

51262

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

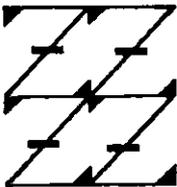
"EVALUACION DE LOS EFECTOS GENOTOXICO Y CITOTOXICO INDUCIDOS EN CULTIVOS DE CELULAS DE SANGRE PERIFERICA EXPUESTOS A TETRAOXIDO DE VANADIO"



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA DE LOS SISTEMAS HUMANOS) PRESENTA: BIOLOGO JUAN JOSE RODRIGUEZ MERCADO

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXIÓN

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

288253

MEXICO

FEBRERO DEL 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis fue realizada en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. En la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción; dentro del Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva. Laboratorio que se encuentra bajo la tutela del Dr. Mario A. Altamirano Lozano. Tesis dirigida por la M. en IBSH. Elia Roldán Reyes.

Durante el desarrollo se contó con el apoyo de la DGPA con el proyecto número IN-214597. PAPIIT IN-214398 y CONACYT 25417-M.

A Alejandra

“CON TODO MI AMOR Y CARIÑO”

Eres admirable, infinitamente gracias.

A Frida

Por darle a mi vida tanta felicidad y armonía,

“TE AMO PEQUEÑA”

A mi madre Dolores

Gracias por enseñarme el mejor camino "TE AMO"

A mis hermanos, a mis sobrinos y a toda mi familia, con cariño.  
Espero que tengamos muchos momentos como este.

A todas las personas que siempre están a mi lado. Gracias por su amistad.

En memoria de quienes ya no están junto a mí.

Mí agradecimiento con especial entusiasmo al **jurado**:

A la **M. en IBSH. Elia Roldán Reyes**, por su asesoría y su constante insistencia sin la cual no hubiera concluido este trabajo.

Al **Dr. Mario A. Altamirano Lozano** por la enseñanza y apoyo que me ha brindado.

Al **Dr. Emilio Rojas del Castillo** y a la **Dra. Rocío Ortiz Muñiz**, por sus valiosos comentarios y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la **M. en C. María del Carmen García Rodríguez**, por sus importantes comentarios y sugerencias a este escrito.

Con especial reconocimiento:

Al **Dr. J. Miguel Betancour Rule**, por los comentarios y sugerencias a este escrito.

A Lucy, Berta, Erendira, Viky, Alejandra, Andrés, Joel, Carlos, ..., por hacer del laboratorio un lugar agradable de trabajo.

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	i
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>VANADIO</b>	
Propiedades Físicas y Químicas .....	3
Origen y usos .....	4
Importancia biológica .....	6
Vanadio como xenobiótico: toxicocinética .....	8
Efectos sobre la reproducción y el desarrollo .....	12
Efectos genotóxicos en bacterias, levaduras e insectos .....	13
Efectos genotóxicos en mamíferos por exposición <i>in vivo</i> .....	14
Efectos genotóxicos en células de mamífero por exposición <i>in vitro</i> .....	15
<b>MARCADORES DE CITOTOXICIDAD Y DE GENOTOXICIDAD</b> .. .....	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>OBJETIVOS</b>	
Objetivo general .....	25
Objetivos particulares .....	25

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Cultivo de linfocitos y tratamientos .....	26
Tratamiento de leucocitos .....	27
Electroforesis unicelular en gel .....	29
Reactivos .....	30
Evaluaciones .....	30
Análisis estadístico .....	32

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
-------------------------	-----------

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
------------------------	-----------

<b>CONCLUSIONES Y COMENTARIOS</b> .....	<b>55</b>
---	-----------

<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>57</b>
--------------------------	-----------

# RESUMEN

Varios estudios sugieren que el vanadio IV es la forma biológicamente activa del vanadio como elemento, sin embargo, los aspectos de su comportamiento toxicológico ha sido menos estudiados en comparación con otros estados de oxidación como el vanadio V. Consecuentemente se conoce poco acerca de la participación de vanadio IV específicamente del tetraóxido de vanadio ( $V_4O_{10}$ ) como inductor de efectos genotóxicos y citotóxicos.

En la presente investigación, se estudio la posibilidad de que el  $V_2O_5$ , sea capaz de inducir aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) y aberraciones cromosómicas numéricas (ACN), asociaciones de satélites (AS), intercambios de cromátidas hermanas (ICH's), cambios en el índice mitótico (IM) e índice de replicación (IR), además, evaluar si es capaz de inducir rompimientos de cadena sencilla (RCS) y sitios sensibles al álcali (SSA) en el ADN (ácido desoxirribonucleico) de células de sangre periférica de humano expuesta, *in vitro* a diferentes concentraciones de este compuesto.

En los resultados se observó, que el  $V_2O_5$  en concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  aplicado en los linfocitos humanos, obtenidos a partir de cultivos de células de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, de muestras pertenecientes a tres donadores (A, B y C), es capaz de incrementar significativamente la frecuencia de ACE en todas las concentraciones probadas, e inducir en ICH's y ACN (heteroploidías) en concentraciones de 4  $\mu\text{g/ml}$  o mayores. También tiende a inhibir el IM y disminuir el IR en dosis altas.

Por otro lado, en muestras de células de sangre completa de dos

donadores (A y C) expuesta durante 2 horas con las diferentes concentraciones de  $V_2O_4$  (2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ ), no se observó daño en el ADN (RCS y SSA) con la prueba de electroforesis unicelular en gel, bajo condiciones alcalinas (EUGa).

La interpretación de los resultados dan información de la capacidad genotóxica y citotóxica de el  $V_2O_4$  y abre la posibilidad de conocer sus efectos y de comprender los mecanismos responsables.

# INTRODUCCIÓN

Los metales pertenecen a una amplia clase de elementos con características propias. Se encuentran en diferentes concentraciones en el medio ambiente y en materiales de origen biológico. La intensa actividad tecnológica, industrial y la quema de combustible fósil requerida para cubrir las necesidades de la sociedad actual ha provocado que muchos de estos elementos y sus compuestos se consideren contaminantes.

Organizaciones internacionales como la Agencia de Protección Ambiental, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, y la Organización Mundial de la Salud, reconocen la importancia de estudiar los efectos de los metales sobre procesos biológicos entre los que se encuentran la división celular, el desarrollo embrionario, el desarrollo fetal, la reproducción y la salud (Friberg y Nordberg, 1986; Sharma y Talukder, 1987; Bolaños, 1990). debido, a que muchos de ellos tienen una alta probabilidad de interactuar con diversas moléculas y en concentraciones elevadas ocasionar cambios irreversibles.

Un metal que ha despertado interés por su posible uso terapéutico en varios padecimientos y por su toxicidad es el vanadio. Diversos grupos han encaminado sus investigaciones para conocer los efectos genotóxicos y citotóxicos que pueda inducir el vanadio en diferentes sistemas de prueba.

El potencial genotóxico y mutagénico del vanadio en el sistema de bacterias no es concluyente, en levaduras induce conversión de genes mitóticos y aneuploidías, en plantas es considerado un veneno mitótico y en

insectos puede actuar como un mutágeno indirecto. En cultivos de células de mamífero no muestra una clara actividad genotóxica y la tendencia de los datos de estudios *in vivo* e *in vitro* indican que el vanadio modifica la cinética de ciclo celular e índice de replicación (IR), disminuye el índice mitótico (IM) e induce micronúcleos, aberraciones cromosómicas numéricas (ACN), rompimientos de cadena sencilla (RCS) en el ADN (ácido desoxirribonucleico) y enlaces cruzados, pero no induce de manera clara intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) ni aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) (Altamirano-Lozano et al., 1998; Léonard y Gerber, 1994; 1998).

La información anterior es resultado de estudios realizados con diferentes compuestos de vanadio principalmente en su estado de oxidación V. Los reportes de los efectos ocasionados por el vanadio IV y en particular el  $V_2O_4$  son limitados, sin embargo, es esencial conocer los efectos genotóxicos y citotóxicos inducidos por el vanadio en cualquiera de sus formas químicas para determinar en que concentración es capaz de inducir daño en la célula y en el material genético con el fin de poder prevenirlo.

# VANADIO

## Propiedades físicas y químicas

El vanadio es un metal pesado de color grisáceo con densidad de 6.11 g/cm<sup>3</sup>. En la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo cinco, tiene como número atómico 23, peso atómico 50.95, punto de fusión 1950°C y punto de ebullición 3600°C. Sus estados de oxidación van de 1- a 5+, y los compuestos en sus formas 3+, 4+ y 5+ (vanadio III, IV y V respectivamente) son los más comunes y e importantes desde el punto de vista biológico.

**Cuadro I. Propiedades físicas y químicas de compuestos de vanadio usados en las industrias**

	Fórmula química	Estado de oxidación	Peso molecular	Densidad	Solubilidad
Pentóxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	V	181.88	3.357	Ligeramente soluble en agua fría o caliente. 8 g/l a 20°C; soluble en anhídrido acético, acetato de etilo y acetona
Metavanadato de amonio	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	V	116.98	2.326	Soluble en agua, 5.2 g/l (15°C), 69.5 g/l (96°C); insoluble en alcohol, éter o NH <sub>4</sub> Cl
Metavanadato de sodio	NaVO <sub>3</sub>	V	121.93	nd	Soluble en agua, 211 g/l (25°C), 388 g/l (75°C)
Ortovanadato de sodio	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	V	183.91	nd	nd
Oxitricloruro de vanadio	VOCl <sub>3</sub>	V	173.30	1.829	Se descompone en solución: soluble en alcohol, éter y ácido acético
Tetraóxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	IV	82.94	4.339	Insoluble en agua; soluble en ácidos o bases
Sulfato de vanadilo	VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	IV	163.00	nd	Soluble en agua fría
Tetracloruro de vanadio	VCl <sub>4</sub>	IV	192.75	nd	Se descompone en solución
Oxidicloruro de vanadio	VOCl <sub>2</sub>	IV	137.85	2.88	Se descompone en agua fría
Trióxido de vanadio	V <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	III	149.88	4.87	Ligeramente soluble en agua fría; soluble en agua caliente, en HNO <sub>3</sub> , en HF y bases

nd= no hay datos

En el Cuadro I, se describen algunas propiedades de los compuestos de vanadio de uso común en diferentes industrias. En general el vanadio se disuelve en agua, en ácidos y puede formar compuestos de vanadio V con bases (vanadatos: sus formas iónicas son:  $\text{HVO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$  o  $\text{VO}_3^-$ ). Sus compuestos organometálicos son poco estables.

Las sales de vanadio III son fuertemente reductoras. las sales de vanadio IV son muy estables y en solución se forma el ion oxovanadio ( $\text{VO}^{2+}$ , conocido como vanadilo), el cual en los fluidos biológicos puede unirse a varias biomoléculas y originar complejos aniónicos, catiónicos y neutros (más información de propiedades físicas y químicas de vanadio en: Baroch, 1983; Lagerkvist et al., 1986; Carson et al., 1987; WHO, 1988; Stern et al., 1993).

## Origen y usos

El vanadio, se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una abundancia de 0.014 a 0.02 %. Forma parte de los materiales de tipo fósil en compuestos conocidos como porfirinas de vanadilo, en condiciones naturales se encuentra en pequeñas cantidades en los organismos vivos en forma vanadio III o vanadio IV. Se puede encontrar en roca bituminosa, sedimentos de roca caliza y en materiales similares de origen marino. Para propósitos industriales, se obtiene de minerales en los que se encuentra en aleación con otros metales. Se conocen 70 minerales de los cuales 40 contienen vanadatos, algunos menos abundantes contienen óxidos de vanadio III o IV (Stokinger, 1981; Baroch, 1983; WHO, 1988; Rehder, 1991).

Los compuestos de vanadio se encuentran en elevadas concentraciones en petróleos crudos y carbón. Los petróleos crudos contienen vanadio en un

rango de 1 a 400 g/ton, pero en cenizas de petróleo se pueden extraer de 600 a 700 g/kg, mientras que en cenizas de carbón arriba de 300 g/kg. Dependiendo del país de origen y el proceso de destilación, productos derivados del petróleo (gasolina, keroseno, diesel y petróleo casero) contiene cantidades menores, 0.05 mg/kg (WHO, 1988).

El vanadio es importante en diferentes industrias. En la industria metalúrgica de todo el vanadio producido de 75 a 85% es usado como aditivo en aleaciones para fabricar varios tipos de aceros, es combinado con; cromo (Cr), níquel (Ni), manganeso (Mn), boro (B), tungsteno (W) y otros elementos en la producción de aceros de alta resistencia.

En las industrias de la química orgánica e inorgánica es usado como catalizador, por ejemplo: las sales de vanadio V en la oxidación de moléculas orgánicas tales como la anilina, el benceno, el tolueno y la producción de ácido sulfúrico, mientras que, los cloruros de vanadio en la elaboración de caucho sintético.

Se utiliza en la preparación de vidrio, de pinturas de uso común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes. También, se utiliza en materiales de super conductividad, es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción de maquinaria aérea y tecnología espacial y, es empleado en menor cantidad en otras industrias (más información de usos industriales de vanadio en: Stokinger, 1981; Baroch, 1983; Carson et al., 1987; Lagerkvist et al., 1986; Alessio et al., 1988; WHO, 1988; Kawai et al., 1989; PISSQ, 1995).

A nivel salud el vanadio ha sido usado como antiséptico. en la

medicina ha adquirido una importancia por sus beneficios terapéuticos en el control de la diabetes tipo I y tipo II, en la medicina deportiva por la mejora en el rendimiento físico de los atletas, por otra parte, en biología de la reproducción se proponen el uso de complejos orgánicos de vanadio IV por sus propiedades anticonceptivas (Heylinger et al., 1985; Khandelwal y Pugazhenthí, 1996; Faweett et al., 1997; D´Cruz et al., 1999).

## Importancia biológica

El vanadio tiene importantes funciones biológicas y es considerado un nutrimento esencial en varias especies de algas, en ciertos mutantes de bacterias fijadoras de nitrógeno, en setas terrestres, en acidias, en pollos y en roedores (Rehder, 1991 y 1992).

En pollos, una dieta deficiente de vanadio reduce el peso y la producción de huevo, retarda el crecimiento de plumas y el desarrollo esquelético, altera la concentración de triglicéridos y de colesterol en plasma (Kubena y Phillips 1983). En ratas, la deficiencia afecta la función de la tiroides, provoca anemia y cambios en el crecimiento de huesos, cartílago y músculo, disminuye el índice de fertilidad y la producción de leche durante la lactancia (Nechay, 1984; French y Jones, 1993).

No obstante, que es un elemento esencial en diferentes organismos los requerimientos en la dieta humana no se han establecido, pero se propone que probablemente son cercanos a 15  $\mu\text{g}/\text{día}$  o de 17.8  $\mu\text{g}/2000\text{kcal}$  (French y Jones, 1993).

En alimentos de consumo cotidiano: semillas de cultivo, frutas,

vegetales, carnes y derivados animales, se han determinado cantidades apreciables de vanadio III y IV, en los cuales hay una diferencia muy marcada en cuanto a la concentración de vanadio en los alimentos en fresco y los productos procesados, que van de 0.1 a 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso húmedo y de 40 a 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso seco, respectivamente (WHO, 1988; French y Jones, 1993; Rojas et al., 1999a).

Se tienen datos de que el vanadio puede encontrarse exclusivamente en los tejidos de mamíferos en su estado de oxidación IV. Experimentalmente se ha demostrado que después de una exposición a vanadio IV o vanadio V, el que circunda en la sangre es la forma IV, pruebas *in vivo* e *in vitro* demuestran que en los fluidos del cuerpo y en el interior de las células respectivamente, el vanadio V es reducido a vanadio IV por distintas biomoléculas como el glutatión, ácido ascórbico, catecolaminas y muchos péptidos (Cantley y Phillips, 1979; Sakurai et al., 1980; Nechay et al., 1986; Sakurai, 1994; Rehder, 1991), por lo que la forma reducida de este metal mantiene un contacto permanente los tejidos, las células y los componentes celulares.

El vanadio IV tienen una fuerte afinidad por las moléculas fosfatadas, las proteínas férricas (transferrina, lactotransferrina y ovotransferrina), el glutatión y varios ligandos carboxilados (como los ácidos glutámico, aspártico, ascórbico y cítrico), a ellos se une para formar complejos y se almacena temporalmente (Nechay et al., 1986; Sakurai et al., 1987; Rehder, 1991 y 1992).

Estudios bioquímicos, muestran que el vanadio II puede ser oxidado a su estado III o IV por la cisteína, las sales de vanadio III son agentes fuertemente reductores que reaccionan lentamente con el agua para liberar de

$H^+$  y producir vanadio IV, pero el oxication vanadilo es muy inestable a pH fisiológico y puede rápidamente oxidarse a vanadio V ( $VO^3$ ) en la ausencia o disminución de agentes reductantes en la sangre o en el citoplasma celular (Nechay et al., 1986; Kalatzi et al., 1988; Crans et al. 1990).

## **Vanadio como xenobiótico: toxicocinética**

Las industrias manufactureras de aceros y aleaciones son las que más vanadio descargan en el ambiente y se han encontrado concentraciones altas de este elemento en las plantas y los suelos cercanos a zonas industriales. pero en general, la concentración ambiental depende de la posición geográfica. el grado de urbanización y la estación del año (Lagerkvist et al., 1986; WHO, 1988).

Se estima que cerca de 280 toneladas de vanadio son emitidas anualmente al ambiente. de las cuales 70 toneladas son de origen natural (cenizas y polvos ) y 210 toneladas descargadas por la actividad humana; 100 toneladas emitidas por la industria y 110 por la quema de combustible fósil (petróleo, carbón y aceites) (Leónard y Gerber, 1994).

En la atmósfera la concentración de vanadio oscila entre 30 y 450  $ng/m^3$ , de lugares rurales a grandes urbes. Estudios en diferentes suelos, muestran que las concentraciones varían de 5 a 140  $mg/kg$  y en suelos contaminados con cenizas superan los 400  $mg/kg$ . En agua para beber, se reportan valores promedio de 4.3  $\mu g/l$  con un mínimo de 0.05  $\mu g/l$  y un máximo de 10  $\mu g/l$  (Phillips et al., 1983; Lagerkvist et al., 1986; WHO, 1988).

