

512812



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

"ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA CAFEINA Y SU PARTICIPACION EN LA PRODUCCION DE INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR EL PENTOXIDO DE VANADIO"

T E S I S

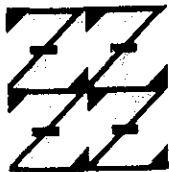
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. en IBSH. ELIA ROLDAN REYES

UNAM FES ZARAGOZA



LO HUMANO ES DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO

MEXICO, D. F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002



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.

---

## DEDICATORIA

*A José Benjamín mi amor, amigo y compañero,  
A mis hijos, T. Magali y Benjamín, por ser la energía que me  
impulsa a seguir adelante.*

---

---

## **DEDICATORIA**

***A TERESA Y ENRIQUE MIS PADRES, PORQUE CON SU FORTALEZA  
ESPÍRITUAL SON MI MEJOR EJEMPLO A SEGUIR.***

***A ROBERTO, JUAN, CRISPÍN, ENRIQUE Y JOSÉ LUIS MIS HERMANOS,  
POR ESE AMOR FRATERO INCONDICIONAL.***

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Mario Altamirano Lozano por su asesoría y dirección en el presente trabajo.

A los integrantes del Comité Tutorial.

Por su tiempo, paciencia y aportaciones para el desarrollo y conclusión del presente trabajo de investigación; y por permitirme aprender de ustedes.

A todos y cada uno de los Miembros del Jurado

Por sus comentarios y sus atinadas observaciones así como las recomendaciones señaladas al presente escrito.

A todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN): Dra. Lucila Alvarez Barrera, Mtra. Ma. del Carmen García Rodríguez, Mtro. Juan José Rodríguez Mercado, Mtra. Bertha Molina Alvarez, Biol. Andrés Aragón García. Por hacer posible un ambiente cordial de trabajo, y por la ayuda que siempre me brindan.

A todos los estudiantes de la Carrera de Biología que han desfilado por la UNIGEN, en particular a las actuales Biólogas: Catia Aguilar Morales y Erendira Sánchez Hernández. Y al Pasante de Biología V. Joel Román Cárdenas, porque con su trabajo contribuyeron a la realización de la presente tesis doctoral.

A la Mtra. Isabel Gracia Mora por toda su desinteresada ayuda, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos y amigas de siempre.

---

## **COMITÉ TUTORIAL**

**DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO**

**DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**

**DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

---

## **JURADO DE EXAMEN**

**DR. MARIO ALTAMIRANO LOZANO**

**DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**

**DR. MIGUEL BETANCOURT RULE**

**DRA. LENA RUÍZ AZUARA**

**DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO**

**DRA. ALDA ROCIO ORTÍZ MUÑIZ**

**DR. ARNULFO ALBORES MEDINA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES \*ZARAGOZA\***

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CAFEÍNA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS INDUCIDOS POR EL PENTÓXIDO DE VANADIO"**

**La tesis fue desarrollada en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.**

**Para el desarrollo del trabajo de esta investigación se recibió el apoyo financiero de PADEP 300304 y DGAPA-UNAM proyectos IN-202593.**



# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Vanadio	3
1.2 Cinética	5
1.3 Efectos toxicológicos	5
1.4 Efectos mutagénicos	6
1.5 Cafeína	9
1.6 Distribución y metabolismo de la cafeína	10
1.7 Metabolismo de cafeína de células en cultivo	13
1.8 Efectos genéticos y celulares de la cafeína	14
1.9 La cafeína como potenciadora de daño inducido al ADN por agentes químicos	15
1.10 Intercambio de cromátidas hermanas	18
1.11 Ciclo celular y su control genético	21
1.12 <i>Linfocitos humanos in vitro como sistema de prueba</i>	31
<b>2. Justificación</b>	<b>33</b>
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>34</b>
<b>4. Metodología</b>	<b>35</b>
4.1 Cultivo de linfocitos humanos	35
4.2 Tratamientos	35
4.3 Tinción diferencial de cromátidas hermanas	36
4.4 Determinación de metabolitos de cafeína	37
<b>5. Resultados</b>	<b>43</b>
5.1 Índice mitótico	43
5.2 Intercambio de cromátidas hermanas	48
5.3 Índice de replicación	48
5.4 Metabolismo de cafeína	57

<b>6. Discusión</b>	<b>59</b>
6.1 Intercambio de cromátidas hermanas	59
6.2 Tratamientos en S/G2	60
6.3 Metabolismo de cafeína	64
<b>7. Conclusiones</b>	<b>70</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>72</b>
<b>9. Publicaciones</b>	<b>88</b>

## RESUMEN

En este estudio se evaluó el comportamiento metabólico de la cafeína en cultivo de linfocitos humanos, así como el papel que juega ésta en la expresión de lesiones inductoras de intercambio de cromátidas hermanas (ICHs) producidas por el pentóxido de vanadio.

Para estudiar el metabolismo de la cafeína, a un primer grupo de cultivos se les adicionó cafeína desde el inicio y los tiempos de cosecha fueron 2 y 72 h. A un segundo lote de cultivos se les aplicó la cafeína 24 h horas después del inicio y las cosechas se realizaron a las 26 y 72 h. El último grupo de cultivos fue tratado con la cafeína 48 h después de iniciados y la cosecha se realizó a las 50 y 72 h. Al final de los tratamientos los cultivos se sonicaron, se centrifugaron y el sobrenadante se empleó para los estudios en cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). A partir de esta metodología se obtuvieron los tiempos de retención y los resultados fueron comparados contra los obtenidos para el grupo testigo y los estándares utilizados: cafeína, teobromina, 1,7-dimetilxantina, teofilina y  $\beta$ -hidroxietilteofilina.

Los resultados sugieren que los linfocitos son capaces de metabolizar a la cafeína originando la aparición de sus principales metabolitos (teobromina y teofilina), lo cual se observó desde las 2 primeras horas de cultivo.

Para determinar el papel de la cafeína en la expresión de lesiones inducidas por el vanadio, se realizaron cultivos de linfocitos a partir de donadores clínicamente sanos, y se trataron con pentóxido de vanadio (2, 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ ) en combinación con la cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ). En ambos casos las sustancias fueron agregadas a tres diferentes tiempos de cultivo, 0, 24 y 48 h considerando todas las combinaciones de tiempos para las dos. Por otro lado se realizaron los mismos tratamientos con vanadio, sin embargo la cafeína se adicionó en el periodo S/G2 del primero ó S/G2 del segundo ciclo de división. A las 72 h se realizó la cosecha y se obtuvieron las laminillas con cromosomas mediante la técnica convencional para tinción diferencial de cromátidas hermanas (ICHs) y se evaluó la frecuencia de ICHs, el índice de replicación (IR) y el índice mitótico (IM).

Cuando evaluó el IM se encontró que este tiende a disminuir ( $p < 0.05$ ) en todos los casos, mientras que el IR mostró un comportamiento similar. La frecuencia de ICHs mostró un incremento en ( $p < 0.05$ ) los cultivos en los que el vanadio (4 y 6  $\mu\text{g/ml}$ ) estuvo presente durante 24 h y la cafeína por 24 ó 48 h.

De igual manera se obtuvo un aumento ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de ICHs cuando el vanadio (6  $\mu\text{g/ml}$ ) estuvo presente en el medio durante 48 h y la cafeína se adicionó en la fase de S/G2 del primer ciclo (43 h de iniciados los cultivos) ó cuando la cafeína fue adicionada en S/G2 del segundo ciclo (a las 67 h), desde la concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio. Cuando el vanadio estuvo presente por 24 h y la cafeína se agregó en S/G2 de la primera o de la segunda división se observó un incremento ( $p < 0.05$ ) de los ICHs en las dos concentraciones más altas.

Los datos obtenidos permiten concluir que el  $\text{V}_2\text{O}_5$  es citotóxico, lo mismo que la combinación vanadio más cafeína la cual también resulta ser genotóxica. Por otro lado se observa que el  $\text{V}_2\text{O}_5$ , tiene una vida media como inductor de lesiones al ADN no mayor de 24 h y que tales lesiones no se acumulan. Esto último sugiere una rápida acción del vanadio y de los mecanismos de reparación, aunque se cree que la cafeína interfiere con ellos durante un periodo corto de tiempo y es posible que posteriormente sea alguno de sus metabolitos.

Finalmente se propone que los ICHs inducidos en el segundo ciclo de división celular son debidos a la acción del vanadio sobre al ADN durante la fase de S, provocando posiblemente un aumento en su duración normal, como consecuencia de esto y por acción de la cafeína en la fase G2, (donde se da uno de los puntos de control genético del ciclo celular o *checkpoint*), se favorece un acortamiento de la duración normal de la misma fase, rebasando la capacidad de la célula de reparar las lesiones inducidas previamente por el vanadio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABSTRACT

The caffeine's metabolic behavior as its the role in lesions-expression induced by vanadium pentoxide was evaluated in human lymphocytes cultures.

We made different assays to determinate caffeine metabolism *in vitro*. In the first group we applied caffeine since the beginning at the cultures, the harvest time was 2 and 72 hours later. A second group was treated with caffeine 24 h after the beginning and then the harvest was at 26 and 72 h. Finally the last group treated was with caffeine 48 h after cultures beginning and the harvest time at 50 and 72 h. Then cells were sonicated, centrifuged and the homogenated supernatant of tissue was injected into the high performance liquid chromatography (HPLC). The results were compared with single blood as control and standards: theobromine, 1,7-dimethylxanthine, theophylline,  $\beta$ -hidroxietiltheophylline and caffeine.

The results shown that human lymphocytes are capable to metabolize caffeine in two main metabolites: theobromine and theophylline since the first 2 h.

Lymphocytes cultures were prepared from non-smoking healthy males, 28-30 years old, to determinate the caffeine role in the expression of lesions induced by vanadium. These cultures were treated with vanadium (2, 4 and 6  $\mu\text{g/ml}$ ) in combination with caffeine (20  $\mu\text{g/ml}$ ) at different times of treatment (72, 48 and 24 h). At the same times were treated with vanadium plus caffeine in the first and second S/G2-phases of cell cycle divisions (43 and 67 h). The slides were made for differential staining of sister chromatid exchanges (SCE). SCE frequency, replication index (RI) and mitotic index (MI) were analyzed.

Comparing the experimental groups with the controls, the MI and RI decreased ( $p < 0.05$ ). In lymphocytes cultures treated at different times with  $\text{V}_2\text{O}_5$  plus caffeine, SCE frequency increased ( $p < 0.05$ ) at 6  $\mu\text{g/ml}$  dose when the  $\text{V}_2\text{O}_5$  was added 24 h after the culture beginning and the caffeine at 43 h. With caffeine treatments at 67 h, the frequency increase too ( $p < 0.05$ ) at 4 and 6  $\mu\text{g/ml}$ . When vanadium was present the last 24 h to lymphocyte cultures and the caffeine at 43 or 67 h (in S/G2 of first o second cell cycle division), the sister chromatid exchange frequency increased ( $p < 0.05$ ) in the two highest doses and caffeine treatments.