La exposición a vanadio puede darse por la dieta y el contacto con lugares contaminados. Las formas en que se encuentra en el ambiente son principalmente los óxidos, por lo que la exposición humana no solo se limita a los trabajadores de las industrias, sino que hay un riesgo para toda la población.

La exposición ocupacional a vanadio en industrias productoras y usuarias es variable, los límites se miden y expresan en términos de  $V_2O_5$ . La mayoría de los países en los que puede incluirse México tienen límites de exposición laboral a humos y polvos de 0.05 a 0.5  $mg/m^3$  (PISSQ, 1995).

La exposición aguda en personas voluntarias a polvos o humos de vanadio (0.2 a 1  $mg/m^3$ ) indujo síntomas como tos, irritación en nariz y mucosa oral, mientras una fuerte exposición aguda causó irritación sensorial, fiebre, conjuntivitis, aumento del movimiento intestinal, dermatitis, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal (WHO, 1988).

La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales, induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos cambios en el ritmo cardíaco y en trabajadores fumadores la aparición de un color verdoso en la lengua. También se han reportado alteraciones bioquímicas en sangre como la disminución de grupos sulfhidrilo, cambios en la concentración de albúmina y colesterol (WHO, 1988; Kawai et al., 1989).

En estudios de los efectos de diversos metales dispersos en el aire sobre la población urbana, se encontraron ligeras correlaciones entre los niveles de vanadio y la mortalidad producida por ciertos cánceres, neumonía y bronconeumonía, de la misma manera, se encontró una correlación entre los

niveles de vanadio en partículas aéreas y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (WHO, 1988).

De lo anterior, se observa que la exposición a vanadio puede ocurrir de manera biológica, ambiental, industrial y ocupacional, siendo la inhalación la principal vía de contacto seguida de la vía oral. Se propone que el contacto por inhalación es más tóxico que cuando es por ingestión y mucho más tóxico si es administrado por vía parenteral (WHO, 1988; Altamirano-Lozano et al., 1996; Domingo, 1996).

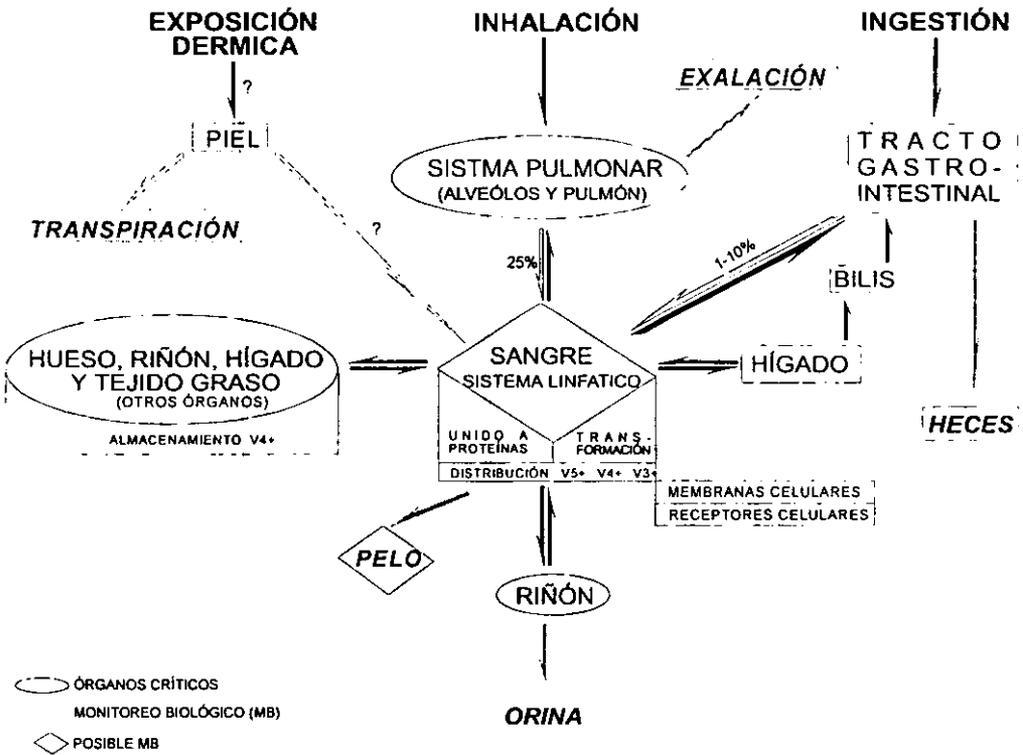
En la Figura I, se muestra la cinética del vanadio, se puede apreciar que la principal vía de entrada es a través del tracto respiratorio, se estima que cerca de 25% del vanadio inhalado es absorbido y transportado al torrente sanguíneo y sistema linfático. La ingestión que es aproximadamente de 70  $\mu\text{g}/\text{día}$ , contribuye en menor grado a la absorción ya que sólo de 1 a 10% que pasa a través del tracto gastrointestinal es retenido y el restante es eliminado en las heces. Los datos que evalúen la exposición a vanadio vía piel son escasos, pero se piensa que la cantidad absorbida es mínima (Elinder et al., 1988; WHO, 1988; French y Jones, 1993; Rojas et al., 1999a).

El vanadio en sangre se transfiere rápidamente a los sitios de almacenamiento, el resto es eliminado a través de la bilis y excretado en las heces, pero la principal vía de excreción es la orina, aunque también puede detectarse en queratina y pelo (Bogden et al., 1982; Sharma et al., 1987; Elinder et al., 1988; WHO, 1988; French y Jones, 1993).

En el plasma sanguíneo, el vanadio es transportado unido a la transferrina y en menor proporción a la albúmina. mientras que, en células rojas se une a la hemoglobina (Elinder et al., 1988; French y Jones, 1993).

Después de su absorción y distribución el contacto con la mayoría de los órganos y tejidos del cuerpo es casi permanente.

**Figura I. Toxicocinética del Vanadio**



Modificado de Elinder et al., 1988

El almacenamiento y acumulación de vanadio da como resultado elevadas concentraciones en hígado, riñón y hueso, cantidades menores se acumulan en bazo, corazón, tiroides, cerebro, testículo, músculo esquelético, pulmón, médula ósea y tejido graso, donde el hueso, músculo y pulmón son los sitios en los que se deposita en elevadas cantidades por tiempo indefinido

(Sharma et al., 1987; Alessio et al., 1988; Elinder et al., 1988; Domingo et al., 1991; French y Jones 1993).

## Efecto sobre la reproducción y el desarrollo

La toxicidad del vanadio en animales de experimentación depende de las propiedades físicas y químicas de sus compuestos y la manera en que es administrado. Su forma catiónica como aniónica son peligrosas y se considera que su toxicidad en mamíferos se incrementa conforme a su valencia y estado de oxidación ( $V > IV > III > II$ , sus representaciones iónicas son:  $VO_3^- > VO^{2+} > VO^+ > VO$ ) (Lagerkvist et al., 1986; Carson et al., 1987; WHO, 1988; Domingo, 1996).

Se ha propuesto que la toxicidad sobre la reproducción, el desarrollo embrionario y el desarrollo fetal depende de los niveles de vanadio circundantes en el cuerpo. Los datos que sustentan esta conclusión están basados en diversos estudios revisados por Domingo en 1996, donde además se observó que los efectos dañinos son menores cuando se administra vanadio IV ( $VOSO_4$ ) en comparación a la administración de vanadio V ( $NaVO_3$ ,  $V_2O_5$  y  $NH_4VO_3$ ).

El vanadio induce alteraciones en el sistema reproductor de ratones machos. La administración de vanadio IV como  $V_2O_4$ , puede ocasionar reducción en el número de espermatozoides y en dosis altas reduce la movilidad, la viabilidad e induce alteraciones citológicas en túbulos seminíferos (Aragón, 1998). Por su parte el vanadio V reduce la movilidad, la viabilidad y el número de espermatozoides, incrementa la producción de espermatozoides con formas anormales; así como reduce el peso de

epidídimos, de testículos y del organismo completo (Domingo, 1996; Altamirano-Lozano et al., 1996).

El vanadio IV puede atravesar la barrera placentaria y llegar al feto, pero no hay reportes de sus efectos teratógenos, no obstante, la administración de vanadio V durante la preñez en hembras de ratón, rata y hámster, induce muerte embrionaria. reduce el peso de los fetos e incrementa la aparición de defectos esqueléticos y la incidencia de paladar hendido (Domingo, 1996).

## **Efecto genotóxico en bacterias, levaduras, plantas e insectos**

No se ha observado un patrón concluyente del efecto mutagénico en bacterias. En cepas de *Bacillus subtilis* (Rec+ y Rec-), *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* compuestos de vanadio IV y V ( $\text{VOCl}_2$  y  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ,  $\text{V}_2\text{O}_5$ ), en concentraciones de 0.3 a 0.5 M, muestra en algunos casos una ligera actividad mutagénica y en otros el efecto no se aprecia (Kanematsu et al., 1980; Kanematsu y Kada, 1978; Kada et al., 1980; WHO, 1988).

En levadura, en la cepa diploide D7 de *Saccharomyces cerevisiae*. el  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 7.5 y 110 mM induce conversión del gen mitótico y de mutaciones puntuales reversas, mientras que el  $\text{VOSO}_4$  de 160 a 420 mM no muestra actividad mutagénica cuando la cepa se encuentra en fase estacionaria con o sin la adición de la fracción hepática S9, pero cuando las células se encuentran en crecimiento se incrementan las células con mutaciones, mientras, que en la cepa diploide D61M ambos estados de oxidación en concentraciones de 4 a 10 mM incrementan la frecuencia de células aneuploides (Bronzetti et al., 1990; Galli et al., 1991).

En plantas, en polen maduro de *Petunia hybrida* W166K, el vanadio II en forma de cloruro induce infidelidad en la síntesis de ADN (Jackson y Linskens, 1982), y en células de *Allium cepa* el  $V_2O_5$  en dosis altas inducen picnosis, pérdida de material cromatídico y en dosis bajas actúan como veneno del huso mitótico (Singh, 1979) y el  $Na_3VO_4$  en concentraciones de 0.01 a 10 mM induce células binucleadas y dosis mayores a 10 mM ocasiona citotoxicidad (Navas et al., 1986).

En alas de *Drosophila melanogaster*, la prueba de mutación y recombinación somática, dio positiva al tratar larvas heterocigas  $^{+}flr_3/mwh^{+}$  con sales de vanadio ( $V_2O_5$ ,  $V_2O_4$  y  $VCl_3$ ) en diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento, por lo que, se propone que el vanadio puede actuar como un mutágeno indirecto y el  $V_2O_4$  en concentraciones bajas (6.5 a 8.5 ppm en la cepa  $Ser/mwh^{+}$ ) puede inducir recombinación mitótica (Abundis, 1994 y 1996).

## **Efecto genotóxico en mamíferos por exposición *in vivo***

La información que existe en la literatura concerniente a la actividad genotóxica y mutagénica en sistemas con mamíferos *in vivo* expuestos a vanadio es escasa y los resultados no son concluyentes.

La inyección subcutánea en ratones macho de 0.2, 1.0 y 4.0 mg/kg de  $V_2O_5$  dio resultados negativos con la prueba de letales dominantes (Sun, 1987), pero su administración intraperitoneal de 8.5 mg/kg/ durante 60 días disminuye el número de hembras preñadas e incrementa la frecuencia de fetos muertos y reabsorbidos (Altamirano-Lozano et al., 1996).

En células de médula ósea de ratas el  $V_2O_5$  administrado en su dieta en dosis de 4 mg/kg durante 21 días no induce ACE pero sí disminuye el IM (Giri et al., 1979) y en ratones macho CD-1 una dosis intraperitoneal de 5.75, 11.5 y 23 mg/kg, no modificó la cinética de ciclo celular, la frecuencia de ICH's o de ACE, sólo reduce del IM en dosis altas (Altamirano-Lozano et al., 1993; Altamirano-Lozano y Alvarez-Barrera, 1996). Sin embargo, el análisis mediante electroforesis unicelular en gel en condiciones alcalinas (EUGa) de células de diferentes órganos de ratones CD-1 en las dosis anteriores indica que el vanadio induce RCS (Altamirano-Lozano et al. 1996; 1999).

En ratones CD-1, la administración por entubación intragástrica de una sola dosis de  $VOSO_4$ ,  $Na_3VO_4$  o  $NH_4VO_3$  en dosis de 100, 75 y 50 mg/kg respectivamente, incrementa la frecuencia de micronúcleos y de aneuploidías en células médula ósea, y sólo el  $VOSO_4$  induce ACE (Ciranni et al., 1995). En otros estudios, con ratones 615 y kunming albino, la administración intraperitoneal, la inyección subcutánea y la inhalación de polvos de  $V_2O_5$  en diferentes dosis también incrementa la frecuencia de micronúcleos, pero muestran resultados negativos cuando el compuesto es administrado vía oral (Sun, 1987).

## **Efecto genotóxico en células de mamíferos por exposición *in vitro***

En cultivos, de fibroblastos de humano, de líneas celulares de ratón y en células de fetos de rata el  $VOSO_4$  o el  $Na_3VO_4$  estimulan la incorporación de timidina tritiada en del ADN en concentraciones entre de 10 a 40  $\mu M$ , efecto que va acompañado con un incremento en el número de células en división y que se inhibe en concentraciones mayores a 40  $\mu M$  (Carpenter, 1981; Smith, 1983; Canalis, 1985). En el sistema de cultivos de linfocitos

humanos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, el  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  actúa como un co-mitógeno ya que incrementa la incorporación de timidina con un máximo en la concentración 20  $\mu\text{M}$  y un efecto inhibitorio en 40  $\mu\text{M}$  (Marini et al., 1987). Por otro lado, cultivos de macrófagos obtenidos de alvéolos de pulmón de conejo y tratados 20 horas con óxidos de vanadio II, III y V ( $\text{VO}_2$ ,  $\text{V}_2\text{O}_3$  y  $\text{V}_2\text{O}_5$ ) en 13.01, 21.35 y 32.75  $\mu\text{g/ml}$  la viabilidad celular disminuye hasta en un 50% (Waters et al., 1974).

En cultivos de células PTK1 de rata, el vanadio V en concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , inhibe el movimiento de los cromosomas hacia los polos y la elongación de huso mitótico, efecto que se revierte con la adición de adenosintrifosfatasas (ATPasas) en el medio de cultivo (Cande y Wolniak, 1978).

Por su parte Sabbioni et al. (1991) al determinar la citotoxicidad, la distribución intracelular y la transformación morfológica en la línea celular BAL/3T3 de embriones de ratón expuestas a  $\text{VOSO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  y  $\text{NaVO}_3$ , encontraron que los compuestos disminuyen la formación de colonias cuando se aplican de  $3 \times 10^{-7}$  a  $5 \times 10^{-5}$  M, con una diferencia en la citotoxicidad dependiente del estado de oxidación. La retención en las primeras horas de exposición se efectuó de forma dependiente quedando asociado al citosol y en cultivos de 48 a 72 horas el vanadio se redistribuye a los organelos celulares, y en los experimentos de transformación morfológica sólo el vanadio en estado de oxidación V dio positivo.

En células de la línea V79 el  $\text{VOSO}_4$  o el  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ , en concentraciones de 0.5 a 7.5 mM no inducen mutaciones puntuales, pero ambos son tóxicos con una diferencia en la citotoxicidad dependiente del estado de oxidación, efecto que se aminora en presencia de la fracción S9 (Galli et al., 1991).

Experimentos aparte, el  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en concentraciones no citotóxicas de 5 a 25  $\mu\text{M}$  incrementó la frecuencia de mutaciones puntuales en las células V79 expuestas 24 horas en un medio libre de suero, efecto que no se observó cuando las células expuestas se cultivan en un medio de sales-glucosa, mientras en células de ovario de hámster Chino y de la línea leucémica de linfocitos T humanos (MOLT4), en 200  $\mu\text{M}$  y 1 mM el vanadio induce la formación de enlaces cruzados ADN-proteínas (Cohen et al., 1992).

Algunos efectos genotóxicos por vanadio IV y otras sales (III y V) se han reportado en cultivos de células de ovario de hámster Chino. El  $\text{VOSO}_4$  y las otras sales en concentraciones de 4 a 24  $\mu\text{g/ml}$  incrementan la frecuencia de ACE y en tratamientos de 0.1 a 6  $\mu\text{g/ml}$  los ICH's, con o sin la adición de la fracción S9 (Owusu Yaw et al., 1990), mientras, en células V79 de hámster Chino el vanadio V como  $\text{V}_2\text{O}_5$  en las concentraciones de 1 a 4  $\mu\text{g/ml}$  no induce mutaciones puntuales ni ICH's, pero sí incrementa la frecuencia de micronúcleos con señal de cinetocoro y disminuye la viabilidad e IR (Zhong et al., 1994).

En cultivos de linfocitos humanos, tratados con  $\text{V}_2\text{O}_5$  en 2, 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ , el IM disminuye, la frecuencia de poliploidías y de asociaciones de satélites (AS) se incrementa, y la duración del ciclo celular se modifica, pero no la frecuencia de ACE o ICH's (Roldán y Altamirano, 1990), pero, el mismo compuesto en combinación con cafeína aplicado en diferentes tiempos disminuye el IM e IR y es capaz de inducir ICH's cuando la cafeína es aplicada en fase  $\text{G}_2$  (Roldán et al., 1997). Sin embargo, en el sistema de linfocitos el tetrafluoruro de vanadio ( $\text{VF}_4$ ) y el tricloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ) aplicado de 2 a 16  $\mu\text{g/ml}$ , los ICH's tienden a incrementar en una frecuencia baja, el IM disminuye y la duración del ciclo celular se alarga (Rodríguez, 1995).

Usando la prueba de ADN  $\alpha$ -satélite del cromosoma 1 y 7 mediante la hibridación fluorescente *in situ* en linfocitos humanos el  $V_2O_5$  en concentraciones de 0.001, 0.01 y 0.1  $\mu M$  incrementa la frecuencia de hiperploidías y en células tratadas con anticuerpos anti- $\beta$ -tubulina este metal puede interrumpir la formación del huso mitótico (Ramírez et al., 1997).

En el mismo sistema de linfocitos, el  $VOSO_4$  y otras sales de vanadio ( $NH_4VO_3$ ,  $NaVO_3$  o  $Na_3VO_4$ ) en tratamientos de 2.5 a 80  $\mu M$  es capaz de inducir la formación de micronúcleos cuando se usan las pruebas para centrómeros, para el cromosoma X y la sonda  $\beta$ -satélite específica para cromosomas acrocéntricos, también incrementa la frecuencia de AS, de hipoploidías y de ICH's. pero no ACE (Migliore et al., 1993; 1995; 1999).

Por otro lado, en leucocitos humanos, la EUGa reveló que el  $V_2O_5$  en concentraciones de 0.3, 30 y 3000  $\mu M$  induce RCS y sitios sensibles al álcali (SSA) en el ADN, y en cultivos de linfocitos el daño se induce sólo en concentraciones altas (Rojas et al., 1996a y 1996b).

# MARCADORES DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD

La actividad de los organismos puede ser evaluada de manera cualitativa o cuantitativa por diversos parámetros los cuales permiten determinar eventos relacionados con su funcionamiento. Estos marcadores biológicos pueden detectar cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos o alteraciones en los componentes del cuerpo así como el grado de cambio y/o de la alteración entre individuos u poblaciones, que se traducen en efectos tóxicos y daño sobre la salud (NRC, 1992; IPCS, 2000).

Específicamente, los marcadores biológicos se clasifican en tres grupos: de exposición, de efecto y de susceptibilidad. Los primeros comprenden la detección de un xenobiótico en fluidos y tejidos de algún organismo. Los segundos involucran cambios cualitativos o cuantitativos en los organismos como alteraciones bioquímicas, genéticas, celulares, fisiológicas o de otro tipo que, dependiendo de su magnitud pueden ser consideradas como daño potencial sobre la salud. Los terceros indican sensibilidad heredada o adquirida de un organismo para responder al reto de la exposición a un xenobiótico en particular (NRC, 1992; IPCS, 2000).

Muchos xenobióticos considerados mutágenos y carcinógenos tienen la propiedad de modificar el proceso de división celular. Dos marcadores biológicos y citogenéticos que permiten determinar muerte celular y alteraciones en la progresión del ciclo celular son el IM e IR.

La disminución en el IM es generalmente, consecuencia de una

reducción en el promedio de células en división (retraso en la mitosis), pero también, puede ser debida a la pérdida permanente de la capacidad de proliferar que finalmente conduce a la muerte celular (Scott et al., 1991; Kirkland y Müller, 2000).

El IR que se calcula a partir de la cinética de ciclo celular, puede evaluarse mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas que se basa por la incorporación de un análogo de timina (BrdU) en el ADN durante la fase de síntesis del ciclo celular. El IR es un parámetro usado para determinar la actividad citostática de drogas, hormonas, agentes ambientales o de diferentes patologías genéticas (Ivett y Tice, 1982; Rojas et al., 1992; Montero et al., 1993; Palma et al., 1993).

La técnica de tinción diferencial para detectar los ICH's, el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) y, la EUGa, son buenos métodos citogenéticos para evaluar efectos mutagénicos, clastógenos y de daño al ADN, por lo que se consideran excelentes marcadores biológicos de genotoxicidad.

Los ICH's se observan mediante tinción diferencial en células de segundo ciclo de división y son una manifestación citológica de rompimiento y reunión en sitios homólogos entre las cromátidas de un mismo cromosoma, el rompimiento involucra a las cuatro hebras del ADN y es necesario que estos eventos ocurran simultáneamente. Para su formación se requiere que el ADN no presente entrecruzamientos y su replicación sea semiconservativa (Latt et al., 1981; Tucker et al., 1993; IPSC, 2000).

Las AC pueden observarse en cultivos celulares previamente expuestos a compuestos mutagénicos o agentes genotóxicos. En células en primera

división pueden detectarse ACE como cambios en la estructura cromosómica; rompimientos o intercambios de material cromosómico, estos pueden ser de tipo cromatídico o cromosómico que conducen a una translocación u otro rearrreglo o pérdida de la parte del material cromosómico en cuestión, aunque también pueden detectarse brechas y lesiones acromáticas. En células que pasan por una segunda o subsecuentes mitosis pueden detectarse cambios en el número cromosómico, pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas o juegos completos del complemento cromosómico; aneuploidías, poliploidías y endorreduplicaciones (Brusick, 1987; Moore y Bender 1993; IPCS, 2000).

La EUGa consiste en medir el daño al ADN inducido por xenobióticos en células aisladas de algún tejido, el ADN dañado se desplaza hacia el ánodo bajo la corriente de un campo eléctrico tomando la forma de un "cometa". Puede aplicarse en poblaciones celulares que se encuentren en  $G_0$  o en proliferación. El daño es detectado por RCS y lesiones capaces de transformarse en RCS a pH alcalino y bajo ciertas condiciones experimentales puede detectar la reparación de las lesiones (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990; Rojas et al., 1999b; Tice et al., 2000; IPCS, 2000).

El análisis de AS es un método alternativo para detectar posibles alteraciones cromosómicas. Durante la profase tardía el nucléolo desaparece pero los cromosomas que participan en la organización del nucléolo permanecen asociados y en mitosis pueden observarse en una posición específica con sus satélites orientados hacia una misma dirección, uno con respecto a otro; dependiendo de la posición y la distancia entre dos o más cromosomas acrocéntricos involucrados puede determinarse el tipo de asociación que se forma (Ferguson-Smith y Handmaker, 1961; Zang y Back, 1968; Verma et al., 1983). La importancia de analizar las AS radica en que varios mutágenos químicos que causan sus efectos de manera directa o

reducción en el promedio de células en división (retraso en la mitosis), pero también, puede ser debida a la pérdida permanente de la capacidad de proliferar que finalmente conduce a la muerte celular (Scott et al., 1991; Kirkland y Müller, 2000).

El IR que se calcula a partir de la cinética de ciclo celular, puede evaluarse mediante la tinción diferencial de cromátidas hermanas que se basa por la incorporación de un análogo de timina (BrdU) en el ADN durante la fase de síntesis del ciclo celular. El IR es un parámetro usado para determinar la actividad citostática de drogas, hormonas, agentes ambientales o de diferentes patologías genéticas (Ivett y Tice, 1982; Rojas et al., 1992; Montero et al., 1993; Palma et al., 1993).

La técnica de tinción diferencial para detectar los ICH's, el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) y, la EUGa, son buenos métodos citogenéticos para evaluar efectos mutagénicos, clastógenos y de daño al ADN, por lo que se consideran excelentes marcadores biológicos de genotoxicidad.

Los ICH's se observan mediante tinción diferencial en células de segundo ciclo de división y son una manifestación citológica de rompimiento y reunión en sitios homólogos entre las cromátidas de un mismo cromosoma. el rompimiento involucra a las cuatro hebras del ADN y es necesario que estos eventos ocurran simultáneamente. Para su formación se requiere que el ADN no presente entrecruzamientos y su replicación sea semiconservativa (Latt et al., 1981; Tucker et al., 1993; IPSC, 2000).

Las AC pueden observarse en cultivos celulares previamente expuestos a compuestos mutagénicos o agentes genotóxicos. En células en primera

división pueden detectarse ACE como cambios en la estructura cromosómica; rompimientos o intercambios de material cromosómico, estos pueden ser de tipo cromatídico o cromosómico que conducen a una translocación u otro rearreglo o pérdida de la parte del material cromosómico en cuestión, aunque también pueden detectarse brechas y lesiones acromáticas. En células que pasan por una segunda o subsecuentes mitosis pueden detectarse cambios en el número cromosómico, pérdida o ganancia de uno o varios cromosomas o juegos completos del complemento cromosómico; aneuploidías, poliploidías y endorreduplicaciones (Brusick, 1987; Moore y Bender 1993; IPCS, 2000).

La EUGa consiste en medir el daño al ADN inducido por xenobióticos en células aisladas de algún tejido, el ADN dañado se desplaza hacia el ánodo bajo la corriente de un campo eléctrico tomando la forma de un "cometa". Puede aplicarse en poblaciones celulares que se encuentren en  $G_0$  o en proliferación. El daño es detectado por RCS y lesiones capaces de transformarse en RCS a pH alcalino y bajo ciertas condiciones experimentales puede detectar la reparación de las lesiones (Singh et al., 1988; Tice et al., 1990; Rojas et al., 1999b; Tice et al., 2000; IPCS, 2000).

El análisis de AS es un método alternativo para detectar posibles alteraciones cromosómicas. Durante la profase tardía el nucléolo desaparece pero los cromosomas que participan en la organización del nucléolo permanecen asociados y en mitosis pueden observarse en una posición específica con sus satélites orientados hacia una misma dirección, uno con respecto a otro; dependiendo de la posición y la distancia entre dos o más cromosomas acrocéntricos involucrados puede determinarse el tipo de asociación que se forma (Ferguson-Smith y Handmaker, 1961; Zang y Back, 1968; Verma et al., 1983). La importancia de analizar las AS radica en que varios mutágenos químicos que causan sus efectos de manera directa o

indirecta sobre el ADN, son capaces de modificar la frecuencia basal de AS (Kirsch-Volders et al., 1978; Roldán y Altamirano, 1990; Yadav y Seth, 1998).

# JUSTIFICACIÓN

El vanadio representa una fuente de riesgo por exposición industrial, laboral, biológica y ambiental. es liberado en forma de óxidos principalmente en forma IV y V. La toxicidad en mamíferos incrementa conforme a su valencia, sin embargo, se ha observado que después de una exposición se detecta en diferentes tejidos del cuerpo vanadio IV. El vanadio V es reducido a vanadio IV por diversas biomoléculas, de tal manera que el estado reducido es el que mantiene un contacto casi permanente con las células y los componentes celulares, y es la forma que menos se conocen sus efectos.

La toxicidad que produce el vanadio se encuentran bien documenta y ha permitido clasificarlo como un metal potencialmente peligroso. En los últimos años se han realizado revisiones de la genética toxicológica de las sales de vanadio y los datos que refieren los efectos genotóxico y citotóxico del vanadio con estado de oxidación IV son limitados. Por tal razón, la finalidad del presente trabajo fue estudiar la capacidad del  $V_2O_4$  como inductor de daño en el ADN y sobre el proceso de división celular, para determinar si los efectos del vanadio IV son o no similares a los descritos en otros reportes, utilizando para ello cultivos de células de sangre periférica de humano expuestas a diferentes concentraciones de este compuesto.

# HIPÓTESIS

La genotoxicidad inducida por vanadio en diferentes sistemas de prueba muestran resultados variables, pero reflejan actividad mutagénica y muerte celular. Los datos del daño genético y celular para el vanadio IV son limitados, sin embargo, es importante conocer los efectos que puedan inducir los compuestos metálicos en sus diferentes formas químicas ya que frecuentemente cada una de ellas esta asociada a cambios que afectan significativamente la intensidad de un efecto. Por lo tanto, si se aplica  $V_2O_4$  en células de sangre periférica de humano, este compuesto será capaz de inducir daño al ADN y modificar el proceso de la división celular.

# OBJETIVOS

## Objetivo general

Evaluar la capacidad del  $V_2O_4$  para inducir alteraciones en el ADN y en el proceso de división celular, en cultivos de linfocitos y en leucocitos de sangre periférica de humano respectivamente, expuestos a diferentes concentraciones de este compuesto.

## Objetivos particulares

Evaluar las frecuencias de AC, de AS y de ICH's de los cultivos de linfocitos obtenidos por estimulación de células de sangre periférica de humano expuestos a  $V_2O_4$ .

Evaluar el IM y el IR de los cultivos de linfocitos obtenidos por la estimulación de células de sangre periférica de humano expuestos a  $V_2O_4$ .

Evaluar los RCS en el ADN en leucocitos de humano expuestos a  $V_2O_4$ .

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Cultivos de linfocitos y tratamientos

A partir de tres donadores hombres clínicamente sanos, no fumadores de 23, 25 y 29 años edad, se obtuvo sangre periférica con una jeringa heparinizada. Se hicieron cultivos, en tubos cónicos de polipropileno (de 15 ml. Nunc, Inc.) con 0.5 ml de sangre en 4.5 ml de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina y carbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) previamente activado con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fitohemaglutinina M.

Se hicieron cultivos de 48 y 72 horas y se incubaron a 37°C en la oscuridad. El análisis de AC y AS se evaluó en los cultivos de 48 horas, en los de 72 horas se evaluaron los ICH's, el IR y en ambos tiempos de cultivo se evaluó el IM. Para obtener la tinción diferencial de cromátidas hermanas previamente (a las 24 horas de iniciada la siembra) a los cultivos de 72 horas se les adicionaron 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).

Una hora antes de concluir el tiempo de incubación, a todos los cultivos se les agrego 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de colchicina. Al finalizar la incubación los cultivos se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, los paquetes celulares se sometieron a un choque hipotónico por 15 minutos a 37°C con 5 ml de una solución de cloruro de potasio 0.075M. Posteriormente se centrifugaron y el paquete celular se fijó con una mezcla de metanol y ácido acético (en una proporción 3:1), preparado en el momento, realizando tres cambios con esta solución dejando reposar en cada uno 15, 10 y 5 minutos respectivamente. Después, se hicieron las preparaciones evitando que una

gota cayera en el mismo sitio más de una vez, se flamearon y el secado se completó a temperatura ambiente.

Las preparaciones destinadas para evaluar las AC y las AS, fueron teñidas durante 5 minutos con una solución de Giemsa al 5%. Las preparaciones destinadas para la tinción diferencial de cromátidas hermanas, se colocaron en un medio acuoso y se irradiaron por 20 minutos con una lámpara de luz ultra violeta situada a una distancia de 15 centímetros de altura. Al terminar éste tiempo se pasaron a un baño con solución de salina citrato (2xSSC) a 60°C, en donde reposaron 20 minutos. Por último se enjuagaron al chorro de agua y se tiñeron durante 5 minutos con una solución de Giemsa al 5%, el exceso de colorante se eliminó al chorro de agua y el secado se completo a temperatura ambiente (Altamirano, 1987).

Los tratamientos se efectuaron a las 24 horas de iniciada la siembra. El tetraóxido de vanadio  $V_2O_4$ , se preparó en agua destilada y se adicionó en concentraciones de 0, 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  de cultivo. Las concentraciones se determinaron mediante ensayos preliminares y los tratamientos se distribuyeron de acuerdo al Cuadro II.

En todos los casos los cultivos se hicieron por duplicado por donador y por concentración empleada. Se hicieron cuatro preparaciones por cultivo, ocho por concentración.

## **Tratamiento de leucocitos**

A partir de una muestra de sangre completa, obtenida con una jeringa heparinizada, se colocaron 50  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorf que contenían 1 ml de

medio RPMI-1640 a 37°C y las concentraciones de V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0, 2, 4, 8 y 16 µg/ml). Después de 2 horas de tratamiento, las células fueron colectadas por centrifugación (4000 rpm durante 3 minutos), se tomaron 10 µl los cuales fueron suspendidos en 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (al 0.5% a 37°C). El paquete celular restante se destino para evaluar la viabilidad. Los experimentos se hicieron uno con su duplicado, por donador por concentración y se distribuyeron conforme al Cuadro II.

**Cuadro II. Distribución de los tratamientos con 0, 2, 4, 8 y 16 µg/ml de V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en células de sangre periférica de humano**

Donador	Tiempo de incubación	Parámetros a evaluar	Tiempo de tratamiento
A	Linfocitos 48 y 72 horas	AC, AS, ICH's, IR e IM	24 y 48 horas respectivamente
	Leucocitos 2 horas	RCS y viabilidad	2 horas
B	Linfocitos 48 y 72 horas	AC, AS, ICH's, IR e IM	24 y 48 horas respectivamente
	Linfocitos 48 y 72 horas	AC, AS, ICH's, IR e IM	24 y 48 horas respectivamente
C	Linfocitos 48 y 72 horas	AC, AS, ICH's, IR e IM	24 y 48 horas respectivamente
	Leucocitos 2 horas	RCS y viabilidad	2 horas

AC = aberraciones cromosómicas; AS = asociaciones de satélites; IR = índice de replicación  
 IM = índice mitótico; ICH's = intercambios de cromátidas hermanas; RCS = rompimientos de cadena sencilla

La viabilidad de los cultivos de leucocitos tratados con el V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> fue evaluada conforme a Strauss (1991) con la siguiente modificación. Se colocaron los paquetes celulares (40 µl aproximadamente) en un tubo para microcentrifuga y se adicionó 10 µl de una solución de trabajo 1:1 preparada a partir de una mezcla de una solución 0.025 µg/ml de bromuro de etidio y de una solución 0.125 µg/ml de diacetato 5-6 carboxifluoroceina. Después de 5 minutos, la fracción celular fue lavada dos veces con 1 ml de medio RPMI-1640, posteriormente se realizaron las preparaciones y se analizaron al

microscopio de fluorescencia.

## **Electroforesis unicelular en gel**

La técnica para evaluar el daño ADN en células individuales, en condiciones alcalinas ha sido descrita previamente por Singh et al (1988; 1990) y Tice et al (1990).

Laminas esmeriladas previamente cubiertas con agarosa regular (110  $\mu$ l al 0.5%) fueron cubiertas con una segunda capa, la cual contenía la mezcla de 10  $\mu$ l de la suspensión celular con los 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión a 37°C, una tercera capa cubrió las preparaciones con 75  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% a 37°C) y se mantuvieron en frío hasta que solidificaran la segunda y tercera capa respectivamente. En cada paso fue colocado un cubre objetos para obtener una película homogénea, removiendo los cubre objetos al solidificar cada capa.