The results suggest that the vanadium pentoxide is cytotoxic with or without caffeine. However, in combination with caffeine was genotoxic. By other hand the vanadium pentoxide has half-life around 24 h to induce DNA lesions, it means early damage and very efficient repair mechanisms where caffeine act in approximately 2 h and maybe later a caffeine's metabolite. According to some authors and taking into account data presented here, its possible that, the induction of SCE's in the second cell cycle division was due to a shortening of G phase induced by the caffeine (produce a jump of G2 checkpoint) with a possible increase in the length of S phase caused by vanadium treatment.

# 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los elementos en la biosfera son metales. Cada año se extraen millones de toneladas de metales de las minas y subsecuentemente se dispersan en la biosfera (aire, suelo, agua). La definición más útil de metal desde el punto de vista toxicológico, es la que se basa en las propiedades de los iones en solución acuosa: un metal es un elemento que bajo condiciones biológicas significativas puede reaccionar, perdiendo uno o más electrones y formar así un catión (Vouck, 1990).

Los metales, aunque algunos son micronutrientes esenciales en muchos organismos, en altas concentraciones son tóxicos, debido a que la mayoría de ellos tienen a formar complejos con las moléculas orgánicas, cuando se fijan y se acumulan en los tejidos (Villanueva *et al.*, 1988). Aunque el término esencial está basado en la observación de un estado deficiente de ciertos metales que conduce al retraso en el crecimiento y aparición de malformaciones en varias especies de animales y vegetales en las cuales, dicho estado puede ser revertido por la administración del metal del que se carece (Elinder *et al.*, 1988).

En los mamíferos, el sodio (Na), el potasio (K), el cobre (Cu), el cobalto (Co), el magnesio (Mg), el molibdeno (Mo) y el zinc (Zn), pueden ser considerados como esenciales, mientras que otros como el cromo (Cr), el níquel (Ni) y el vanadio (V), así como los metaloides arsénico (As) y selenio (Se), se consideran elementos esenciales para al menos alguna especie de mamíferos. En contraste, elementos como el cadmio (Cd), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg) y aún el As, son notablemente tóxicos y causan efectos adversos en los mamíferos (Kazantzis *et al.*, 1986).

La exposición ocupacional a metales está restringida a niveles permisibles los cuales reflejan ampliamente el potencial toxicológico de cada elemento, mientras que la exposición ambiental a metales pesados (todos los mencionados anteriormente excepto el arsénico) está asociada también a un amplio rango de efectos tóxicos. Desgraciadamente, no se tiene gran conocimiento de estos elementos y compuestos, ni de los efectos clínicos que éstos producen, pero se sabe que causan enfermedades ocupacionales prevalentes y graves, tanto en países desarrollados como en subdesarrollados (Sharma y Talukder, 1987).

En relación a lo anterior no es raro que dentro de los elementos considerados como muy peligrosos tanto por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), como por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos estén los metales, ya que con el tiempo se ha demostrado ampliamente su toxicidad y los efectos adversos que producen sobre los organismos (Ortiz Monasterio *et al.*, 1987). Además de su gran potencial toxicológico algunos metales como el Cr, el Pb, el Ni, el Zn, el Cd y el Hg son capaces de inducir mutaciones y alterar el proceso reproductivo (ECETOC, 1983; Villanueva *et al.*, 1988). La mayoría de los organismos muestran poca estabilidad y adaptabilidad a elevadas concentraciones de estos elementos (Deknudt y Deminnatti, 1978).

En relación con los efectos carcinogénicos de los metales tenemos que, un agente químico considerado como carcinógeno puede iniciar los cambios malignos por acción directa o por una variedad de mecanismos indirectos, sin embargo el único mecanismo común conocido está relacionado con reacciones electrofílicas las cuales hacen que estos elementos sean capaces de reaccionar con varios centros neutrofilicos en las células, como son los ácidos nucleicos y las proteínas, acciones que poseen los compuestos metálicos. La hipótesis actual plantea la iniciación química del cáncer, lo cual implica mecanismos genéticos y epigenéticos (Miller y Miller, 1981).

Pocos metales parecen ser de acción directa o carcinógenos finales, mientras que algunos otros pueden actuar como promotores, posiblemente modificando la susceptibilidad de la célula a otros carcinógenos. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la carcinogénesis química no esta bien entendida.

A partir de estudios epidemiológicos, tres de los metales han sido inequívocamente considerados como carcinógenos en humanos, estos son: el Ni, el Cr y el As, sin embargo no se han realizado estudios de este tipo para los otros metales, por lo que existe una gran carencia de datos en carcinogénesis humana. Hay algunas evidencias recientes no concluyentes, de que el Cd, y posiblemente también el berilio (Be), puedan ejercer un efecto carcinogénico en el hombre ya que pruebas de laboratorio han mostrado inducir cáncer en animales, aunque, las condiciones de exposición no son comparables con las del humano. Algunos otros metales como el Co, el fierro (Fe), el Pb, el manganeso (Mn), el platino (Pt), el titanio (Ti), y el Zn han inducido tumores en animales, pero las dosis usadas han sido diferentes de cualquier situación de

exposición humana conocida (Kazantzis y Lilly, 1986). Hasta el momento no se tienen datos claros del vanadio y sus efectos en el proceso carcinogénico (Sabbione *et al.*, 1991). Desafortunadamente, la mayoría de las sociedades no tienen conocimiento del peligro que encierran estos elementos, el riesgo de su empleo es muy alto y aunque su uso es indispensable para la vida diaria en muchos casos es desmedido y sin control, por lo que en la actualidad una de las necesidades inmediatas es la de incrementar el estudio de los efectos tóxicos, mutagénicos, reproductivos y carcinogénicos de los metales tanto a nivel de laboratorio como a nivel epidemiológico y darlos a conocer para tratar de eliminar en lo posible este problema.

## 1.1 VANADIO

El vanadio pertenece al grupo Vb de los metales de transición, dentro de los cuales se incluye el niobio (Nb) y el tantalio (Ta) (Phillips *et al.*, 1983), aparece en la naturaleza en forma combinada en los estados de oxidación  $-1$ ,  $0$ ,  $+2$ ,  $+3$ ,  $+4$  y  $+5$ , y se encuentra además en forma de isótopo  $V^{50}$  y  $V^{51}$  (Baroch, 1983; Phillips *et al.*, 1983).

Aunque el vanadio no es un contaminante común en el ambiente, se pueden encontrar grandes cantidades de éste en el medio por efecto del uso de combustibles de tipo fósil como el petróleo y de elementos como el carbón que se utilizan para la obtención de energía, esto da como resultado la acumulación de vanadio en el ambiente, produciéndose así un gran impacto en la salud humana (Sabbioni *et al.*, 1983). La forma más común del vanadio en la extracción, comercialización y como desecho es la pentavalente (como pentóxido de vanadio), también ésta es la forma más tóxica para los mamíferos (Hansen y Stern, 1984).

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

Los efectos del vanadio y de sus compuestos se han estudiado en varias especies y es importante señalar que la mayoría de los estudios que se han efectuado, han utilizado

pentóxido de vanadio Este compuesto se ha administrado por inhalación o intragástrico y recientemente se describen estudios hechos con este metal donde se administra por vía intraperitoneal (Roschin, 1967; Roschin, 1968; WHO; 1988, Roldán, 1992; Altamirano, *et al.*, 1993, Sakurai, 1994, Zhong; *et al.*, 1994).

La toxicidad del vanadio en animales de experimentación depende principalmente de la especie y la vía de administración. En general, la toxicidad es menor cuando el metal es administrado por la vía oral, moderada cuando es por vía respiratoria y alta cuando se aplica por vía parenteral (WHO, 1988). La toxicidad de este elemento también varía considerablemente con la naturaleza del compuesto, el vanadio es tóxico ya sea como catión o como anión, y se sabe que la toxicidad se incrementa de forma directamente proporcional a su valencia, de tal forma que el  $V^5$  es el más tóxico. Entre los óxidos de vanadio, el pentóxido de vanadio es el más soluble y es más tóxico que el trióxido o dióxido (WHO, 1988).

El vanadio presenta varios estados de oxidación y frecuentemente forma polímeros (Nechay, 1984). En fluidos biológicos (pH de 4 a 8) el estado de oxidación predominante es  $VO_3^-$  (estado de oxidación  $+5$ , vanadato), mientras que en las células el vanadato puede ser reducido a  $VO^{2+}$  (estado de oxidación  $+4$ , vanadilo). Se ha descrito que en tejidos de ratas inyectadas con vanadio en estado de oxidación  $+5$ , sólo se encuentra la forma de oxidación  $+4$ . Esta última forma es la que representa el estado de oxidación más estable para el vanadio. Casi todos los complejos de  $V^{+4}$  se derivan a partir de los iones vanadilo ( $VO^{2+}$ ). En el estado de oxidación como en  $V_2O_3$ , el vanadio es completamente básico y es un agente reductor fuerte que es atacado lentamente por el agua, libera iones  $H^+$  y da como resultado  $V^{+4}$  (Waters, 1977).

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



## 1.2 CINÉTICA DEL VANADIO

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

Los datos sobre la excreción de vanadio son limitados. No obstante se sabe que la vía urinaria es la ruta predominante para la eliminación de este compuesto cuando ha sido absorbido. En los trabajadores ocupacionalmente expuestos, la cinética de eliminación está influenciada por el grado de exposición (Kawai *et al.*, 1989).

## 1.3 EFECTOS TOXICOLÓGICOS

Los efectos tóxicos en órganos blanco durante la exposición ocupacional a cenizas y gas de vanadio, pueden ser irritación aguda en el tracto respiratorio lo cual finalmente desarrolla rinorrea, epistaxis, disnea y bronquitis asmática aguda (Alessio *et al.*, 1988). Los efectos aparecen algunas horas después de cumplir con la jornada laboral y desaparecen en algunos días. No hay consenso de cómo estos efectos pulmonares del vanadio llevan de forma progresiva a la bronquitis crónica y al enfisema después de que la exposición cesa.

El vanadio también causa efectos gastroentéricos tales como náusea, vómito y dolor abdominal. Es frecuente observar en trabajadores expuestos a altas concentraciones de vanadio que la lengua toma una coloración verde, registrándose en ellos, alteraciones de tipo eczema o urticaria generalizada (Elinder *et al.*, 1988).