Las láminas se colocaron en una solución de lisis preparada en el momento (NaCl 2.5 M, Na<sub>2</sub>-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10 y sarcocinato de sodio al 1%) con tritón X-100 al 1% y dimetil sulfoxido al 10%, por no menos de una hora a 4°C. Después se drenaron y se colocaron en una caja horizontal de electroforesis, donde el ADN se dejó desenrollar por 20 minutos en una solución amortiguadora (NaOH 300 mM y Na<sub>2</sub>-EDTA 1 mM), el nivel de la solución se encontraba 0.25 cm por arriba de los minigeles. La electroforesis, fue llevada por 20 minutos a 25 volts y 300 miliampers. La metodología de electroforesis fue conducida en la oscuridad y siempre se contó con un testigo positivo tratado 30 minutos con 200  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno.

Finalmente, las preparaciones se colocaron en una solución de Tris (0.4M a pH 7.5) para neutralizar las condiciones alcalinas, realizando tres cambios de 5 minutos cada uno con esta solución. Por último las laminas se deshidrataron 5 minutos en etanol frío al 100% y se dejaron secar al aire. Se hicieron dos experimentos por donador por concentración y cuatro laminas de cada experimento, ocho por concentración. En el momento de la evaluación, las laminas fueron teñidas con 75  $\mu$ l de bromuro de etidio (de una solución de 20  $\mu$ g/ml).

## Reactivos

Todos los reactivos usados fueron de Sigma, St Louis MO, USA; excepto: heparina de Elkins Sinn, Inc. NJ USA;  $V_2O_4$  99.9% de pureza de Aldrich Chem. Co. Inc. USA; ácido acético ( $CH_3-COO$ ) de JT Baker NJ USA; cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), citrato de sodio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), metanol absoluto ( $CH_3-OH$ ) y etanol absoluto ( $CH_3-CH_2-OH$ ) de JT Baker de México, SA de CV, y Giemsa de Sigma de México, SA de CV.

## Evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron en las preparaciones que previamente fueron codificadas para su análisis. Para determinar el IM se cuantificaron 1000 células por lamina, distinguiendo las células en división de las células en interfase, donde:

$$IM = (\text{número de células en división} / \text{número total de células}) \times 100$$

Para calcular el IR se evaluó la cinética de ciclo celular, se observaron 50 células por lamina, y se clasificaron de acuerdo a la tinción diferencial de cromátidas hermanas en células en primera (I), segunda (II) y tercera o sucesivas divisiones (III), donde:

$$IR = 1(I) + 2(II) + 3(III) / \text{número total de células}$$

La frecuencia de ICH's, se determinó mediante el análisis de células en metafases de segundo ciclo de división, 15 células por lamina, contando intercambios terminales como uno e intermedios como dos de acuerdo con los criterios propuestos por Carrano y Natarajan (1988).

La frecuencia de ACE y ACN se efectuó por el análisis de 25 células en metafase por lamina, tomando en cuenta los criterios de Brusick (1987) y Carrano y Natarajan (1988), registrando: rompimientos, brechas e intercambios de tipo cromatídico o cromosómico, heteroploidías (aneuploidías y poliploidías) y células con aberraciones.

De igual manera, se analizaron 25 metafase por lamina, determinando la frecuencia de AS de acuerdo con Zang y Back (1968), registrando: la participación de los cromosomas acrocéntricos del grupo D y G, número de cromosomas acrocéntricos asociados (CAA) por célula y células con AS.

El análisis de ICH's, IR, AS, ACE y ACN se efectuó en microscopio óptico NIKON (Labophot-2, Japón) a 1000 aumentos, mientras el IM se determinó a 200 aumentos.

La viabilidad celular se determinó por el conteo de 200 células, 100 células por experimento más su duplicado, en un microscopio de epifluorescencia (American Optical, USA) a 400 aumentos con excitación de luz de 515-560 nm, donde las células vivas metabolizan el diacetato-5-6-carboxiflorosceína a un compuesto fluorescente que tiñe el citoplasma de verde, mientras que el bromuro de etidio tiñe de naranja a rojo el núcleo de las células con daño en la membrana celular (Strauss, 1991).

La longitud de la migración de ADN (en  $\mu\text{m}$ ) se midió a 400 aumentos con un ocular graduado y un filtro de excitación de luz de 450-490. la evaluación fue en 200 células, 50 células por preparación de dos preparaciones por experimento, cuantificando núcleos intactos, núcleos con cola "cometas" y núcleos difusos "nubes". Tomando en cuenta al mismo tiempo otro criterio de evaluación (Anderson et al., 1994). clasificando el daño en cinco categorías dependientes del valor de la media del núcleo, donde, núcleos intactos "sin daño", núcleos con colas de hasta 1 núcleo de largo "daño bajo", colas con 2 núcleos de largo "daño medio", colas con 3 o más núcleos de largo "daño alto" y nubes "daño total".

## **Análisis estadístico**

La comparación estadística de los resultados de IM se analizó mediante una prueba de Z para proporciones. Para el IR, la frecuencia de ACN y ACE se utilizó una prueba de  $\chi^2$  con la corrección de Yates, mientras que para la migración de daño al ADN se empleó una prueba de rangos para muestras independientes U de Mann-Whitney. Las diferencias de las frecuencias de ICH's y AS se determinaron con un análisis de varianza de un factor seguido de una prueba de rangos múltiples Tukey (ANDEVA-Tukey) (Marques,

1988).

Los resultados se expresan en porcentaje (%), o bien, como el promedio más-menos la desviación estándar ( $x \pm ds$ ), donde la probabilidad ( $p$ ) donde hay diferencia significativa se expresa con la letra *a*  $p < 0.05$  y *b*  $p < 0.01$ .

# RESULTADOS

Los resultados de los diferentes parámetros se analizaron individualmente y se pueden apreciar en los Cuadros del III al VII, en ellos se indica al donador de 29 años, al de 23 y al de 25 años con la letra A, B y C, respectivamente. El promedio de los resultados de los tres donadores que reflejan la tendencia general de cada parámetro se muestra en las Figuras de la II a la V.

El  $V_2O_4$  es capaz de inhibir el IM y disminuir el IR en ciertas concentraciones, el promedio de los datos indica diferencia estadística en el IM en concentraciones de 4 a 16  $\mu\text{g/ml}$  y sólo en la más alta para el IR, con una tendencia a disminuir conforme aumenta la dosis (Cuadro III y IV; Figura II). El IR se calculo a partir de la cinética de ciclo celular, donde se observó un incremento en el número de células en primera división (datos que no se muestran).

La frecuencia de ICH's que se determino mediante el análisis citogenético de la tinción diferencial de cromátidas hermanas, en los linfocitos tratados con  $V_2O_4$  y que se muestran en el Cuadro III, se incrementa en una frecuencia baja en algunas concentraciones y con una tendencia a incrementarse la cual no refleja una relación dosis efecto (Figura III).

El total de ACE y el porcentaje de células con ACE, excluyendo aquellas células que sólo tenían brechas, se incrementa de manera similar en todos los tratamientos con vanadio en los tres donadores, con respecto a su testigo (Cuadro IV). Incluso este incremento se induce significativamente en concentraciones en las que no se inhibe el IM (Figura IV). Las aberraciones

que se observaron comúnmente fueron rompimientos, pérdidas cromatídicas, minutas, brechas y entre las ocasionalmente encontradas fueron los cromosomas dicéntricos y figuras radiales.

La frecuencia de ACN (heteroploidías) que se muestran en el Cuadro V y Figura V se ve modificada, donde, la diferencia estadística se debe al incremento de aneuploidías. principalmente hipoploidías (células con 45, 44 o 43 cromosomas), no obstante, en algunas concentraciones aparecen las hiperploidías (células con 47 o 48 cromosomas) y poliploidías (complementos extras del el número haploide  $2n$ ) como células  $4n$ .

En el Cuadro VI, los datos de la frecuencia de AS que incluye la frecuencia de CAA del grupo D y G, cromosomas asociados por célula, AS por célula y el porcentaje de células con al menos una asociación, no muestran diferencias consistentes.

Los resultados de las evaluaciones del daño al ADN mediante EUGa se describen en el Cuadro VII. El porcentaje de células con algún grado de daño y el promedio de la migración de su ADN (en  $\mu\text{m}$ ) de los leucocitos expuestos durante 2 horas a  $\text{V}_2\text{O}_4$  no se modificó. Es importante mencionar que la viabilidad celular, que se observó entre 5 y 10 minutos después del tratamiento, sobre paso el 95 % excepto en la muestra del donador C en la concentración de  $16 \mu\text{g/ml}$  que fue de 85%.

Los resultados muestran cierta variación la cual es producto de la sensibilidad individual. Las diferencias en el número de células analizadas en el caso del donador C en la concentración de  $16 \mu\text{g/ml}$ . se debe a que las metafases no eran de buena calidad, por lo cual no se llegó al número esperado de 200 células analizadas en AC y AS.

**Cuadro III. Índice mitótico (IM), índice de replicación (IR) y frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) en cultivos de linfocitos humanos expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

Donador	Concentración de V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (µg/ml)	% de IM (x ± ds)	ICH's /célula (x ± ds)	IR (x ± ds)
A	0	1.64 ± 0.21	5.88 ± 2.91	2.40 ± 0.01
	2	1.14 ± 0.12 <sup>b</sup>	6.53 ± 3.41	2.48 ± 0.13
	4	0.91 ± 0.08 <sup>b</sup>	6.93 ± 3.13	2.40 ± 0.21
	8	1.35 ± 0.29	6.17 ± 3.13	2.44 ± 0.08
	16	1.26 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.52 ± 3.93 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.01
B	0	2.40 ± 0.13	5.66 ± 2.62	2.15 ± 0.04
	2	2.70 ± 0.21	5.62 ± 2.68	2.29 ± 0.01
	4	2.10 ± 0.24	5.32 ± 2.45	1.98 ± 0.25
	8	1.05 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.57 ± 2.47	1.99 ± 0.12
	16	1.28 ± 0.12 <sup>b</sup>	6.48 ± 3.28	1.88 ± 0.07 <sup>a</sup>
C	0	2.36 ± 0.12	5.60 ± 2.60	2.51 ± 0.03
	2	2.33 ± 0.16	5.90 ± 2.55	2.17 ± 0.05 <sup>a</sup>
	4	1.80 ± 0.08 <sup>a</sup>	9.25 ± 4.29 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.02
	8	2.19 ± 0.19	8.02 ± 2.54 <sup>b</sup>	2.24 ± 0.05 <sup>a</sup>
	16	1.80 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.00 ± 2.93 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.13 <sup>b</sup>

IM de 8000 células por donador por concentración; prueba de Z para proporciones

IR de 400 células por donador por concentración; prueba de  $\chi^2$

ICH's de 60 células en segunda división por donador por concentración; prueba de ANDEVA-Tukey

<sup>a</sup> $p < 0.05$  y <sup>b</sup> $p < 0.01$

**Cuadro IV. Índice mitótico (IM) y frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) en cultivos de linfocitos humanos expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

Donador	Concentración de V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (µg/ml)	% de IM (x ± ds)	ACE								% de células c/ACE
			Cromatídicas			Cromosómicas			Total		
			r	i	b	r	i	b	sin b	con b	
A	0	1.72 ± 0.20	4	0	4	1	0	0	5	9	2.0
	2	2.04 ± 0.19	12	0	8	2	0	1	14 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	5.5 <sup>a</sup>
	4	1.67 ± 0.13	10	0	5	5	1	1	16 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	5.0
	8	1.48 ± 0.18	12	1	9	2	1	0	16 <sup>b</sup>	25 <sup>b</sup>	5.0
	16	1.00 ± 0.22 <sup>b</sup>	15	0	6	4	0	1	19 <sup>b</sup>	26 <sup>b</sup>	4.5
B	0	1.73 ± 0.09	2	1	8	0	0	1	3	12	1.5
	2	1.76 ± 0.16	6	1	11	3	0	2	10 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>	5.0 <sup>a</sup>
	4	1.83 ± 0.23	5	0	7	2	0	2	7	16	3.0
	8	1.36 ± 0.12 <sup>a</sup>	9	0	5	4	0	3	13 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	6.0 <sup>a</sup>
	16	1.19 ± 0.20 <sup>a</sup>	5	0	5	3	0	0	8 <sup>b</sup>	13	4.0
C	0	3.27 ± 0.24	4	0	5	0	0	0	4	9	2.0
	2	2.75 ± 0.32	6	1	1	2	0	0	9 <sup>b</sup>	10	4.5
	4	2.45 ± 0.22 <sup>b</sup>	6	0	3	2	0	0	8	11	4.0
	8	2.01 ± 0.15 <sup>a</sup>	10	0	5	4	1	1	15 <sup>b</sup>	21 <sup>b</sup>	7.0 <sup>a</sup>
	16	1.12 ± 0.09 <sup>a</sup>	10	1	7	2	0	0	13 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	7.5 <sup>a</sup>

IM de 8000 células por donador por concentración; prueba de Z para proporciones

ACE de 200 células analizadas por donador por concentración, excepto en 16 µg/ml donador C donde se analizaron 170 células; prueba de ji<sup>2</sup>

r = rompimientos    i = intercambios    b = brechas

<sup>a</sup>p < 0.05 y <sup>b</sup>p < 0.01

**Cuadro V. Frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) en cultivos de linfocitos humanos expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

Donador	Concentración de V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (µg/ml)	ACN (número cromosómico)							% de células c/ACN (heteroploidías)
		Aneuploidías						Poliploidías (4n)	
		Hipoploidías		Células normales (46)	Hiperploidías				
		(43)	(44)		(45)	(47)	(48)		
A	0	0	10	18	172	0	0	0	14.0
	2	0	13	20	163	1	1	2	18.5
	4	0	7	20	172	0	0	1	14.0
	8	0	7	24	168	0	0	1	16.0
	16	8	14	36	142	0	0	0	29.0 <sup>b</sup>
B	0	0	14	25	161	0	0	0	19.5
	2	0	10	18	168	2	0	2	16.0
	4	0	12	22	165	0	1	0	17.5
	8	0	18	27	153	1	0	1	23.5
	16	0	17	22	160	0	0	1	20.0
C	0	0	5	9	186	0	0	0	7.0
	2	1	6	11	182	0	0	0	9.0
	4	1	12	22	161	2	2	0	19.5 <sup>b</sup>
	8	2	12	18	168	0	0	0	16.0 <sup>a</sup>
	16	6	6	19	139	0	0	0	18.0 <sup>b</sup>

ACN de 200 células analizadas por donador por concentración, excepto en 16 µg/ml donador C donde se analizaron

164 células; prueba de ji<sup>2</sup>

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  y <sup>b</sup>  $p < 0.01$

**Cuadro VI. Frecuencia de asociaciones de satélites (AS) y de participación de los cromosomas acrocéntricos asociados (CAA) D y G, en cultivos de linfocitos humanos expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

Donador <sup>a</sup>	Concentración de V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (µg/ml)	CAA "D" (x ± ds)	CAA "G" (x ± ds)	CAA/célula (x ± ds)	AS/célula (x ± ds)	% de células c/AS
A	0	1.71 ± 1.29	2.08 ± 1.25	3.80 ± 2.13	1.63 ± 0.92	89
	2	1.67 ± 1.29	1.90 ± 1.27	3.57 ± 2.12	1.49 ± 0.91	87
	4	1.69 ± 1.15	1.96 ± 1.23	3.65 ± 1.99	1.60 ± 0.92	91
	8	1.74 ± 1.22	2.04 ± 1.22	3.74 ± 2.10	1.55 ± 0.89	89
	16	1.73 ± 1.29	2.09 ± 1.21	3.80 ± 2.07	1.60 ± 0.85	92
B	0	1.95 ± 1.37	1.17 ± 0.97	3.12 ± 1.91	1.35 ± 0.80	86
	2	1.94 ± 1.29	1.26 ± 0.98	3.20 ± 1.86	1.42 ± 0.82	88
	4	1.99 ± 1.24	1.34 ± 1.06	3.33 ± 1.85	1.44 ± 0.78	88
	8	2.11 ± 1.34	1.28 ± 1.04	3.39 ± 2.04	1.49 ± 0.86	85
	16	2.24 ± 1.41	1.32 ± 0.99	3.57 ± 1.94	1.53 ± 0.85	88
C	0	2.09 ± 1.33	1.80 ± 1.11	3.88 ± 2.02	1.67 ± 0.86	92
	2	1.93 ± 1.22	1.71 ± 1.21	3.65 ± 2.03	1.58 ± 0.85	90
	4	1.95 ± 1.32	1.88 ± 1.12	3.83 ± 2.01	1.71 ± 0.89	90
	8	2.09 ± 1.31	1.84 ± 1.25	3.92 ± 2.06	1.70 ± 0.90	91
	16 <sup>b</sup>	2.34 ± 1.30	2.18 ± 1.11	4.52 ± 1.90 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.81	94

AS de 200 células por donador por concentración, excepto en 16 µg/ml donador C donde se analizaron 164 células; prueba de ANDEVA-Tukey

<sup>a</sup> p < 0.05

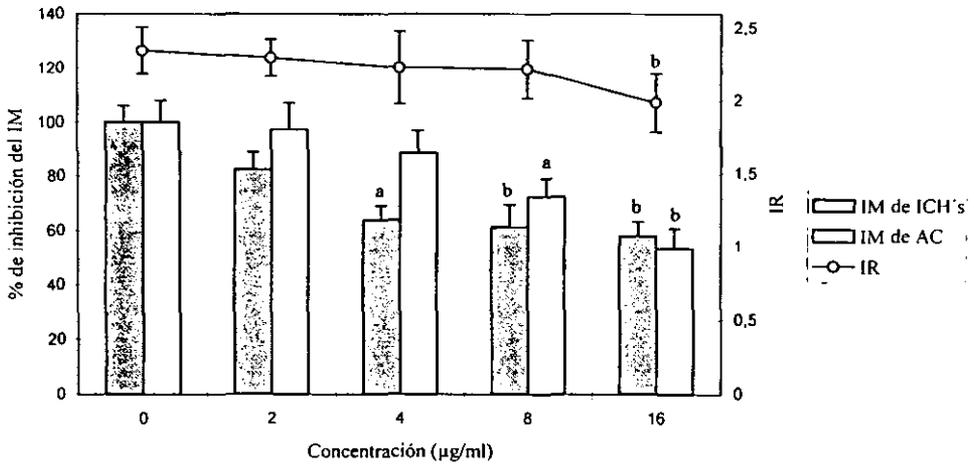
**Cuadro VII. Daño al ADN evaluado mediante electroforesis unicelular alcalina en leucocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>**

Donador	Concentración de V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (µg/ml)*	Longitud de ADN de células con migración en µm(x ± ds)	% de células				
			Sin daño	Daño bajo	Daño medio	Daño alto	Daño total
A	0	12.69 ± 5.44	93.3	2.0	4.0	0.5	0.0
	2	20.00 ± 12.10	92.0	0.5	5.5	1.5	0.5
	4	13.12 ± 5.88	92.5	2.5	4.5	0.5	0.0
	8	12.08 ± 5.82	94.0	2.0	3.0	1.0	0.0
	16	18.18 ± 9.94	92.0	0.5	4.5	2.5	0.0
C	0	15.44 ± 13.86	91.5	5.0	2.0	1.5	0.0
	2	12.50 ± 5.71	84.5	6.0	7.5	2.0	0.0
	4	13.93 ± 11.12	93.0	4.0	2.0	1.0	0.0
	8	16.41 ± 16.09	92.5	2.5	3.0	2.0	0.0
	16	14.90 ± 11.39	87.0	5.5	5.0	2.5	0.0

200 células analizadas por donador por concentración

\* 2 horas de tratamiento

**Figura II. Efecto del  $V_2O_4$  sobre el IR y su relación con la inhibición del IM, promedio de los tres donadores**

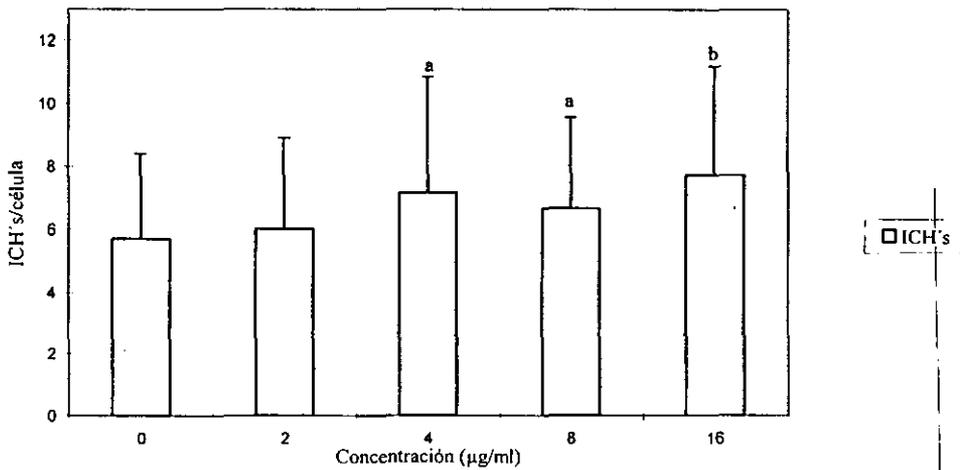


IM prueba de Z para proporciones

IR prueba de  $ji^2$

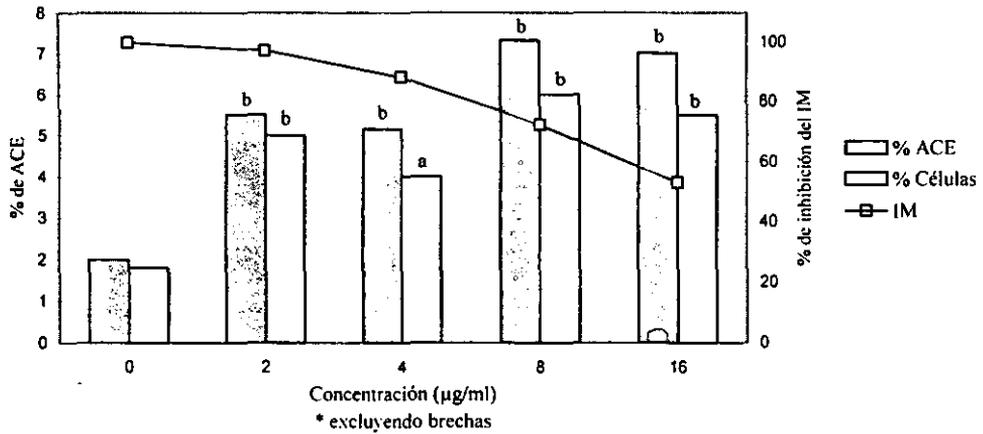
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  y <sup>b</sup>  $p < 0.01$

**Figura III. Efecto del  $V_2O_4$  sobre la la frecuencia de ICH's, promedio de los tres donadores**



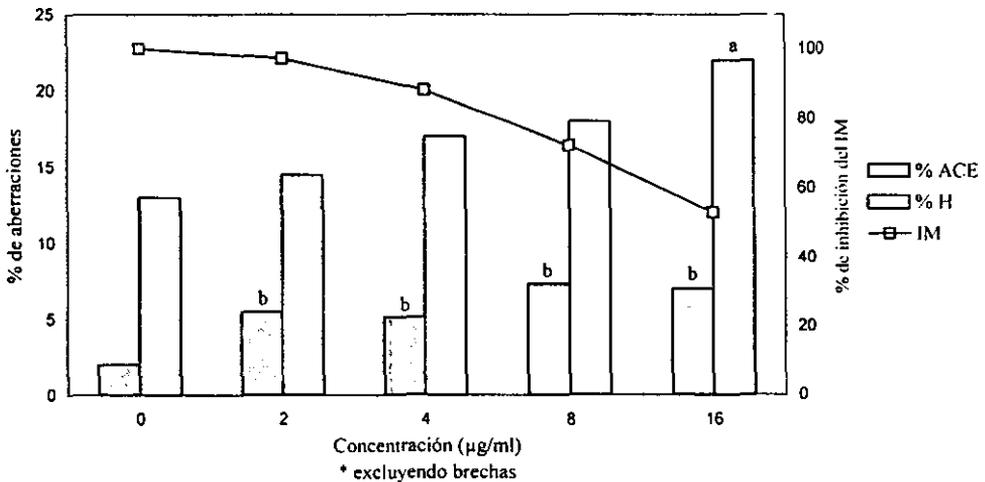
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  y <sup>b</sup>  $p < 0.01$  prueba de ANDEVA-Tukey

**Figura IV. Relación entre la frecuencia de ACE\*, células con ACE\* y la tendencia de inhibición del IM inducidos por V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, promedio de los tres donadores**



<sup>a</sup> p<0.05 y <sup>b</sup> p<0.01 prueba de ji<sup>2</sup>

**Figura V. Relación entre ACE\*, heteroploidias (H) y la tendencia de la inhibición del IM inducidos por V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, promedio de los tres donadores**



<sup>a</sup> p<0.05 y <sup>b</sup> p<0.01 prueba de ji<sup>2</sup>

# DISCUSIÓN

Se han descrito una gran variedad de efectos tóxicos atribuibles a la exposición a vanadio; respiratorios, gastrointestinales, sobre la descendencia, la reproducción y sobre el material genético.

La finalidad del presente estudio fue determinar la capacidad del vanadio IV como  $V_2O_4$  para inducir daño citogenético, resultado del efecto del vanadio sobre el ADN, el proceso de división celular y otro tipo de lesiones genéticas que son inducidas por la exposición de células de sangre periférica a este compuesto.

Los resultados muestran que el  $V_2O_4$  es capaz de inhibir el porcentaje de IM y el IR con una tendencia a disminuirlo conforme aumenta la dosis. Esto indica que el vanadio es citotóxico y modifica el proceso de división por el incremento en el tiempo que requieren las células para pasar de una primera a una segunda división, induciendo un efecto citostático.

La disminución en el IM se observa en concentraciones de 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  en las que se inhibe en un 28 y 47 % respectivamente, en los cultivos de AC expuestos por 24 horas a vanadio, tendencia que se modificó al prolongarse el tiempo de contacto del compuesto con las células y que se observa en los cultivos de ICH's expuestos durante 48 horas, donde en estos últimos el IM se inhibe en 36 % para 4  $\mu\text{g/ml}$  hasta un 42 % en la concentración de 16  $\mu\text{g/ml}$ .

Estas diferencias en el IM en ambos tiempos de cultivo se deben, por una parte, a la inducción de muerte celular que conduce a una disminución en

el número de células que entraron a dividirse y por otra, las variaciones de la citotoxicidad entre donadores a una determinada concentración se debe probablemente al metabolismo enzimático, donde, se están activando procesos de detoxificación como el del glutatión que es una de las principales mecanismos de defensa celular ante la presencia iones metálicos como el vanadio (Bran, 1998).

Se ha observado en cultivos de líneas celulares de ratón y de otros tipos de células de mamíferos que diversas sales de vanadio incluyendo  $\text{VOSO}_4$  (vanadio IV) en concentraciones cercanas a  $10 \mu\text{M}$  incrementan la incorporación de nucleótidos en el ADN e inducen consecuentemente un incremento en la actividad mitótica, pero en concentraciones entre  $20$  y  $40 \mu\text{M}$  o superiores este efecto se invierte (Carpenter, 1981; Smith, 1983; Sabbioni et al., 1983; Canalis, 1985). Estos datos son consistentes con nuestros resultados, puesto que el  $\text{V}_2\text{O}_4$  en concentraciones de  $2 \mu\text{g}$  (equivalentes a  $12 \mu\text{M}$ ) en algunos cultivos estimula ligeramente la mitosis y en concentraciones de  $4 \mu\text{g}$  (equivalentes a  $24.11 \mu\text{M}$ ) o mayores se inhibe.

En diferentes sistemas de prueba *in vivo* e *in vitro*, se ha observado que vanadio y sus compuestos modifican el IM, la cinética del ciclo celular y consecuentemente el IR (Altamirano-Lozano et al., 1998, Leónard y Gerber, 1998 y 1994). En un estudio previo usando linfocitos humanos tratados con tetrafluoruro de vanadio ( $\text{VF}_4$ ) el IM disminuye y la duración del ciclo celular se incrementa (Rodríguez, 1995) en concentraciones semejantes a las que induce cambios el  $\text{V}_2\text{O}_4$ , resultados que sumados a los nuestros permite establecer que el vanadio en su estado de oxidación IV modifica el proceso de división de manera similar al observado para el vanadio V en sistemas *in vitro*, con la diferencia de que la forma IV requiere concentraciones mayores para producir un mismo efecto.

Los efectos del vanadio son diversos. El vanadio IV al igual que el vanadio V en concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , es capaz de interactuar con muchas enzimas y substratos, cofactores, amino ácidos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas, sin embargo el vanadio V es considerado un potente inhibidor enzimático. La combinación de vanadio IV con proteínas férricas y calmodulina es la que mejor se conoce. Ambos iones inhiben o bloquean ribonucleasas y numerosas enzimas dependientes de fosfatos tal como las ATPasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , y otras que hidrolizan o transfieren grupos fosfato incluyendo algunas que intervienen en la respiración mitocondrial (Nechay et al., 1986; Crans et al., 1989; Léonard y Gerber, 1998).

Eventos como estos pueden afectar a las células y detenerlas en  $G_1$  donde los requerimientos de proteínas, enzimas, iones y energía son importantes para que las células puedan ciclar normalmente, a demás, sí el  $\text{V}_2\text{O}_4$  en dosis altas es capaz de inhibir la incorporación de nucleótidos en el ADN y por consiguiente la síntesis del mismo, entonces la duración del ciclo celular de los linfocitos expuestos a  $\text{V}_2\text{O}_4$  se ve afectada, y consecuentemente el IR se disminuye. Eventos como estos ayudan a explicar por que el vanadio es citotóxico y citostático y porque las células son más tolerables al vanadio IV.

En cuanto a los ICH's, el  $\text{V}_2\text{O}_4$  tiende a incrementar la frecuencia de manera baja pero significativa ( $P < 0.05$ ) (Figura III) y en particular en las concentraciones de 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y de 4 a 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para el donador B y el donador C, respectivamente (Cuadro III). Otros resultados apoyan estas diferencias, en células de hámster de 0.5 a 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y en linfocitos humanos en un intervalo similar a las concentraciones aquí probadas en 40 y 80  $\mu\text{M}$

equivalente a 6.40 y 12.80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , el  $\text{VOSO}_4$  es capaz de inducir ICH's (Owsu Yan, 1990; Migliore et al., 1993).

No obstante, los resultados de la inducción de ICH's por vanadio no son contundentes, puesto que cuando es aplicado en forma de pentóxido no hay diferencias de esta frecuencia en linfocitos humanos, en células V79 de hámster (Roldán y Altamirano, 1990; Zong et al., 1994) o en células de médula ósea de ratones CD-1 (Altamirano-Lozano et al., 1993), contra un incremento cuando se aplica en forma de vanadato en células hámster y en linfocitos humanos en concentraciones de 0.1 a 1  $\mu\text{g}$  y mayores a 6.40  $\mu\text{g}$ , respectivamente (Owsu Yan et al., 1990; Migliore et al., 1993).

Algo importante, es la diferencia en la inducción de ICH's entre individuos. Se ha observado que las lesiones que originan los ICH's pueden persistir por largo tiempo después de la exposición a algún mutágeno físico o químico, lo que indica que hay células que presentan daño persistente a lo largo de su vida y representan una población sensible (Carrano y Natajaran, 1988; Morales-Ramírez et al., 1992; 1995; Toker et al., 1993). Esto último podría estar sucediendo con el donador C, el cual presenta mayor sensibilidad por la exposición *in vitro* al  $\text{V}_2\text{O}_4$ , que se manifiesta como ICH's.

El mecanismo de formación y el significado biológico de los ICH's no han sido esclarecido. Hay diferentes modelos que tratan de explicarlo. Unos relacionan de manera directa la formación de los intercambios con el sitio donde a ocurrido una lesión, otros por alteraciones en los procesos de síntesis y reparación del ADN como la inhibición de enzimas involucradas en estos. o bien, una combinación de ambas situaciones (Latt et al., 1981; Morales-Ramírez et al., 1992; 1995; Fantini et al., 1998; Kaina, 1998).

Los ICH's ocurren en el sitio donde se encuentre una lesión o muy cerca de ella, pueden ser inducidos por mutágenos que causan diferentes tipos de lesiones en el ADN por ejemplo enlaces cruzados o aductos, pero al parecer los rompimientos de cadena no están involucrados (Wolf et al., 1974; Carrano y Natajaran, 1988; Morales-Ramírez, 1995). Los rompimientos en la cadena del ADN son considerados lesiones involucradas en la formación de ACE, los rompimientos de cadena doble son producto de lesiones primarias las cuales son responsables de la inducción de mutaciones puntuales, rompimientos en los cromosomas y rearrreglos (Phillips y Morgan, 1993; Moore y Bender, 1993; Hillard et al., 1998)

Tanto los ICH's como las AC son usadas para detectar daño. Ambos parámetros son producidos vía diferentes mecanismos. En general los ICH's son inducidos por lesiones o alteraciones en la reparación o replicación en el ADN, mientras que las AC pueden tener su origen por rompimientos en los cromosomas o por alteraciones en el huso mitótico. En este estudio el  $V_2O_4$  además modificar la frecuencia de los ICH's es capaz de inducir ACE y ACN.

El  $V_2O_4$  incrementa dos veces o más la frecuencia de ACE de manera semejante en los tres individuos, sin una clara relación dosis efecto (Cuadro IV), donde el incremento significativo en la incidencia de células con aberraciones va acompañado de un incremento en el número de aberraciones por célula (Figura IV).

Es importante señalar que muchos agentes químicos inhiben el IM en un 50% o más e inducen aberraciones como un mecanismo secundario asociado a un efecto citotóxico (Hillard et al., 1998; Kirkland y Müller, 2000). En este caso se detectó que las ACE se inducen en concentraciones no citotóxicas por lo que este incremento posiblemente se debe al efecto del

V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

El V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induce un efecto clastógeno en dosis en las que prácticamente el IM no se inhibe, o se inhibe pero esta apenas alcanza el 28% como lo es en la concentración de 8 µg/ml. Este efecto puede ser confirmado al comparar el promedio de las ACE (excluyendo brechas) de los cultivos testigo de los tres donadores contra el propuesto en la literatura para linfocitos humanos cultivados por 48 horas, de  $2.00 \pm 0.50$  % de nuestro estudio contra  $1.73 \pm 1.20$  reportado por Sinha et al., 1984, o bien, no más del 2 % de células con ACE en cultivos de células de mamífero que propone Swierenga et al., 1991, contra  $1.83 \pm 0.29$  de este estudio.

Los resultados positivos en el promedio de los tres individuos, confirman que el V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> induce lesiones en el ADN que pueden manifestarse como rompimientos en el ADN cromosómico, como ocurre en células de ovario de hámster Chino y células de médula ósea de ratón por el VOSO<sub>4</sub> (Owusu Yan et al., 1990; Ciranni et al., 1995) por lo que la diferencia encontrada en los cultivos de linfocitos humanos de este estudio probablemente sí tiene un importante significado biológico.

Las lesiones en el ADN pueden ser producidas en cualquier fase de ciclo celular. En linfocitos humanos estimulados la fase de síntesis del ADN principia 18 horas después de la siembra y la siguiente fase de síntesis comienza entre 48 y 58 horas después de iniciados los cultivos. se recomienda que los tratamientos se den a las 24 horas, donde mutágenos que inducen ICH's incrementan en una alta frecuencia este parámetro, independientemente de las diferencias del tiempo de tratamiento (Latt et al., 1981; Chakrabati et al., 1997). Bajo estas condiciones el V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> no es un buen inductor de ICH's ya que las diferencias estadísticas de los resultados entre donadores son

variables.

Por otro lado mutágenos que producen rompimientos en el ADN y/o rompimientos cromosómicos no necesariamente son buenos inductores de ICH's (Perry y Evans, 1975; Latt et al., 1981). Lesiones en el ADN como enlaces cruzados ADN-proteínas otro tipo de aductos (por ejemplo, oxidación de bases o nucleótidos) son lesiones importantes en la formación de ACE (Kaina et al., 1993; Galloway, 1994; Hartwing, 1995; Moller y Wallin 1998; Kaina, 1998).