## 1.4 EFECTOS MUTAGÉNICOS

Se conoce poco sobre las interacciones del vanadio con el ADN (ácido desoxirribonucleico) así como su posible acción carcinogénica y su efecto sobre el proceso reproductivo en el humano (WHO, 1988), aunque se ha descrito que en animales de laboratorio este metal en forma de metavanadato se acumula en la placenta y es excretado en la leche (Hansen y Stern, 1984; Graedel *et al.*, 1986; WHO, 1988).

*In vitro* el vanadio  $5^+$  dependiendo de la concentración presente en el medio, tiene efectos estimulantes e inhibitorios de la síntesis del ADN, (WHO, 1988, Sabbioni *et al.*, 1983), mientras que en cultivos de linfocitos humanos no incrementa la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's) (Sun, 1987; Roldán y Altamirano, 1990; Roldán, 1992). En los ensayos realizados para mutaciones letales dominantes, los resultados obtenidos para el pentóxido de vanadio parecen ser negativos (Sun, 1987).

Sun y colaboradores (1987), así como Roldán y Altamirano (1990), señalan que en cultivo de linfocitos humanos tratados con diferentes concentraciones de  $V_2O_5$  no hay incremento en la frecuencia de ICHs. Así mismo Zhong y colaboradores (1994), evaluaron la frecuencia de ICHs en cultivos de células V79 tratadas con  $V_2O_5$  (1,2,3, y 4  $\mu\text{g/ml}$  por 24 horas y con bromodesoxiuridina) y encontraron que tampoco hubo un incremento significativo en las concentraciones probadas, sin embargo Owusu-Yau *et al.*, (1990), utilizando cultivos de células de hámster Chino evaluaron los efectos de tres sales de vanadio, y los resultados mostraron un ligero incremento en la frecuencia de ICHs sin encontrar una relación con la dosis. Por su parte Altamirano y colaboradores (1993 y 1996), indican que cuando se trataron ratones macho de la cepa CD-1 con  $V_2O_5$  (5.75, 11.5 y 23 mg/Kg), no se modificó la frecuencia de ICHs en células de médula ósea.

Estudios realizados en *Allium cepa* mostraron que los iones vanadato son capaces de inhibir la formación de la placa celular lo que induce la aparición de células binucleadas (Navas *et al.*, 1986); mientras que en los ensayos bacterianos, compuestos como el  $VOCl_2$ ,  $V_2O_5$ , y el  $NH_4VO_3$  dan resultados positivos moderados de daño directo al ADN (Kanematsu *et al.*, 1980). Sin embargo el metavanadato de amonio es fuertemente

mutagénico para *Salmonella typhimurium* TA1535. Mientras que en los ensayos con *Salmonella*, cepas TA1535, TA1537, TA98 ó TA100, el pentóxido de vanadio da resultados negativos (WHO, 1988). Aunque en ciertos estudios se demuestra que el pentóxido de vanadio aplicado por vía subcutánea o por inhalación incrementa la frecuencia de micro núcleos en ratones de la cepa 615, no se observan los mismos efectos en la cepa Kunming albina (Sun, 1987).

En pocos trabajos se han descrito los efectos del vanadio en células de mamífero *in vitro*. El trabajo de Cande y Wolniak (1980) ha destacado los efectos citogénéticos en los cuales los compuestos de vanadio pueden inhibir los movimientos cromosómicos hacia los polos. El óxido de vanadio, el sulfato de vanadilo y el metavanadato de amonio, han mostrado ser clastogénicos en células del ovario de hámster Chino (CHO), con una alta incidencia de aberraciones cromosómicas e ICHs (Owusu-Yaw *et al.*, 1990). Así mismo se ha mostrado, que el pentóxido de vanadio no incrementa la frecuencia de aberraciones estructurales ni de ICHs en cultivo de linfocitos humanos, sin embargo sí hay un aumento en la frecuencia de células poliploides y en las células con asociaciones de cromosomas satelitados (Roldán y Altamirano, 1990).

La toxicidad de los compuestos de vanadio depende de su forma química. Sabbioni y colaboradores en 1991 mostraron el potencial carcinogénico de compuestos de vanadato en la línea celular BALB/3T3, mientras que el sulfato de vanadilo mostró sólo efectos citotóxicos, pero no la capacidad de inducir transformaciones malignas.

Por su parte Migliore y colaboradores en 1993, evaluaron en linfocitos humanos la genotoxicidad de cuatro compuestos de vanadio, metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ), metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y sulfato de vanadilo ( $\text{SVO}_5$ ). Estos compuestos no incrementaron la frecuencia de aberraciones estructurales, pero sí se encontró un aumento en las aberraciones numéricas, micronúcleos y asociaciones de satélites. A partir de estos resultados se intentó relacionar un posible mecanismo de acción del vanadio como un veneno del huso mitótico. Así mismo, la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) fue aplicada la prueba de micronúcleos de linfocitos humanos, por medio de una sonda de ADN alfoide, específico para centrómero. Las cuatro sales de vanadio mostraron un incremento significativo (mayor al 68%) de micronúcleos con señal positiva (presencia

del cromosoma completo con centrómero), en todas las dosis probadas, lo que confirma el potencial aneuploidógeno del vanadio.

Se ha descrito que el vanadio es capaz de afectar los procesos normales de síntesis del ADN (Sabbioni *et al.*, 1991) interfiriendo al mismo tiempo con otras moléculas involucradas en el metabolismo celular, como el motor que impulsa el movimiento cromosómico (Migliore *et al.*, 1993). Por su lado Cohen, (1992), mostró que el vanadato requiere 24 horas para inducir una respuesta citotóxica dosis dependiente. La entrada del  $\text{VO}^{3-}$  (vanadato) a la célula, es más rápida dentro de las primeras cuatro horas de exposición (Sabbioni *et al.*, 1991), encontrando una detoxificación citoplásmica que ocurre por la reducción del ion vanadilo (tetraivalente), que es el menos tóxico o por la formación de complejos con algunos ligandos celulares. Posteriormente hay una transferencia del vanadio presente en el citoplasma a la fracción nuclear y a los diferentes organelos celulares.

En los trabajos efectuados previamente en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la FES-Zaragoza, utilizando linfocitos humanos tratados con pentóxido de vanadio se encontró que no se incrementa la frecuencia de aberraciones estructurales ni de ICHs pero si aumenta significativamente la frecuencia de células poliploides y disminuye el índice mitótico (Roldán y Altamirano, 1990; Altamirano *et al.*, 1998), sin embargo cuando los cultivos fueron tratados con pentóxido de vanadio en combinación con cafeína se observó un incremento en la frecuencia de ICHs, (Roldán, 1992, Roldán *et al.*, 1997), existiendo una relación entre el tiempo de tratamiento con la cafeína y el incremento de los ICHs.

## 1.5 CAFEÍNA

La característica más importante de la cafeína, es su influencia en ciertos efectos biológicos inducidos por mutágenos como las radiaciones o los agentes alquilantes. La cafeína amplifica el daño cromosómico producido por estos agentes tanto en células animales como en células vegetales, debido a que evita que las células dañadas puedan reparar las lesiones producidas, por lo que favorece la formación de estas aberraciones a partir de lesiones inducidas principalmente por agentes S-dependientes (González-Fernández *et al.*, 1985; Kesavan y Natarajan, 1985). Los efectos mutagénicos, co-mutagénicos y anti-mutagénicos mostrados por la cafeína han despertado un gran interés, debido a su amplio uso.

La cafeína es el principal componente del café, té, chocolates, y muchos refrescos, principalmente los de cola, así como de analgésicos y otros fármacos (Pollart *et al.*, 1987). Además sirve como fungicida, herbicida e insecticida, para las plantas que la producen (Shin *et al.*, 1990). Su consumo es elevado entre un gran número de personas.

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

La cafeína es un ingrediente en muchos fármacos prescritos como: los estimulantes, analgésicos para el dolor de cabeza y resfriados, tabletas para el dolor menstrual, para el control de peso y diuresis (US Food and Drug Administración, 1980). La cafeína se usa en una variedad de fármacos orales, frecuentemente en combinación con analgésicos tales como la aspirina, paracetamol (IARC, 1990), fenacetina (IARC, 1987) y propoxifeno, para dolores de cabeza y dolor menstrual, con tartrato de ergotamina para el tratamiento de migrañas en combinación con algunos antihistámnicos para contrarrestar sus efectos soporíferos (Gennaro, 1985; Griffith, 1989, McElvoy, 1989; Consumers Unión, 1990; US Pharmacopeial Convention, 1990). La cafeína (como

citrato de cafeína) ha sido usada por vía intravenosa en el tratamiento de apnea neonatal (McElvoy, 1989), para control de síntomas asmáticos y en espasmos bronquiales (Stavric, 1988)

## **1.6 DISTRIBUCIÓN Y METABOLISMO DE LA CAFEÍNA**

La cafeína puede ser detectada en todos los fluidos del cuerpo y puede pasar a través de las membranas biológicas. Pasa también la barrera hematoencefálica y la placenta. En humanos, únicamente del 0.5 al 2% de la ingesta de cafeína es excretada sin cambio por la orina. Así mismo la absorción de la cafeína por el tracto gastrointestinal es rápida y completa en humanos, el 99% de la dosis administrada es absorbida en 45 minutos aproximadamente (Daly, 1993).