No hay datos que demuestre la inducción de enlaces cruzados por el vanadio IV, pero se ha reportado que el vanadio V produce enlaces ADN-proteínas que se disocian rápidamente (Olin et al., 1996). Pruebas bioquímicas muestran que los iones de vanadio inhiben diferentes ADN polimerasas y deoxirribonucleasas (Sabbioni et al., 1983), inducen peroxidación de lípidos y en particular el vanadio IV se auto-oxida, genera radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) e induce lesiones en los nucleósidos como 8-hidroxi-2-deoxiguanocina que finalmente pueden conducir a rompimientos de cadena doble (RCD) en el ADN (Liochev y Fridovich, 1987; 1990 y 1996; Sakurai, 1994; Shi et al., 1996).

Estos reportes sugieren que el vanadio IV es capaz de afectar el proceso normal de síntesis del ADN e interferir con el metabolismo de los ácidos nucleicos, así como interactuar con otras moléculas e inducir lesiones en el ADN. Si esto sucede en los linfocitos en cultivo y si ambos procesos esta involucrados en la formación de ICH's, entonces el incremento encontrado puede ser explicado por la interacción del vanadio con las enzimas nucleares. Por otra parte, si el vanadio produce alteraciones en las bases, nucleótidos o en la estructura de fosfatos del ADN, entonces las lesiones

pueden conducir a RCD y consecuentemente rompimientos cromatídicos.

Respecto a las ACN, las aneuploidías muestran algunas diferencias significativas. Se ha propuesto que las aneuploidías en cultivos no tratados de células de mamífero no sobrepase el 5% (Galloway e Ivett, 1986; Dellarco et al., 1986), pero en algunos estudios en los que utilizan el mismo sistema de linfocitos humanos y una técnica similar de evaluación han reportado entre el 8 y 11% (Migliore et al., 1993).

En la distribución de las aneuploidías se ve un incremento en el número de células con 45 ó 43 cromosomas en las concentraciones que muestran diferencia estadística (Tabla V). Las hipoploidías no son aceptadas como una evidencia contundente de un efecto aneuploidógeno ya que muchos compuestos químicos inducen fragilidad en la membrana y ruptura prematura de la misma (Galloway y Ivett, 1986; Dellarco et al., 1986). Pero las hiperploidías son generalmente aceptadas como evidencia de daño genotóxico debido a que es difícil que una célula tenga cromosomas de más producto de la técnica, y si los tiene no pueden pasar desapercibidos en el momento del análisis .

Con base a lo mencionado y la observación de hiperploidías y poliploidías en algunas concentraciones se da evidencia de que el  $V_2O_4$  puede intervenir con la distribución de los cromosomas durante la mitosis, por lo que, la tendencia en el incremento en la frecuencia de hipoploidías no debe descartarse aunque este no sea el principal efecto genotóxico. Es importante mencionar que la formación de poliploidías no depende directamente de un efecto aneuploidógeno pero puede indicar cual es el mecanismo por el cual se forman, ya que puede ser reflejo de un efecto en los microtúbulos.

El vanadio y sus compuestos se han considerados más aneuploidógenos que clastógenos. En levaduras, plantas y en células de mamífero induce hipoploidías, hiperploidías, poliploidías y micronúcleos (Altamirano-Lozano et al., 1998 Léonard y Gerber, 1998; Migliore et al., 1999).

Específicamente, las alteraciones en mitosis y su relación con la formación del huso. como mecanismo en la formación de aneuploidías, es el hecho de que el vanadio interactúa con los microtúbulos y en forma de pentóxido en concentraciones cercanas a  $0.1 \mu\text{M}$  inhibe la polimerización y estimula la depolimerización de la tubulina (Cande y Wolniak, 1978; Ramírez et al., 1997) mientras que el vanadio IV como  $\text{VOSO}_4$  inhibe la polimerización en concentraciones menores a  $5 \text{ mM}$  (Hantson et al., 1996). En los linfocitos en división pudiera ser que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  afecte la función del huso mitótico produciendo un inadecuado reparto cromosómico.

En humanos una de las principales causas de abortos espontáneos debidos a anormalidades cromosómicas la constituyen las aneuploidías, además, a nivel salud son importantes porque están relacionadas con defectos al nacimiento, infertilidad y con desarrollo de cáncer (Sankaranarayan, 1979; Toker y Preston, 1996).

La formación de aneuploidías puede involucrar no-disyunción por un inadecuado reparto cromosómico o rearrreglos estructurales tales como translocaciones. Se tiene documentado que en estas anormalidades la participación de los cromosomas acrocéntricos es significativa, y se propone que los acrocéntricos en los complejos de asociaciones son vulnerables a no-disyunción y la región del centrómero a romperse (Hansson, 1970; Sankaranarayan, 1979; Houghton, 1979).

La tendencia de los cromosomas acrocéntricos a asociarse, es genéticamente controlada, pero su frecuencia puede ser influenciada por alteraciones en el metabolismo o factores ambientales (Hansson, 1970; Nilsson et al., 1975; Kirsch-Volder et al., 1978; Yadav y Seth, 1998). Un incremento en las AS se considera como predisposición a incrementar la tendencia a no-disyunción e inducir trisomías de los cromosomas del grupo D y G (Houghton, 1979).

Algunas sales de vanadio tienden a incrementar las AS (Roldán y Altamirano, 1990; Migliore et al., 1993), sin embargo, los resultados de este estudio, reflejan que el  $V_2O_4$  no produce cambios. Los valores encontrados en nuestro grupo testigo que fue una media de 3.80, 3.12 y 3.88 para los CAA por célula y 89, 86 y 92 para el porcentaje de células con AS de los donadores A, B y C respectivamente, son valores que se encuentran en los basales reportados por Sigmund et al. (1979), donde 3.42 es la media para los CAA y 88.3 para el porcentaje de AS en cultivos de linfocitos humanos que han pasado por una sola mitosis.

Por otra parte la exposición de leucocitos de sangre completa a  $V_2O_4$  no induce cambios en la viabilidad (>95%) ni en la longitud de la migración del ADN nuclear. En condiciones experimentales similares el  $V_2O_5$  (Rojas et al., 1996a y 1996b), en comparación con el  $V_2O_4$ , induce RCS y SSA daño que en 90 minutos se repara e iguala el valor del grupo testigo.

Estos resultados que son opuestos, tienen dos posibles explicaciones. La primera es que las lesiones que induce el vanadio IV o el vanadio V son diferentes e involucran una clase específica de daño. La segunda es que el daño al ADN es reparado y/o si el vanadio IV es capaz de inducir enlaces

cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas, estos pueden retardar la migración del ADN fragmentado como ocurre con agentes alquilantes (Tice et al., 1992; Green et al., 1992; Hartmann y Speit, 1994).

Sin embargo, en este estudio los tratamientos de 2 horas con  $V_2O_4$  y la evaluación de las células inmediatamente después de la exposición posiblemente no es el protocolo más adecuado para detectar daño al ADN con la prueba de electroforesis.

La prueba de EUGa bajo las condiciones aquí usadas, indican que la producción de RCS y/o la producción de SSA en el ADN no son un efecto predominante en la inducción de daño al ADN cromosómico por el  $V_2O_4$ , pero es conveniente evaluar el daño a diferentes tiempos de exposición por ejemplo de 3 a 6 horas en células en  $G_0$  (Tice et al., 2000) y de 24 horas en linfocitos estimulados (Rojas et al., 1996a; Rojas et al., 1999b), para obtener conclusiones más sólidas.

En resumen, la sensibilidad de la prueba de ICH's y el incremento en la frecuencia de ACE ponen en evidencia la capacidad del  $V_2O_4$  para inducir lesiones que pueden convertirse en RCD en el ADN y finalmente conducir a la formación rompimientos en los cromosomas, por lo cual, el  $V_2O_4$  puede ser considerado un agente con actividad clastógena. En altas dosis, la inducción de ACN denota la capacidad del vanadio de alterar la función de los microtúbulos del huso mitótico, la modificación en el IR da evidencia de la interferencia con diferentes rutas metabólicas y bloqueo enzimático, así como, la disminución en el IM muestra efecto citotóxico. Unido a esto, la falta de respuesta en los parámetros de AS y de migración de daño al ADN evaluado por EUGa en la presente investigación, dan información de la genotoxicidad y citotoxicidad del  $V_2O_4$  (vanadio IV) y abren la posibilidad de conocer sus

efectos y de comprender los mecanismos responsables.

Por último, las frecuencias básicas de las diferentes pruebas citogenéticas así como las variaciones de los resultados entre donadores, pueden ser causadas por factores genéticos, metabólicos, capacidad de reparación del ADN e incluso hábitos de dieta (Rojas, et al., 1992 Rojas et al., 1999a). Resultados como estos son atribuidos a la susceptibilidad individual y ha sido reportada en varios estudios usando células de sangre periférica de humano (Migliore et al., 1991; Ramírez et al., 1997; Yadav y Seth, 1998; Gorla et al., 1999).

# CONCLUSIONES Y COMENTARIOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el  $V_2O_4$  se comporta de manera similar a como actúan otras sales de vanadio y comparte algunos efectos producidos por otros cationes metálicos:

1. Es citotóxico, efecto evidenciado por la inhibición en el IM y que se observa en concentraciones diferentes a las que ejerce otros efectos.
2. Modifica el proceso normal de división celular, efecto que se observa por la disminución en el IR, y que puede deberse a la capacidad de formar complejos con diferentes moléculas inhibiendo o bloqueando su actividad.
3. Puede considerarse un agente clastógeno que actúa en concentraciones bajas, efecto que puede deberse a la inducción de lesiones en el ADN y que se manifiestan como rompimientos en los cromosomas e ICH's.
4. En concentraciones altas incrementa ligeramente las ACN, pero, no modifica la frecuencia de AS, por lo que posiblemente la formación de aneuploidías sea debida a un efecto a nivel de huso mitótico y no por una tendencia a no-disyunción.
5. No se detecto daño al ADN mediante la prueba de EUGa, por lo que, bajo las condiciones aquí usadas posiblemente la producción de RCS no son un efecto predominante en la inducción de daño al ADN.

Finalmente, el hecho de que el  $V_2O_4$  incremente la frecuencia de ACE en concentraciones no citotóxicas e induzca ICH's, que sea capaz de modificar el proceso de división celular y que la producción de aneuploidías

no sea su principal efecto, nos lleva a proponer que el vanadio IV y sus compuestos deben ser evaluados usando algunos otros métodos bioquímicos y citogenéticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

# REFERENCIAS

**Abundis MHM** (1994) Valoración de la genotoxicidad del pentóxido de vanadio en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Comparación de tres protocolos. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.

**Abundis MHM** (1996) Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. UMAM, México.

**Alessio L, Marinoni M y A Dell'Orto** (1988) Biological monitoring of vanadium. En: Biological monitoring of toxic metals. (Eds) Clarkson WT, Friberg L, Nordberg F y R Sanger. Plenum Press, NY. Pags. 427-436.

**Altamirano LM** (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 LM, Alvarez BL y ER Roldán** (1993) Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.* 21:711-713.

**Altamirano-Lozano MA y L Alvarez-Barrera** (1996) Genotoxic and reprotoxic effects of vanadium and lithium. En: Metal Ions in Biology and Medicine. Vol. 4. (Eds) Collery J, Corbella Ph, Domingo JL, Etienne JC y JM Llobert. John Libbey Eurotex, Paris. Pags. 423-425.

**Altamirano-Lozano MA, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcantara F, Valverde M y E Rojas** (1996) Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 16:7-17.

**Altamirano-Lozano MA, Roldán-Reyes E y E Rojas** (1998) Genetic toxicology of vanadium compounds. En: Vanadium in the environmental. Parte 2: Health Effects (Eds) Jerome O Nriagu. John Wiley y Sons. Inc. Pags. 159-179.

**Altamirano-Lozano MA, Valverde M, Alvarez-Barrera L, Molina B y E Rojas** (1999) Genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 19:243-255.

- Aragón AM** (1998) Reprotoxicidad inducida por tetraóxido de vanadio en el ratón macho CD-1. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- Anderson D, Yu T-W, Phillips BJ y P Schmezer** (1994) The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307:261-271.
- Baran, EJ** (1998) Vanadium detoxification. En: Vanadium in the environmental. Parte 2: Health Effects (Eds) Jerome O Nriagu. John Wiley y Sons, Inc. Pags. 317-345.
- Baroch EF** (1983) Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopaedia or chemical technology. John Wiley y Sons, NY. Pags. 673-710.
- Bogden JD, Higashino H, Lavenhar MA, Bauman JW, Kemp FW y A Aviv** (1982) Balance and tissue distribution of vanadium after short-term ingestion of vanadate. *J. Nut.* 112:2279-2285.
- Bolaños F** (1990) El impacto biológico: problema ambiental contemporáneo. UNAM, México. Cap. 5 y 7.
- Bronzetti G, Morchetti E, Della Croce E, Del Carratore R, Giromini L y A Galli** (1990) Vanadium; genetical and biochemical investigations. *Mutagenesis.* 5:293-295.
- Brusick D** (1987) Principles of genetic toxicology. Plenum Press. NY. Cap. 1-3.
- Canalis E** (1985) Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat Calvarie. *Endocrinology.* 116:855-862.
- Cande WZ y SM Wolniak** (1978) Chromosome movement in lysed mitotic cells inhibited by vanadate. *J. Cell. Biol.* 79:573-580.
- Cantley LC y A Phillips** (1979) The fate of cytoplasmic vanadium. *J. Biol. Chem.* 254:1781-1784.
- Carrano AV y AT Natarajan** (1988) Considerations for population monitoring using cytogenic 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 BL, Ellis HV y JL McCann** (1987) Toxicology and biological

monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, Inc. Pags. 276-289.

**Chakrabarti S, Zhang XX y CL Richer (1997)** Influence of duration of exposure to styrene oxide on sister chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in cultured human blood lymphocytes *in vitro*. *Mutat. Res.* 395:37-45.

**Ciranni R, Antonetti M y L Migliore (1995)** Vanadium salts induce cytogenetic effects *in vivo* treated mice. *Mutat. Res.* 343:53-60.

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

**Crans DC, Robin I y LA Theisen (1989)** Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111:7597-7607.

**Crans DC, Willging EM y SR Butler (1990)** Vanadate tetramer as the inhibiting species in enzyme reactions *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Chem. Soc.* 112:427-432.

**Dellarco VL, Mavournin KH y MD Waters (1986)** Aneuploidy data review committee: summary compilation of chemical data base and evaluation of test methodology. *Mutat. Res.* 167:149-169.

**D'Cruz OJ, Dong Y y FM Uckun (1999)** Spermicidal activity of oxovanadium(IV) complexes of 1-10-phenanthroline, 2,2'-bipyridyl, 5'-bromo-2'-hydroxyacetophenone and derivatives in humans. *Biol. Rep.* 60:435-444.

**Domingo JL (1996)** Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Rep. Toxicol.* 10:175-181.

**Domingo JL, Gomez M, Llobet JM, Corbella J y CL Keen (1991)** Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology.* 66:279-287.

**Elinder CG, Gerhardsson L y G Oberdoerster (1988)** Biological monitoring of toxic metals-overview. En: Biological monitoring of toxic metals. (Eds) Clarkson WT, Friberg L, Nordberg F y R Sanger. Plenum Press, NY. Pags. 1-72.

**Fantini C, Vernole P, Tedeschii B y D Caporossi (1998)** Sister chromatid

exchanges and DNA topoisomerase II inhibitors: effects of low concentrations of etoposide (VP-16) in ataxia telangiectacea lymphoblastoid cell lines. *Mutat. Res.* 412:1-7.

**Faweett JP, Farquhar SJ, Thou T y BI Shand** (1997) Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in human. *Pharmacol. Toxicol.* 80:202-206.

**Ferguson-Smith MA y SD Handmaker** (1961) Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet.* 1:638-40.

**French RJ y JH Jones** (1993) Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif. Sci.* 52:339-346.

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

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

**Galloway SM y JL Ivett** (1986) Chemically induced aneuploidy in mammalian cells in culture. *Mutat. Res.* 167:89-105.

**Galloway SM** (1994) Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ. Mol. Mutagen.* 23 sup 24:44-53.

**Giri AK, Sanyal R, Sharna A y G Talukder** (1979) Cytological and cytochemical changes induced though certain heavy metals in mammalian systems. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 2:391-394. Citado en Léonard y Gerber, 1994.

**Gorla N, García Ovando H y Y Larripa** (1999) Chromosomal aberrations in humans lymphocytes exposed *in vitro* to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicol. Lett.* 104:43-48.

**Green MHL, Lowe JE, Harcourt SA, Akinluyi P, Rowe T, Cole J, Anstey AV y CF Arlett** (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutat. Res.* 273:137-144.

**Hansson A** (1970) Differences in the satellite association pattern in the human population. *Hereditas.* 66:21-30.

**Hantson Ph, Saint-Geoges L, Mahieu P, Léonard ED, Crutzen-Fayt MC y A Léonard** (1996) Evaluation of the ability of paracetamol to produce chromosome aberrations in man. *Mutat. Res.* 368:293-300.

**Hartmann A y G Speit** (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects on metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.* 23:299-305.

**Hartwin A** (1995) Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals.* 8:3-11.

**Heylinger CE, Tahiliani AG y JH McNeill** (1985) Effect of vanadium on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science.* 227:1474-1477.

**Hilliard CA, Armstrong MJ, Bradt CI, Hill RB, Greenwood SK y SM Galloway** (1998) Chromosome Aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environ. Mol. Mutagen.* 31:316-326.

**Houghton JA** (1979) Relationships between satellite association and the occurrence of no-disjunction in man. *Mutat. Res.* 61:103-114.

**IPCS** (2000) International programme on chemical safety. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463:111-172.

**Ivett, JL y RR Tice** (1982) Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:358.

**Jackson JF y HF Linskens** (1982) Metal ion induced unscheduled DNA synthesis in petunia pollen. *Mol. Gen. Genet.* 187:112-115.

**Kada T, Hirano K y Y Shirasu** (1980) Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. En: Chemical mutagens: Principles and methods for their detection Vol. 5 (Eds) Serres FJ y A Hollaender. Plenum Press, NY. Pag. 149-173.

**Kaina B, Fritz G y T Coquerelle** (1993) Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formations of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations and gene mutations: New insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. *Environ. Mol. Mutagen.* 22:283-292.

**Kaina B** (1998) Critical steps in alkylation-induced aberration formation.

*Mutat. Res.* 404:119-124.

**Kalatzis G, Katakis D, Vrachnou E y 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.

**Kanematsu N, Hare M y I Kada (1980)** Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77:109-116.

**Kanematsu N y I Kada (1978)** Mutagenicity of metal compounds. *Mutat. Res.* 53:207-208.

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

**Khandelwal RL y S Pugazhenthii (1996)** Vanadium as a potential therapeutic agent for treatment of diabetes mellitus. En: Metal Ions in Biology and Medicine. Vol. 4 (Eds) Collery J Corbella Ph. Domingo JL, Etienne JC y JM Llobert. John Libbey Eurotex. Paris. Pags. 673-675.

**Kirkland D y L Müller (2000)** Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat. Res.* 464:137-147.

**Kirsch-Volders M, Hens L, Verschaeve L, Alexander A, Driesen M, Poma K y C Susanne (1978)** Modification of human acrocentric associations after *in vivo* exposure to environmental mutagens. *Acta Antropogenetica.* 3:1-16.

**Kubena LF y TD Phillips (1983)** Toxicity of vanadium in female Leghorn Chickens. *Poultry Science.* 62:47-50.

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

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

**Léonard A y GB Gerber (1994)** Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317:81-88.

**Léonard A y GB Gerber (1998)** Mutagenicity, carcinogenicity, and

teratogenicity of vanadium. En: Vanadium in the environmental. Parte 2: Health Effects (Eds) Jerome O Nriagu. John Wiley y Sons, Inc. Pags. 39-53.

**Liochev SI y Y Fridovich** (1987) The oxidation of NADH by tetravalent vanadium. *Arch. Biochem. Biophys.* 255:274-278.

**Liochev SI y Y Fridovich** (1990) Vanadate stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Arch. Biochem. Biophys.* 279:1-7.

**Liochev SI y Y Fridovich** (1996) Comments on vanadate chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* 20:157.

**Marini M, Zunica G, Bagnara GP y C Franceschi** (1987) Effect of vanadate on PHA-induced proliferation of human lymphocytes from young and old subjects. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142:836-842

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

**Migliore L, Bocciardi R, Macri C y 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.

**Migliore L, Parrini M, Sbranca I, Biagini C, Battaglia A y N Loprieno** (1991) Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat. Res.* 256:13-20.

**Migliore L, Scarpato R y P Falco** (1995) The use fluorescence in situ hybridization with a B-satellite DNA probe for the detection of acrocentric chromosomes in vanadium-induced micronuclei. *Cytogenet. Cell Genet.* 69:215-219.

**Migliore L, Zotti-Martelli L y R Scarpato** (1999) Detection of chromosome loss and gain induced by griseofulvin, estramustine an vanadate in binucleated lymphocytes using FISH analysis. *Environ. Mol. Mutagen.* 34:64-68.

**Moller P y H Wallin** (1998) Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat. Res.* 410:271-290.

**Montero R, Gonsebatt ME, Gerson R, Rojas E, Herrera LA y P Ostrosky-Wegman** (1993) AS-101: a modulator of *in vitro* T-cell proliferation. *Anti-Cancer Drugs.* 4:351-354.

**Moore RC y MA Bender (1993)** Time sequence o events leading to chromosomal aberration formation. *Environ. Mol. Mutagen.* 22:208-213.

**Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R y T Vallarino-Kelly (1992)** *In vivo* fate of MMS-induced DNA lesions that elucit SCE. *Mutat Res.* 272:215-221.

**Morales-Ramírez P, Rodríguez-Reyes R y T Vallarino-Kelly (1995)** Fate of lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutat. Res.* 344:13-26.

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

**NRC (1992)** National Research Council. Biological markers in immunotoxicology. National Academic Press, Washington, DC. Pag. 9-22.

**Nechay BR (1984)** Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:501-524.

**Nechay BR, Nanninga LB y SE 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.

**Nilsson C, Hansson A y G Nilsson (1975)** Influence of thyroid hormones on satellite association in man and the origin of chromosome abnormalities. *Hereditas.* 80:157-166.

**Olin KL, Cherr GN, Rifkin E y CL Keen (1996)** The effects of some redox-active metals and aldehydes on DNA-protein cross-links *in vitro*. *Toxicology.* 110:1-8.

**Owusu Yaw J, Choen MD, Fernando SY y CI Wei (1990)** An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327-336.

**Palma V, Tuldón H, Buentello L, Nava S, Ostrosky P y F Salamanca (1993)** Methods for the analysis of cellular kinetics in PHA-stimulated blood lymphocytes using BrdU incorporation. A comparative study. *Mutat. Res.* 286:267-273.

**Perry P y HJ Evans (1975)** Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature.* 258:121-125.

- Phillips JW y WF Morgan (1993)** DNA double-strand breaks in mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 22:214-217.
- Phillips TD, Nechay BR y ND Heidelbaugh (1983)** Vanadium: chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973.
- PISSQ (1995)** Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas. Vanadio y algunas sales de vanadio. Guía para la Salud y la Seguridad No. 42. Metepec, México.
- Ramírez P, Easstmond DA, Laclette JP y P Ostrosky-Wegman (1997)** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386:291-298.
- Rehder D (1991)** The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30: 148-167.
- Rehder D (1992)** Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *BioMetals.* 5:3-12.
- Rodríguez MJJ (1995)** Genotoxicidad inducida *in vitro* por sales de vanadio en cromosomas de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura UNAM. México.
- Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodríguez R y P Ostrosky-Wegman (1992)** Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?. *Mutat. Res.* 282:283-286.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M y P Ostrosky-Wegman (1996a)** Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 359:77-84.
- Rojas E, Valverde M, Sordo M, Altamirano-Lozano M y P Ostrosky-Wegman (1996b)** Single cell gel electrophoresis assay in the evaluation of metal carcinogenicity. En: Metal Ions in Biology and Medicine. Vol. 4 (Eds) Collery J Corbella Ph, Domingo JL, Etienne JC y JM Llobert. John Libbey Eurotex, Paris. Pag. 375-377.
- Rojas E, Herrera LA, Poirier LA y P Ostrosky-Wegman (1999a)** Are metals dietary carcinogens?. *Mutat. Res.* 443:157-181.
- Rojas E, Lopez MC y M Valverde (1999b)** Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B.* 722:225-254.

**Roldán RE y LM 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-Reyes E, Aguilar-Morales C, Frias-Vázquez S y MA Altamirano-Lozano** (1997) Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by vanadium pentoxide in combination with caffeine. *Med. Sci. Res.* 25:501-504.

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

**Sabbioni E, Pozzi G, Pintar A, Casella L y 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, Nishida M, Koyama M y J Takada** (1987) Occurrence of vanadium ions in serum albumins. *Biochem. Biophys. Acta* 924:562-563.

**Sakurai H, Shimomura S, Fukuzawa K y 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.

**Sankaranarayan K** (1979) The role non-disjunction in aneuploidy in man an overview. *Mutat. Res.* 61:1-28.

**Scott D, Galloway SM, Marshall RR, Ishidate M, Brusick D, Ashby J y BC Myhr** (1991) Genotoxicity under extreme culture conditions. *Mutat. Res.* 257:147-204.

**Sharma RP, Flora JS, Drown DB y SG Oberg** (1987) Persistence of vanadium compounds in lungs after intracheal instillation in rats. *Toxicol. Industrial Health.* 3:321-329.

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

**Shi X, Jiang H, Mao Y, Ye J y U Saffiotti** (1996) Vanadium(IV)-mediated

free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology*. 106:27-38.

**Sigmund J, Schwarzacher HG y AV Mikelsaar (1979)** Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR-activity. *Hum. Genet.* 50:81-91.

**Sinha AK, Linscombe VA, Gollapudi BB, McClintock ML, Flake RE y M Bodner (1984)** The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal humans for 48 and 72 h. *Can. J. Genet. Cytol.* 26:528-531

**Singh OP (1979)** Effects of certain metallic pollutants on plant chromosomes. Tesis Doctoral. Universidad de Calcuta, India. Citado en: Sharma A. y G. Talukder (1987).

**Singh NP, McCoy M, Tice RR y EL Schneider (1988)** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res.* 175:184-191.

**Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L y EL Schneider (1990)** DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237:123-130.

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

**Stern A, Yin X, Tsang S-S, Davison A y J Moon (1993)** Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogen expression. *Biochem. Cell Biol.* 71:103-112.

**Strauss GHS (1991)** Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT). *Mutat. Res.* 252:1-15.

**Stokinger HE (1981)** The metals. En : Patty's industrial hygiene and toxicology. 3ª Ed. Vol. II A. Clayton GD y FE Clayton. (Eds) John Wiley and Sons. NY. Cap. 29.

**Sun P (1987)** Toxicity of vanadium and its environmental health standard. Changdu West China University of Medical Sciences, Report. Citado en Altamirano et al., 1998.

**Swierenga SHH, Heddle JA, Sigal EA, Gilman JPW, Brillinger RL, Douglas GR y ER Nestmann (1991)** Recommended protocols based on a

survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocytes cultures. *Mutat. Res.* 246:301-322.

**Tice RR, Andrews PW y NP Singh** (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. En: DNA Damage and repair in human tissues. (Eds) Sutherland BM y D Woodhead, Plenum Press, NY. Pags. 291-301.

**Tice RR, Strauss GHS y WP Peters** (1992) High dose alkylating agents whit autologus bone-marrow support in patients whit breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique assay. *Mutat. Res.* 271:101-113.

**Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Rojas E, Ryu JC y YF Sasaki** (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221.

**Tucker JD, Auletta A, Cimmino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR y AV Carrano** (1993) Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 297:101-180.

**Tucker JD y RJ Preston** (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.

**Verma RS, Shah JV y H Dosik** (1983) Frequencies of chromosome and chromatid types of associations of nucleolar human chromosomes demonstrated by the N-banding technique. *Cytobios.* 36:25-29.

**Waters MD, Gardner DE y DL Coffin** (1974) Cytotoxic effects of vanadium on rabbit alveolar macrophages *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 28:253-263.

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

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

**Yadav JS y N Seth** (1998) Effect of NO<sub>x</sub> on the somatic chromosomes of goldsmiths. *Environ. Health Perspect.* 106:643-647.

**Zang KD y E Back (1968)** Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. *Citogenetics*. 7:455-470.

**Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ y T Ong (1994)** Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* 321:35-42.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



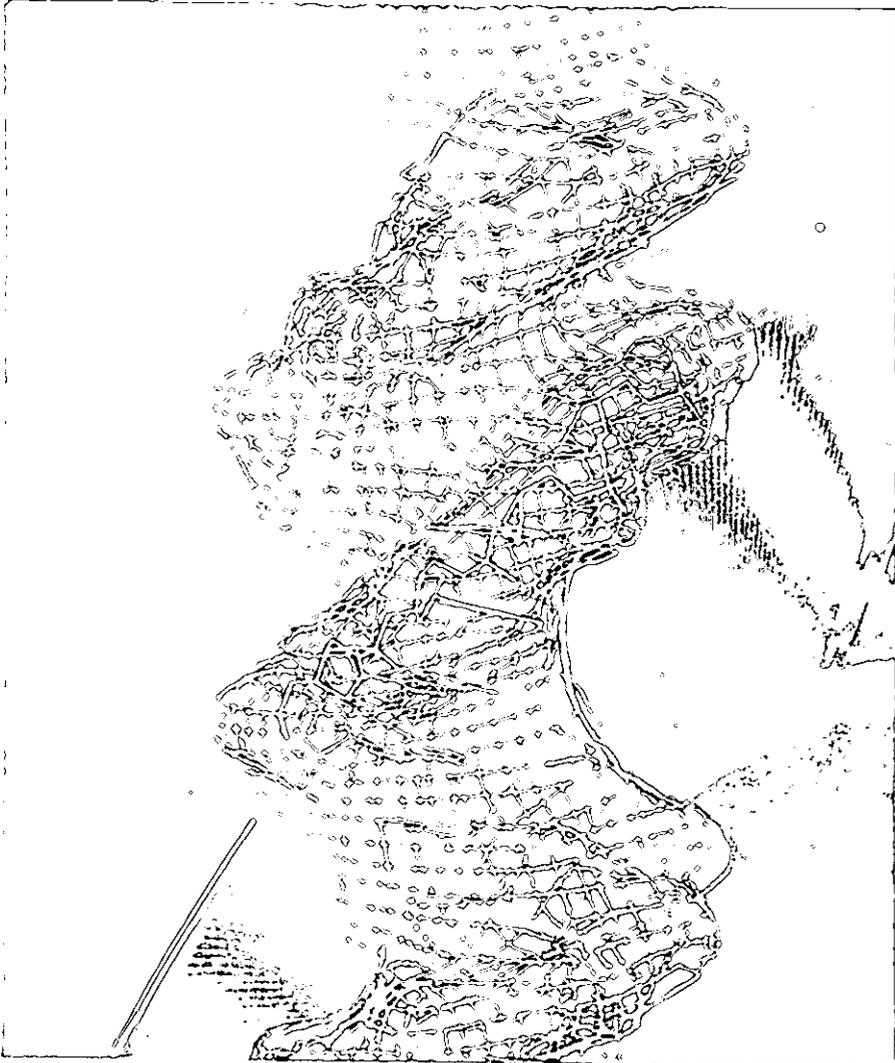
SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA

# VIII CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA

Sept. 28 - Oct. 2, 1997



Universidad Autónoma de Baja California  
Ensenada, B.C.

ANÁLISIS GEOGRÁFICO DE LA CARIOLOGÍA DEL GÉNERO  
*Enallagma* EUCHSON (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE). *Cyrtopogon*  
*zosteri* G., *Scleroderma*, Y. y *Reticularia* B. ENCH-  
D. Depto. de Zoología, L. C. de Virología Biológica y Evolución, México, D.F.

El género *Enallagma* comprende 19 especies distribuidas desde Alaska hasta  
Brasil, con excepción de las especies Boreales. El género se ha dividido en  
13) todo en cinco grupos taxonómicos con base en caracteres morfológicos y  
filogenéticos, y por otro en más de cuarenta con base en caracteres cromosómicos, ecológicos y  
geográficos. Ambos presentados con cambios en cuanto a las especies que  
forman los grupos, en diferentes rasgos en el orden de especialización de estos  
rasgos o caracteres. En este trabajo se hace un análisis de la cariólogía del  
género en función de su distribución geográfica. Para ello, se partió del  
material cromosómico de 14 especies previamente estudiadas, en 50  
muestras de Canadá y Estados Unidos, y del material realizado por nuestro  
grupo de trabajo en 53 localidades pertenecientes a 11 especies de Canadá, México

y Brasil. Los resultados del análisis de 16 especies pertenecientes a 103 poblaciones  
muestran que el número cromosómico del grupo varía de  $2n = 12$  a  $2n = 30$  y que  
se distingue entre las especies a través de un gradiente latitudinal que va de  
norte a sur, los cromosomas sexuales son del tipo  $X_{1Y}$ , y los números  
cromosómicos intra- e interpopulacionales son estables a lo largo de la distribución  
geográfica de las especies, debido a la existencia de interpopulaciones estables en  
norte y sur. Por otro parte, estas diferencias, desde un punto de vista de la  
filogenética y del posible centro de diversificación del género, que las  
especies que se localizan en México y Centroamérica son derivadas de aquellas  
que se encuentran más al norte del continente, esta última hipótesis es contrastada  
con estudios que el género tuvo su origen en México, a partir de un  
grupo de especies que habitaron los antiguos puros del género  
norte, de donde se dispersó a Europa y Asia.

EVALUACIÓN DE LA REPARACIÓN DEL DAÑO AL ADN POR MEDIO  
DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN LINFOCITOS DE NIÑOS  
DESNUTRIDOS. *González-Torres, C.*, *Nájera-Medina, O.*, *López-Guadán,  
L.*, *Toledo-Fuentes, G.*, *Correa-Barberán, E.*, *Betancourt-Rule, M.* y *Ortiz-  
Muniz, R.* 1. Depto. de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, 2. Depto. de Atención a la Salud, Universidad  
Autónoma Metropolitana-Xochimilco, 3. Hospital Infantil Iztapalapa, D.D.F. 4.  
Hospital Infantil Xochimilco, D.D.F. México D.F.

Se ha determinado que niños con desnutrición presentan niveles  
elevados de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y  
micronúcleos. Recientemente se ha establecido por medio de electroforesis  
unicelular un incremento significativo en los niveles de daño al ADN en ellos.

Dado que el incremento en el daño al material genético presente en las  
muestras de los niños desnutridos podría relacionarse con deficiencias en los  
mecanismos de reparación del ADN, el objetivo del presente trabajo consistió en  
evaluar en linfocitos de niños eutróficos y de niños desnutridos, la eficiencia de  
la reparación del daño al ADN, por medio de electroforesis unicelular. La  
electroforesis unicelular en condiciones alcalinas, ha mostrado ser una técnica  
muy sensible para evaluar el daño al ADN provocado por diversos agentes,  
además de que ha sido muy útil en el estudio de la reparación del mismo.

Se tomaron muestras de sangre a niños eutróficos y a niños con  
desnutrición de segundo y tercer grado, a partir de las cuales se aislaron  
linfocitos, los que fueron mezclados con agarosa para elaborar los geles. Para  
inducir daño al ADN se utilizó peróxido de hidrógeno (5  $\mu$ M) durante 20 min.,  
concluido este periodo se permitió la reparación colocando las preparaciones en  
medio de cultivo a 37°C, se tomaron muestras a 0, 5, 15, 30 y 60 min. de  
incubación. Posteriormente las preparaciones fueron colocadas en solución de  
lisis, para finalmente realizar la electroforesis unicelular en condiciones  
alcalinas.

Los resultados obtenidos muestran que la eficiencia de la reparación del  
daño inducido al ADN de linfocitos de niños desnutridos, es aproximadamente  
del 50% en comparación con la observada en las muestras de los niños  
eutróficos. Esto apoya la posibilidad de que los niveles elevados de daño en estos  
niños están relacionados con un proceso deficiente de reparación del daño al  
ADN, lo cual podría deberse a alteraciones en la síntesis de proteínas que  
participan en el proceso.