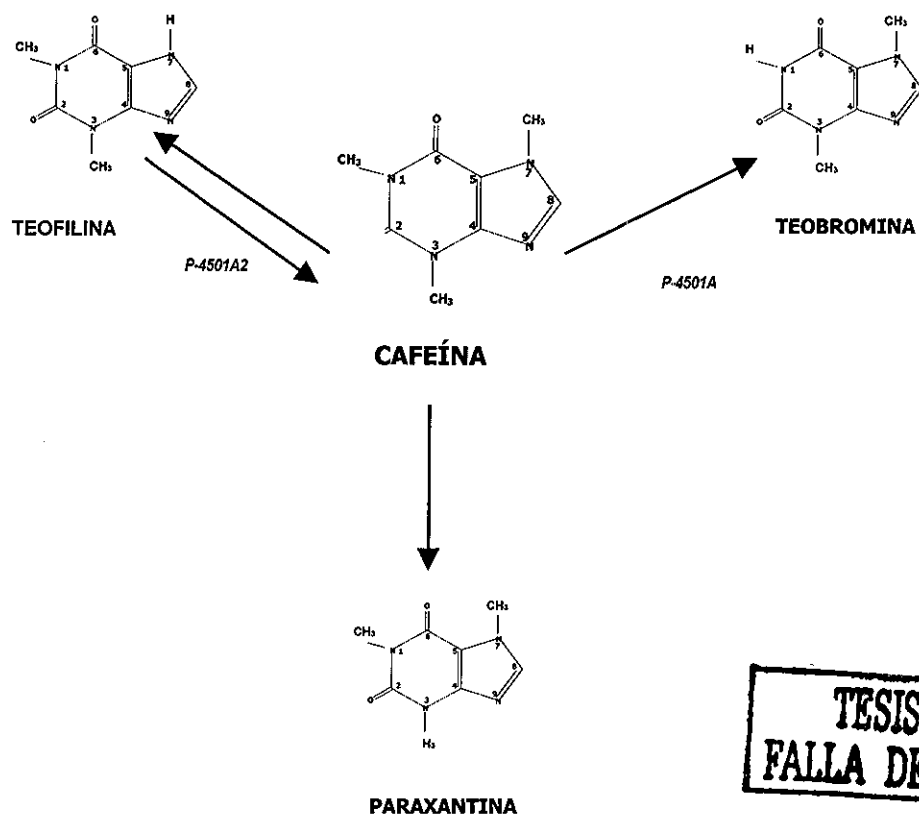
La cafeína es eliminada en animales por biotransformación en el hígado a dimetilxantina, ácidos dimetil y monoetilúrico y derivados del uracilo, aunque hay diferencias en la formación y eliminación de los metabolitos en diferentes especies de mamíferos (ratas, ratones y hámster Chino) (Arnaud, 1985). En monos la cafeína es completamente metabolizada a teofilina (Gilbert *et al.*, 1985, 1986). Sin embargo Nolan y Kidder (1979) sugieren que los linfocitos humanos pueden no ser capaces de metabolizar la cafeína.

En humanos después de la ingesta de la cafeína, los metabolitos tales como teofilina, teobromina, y paraxantina son detectados en los fluidos del cuerpo. Las concentraciones de teofilina y teobromina en el plasma se incrementan en pequeña proporción. En contraste las concentraciones de paraxantina son diez veces más altas que la teofilina y la teobromina. Las concentraciones de cafeína en el plasma decrecen más rápidamente que la paraxantina, a pesar de las diferencias interindividuales, las concentraciones de la paraxantina son más altas que las de la cafeína después de ocho a diez horas de la administración. Este perfil metabólico en plasma, caracteriza a todas las especies animales, la teofilina es el principal metabolito de la cafeína en el plasma de monos, mientras que en ratas la paraxantina, teofilina y teobromina están presentes en cantidades similares. La cafeína, se metaboliza por enzimas

microsómicas hepáticas y no se ha demostrado la contribución por otros órganos (Arnaud y Welsh, 1980; Grant *et al.*, 1987; Berthou *et al.*, 1989).

En la Figura 1, se presentan las vías metabólicas de la cafeína, la teofilina y la teobromina en el hombre. Después de la ingestión de 1 g de teobromina, el principal producto de excreción que se encuentra en la orina de dos sujetos, expresado como porcentaje de la dosis, es 7-metilxantina (28-30%), 3-metilxantina (14-21%), y teobromina sin cambio (11-12%). También se excreta una pequeña cantidad de ácido 7-metilurico (3-4%), lo cual sugiere que la demetilación ocurre más rápidamente en la posición 3 que en la 7 (Cornish y Christman, 1957).

Estudios en animales han sugerido que la cafeína induce algunas formas del citocromo P-450 y que puede inducir su propio metabolismo. La inducción del metabolismo de la cafeína ha sido demostrado en animales pretratados con 3-metilcolantreno y naftoflavona (Aldrige *et al.*, 1977; Aldrige y Neims, 1979; Wietholtz *et al.*, 1981; Bonati *et al.*, 1982). El fenobarbital prácticamente no tiene efecto sobre la eliminación de la cafeína. Se mostraron efectos similares del 3-metilcolantreno y fenobarbital en cultivo de hepatocitos humanos (Ratanasavanh *et al.*, 1990).



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FIGURA 1** Metabolitos primarios de la cafeína en el hombre.

La inducción de la desmetilación por 3-metilcolantreno, originando paraxantina y teobromina, correlacionó significativamente, pero no para la formación de la teobromina, lo que sugiere que al menos dos isoenzimas de la familia P-450IA están implicadas. En otro estudio se estableció que la demetilación de la posición 3 (3-demetilación) de la cafeína fue catalizada por el citocromo humano P-450IA2 (Butler *et al.*, 1989). Esta enzima no participa en las desmetilaciones N-7 y N-1 de la cafeína las cuales son mediadas al menos parcialmente por otras enzimas P-450 (Berthou *et al.*, 1991). Las vías metabólicas muestran desmetilaciones múltiples y separadas, oxidación del carbono 8 (C-8) y formación de uracilo en humanos y roedores. Esta transformación ocurre en los microsomas del hígado excepto para la oxidación del C-8 de la 1-metilxantina en ácido 1-metilúrico, la cual está mediada por la xantina oxidasa. La biotransformación reversa de teofilina a cafeína fue descrita inicialmente en infantes prematuros tratados en el manejo de apnea. En los bebés tratados con teofilina, la acumulación de cafeína es debida a la inmadurez de las enzimas microsómicas



hepáticas que corresponden únicamente a una tercera parte del nivel adulto normal (Aranda *et al.*, 1979). En adultos, la cafeína producida a partir de la conversión de teofilina a cafeína es metabolizada extensivamente y ha sido evaluada en un 6% de la dosis de teofilina (Tang-Liu y Riegelman, 1981) El metabolismo de Teofilina a Cafeína ha sido mostrada en rata, pero la importancia cuantitativa de esta vía no se ha establecido (Arnaud, 1993).

El metabolismo de cafeína rinde productos demetilados farmacológicamente activos como la teofilina, la paraxantina, la teobromina y las monometilxantinas. Además son formados metabolitos de anillos oxidados inactivos (uratos) y anillos abiertos (uracilos). Las rutas metabólicas para la cafeína son especie específicas. En humanos, el 70% del producto del metabolismo son paraxantinas, la cual es también metabolizada en 1- y 7- metilxantinas, aunque también se forman teofilina y teobromina, mientras que el 5% lo constituyen el anillo oxidado y el anillo abierto. En contraste con los humanos, la teofilina puede ser el principal metabolito en otras especies, por ejemplo, únicamente el 60% del metabolismo es por vía de la demetilación en la rata, en contraste con el 95% en humanos (Daly, 1993).

## **1.7 METABOLISMO DE CAFEÍNA DE CÉLULAS EN CULTIVO**

Las enzimas que metabolizan diferentes tipos de farmacos están distribuidas en tejidos hepáticos y extrahepáticos como el cerebro, riñón y pulmón (Wheeler *et al.*, 1990; Hedlund *et al.*, 1998). Se han identificado y incluso caracterizado los P450 y las enzimas de conjugación en muchos tejidos, mientras que su distribución en el tejido sanguíneo ha recibido poca atención debido a la dificultad que esto implica.

En cultivo de células humanas y de ratón la cafeína es metabolizada por desmetilación: en la exposición de 1 a 3 h con una concentración milimolar de cafeína marcada, se vió que más del 90% de los productos consistían en moléculas marcadas del metabolismo y menos del 10% era aún cafeína. Los grupos metilo son transferidos y utilizados en la síntesis *de novo* de timina, guanina y adenina en los ácidos nucleicos. La cafeína es metabolizada de forma similar en fibroblastos normales, de Lesch-Nyhan, de xeroderma pigmentosum, células HeLa, células de ratón silvestre y células deficientes en adenina fosforribosil-transferasa (Goth y Cleaver, 1976). Sin embargo

otros autores como Nolan y Kidder (1979), sugieren que los linfocitos humanos posiblemente no son capaces de metabolizar cafeína.

### **1.8 EFECTOS GENÉTICOS Y CELULARES DE LA CAFEÍNA**

En relación con los efectos de tipo genético que presenta la cafeína y/o sus metabolitos, en las células B-16 de melanoma de ratón Kolb y Mansfield (1980), establecieron que la teofilina inhibió la síntesis del ADN, redujo el crecimiento celular, elevó los niveles intracelulares de AMPc y sus potenciadores en otras líneas celulares. La inhibición de la síntesis del ADN se asume como un efecto secundario del incremento en los niveles de AMPc, resultado de la inhibición de la fosfodiesterasa del AMPc por la teofilina. Se sabe que el AMPc inhibe el crecimiento celular y el transporte de metabolitos, también participa en la inhibición por contacto, la formación de las estructuras del citoesqueleto e incrementa la adhesividad celular (Rajaraman y Fulker, 1984).

Por otro lado, los efectos celulares de las metilxantinas en células tratadas con agentes mutagénicos se pueden resumir de la siguiente forma (Roberts, 1984):

- 1) Invierte el efecto de los agentes que inducen disminución en la síntesis de ADN.
- 2) Cambia el efecto de agentes que inducen inhibición de la iniciación del replicón.
- 3) Disminuye el tamaño de los replicones (aún en ausencia del ADN dañado)
- 4) Inhibe la elongación del ADN naciente.
- 5) Inhibe de forma tiempo-dependiente la nueva cadena del ADN.
- 6) Induce rompimientos de doble cadena del ADN de forma tiempo-dependiente.
- 7) Inhibe la escisión de la base dañada.
- 8) Induce la síntesis protéica.
- 9) Previene el retraso de la fase S y arresto de G2 (inducción de mitosis prematuras)

Se sabe que la cafeína es metabolizada por la función oxidasa de la fracción microsomal hepática (Arnaud y Welsh, 1980). Se puede incrementar la actividad enzimática en la metabolización del fármaco, en dosis altas (75 mg/Kg de peso corporal). Sin embargo, los estudios *in vitro* no mostraron inducción o inhibición de la actividad de las enzimas microsomaes después de seis días de tratamiento con una dosis oral de 37.5 mg/Kg de peso de cafeína (Aeschbacher y Wurznner, 1975).

## **1.9 LA CAFEÍNA COMO POTENCIADORA DE DAÑO INDUCIDO AL ADN POR AGENTES QUÍMICOS**

Existen muchos trabajos en la literatura que describen a la cafeína como un agente que es capaz de amplificar el daño genotóxico producido por muchos agentes físicos o químicos. La cafeína (1mM) ha sido utilizada para inhibir la reparación del daño cromosómico producido por la mitomicina-C en linfocitos humanos (Okoyoma y Kitao, 1981) y también para amplificar el efecto de la luz UV en células de *Xeroderma pigmentosum* a una concentración de 0.1 mM, concentración que no afecta a las células normales (Tohda y Oikawa, 1988). También se sabe que la cafeína en altas concentraciones actúa sobre la cadena sencilla del ADN (desnaturalizado) y se une preferencialmente en regiones ricas en A-T, induce ligeros incrementos de Intercambios de ICHs en linfoblastos de pacientes con *Xeroderma pigmentosum* y aumenta la expresión de sitios frágiles en pacientes con fragilidad heredable (Timson, 1977; IARC, 1991)

Se ha observado que la cafeína actúa como modulador de químicos mutagénicos y carcinogénicos como la N-metil-N-nitrosourea (MNU) ó la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) aplicados en *Salmonella typhimurium*, antes, durante o después del tratamiento, en donde la cafeína en combinación con alguno de los mutágenos produce una amplificación significativa del daño, lo cual se atribuye a la inhibición de alguno de los mecanismos específicos de la reparación del ADN (Samson *et al.*, 1988; IARC, 1991; Balansky, 1992).

Se sabe que la cafeína y otras xantinas metiladas tienen efectos pleiotrópicos en muchos organismos y en los sistemas de cultivo de células. Estos efectos incluyen mutagénesis, inducción de aberraciones cromosómicas, inhibición de la reparación post-replicativa en células de mamífero irradiadas con luz UV, alteración de la frecuencia de mutaciones inducidas por radiaciones o agentes químicos, reducción de la carcinogénesis de piel inducida por la UV, incremento *in vitro* de la transformación inducida por químicos carcinógenos y modificación de los niveles del AMP-cíclico. Todos estos efectos muestran que la cafeína puede interactuar con el material genético, pero los mecanismos moleculares no están bien entendidos. Algunos efectos pueden ser mediados por la cafeína por sí misma, mientras que otros pueden estar mediados por sus productos metabólicos y los efectos encontrados en los propios animales

pueden implicar diferentes vías bioquímicas (Goth y Cleaver, 1976, Nolan y Kidder, 1979).

Se han descrito varios mecanismos de acción de la cafeína sobre los sistemas biológicos de prueba. La cafeína tiene la capacidad de:

*(a) Incorporarse en los sitios dañados del ADN.* Hay evidencias de que la cafeína puede ser integrada en sitios dañados del ADN (Lehmann, 1972) y de esta forma las enzimas de reparación ya no son capaces de reconocer el daño y participar en la restauración de la estructura del ADN.

*(b) Realizar modificaciones conformacionales del ADN.* Lang en 1975 presentó evidencias de que los sitios de reconocimiento para las enzimas de reparación son modificados por inserción de las moléculas de la cafeína dentro del ADN cambiando la estructura tipo-B.

*(c) Permite una desactivación de la inhibición de la división celular inducida por radiación en la replicación.* Painter (1980b) atribuyó la interacción entre el daño de la radiación y la cafeína como un incremento en el número de sitios activos de inicio de los replicones en presencia de cafeína, evitando un alargamiento de la fase-S producida por la radiación, impidiendo que la célula cuente con suficiente tiempo para los procesos de reparación.

*(d) Desactivar el bloqueo de la fase G2 inducida por la radiación.* Existen numerosos trabajos que describen que la cafeína reduce el tiempo en G2 de las células que son irradiadas. (Scaife, 1971; Boynton *et al.*, 1974; Walters *et al.*, 1974; Snyder *et al.*, 1977; Tolmach *et al.*, 1977; Busse *et al.*, 1978; Tomasovic y Dewey, 1978; Kimler *et al.*, 1982, Lucke-Huhle, 1982; Lucke-Huhle *et al.*, 1983). Así mismo, se ha descrito que la cafeína juega un papel crucial en los procesos de fosforilación de las proteínas. El principal efecto de la cafeína es una reducción en el tiempo disponible para la reparación antes de que finalmente se fije el daño durante la mitosis.

*(e) Interfiere con la reserva de elementos precursores del ADN.* La cafeína inhibe la síntesis *de novo* y utilización de purinas adicionales exógenas, así como la síntesis de nuevas pirimidinas (Waldren *et al.*, 1983).

(f) *Inhibe de manera directa las enzimas de reparación del ADN.* Frecuentemente, se ha especulado que la cafeína puede afectar directamente enzimas de reparación específicas (Kihlman, 1977). Los mecanismos fueron identificados por Selby y Sancar (1990a,b) en *Escherichia coli*, y explican al menos el mecanismo de inactivación de las enzimas de reparación por escisión.

La cafeína tiene una estructura química similar a las purinas del ADN (Kligerman *et al.*, 1988). Bloquea los receptores de adenosina, inhibe la fosfodiesterasa del AMP-cíclico; se une a una de las cadenas del ADN, modifica la distribución intracelular de calcio e inhibe la actividad de la poli (ADP)-polimerasa, la topoisomerasa II y las fosforilasas (IARC, 1991). Todas estas acciones pueden ser sumadas a uno o varios procesos celulares importantes incluyendo: la reparación del ADN (escisión, fotorreactivación y el post-replicativo) y la división celular (Selby y Sancar, 1990a,b; IARC, 1991; Rowley, 1992). Algunos estudios han mostrado que la cafeína puede afectar el metabolismo de los precursores del ADN (Haynes *et al.*, 1984), así como inhibir las enzimas que participan en el metabolismo de las purinas y pueden por lo tanto alterar la proporción normal de la reserva de los precursores del ADN, y esto inducir errores en el apareamiento de las bases.

Se ha descrito que la cafeína también puede inhibir tanto la síntesis *de novo*, como la utilización exógena de purinas. La fidelidad de la replicación se ve afectada relativamente por una disminución en las concentraciones de desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs). Debido a ambos desbalances en el aporte de los dNTPs y a una disfunción en el sistema de reparación se producen las mutaciones, las aberraciones cromosómicas y los ICHs en células de mamífero en cultivo (Reichard, 1988; IARC, 1991).

## 1.10 INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS

Muchos compuestos catalogados como mutágenos-carcinógenos (Shiraishi y Sandberg, 1980) y los clastógenos no mutagénicos (Hori, 1981; Madle *et al.*, 1981; Oikawa *et al.*, 1980) son capaces de inducir ICHs en células humanas y su actividad inductora es aproximadamente paralela a su actividad mutagénica en sistemas de prueba bacterianos (Giri *et al.*, 1979; Tucker y Preston, 1996; Donovan *et al.*, 1997; Giri y Mukhopadhyay, 1998; Eliopoulos y Mourelatos, 1998; Steiner y Kuempel, 1998). Sin embargo este hecho no significa necesariamente que todos los humanos respondan similarmente a un mutágeno o a un clastógeno particular, debido a que se sabe que la habilidad de los seres humanos para metabolizar estos agentes químicos y reparar el daño introducido por ellos es muy heterogénea. Como ejemplos extremos tenemos a las células del síndrome de Bloom y Xeroderma pigmentosum, donde ambas enfermedades predisponen al cáncer, muestran una frecuencia alta y espontánea de ICHs y son susceptibles a la inducción de éstos por luz ultravioleta (UV), (Chaganti *et al.*, 1974; De Weer-Kastelein *et al.*, 1977; Tucker *et al.*, 1993).

Los ICHs son el reflejo del daño al ADN, inducido por agentes químicos mutagénicos, carcinogénicos, ultrasonido, luz UV, radiación ionizante, desnutrición y temperatura entre otros (Kato, 1980; Ortiz y Betancourt, 1984; Morales-Ramírez *et al.*, 1987, 1988; Tsuji *et al.*, 1988; Barale, *et al.*, 1993; Gennart *et al.*, 1993; Lakhanisky *et al.*, 1993; Betancourt *et al.* 1992; Leonard y Gerber, 1994). Los ICHs, son transposiciones simétricas en el mismo *locus* entre las cromátidas de un mismo cromosoma, que no producen alteraciones estructurales, y su frecuencia es utilizada como un indicador de daño producido al material genético y su análisis ofrece la posibilidad de ensayos rápidos, sensibles y cuantitativos empleando dosis de 10 a 100 veces menores que las utilizadas para inducir aberraciones cromosómicas (Sivikova y Dianovsky, 1995; Donovan *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que para dar origen a un intercambio de doble hebra de ADN entre cromátidas hermanas, es necesario que la célula pase por la etapa de síntesis del ciclo celular y que el sitio para la formación de los ICHs este confinado a la horquilla de replicación (Kato, 1980), mientras que Schvarztman y colaboradores (1979), proponen que la inducción de ICHs aumentaba durante la replicación del ADN debido a la presencia de lesiones no reparadas. Estas evidencias indican que la etapa en la que se

producen los intercambios en las cromátidas hermanas es durante la síntesis del ADN, ya que es el momento en que las zonas homólogas de las cadenas nacientes del ADN se encuentran más cercanas, permitiendo que se lleven a cabo dichos intercambios de manera simétrica y equivalente a nivel molecular, lo que significa un menor costo de energía para la célula que si ocurriera después de la fase de síntesis del ADN, ya que implicaría un sistema de reconocimiento y de asociación de las moléculas del ADN ya duplicadas. (Figura 2 a y b).

Painter en 1980(a) propuso, que los ICHs son el reflejo de errores en la síntesis, e involucran rompimiento y reunión del ADN en loci homólogos de las cromátidas, como resultado de una mala replicación de la hebra molde de ADN dañado, probablemente por recombinación o pérdida de velocidad de la horquilla de replicación. Los intercambios de los dos filamentos entre las dos moléculas de ADN posiblemente ocurren por alguna de las tres siguientes vías: 1) Un intercambio entre cromátidas que han sido rotas independientemente en sitios homólogos; 2) Un sistema de reparación que opera durante la replicación del ADN y 3) Un error en la replicación del ADN. Sin embargo, el mecanismo molecular responsable para el intercambio todavía no se conoce (Knuutila, 1979; Iannuzzi *et al.*, 1991; Morales-Ramirez *et al.*, 1995b; Tucker y Preston, 1996).