#### EFFECTO DE LA CAFEINA Y LA HIDROXIUREA EN FASE G2 DE LINEAS CROMOSÓMICAS DE ANEMIA DE FANCONI

Dr. L. Molino B. Sánchez SR, Camarero A. Esmer MC y Fricis S. Instituto  
Nacional de Pediatría.

La hipersensibilidad a agentes alquilantes bifuncionales como la  
nitrosourea (MMC) y la alteración en el ciclo celular es característica de las  
líneas de pacientes con Anemia de Fanconi (AF), síndrome de inestabilidad  
cromosómica con falla progresiva en médula ósea y predisposición a cáncer  
diversos (HU) es un compuesto que impide la incorporación de nucleótidos  
nuevos tanto de replicación como de reparación, en células AE ha encontrado  
hipersensibilidad a la HU en cuanto a recuperación de síntesis programada de

Por otro parte, la cafeína interfiere con la reparación postreplicativa y  
con la normalización larga fase G2 en células AF e incrementa la frecuencia de  
aberraciones cromosómicas (AC).

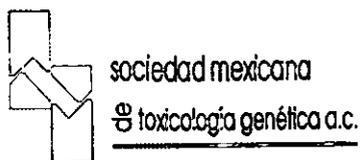
En el presente trabajo se investigó el efecto de la HU y la cafeína en la fase G2 de líneas  
cromosómicas de cuatro grupos de complementación de AF: A, B, C, y D y de una  
línea normal con y sin tratamiento de MMC (10ng/ml) durante 24 horas, después  
de las células se lavan y se reincuban con HU (2 mM) o Cafeína (0.25 mM) y se  
analizan después de 3 horas de la manera habitual, se hace una segunda cosecha a  
las 24 horas. La HU y Cafeína se agregaron también 3 horas antes.

Los cultivos sin tratamiento. Las células AF mostraron mayor frecuencia de AC  
respecto a las células normales. El tratamiento con MMC produjo incremento en  
frecuencia de AC en todas las líneas, el cual se hace más evidente en la cosecha  
a las 4 horas. La HU incrementó la frecuencia de AC en ambas cosechas  
inmediatamente al añadir, y al agregarla después del tratamiento con MMC es un  
efecto del cual depende por esto. La cafeína también incrementó la frecuencia  
de AC, este incremento es menor las líneas AF-B y AF-D que en las líneas NL,  
y AF-C. En cultivos con MMC también se observó este incremento excepto  
línea AF-D, en el resto se hace más evidente en los cultivos de 24 horas  
que en la línea normal. Estos resultados evidenciaron un comportamiento  
anormal en las líneas AF.

Este proyecto está financiado por CONACYT registro 1411-M y 3388 P-N.

#### INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS Y ADERENCIAS CROMOSÓMICAS, INDUCIDAS POR TETRAOXÍDO DE VANADIO EN CULTIVOS DE LINFOCITOS HUMANOS. *Reidín-Royas E.*, *Rodríguez- Morcedo J.*, *Argón-Morales A.* y *Alcázar-Lorenzo M.* Laboratorio de Cromosómica, Mutagenética y Toxicología Reproductiva. UIBR. FES- Zaragoza, UNAM. México D.F.

Los estudios de oxidación más comunes del vanadio son, IV y V.  
Su compuesto en la forma V son considerados como los de mayor  
probabilidad de causar daño y por tal razón ha sido la forma más  
estudiada por la Toxicología Genética. El vanadio V es reducido por las  
células a vanadio IV, forma más estable en los fluidos biológicos y más  
representativa de contaminación en diferentes órganos y tejidos en plantas  
y animales. Lo anterior nos lleva a pensar que el vanadio IV puede estar  
jugando un papel importante en la inducción de aberraciones celulares  
deberidas pero el vanadio V. Por el motivo anterior, en el estudio el efecto  
del tetraóxido de vanadio ( $V_2O_4$ , IV) en linfocitos de congo portátiles  
cultivados durante 72 y 48 hrs. Se evaluó la frecuencia del intercambio de  
cromátidas hermanas (ICH) en 100 células de la segunda división, el  
tiempo promedio generacional (TPG) de 1200 mitosis, y el índice  
médico (IM) de 2400 células, en cultivos de 72 hrs. en presencia de  
BrUdU. Se cuantificó la frecuencia de aberraciones cromosómicas  
estructurales (ACe) y numéricas (ACn) de 500 células en mitosis y el IM  
de 2400 células, en cultivos de 48 hrs. En todos los casos a las 24 hrs.  
de iniciados los cultivos, se aplicó 0, 2, 4, 8 y 16  $\mu$ g/ml de  $V_2O_4$ . Las  
evaluaciones se realizaron por concentración. Los resultados muestran un  
incremento en la frecuencia de ICH's en 4, 8 y 16  $\mu$ g (7.17±3.73, 0.66  
±2.02, 7.73±3.49 vs 5.71±2.70 del testigo; P<0.01), así como un aumento  
en el TPG en la concentración de 16  $\mu$ g (24.00 hrs. vs 20.42 hrs; P<0.05).  
El IM disminuyó en 4, 8 y 16  $\mu$ g tanto en los cultivos de 72 hrs. (1.31%,  
1.20% y 1.10% vs 1.70% del testigo; P<0.01) como en los de 48 hrs.  
(1.09%, 1.59% y 1.17% vs 2.25% del testigo; P<0.01). Las ACe más  
frecuentes fueron rompiéndose, roturas, roturas y roturas. El total de  
ACe, excluyendo gaps, se incrementaron todas las concentraciones; 2, 4,  
8 y 16  $\mu$ g (43/500, 42/500, 53/500 y 57/570 vs 17/500 del testigo; P<0.01),  
mientras las ACn muestran un incremento en hipopoloides en las  
concentraciones de 4, 8 y 16  $\mu$ g (101/500, 111/500 y 124/570 vs 53/500  
del testigo; P<0.01). Los resultados sugieren que el  $V_2O_4$  puede ser  
considerado un agente con actividad clastogénica, genotóxica y clastogénica,  
capaz de romper cromosomas y alterar el proceso de segregación de los  
mismos durante la mitosis.



SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA

SOCIEDAD MEXICANA DE TOXICOLOGIA GENÉTICA

V CONGRESO CONJUNTO

27 DE SEPTIEMBRE AL 2 DE OCTUBRE DE 1998  
ACAPULCO, GRO. , MEXICO

**DAÑO CROMOSÓMICO INDUCIDO POR VANADIO EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO*.**  
 Roldán-Reyes, E., Rodríguez-Mercado, J.J., Aragón-Martínez, A. y Altamirano-Lozano, M.A. Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva. UIBR, FES-Zaragoza, UNAM.

El vanadio es un elemento esencial en la vida de muchos organismos, pero sus funciones biológicas aun no son claras. Su liberación se ha incrementado en las dos últimas décadas por lo que se considera un importante metal ambiental. El uso excesivo de material fósil es la fuente principal de liberación de vanadio en la atmósfera, y en menor grado los eventos naturales (emisiones volcánicas, erosión e incendios forestales). En el ambiente así como en los fluidos biológicos extracelulares predomina en su estado de oxidación 5+ como vanadatos (VO<sub>3</sub><sup>-</sup>), razón por la cual ha sido su forma más estudiada por la toxicología, sin embargo, el vanadio 4+ como los iones vanadilo (VO<sup>2+</sup>) es la forma en la que se encuentra en las células y en los tejidos de plantas y animales, a demás de acumularse y permanece en contacto con los componentes celulares. Por lo anterior, se decidió estudiar los efectos del tetróxido de vanadio (V<sup>4+</sup>, V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en linfocitos de sangre periférica cultivados durante 72 hrs en presencia de BrdU. La sangre se obtuvo de tres donadores varones clínicamente sanos A, B y C. Se evaluó, la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's, 60 células) índice de replicación (IR, 200 células) y el índice mitótico (IM, 800 células), por donador y por concentración. A las 24 hrs de iniciados los cultivos se dieron los tratamientos con 0, 2, 4, 8 y 16 µgV/ml. Los resultados muestran un ligero incremento en la frecuencia de ICH's en 16µg/ml para el donador A (8.52 ± 0.51 vs 5.88 ± 0.38 del testigo; P<0.05 ANDEVA), y en la concentración de 4, 8 y 16 µg/ml para el donador C (9.25 ± 0.55, 8.02 ± 0.33 y 8.60 ± 0.38 respectivamente vs 5.60 ± 0.34 del testigo; P<0.01 ANDEVA), permaneciendo sin cambio en donador B. El IR disminuyo en 16µg/ml para el donador B (1.88 vs 2.85 del testigo; P<0.05 ji<sup>2</sup>) y a partir de 2 y hasta 16 µg/ml para el donador C (2.17, 2.28, 2.24 y 1.86 respectivamente vs 2.51 del testigo; P<0.05 de ji<sup>2</sup>). Una disminución significativa se observo en el IM en la concentración de 2, 4 y 16 µg/ml para el donador A (1.14, 0.91 y 1.26 respectivamente vs 1.64 del testigo; P<0.01 Z para proporciones), en 8 y 18µg/ml para el donador B (1.05 y 1.32 respectivamente vs 2.41 del testigo; P<0.01 Z para proporciones), mientras que para el donador C se modifico en 4 y 16 µg/ml (1.80 y 1.80 respectivamente vs 2.29 del testigo; P<0.01 Z para proporciones). Los resultados muestran evidencias de una actividad genotóxica y citotóxica la cual puede ser explicada por un retraso en el proceso de la mitosis y una interferencia con los procesos involucrados en la síntesis y reparación del ADN, así como muerte celular.

(Proyecto apoyado por DGAPA IN-214597)

**HALLAZGOS CITOGENETICOS EN PADECIMIENTOS ONCOHEMATOLOGICOS**

Sierra-Martínez, M., Vergara, M. D., y Cruz, R.J\*\*, \*Servicio de Genética, \*\*Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México, Dirección de Investigación y Enseñanza. Av. Instituto Politécnico Nacional, No. 5160, 007760, México.

Las Leucemias Agudas (LAs) ocupan el cuarto lugar de mortalidad de neoplasias malignas en México, son la causa principal de muerte en menores de 25 años, con una mayor frecuencia en el sexo masculino. Según la FAB (French-American-British) se clasifican en: Leucemias Agudas Mieloides o mieloblásticas (LAM) y en Leucemias Agudas Linfoides (LAL) (RHNM, 1994). En este trabajo se presentan los hallazgos citogenéticos de pacientes que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México, se estudiaron 30 pacientes de ambos sexos e independiente edad, en los cuales el padecimiento fue *De Novo*, sin tratamiento. El análisis citogenético se llevó a cabo en muestras de médula ósea, mediante cosecha directa y/o cultivos de 24, 48 y 72 hrs (sin estimulación). Se analizaron de 10 a 30 metafases por caso, con técnica de bandas GTG y los cariotipos fueron clasificados de acuerdo con los criterios del Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica (ISCN, 1995). De los 30 pacientes estudiados, 14 fueron de sexo masculino y 16 de sexo femenino, el rango de edad: de 7 a 84 años. De los cuales 11 pertenecieron a LAM, 12 a LAL, 5 a Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y 2 a síndrome mielodisplásico. Los hallazgos citogenéticos se resumen en la siguiente tabla:

**DISTRIBUCION DE ALTERACIONES CITOGENETICAS EN PACIENTES CON LAM Y LAL**

LAM	M1	M2	M3	M4	M6	total	LAL	L1	L2	total
no. de casos	1	3	2	3	2	11	no. de casos	3	9	12
cariotipo normal	-	-	-	-	1	1	cariotipo normal	1	2	3
t(9;22)	-	1	-	-	-	1	t(9;22)	1	2	3
t(8;21)	1	1	-	1	-	3	t(1;19)	-	1	1
t(5;17)	-	-	1	-	-	1	del 5p-	1	-	1
-7/7q-	-	-	-	-	1	1	del 6p-	-	1	1
4del/inv (16)	-	-	1	-	-	1	hipodiploides	-	2	2
t(8)	-	-	-	1	-	1	hiperdiploides	-	1	1
hipodiploides	-	1	-	1	-	2				

Todos los pacientes con LMC fueron portadores de t(9;22), en los pacientes con síndrome mielodisplásico; uno presentó cariotipo normal y otro con t(9;22). El estudio citogenético en estos pacientes es un factor pronóstico importante para predecir el rango y duración de la remisión y la sobrevida independiente de los parámetros clínicos, hematológicos e inmunológicos.

## INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN *Vicia faba* POR EL INSECTICIDA CARBÁMICO VYDATE L-24

Valencia-Quintana R., Nervo-Galicia C.I., Juárez-Santacruz L., Vázquez-Cuacucocha O. y Sánchez-Alarcón J.  
Laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación en Genética y Ambiente  
de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Av. Universidad No. 1, Tlaxcala 90000, Tlaxcala, México.

Los plaguicidas son indispensables para la agricultura y permanecerán en uso, a pesar de sus muchas desventajas. Son principalmente tóxicos, que directa e indirectamente influyen en el ambiente y la salud humana. Esta contaminación tóxica por medio de los insecticidas es actualmente la principal preocupación de los investigadores en materia de contaminación y salud. Su empleo ha contribuido al incremento del deterioro de los ecosistemas, debido principalmente a la persistencia de residuos en los alimentos, el agua, el aire y los suelos, pudiendo representar un riesgo para los seres vivos en general.

Una de las especies vegetales más eficiente para evaluar el daño cromosómico, inducido por contaminantes ambientales, es el haba (*Vicia faba*). Más de una tercera parte de los estudios con plantas para el análisis de aberraciones la usa y ha sido propuesta como un sistema de prueba para mutágenos ambientales en el programa Geno-Tox.

En una evaluación previa el insecticida carbámico oxamilo (vydate L-24), ampliamente utilizado en la agricultura, no indujo alteraciones cromosómicas en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba* ni efectos sobre el índice mitótico y se sugirió que estos resultados podrían deberse al hecho de que las concentraciones empleadas fueron insuficientes para causar algún daño o a que el compuesto en sí, no era clastogénico.

Con el propósito de confirmar alguna de estas opciones, la toxicidad genética del vydate L-24 (oxamilo al 24 %), fue analizada a través de su capacidad para inducir aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Las raíces de entre 3-4 cm fueron expuestas durante 4 horas a soluciones acuosas de este insecticida (4000, 6000, 8000 y 10000 ppm de i.a.), con 18 y 44 horas de recuperación, los lotes testigo, uno por cada tiempo de recuperación, se mantuvieron bajo las mismas condiciones experimentales con la excepción de que durante el tratamiento fueron sumergidos en agua destilada. El daño fue registrado en células en metafase como fragmentos cromatídicos e isocromatídicos y anillos. Los resultados mostraron que este insecticida indujo aberraciones cromosómicas que se incrementaron conforme se elevó la concentración. Por otra parte el índice mitótico no se vio afectado. Con base en estas observaciones el vydate L-24 (oxamilo al 24 %) puede considerarse genotóxico y deben tomarse las medidas de protección adecuadas para evitar este riesgo, ya que contra algunas plagas y en ciertas cultivos, éste se recomienda en concentraciones superiores a las probadas en este estudio.

## EVALUACIÓN DEL DAÑO INDUCIDO AL ADN POR TETRAÓXIDO DE VANADIO. Rodríguez-Mercado, J.J., Rotdán-Reyes, E. y Altamirano-Lozano, M. A. Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, UIBR, FES-ZARAGOZA, UNAM.

El vanadio en su estado de oxidación 5+, es reducido a su forma 4+ por moléculas comunes en la célula, en las cuales puede permanecer unido y así ser transportado y acumulado. Diferentes reportes sugieren que el vanadio 4+ es la forma biológicamente activa. sus efectos bioquímicos y toxicológicos han sido menos estudiados que los de vanadio 5+. Consecuentemente se conoce poco acerca de los efectos genotóxicos y citotóxicos de los compuestos de vanadio en su forma 4+. Debido a lo anterior y a la necesidad de conocer los mecanismos por los cuales el vanadio ejerce sus efectos citogenéticos, se obtuvo sangre periférica humana y se hicieron cultivos de linfocitos de 48 hrs para determinar aberraciones cromosómicas (AC, 200 células), asociaciones de satélites (AS, 200 células) e índice mitótico (IM, 8000 células), a los cuales se les aplicó tetraóxido de vanadio ( $V^{4+}$ ,  $V_2O_4$ ) a las 24 hrs de iniciados los cultivos en concentraciones de 0, 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ . Se evaluó la capacidad del  $V_2O_4$  de inducir rompimientos de una sola hebra por medio de electroforesis unicelular (EU), en leucocitos en  $G_0$  de sangre humana, tratados durante dos hrs. Las evaluaciones de AC se realizaron en tres donadores clínicamente sanos A, B y C, mientras que para EU fueron en dos A y C. En todos los casos la frecuencia de AC estructurales se duplicó en las diferentes concentraciones para los tres donadores ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$ ), las AC más frecuentes fueron, rompimientos sencillos > rompimientos dobles. La frecuencia de AC numéricas, hipoploidías, se duplicó ( $P < 0.05$ ,  $\chi^2$ ) en 16  $\mu\text{g/ml}$  para el donador A y en 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$  para el donador C, mientras que la frecuencia de hiperploidías y poliploidías no se modificó. El IM disminuyó ( $P < 0.05$ , Z para proporciones) en 16  $\mu\text{g/ml}$  para el donador A y B, en el caso del tercer donador disminuyó ( $P < 0.01$ , Z para proporciones), en 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ . La frecuencia de AS que involucran cromosomas del grupo D y G permanecieron sin cambio. La migración de ADN evaluado mediante EU no se modificó. Los resultados sugieren que el  $V_2O_4$  puede ser considerado como un agente citotóxico en concentraciones moderadas y altas, y potencialmente clastógeno (S-dependiente) a bajas dosis. Así como manifestar actividad aneuploidogena por pérdida de cromosomas durante la mitosis, debida posiblemente a la interferencia del vanadio con el uso mitótico.