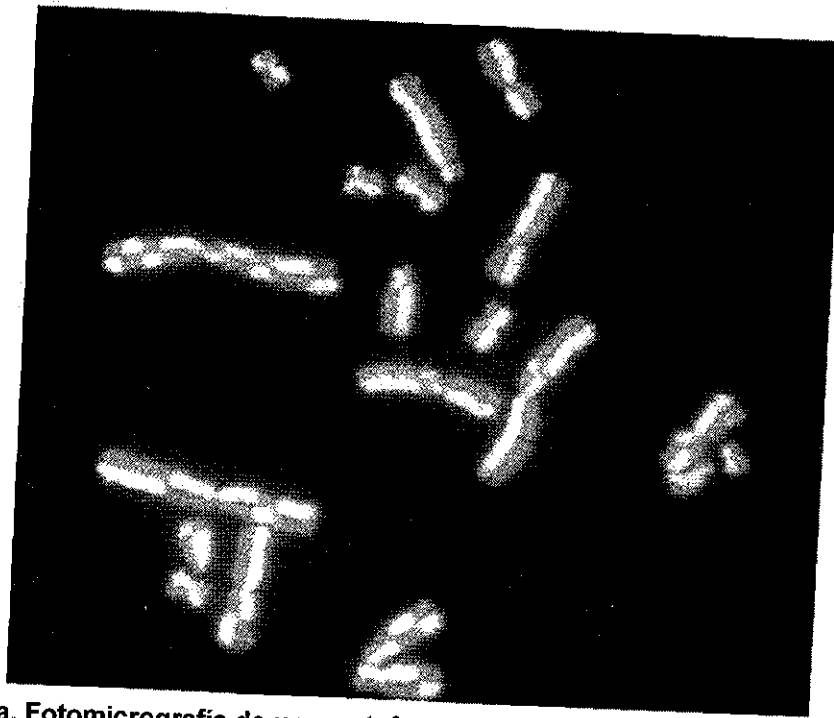


FIGURA 2a. Fotomicrografía de una metafase con tinción diferencial que muestra los intercambios de cromátidas hermanas (Klug y Cummings, 1996).

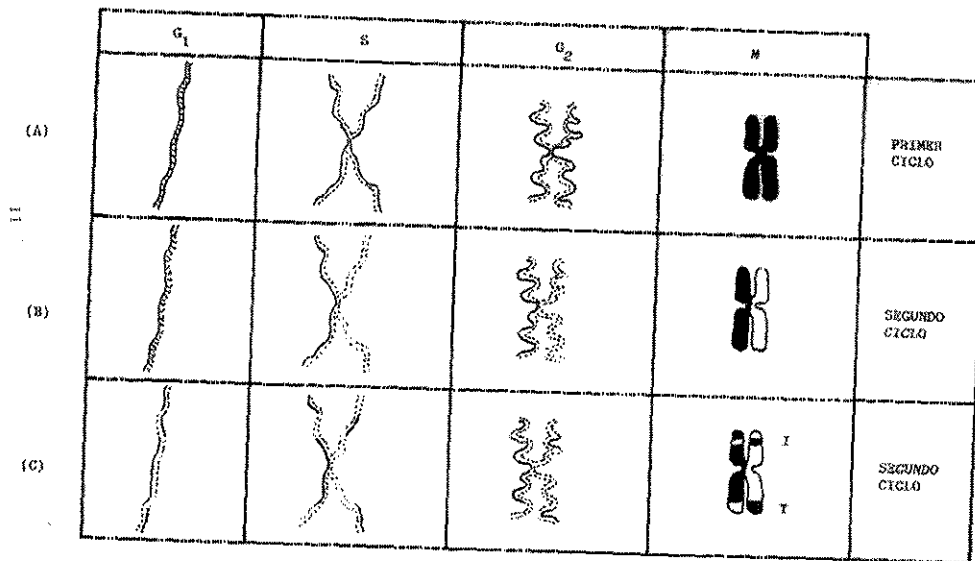


FIGURA 2b. Incorporación de Brdu (-----) en cromosomas de linfocitos humanos durante dos ciclos de Replicación: (A) primer ciclo, (B) segundo ciclo, (C) segundo ciclo mostrando un intercambio terminal (T) e intersticial (I).



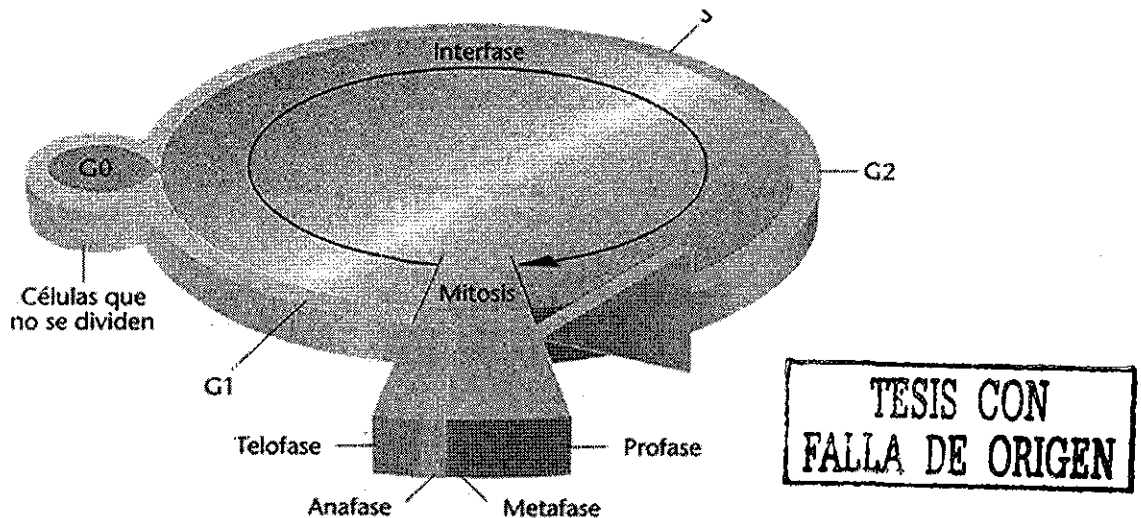
Por muchos años la prueba de ICHs ha sido considerada como una de las técnicas más sensibles para detectar daño por exposición a agentes mutagénicos, quizás más que la de aberraciones cromosómicas (Hartmann *et al.*, 1995; Siviková y Dianovsky, 1995). A pesar de que los mecanismos de formación y su significado biológico no han sido establecidos, es claro que las lesiones inducidas en el ADN durante su duplicación conducen a la aparición de ICHs, pueden diferir en origen (Cortés *et al.*, 1994) y seguir varios caminos, de modo que: 1) las lesiones pueden perderse por muerte celular, 2) diluirse mediante la división de las células precursoras, o por reparación del ADN (Kligerman *et al.*, 1988), sin embargo se sabe que un porcentaje de estas lesiones en el ADN, capaces de inducir ICHs, pueden persistir en algunos casos a través de generaciones celulares sucesivas (Cortés *et al.*, 1994; Daza *et al.*, 1992; Morales-Ramírez *et al.*, 1995a,b).

### **1.11 CICLO CELULAR Y SU CONTROL GENÉTICO**

El estudio de la división y el ciclo celular fue posible principalmente con el desarrollo del microscopio en el siglo XVII, seguido por el desarrollo de la Teoría Celular en el siglo XIX (Ford, 1998). Pero desde 1953 Howard y Pelc demostraron que la síntesis de ADN ocurre en un período discreto entre mitosis y se le denominó fase S. El período previo a la fase S fue denominado como Gap (hueco) 1 (G1) el período posterior a S y antes de la mitosis fue denominado Gap 2 (G2) (Baserga, 1985). Es decir el ciclo celular fue dividido en cuatro fases distintas G1, S, G2 y M (mitosis) (Howard Y Pelc, 1953; Baserga, 1985). Poblaciones de células viables y metabólicamente activas que no se están dividiendo, como las células diferenciadas, se dice que están en G0. (Figura 3).

Rao y Johnson en 1970 realizaron experimentos fusionando células que estaban en diferentes fases del ciclo celular. Cuando las células en fase S se fusionaron con células en G1 o G2, el núcleo en fase G1 entraba en síntesis de ADN prematura, mientras que el núcleo en G2 se bloqueó hasta que el núcleo en fase S completó la replicación de su ADN. No así en el caso en que se fusiona células en S con células en fase de G2. Sin embargo resultó que la célula en G2 re-replicó su ADN. Estos resultados indican que: 1) las células en fase S tienen un factor promotor de la síntesis (SPF), 2) las células en G2 son resistentes a los efectos del SPF, y 3) las células en

fase S contienen factores que inhiben la entrada a mitosis hasta que el ADN se ha replicado completamente.



**Figura 3. Representación esquemática de las fases de un ciclo celular típico. Después de la mitosis (M), la célula inicia un nuevo ciclo G1). Las células pueden no dividirse (G0) o continuar por G1, viéndose reforzadas a comenzar la síntesis de ADN (S) y completar el ciclo (G2 y M). Después de la mitosis se producirán dos células hijas. (Klug y Cummings, 1999).**

En experimentos similares, las células en metafase (M) fusionadas con células en cualquier punto de la interfase originaron células con la membrana nuclear fragmentada y condensación prematura de la cromatina de estas últimas, demostrando que las células en M poseen un factor promotor de la mitosis (MPF) que es transdominante con respecto a todas las células interfásicas. Es claro entonces que las células en división presentan factores que actúan a través del ciclo celular asegurando un orden progresivo a lo largo del mismo, que también se encargan de que cada evento ocurra en el tiempo correcto y que no sea inapropiadamente repetido u omitido.

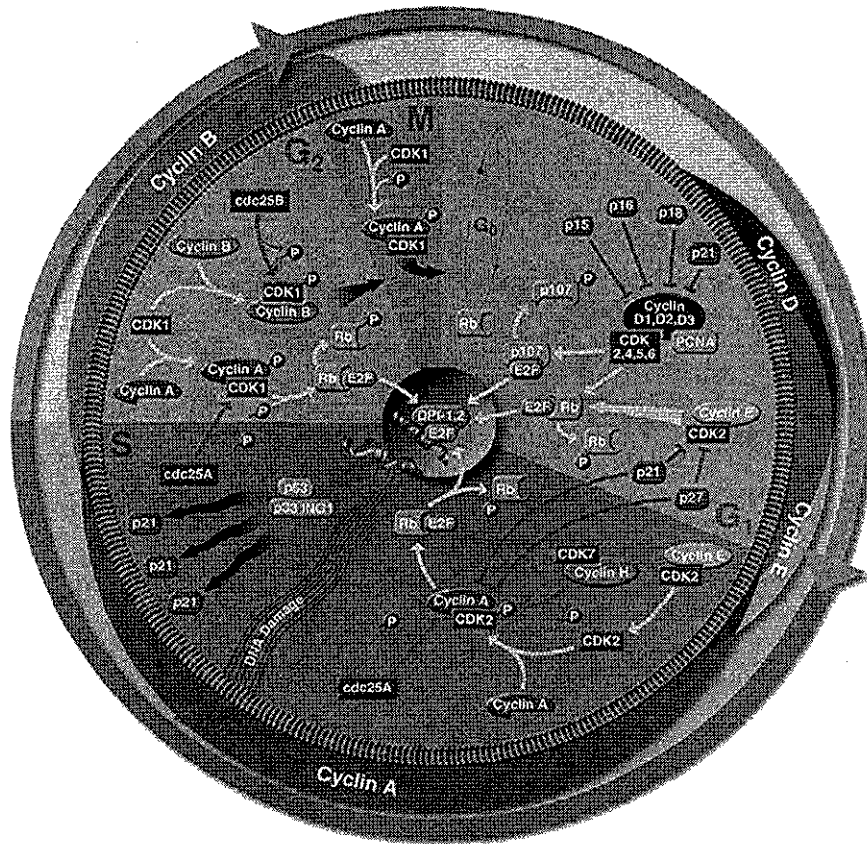
Otra área importante en el estudio del ciclo celular es la permanencia de la integridad del genoma y la habilidad de las células para reparar el ADN dañado antes de su replicación y de la mitosis, ya que si esto no fuera así resultaría en muerte celular y/o acumulación de mutaciones (Kaufmann y Paules, 1996). Incluidas dentro de los mecanismos que las células utilizan para asegurar la integridad del genoma, están las

vías de sobrevivencia conocidas como control genético del ciclo celular (cell cycle checkpoints). La respuesta al control genético del ciclo celular ha sido considerada como una pausa inducida activamente en progresión a través del ciclo celular después de la exposición a agentes que causan daño. Esta pausa temporal se piensa que es para que las células reparen su ADN dañado antes de reiniciar el ciclo y completar la mitosis.

Después de los trabajos de Rao y Johnson (1970) con diferentes sistemas que incluyeron levaduras, moscas de la fruta, invertebrados marinos, anfibios y células de mamífero, se ha llegado a un mejor entendimiento de los MPF y SPF, los eventos moleculares que controlan la progresión del ciclo celular y las funciones del control genético. Punto central de lo anterior son las actividades de complejos protéicos formados por una subunidad protéica reguladora conocida como **ciclina** y una subunidad de proteína **quinasa** con actividad catalítica (referida como **quinasas dependientes de ciclinas**). Ambos el MPF y el SPF forman parte de estos complejos protéicos. Diferentes complejos ciclinas/quinasa (ciclina/cdk) son ensamblados y activados en puntos diferentes del ciclo celular (Iliakis, 1995; Nigg, 1995) (Figura 4).

### ***Ciclinas de la fase G1***

En G1 temprana, hay una serie de eventos moleculares que determinan si la célula entra al ciclo o permanece en G0. Lo predominante en esta G1 temprana es inducción de las ciclinas tipo D y la subsecuente fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb). Desde el inicio hacia la mitad de G1, si se retiran los factores de crecimiento externos resulta un rápido descenso de las concentraciones de la ciclina D y el paso a la siguiente fase del ciclo (Matsushime *et al.*, 1991). Al final de G1 ocurre un punto, referido como punto de restricción donde el que se retiren los factores externos de crecimiento hace que el bloqueo de la progresión falle y la célula es irreversiblemente llevada a proseguir el ciclo celular (Pardee *et al.*, 1978). Este punto de restricción se ha perdido en muchos de los tumores humanos (Levine *et al.*, 1991).



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**Figura 4.** Las ciclinas y las ciclinas dependientes de cinasas (cdks) son esenciales para el control del ciclo celular en eucariontes. Las ciclinas (subunidades reguladoras se unen a las cdks (subunidades catalíticas) para formar los complejos activos ciclincdk, (explicación en el texto). (Tomado de Pharmigen).

La ciclina D juega un papel importante en la continuidad de G1 a la fase S. Las ciclinas tipo D tienen una vida media relativamente corta de aproximadamente 20 min y rápidamente desaparecen cuando se remueven los factores de crecimiento o con la aparición de señales antiproliferativas (Matsushime *et al.*, 1991). En poblaciones celulares en donde las células se están dividiendo continuamente las concentraciones no cambian a largo del ciclo celular. Hay tres isoformas de ciclinas D, conocidas en

mamíferos (D1, D2 y D3). Cada tiene su propio patrón de expresión en diferentes tipos celulares (Motokura *et al.*, 1991; Kiyokawa *et al.*, 1992; Won, *et al.*, 1992; Ajchenbaum *et al.*, 1993). Las ciclinas tipo D normalmente se asocian con las kinasas 4 y 6 (Figura 4). Los complejos ciclina D/cdk4/6 funcionan en la fosforilación de la familia de proteínas pRb, esta y otras proteínas relacionadas actúan atrapando y por lo tanto inactivando numerosos factores que participan en la progresión del ciclo celular (Herwig y Strauss 1997). Los mejor caracterizados son la familia de proteínas 2F2, que están integradas por factores de transcripción los cuales se unen y secuestran formas hiperfosforiladas de pRb. En la fosforilación por el complejo ciclina D (cdk4/6, las proteínas E2F son liberadas y pueden ser asociadas con otras proteínas como la familia DP-1, para formar complejos que actúan como activadores transcripcionales para varios genes requeridos en la fase de S. Entre estos genes están los de: la timidina quinasa, la dihidrofolato reductasa, la ciclina E, la ADN polimerasa  $\alpha$ , el E2F1, el antígeno nuclear de la proliferación celular, la histona H2A y la Cdc2 (Dou *et al.*, 1991; Dyson, 1998).

La actividad de la ciclina E sigue a la actividad temporal de la ciclina A. La ciclina E se asocia con la quinasa 2 y tiene una mayor especificidad de sustratos que el complejo D/Cdk ya que es capaz de fosforilar una variedad de proteínas además de pRb (Dulic *et al.*, 1992; Koff *et al.*, 1992). Los complejos de las ciclinas D y E, parecen actuar cooperativamente en la fosforilación de pRb (Lundberg y Weingberg, 1998).

### **Ciclinas de la fase S**

La ciclina A aparece primero en G1 y aumenta durante la fase S, mientras ocurre la replicación del ADN, continua aumentando hasta G<sub>2</sub> y se degrada en la fase de M (Minshull *et al.*, 1990; Murray y Hunt, 1993, , Pines y Hunter, 1990). La ciclina A se requiere para la transición de la fase G1 a S, la progresión de S y la continuación de G2 a M. La ciclina A se asocia con Cdk2, Cdc2 (o Cdk1) (Pines y Hunter, 1990, Rosenblatt *et al.*, 1992). Hay evidencias que apoyan el hecho de que la actividad del complejo ciclina A/Cdk esta presente en ambas fases S y G2, mientras que la ciclina A/Cdc2 existe principalmente en G2. (Figura 4). El ensayo de quinasa *in vitro* ha mostrado que el complejo ciclina A/Cdk2 tiene actividad de quinasa en pRb y la histona H1, mientras que A/Cdc2 fosforila la histona H1 (Minshull *et al.*, 1990; Pines y Hunter,

1990). Se ha establecido que así como las ciclinas D y E, la A esta desregulada en algunos tumores humanos (Chao *et al.*, 1998).

### ***Ciclinas de la fase G2/M***

El paso de las células de G2 a Mitosis esta regulado por la ciclina A y por la ciclina B/Cdc2 como ya se mencionó. La ciclina B aparece primeramente en la fase S, se incrementa a través de G2 y se degrada durante la anafase (Figura 4). La ciclina B/Cdc2 alcanza su mayor actividad al final de G2 y así permanece hasta que se degrada (Pines y Hunter, 1989). La ciclina B/Cdc2 se ha identificado como el principal componente de MPF (Arion *et al.*, 1988; Gautier, 1990). En las células de mamífero se han caracterizado tres isoformas de la ciclina B: la B1, B2 y B3. Las ciclinas B1 y B2 son citoplásmicas hasta la transición G2/M, estas entran en el núcleo justo antes de que se rompa la envoltura nuclear (Pines y Hunter 1991, Li, *et al.*, 1997). La localización nuclear de las ciclinas B1 y B2 parece estar regulada en parte por la fosforilación y es requerida para la función normal (Li, *et al.*, 1997). La ciclina B3 parece ser nuclear, asociada con ambas Cdc2 y cdk2, y tiene similitudes con la ciclina A.

### ***La función del control genético del ciclo celular***

Bajo circunstancias normales el ciclo celular progresa sin interrupciones. Sin embargo si las ciclinas celulares sufren daño, las células usualmente tienen la capacidad de parar temporalmente en las fases G1, S, o G2, reparar el daño (sí es posible), y regresar al ciclo celular. Cuando el daño es severo, las células pueden alternativamente sufrir apoptosis o entran en el esto G0 de forma irreversible. Las vías moleculares que monitorean el movimiento a través del ciclo celular, inspeccionan el daño celular y generan una pausa en la progresión del ciclo celular si ocurrió el daño, son denominadas puntos de control (checkpoints) (Figura 5) (Hartwell y Weiner, 1989; Elledge, 1996). Estos frecuentemente implican cancelación en la actividad de las ciclinas/Cdk.

### **Control genético en fase G1**

Después del daño en G1 temprana a media, las células pueden retrasarse en G1 en el punto de control de esta fase (Figura 5). Esto depende del incremento de la expresión y activación de los productos génicos de p53 (Kastan *et al.*, 1991). El gen p53 ha sido caracterizado como un supresor de tumores ya que se ha encontrado mutado en más del 50% de los tumores humanos. El gen p53 tiene normalmente una vida media corta (aproximadamente 15 min), pero es inducido y activado a través de mecanismos postraduccionales en respuesta al ADN dañado (, Maltzman y Czyzyk, 1984; Kastan *et al.*, 1991). Agentes como la radiación ionizante (RI), la ultravioleta (UV), los agentes químicos radiomiméticos y el estrés oxidativo pueden también inducir a p53 (Kastan *et al.*, 1991).

### **Control genético en fase S**

La respuesta al control genético de la fase de la que menos se conoce es S comparada con G1 y G2. Similarmente a estas fases, la respuesta al control genético en S es estereotípica para una amplia variedad de daño al ADN (Kaufmann y Paules, 1996). Agentes carcinogénicos conocidos incluyendo la RI, la radiación UV-B y UV-C, el metil metano sulfonato, y el benzo(a)pireno, dañan al ADN y disparan la repuesta en fase S; así como algunos agentes quimioterapéuticos como la bleomicina, amsacrina, etc. La actividad de la ciclina A/Cdk2 se requiere para la progresión de la fase S y la síntesis de ADN (Figura 4). La RI suprime fuertemente la actividad de la ciclina A/Cdk2 (Beamish *et al.*, 1996). Sin embargo esta supresión no ocurre en células de individuos con ataxia telangiectasia (AT), indicando que el producto génico mutado de la AT el pATM puede ser un regulador en cascada de la actividad de la ciclina A/Cdk2 (Beamish *et al.*, 1996).

### **El control genético de la fase G2**

Agentes como la RI y el estrés oxidativo pueden disparar una respuesta al control genético en G2 (Figura 5) que resulta en un retraso en la activación de la ciclina B/Cdk2 en el límite de G<sub>2</sub>/M (Figura 4). Células tratadas con RI resultan en la

acumulación de Cdc2 fosforilado en los residuos 14-treonina/15 tirosina, lo que da como resultado la inhibición de la actividad de la ciclina B/Cdk2 (Loch y Ross, 1990a,b; Herzinger *et al.*, 1995; Paules *et al.*, 1995). La activación de la ciclina B/Cdc2 se da a través de la acción de la fosfatasa CDC25C la cual remueve los residuos fosforilados 14-treonina/15 tirosina (Gautier *et al.*, 1991; Strausfeld *et al.*, 1991). La hiperfosforilación de CDC25C correlaciona con un incremento en la actividad cercana a G2/M y esta hiperfosforilación no ocurre en las células arrestadas en G2 por daño al ADN. Similarmente, el complejo ciclina B/Cdc2 y CDC25C, el cual normalmente se asocia con G2/M, no así en las células con el ADN dañado (O'Connor *et al.*, 1994).

Existen otros niveles de regulación del control genético en G2. Como ya se mencionó, el complejo ciclina B/Cdc2 es citoplásmico en S/G2 y entra al núcleo al final de G2 (Pines y Hunter, 1991, Gallan y Nigg, 1992). El complejo B/Cdc2 es retenido en el citoplasma después del tratamiento con RI, sugiriendo que sus diferentes localizaciones pueden tener importancia en algún aspecto para la función del control genético en G2 (Smeets *et al.*, 1994, Toyoshima *et al.*, 1998), especialmente esta activo si la exposición es continua.

### **Control genético de la fase M**

El último punto de control se encuentra en la misma mitosis (Figura 5). En este punto se comprueba, antes de iniciarse la migración de los cromosomas en la anafase, tanto la formación correcta de las fibras del huso como su unión a los cinetocoros de las cromátidas. Si por alguna razón el huso no se ha formado completamente o no ha ocurrido un adecuado enganche, la mitosis se detiene, antes de la iniciación de la anafase (la separación de las cromátidas hermanas hacia los polos de huso mitótico) la célula verifica que todos los cromosomas estén propiamente alineados con las fibras del huso unidas a cada cinetocoro (Tyson, 1999, Molinari, 2000). Este punto de control parece estar regulado, no por un complejo Cdk-ciclina, sino más bien por enzimas proteolíticas específicas cuya producción se ha estimulado por el MPF (Klug y Cummings 1999).

Todavía no se ha clarificado completamente el mecanismo preciso mediante el cual el complejo Cdk-ciclinas y las moléculas que son fosforiladas funcionan para llevar a cabo



los controles discutidos anteriormente. No obstante se dispone de una gran cantidad de información que proporcionará las bases para una comprensión global de la regulación genética del ciclo celular. Estos conocimientos indudablemente proporcionarán información básica sobre la comprensión y tratamiento del cáncer (Klug y Cummings 1999)

### ***Las metilxantinas y la “anulación” del control genético***

Hipotéticamente las respuestas al control genético en G1, S y G2 es seguida por células dañadas ya sea para reparar el daño, particularmente del ADN, y alternativamente sufrir apoptosis o entrar en estado G0 permanente (Pardee et al., 1978; Murray y Hunt, 1993). En apoyo a esta hipótesis se tiene la habilidad de algunas metilxantinas, como la cafeína y la pentóxifilina para liberar los retrasos en los puntos de control en G1, S y G2 después de la exposición a RI y agentes alquilantes (Russell et al., 1995; Chang et al., 1997). Los tratamientos simultáneos de células con ambas metilxantinas y agentes que dañan al ADN realzan la letalidad de estos (Fingert et al., 1986; Russell et al., 1995). Por ejemplo, cuando células de hámster en G1/S se trataron con 0.5  $\mu$ M de mostaza nitrógenada, sobreviven el 90% mientras que el mismo tratamiento combinado con 2mM de cafeína resultó de 5 a 10 veces más letal (Lau y Pardee, 1982). Los mecanismos por los cuales se ejerce la acción de las metilxantinas sobre la supresión de los puntos de control no son claros, pero parece ser que están implicados los eventos que gobiernan la fosforilación de los residuos 14-treonina/15 tirosina sobre Cdc2, antes mencionados (Poon et al., 1996).

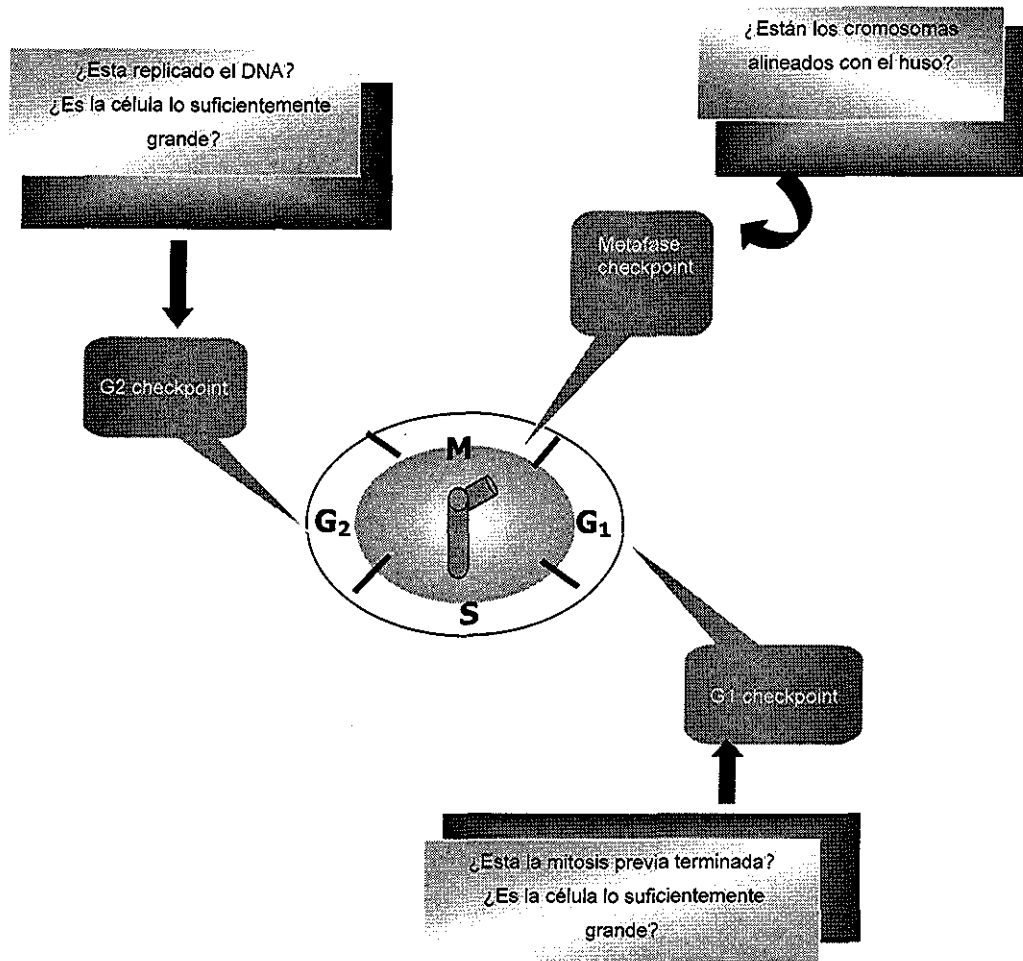


Figura 5. La regulación del ciclo celular es como el control de una lavadora de platos. El selector se gira en el sentido de las manecillas del reloj de un punto de control ("checkpoint") hacia el siguiente. Las fases del ciclo celular son como las fases de un ciclo de lavado: remojar, lavar, enjuagar y secar. El control de la lavadora tiene al menos un checkpoint, al final del ciclo, para asegurarse que la puerta se abra y se cierre (presumiblemente para sacar los platos limpios e introducir los sucios) antes de que comience el *nuvo* ciclo. El ciclo de las células embrionarias es a veces como una lavadora fuera de control, pasan varios ciclos de lavado aunque no haya ningún plato sucio en la maquina (Tayson, 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **1.12 LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO COMO SISTEMA DE PRUEBA**

Los linfocitos son muy pequeños con una alta proporción núcleo/citoplasma. Hay dos tipos de linfocitos, los T (dependientes del timo) y las células B (dependientes de la bursa o de la médula ósea). Los primeros están relacionados con la inmunidad mediada por células y los últimos con la inmunidad humoral. No se distinguen morfológicamente, pero pueden ser identificados en base a técnicas que denoten los marcadores de membrana (Watt y Stephen, 1986).

La materia extraña (antígenos) provoca dos tipos principales de respuesta inmune *in vitro*: los linfocitos T se sensibilizan con inmunoglobulinas, mientras que los linfocitos B producen anticuerpos libres. Después de la exposición a un apropiado antígeno, ambos linfocitos T y B tienen la capacidad de convertirse en células proliferantes con una apariencia inmadura (transformación blástica). Las células T son la mayoría (70%) y pueden ser divididas en los tipos cooperadores, supresores y citotóxicos. La diferenciación de linfocitos B humanos en células plasmáticas que secretan anticuerpos esta regulada por estos subgrupos de linfocitos T funcional y fenotípicamente diferentes. La identificación de las subpoblaciones de las células T se ha facilitado por la disponibilidad de anticuerpos monoclonales que reconocen varios antígenos de diferenciación de las células T. De aquí que la actividad mitótica de las células B implique a las células T y una complicada cooperación entre estos tipos es esencial para la competencia inmunológica (Watt y Stephen, 1986).

El ciclo celular promedio de los linfocitos es de aproximadamente 24 h. Donde G1 tiene una duración aproximada de 12 h y el tiempo promedio de la fase de síntesis (S) del ADN en éstas células es aproximadamente de 6 horas y G2 es de 4 h. Actualmente la mitosis (profase, metafase, anafase y telofase), tiempo durante el cual los cromosomas son visibles, es de aproximadamente una hora (Watt y Stephen, 1986).

Por su parte los estudios de individuos expuestos, y de células en cultivo, han mostrado que los linfocitos humanos de sangre periférica son un indicador extremadamente sensitivo de cambios en la estructura cromosómica inducidos tanto *in vivo* (Evans, 1982; Evans et al., 1979), como *in vitro* (Evans, 1970; Buckton y Evans, 1973). Dichos cambios en la estructura cromosómica ofrecen una evidencia morfológica de daño al material genético. A pesar de los problemas que existen en la

extrapolación de los resultados *in vitro* a la situación *in vivo*, los linfocitos ofrecen las siguientes ventajas como sistema de prueba:

1. Se obtiene fácilmente un gran número de células humanas: en pocos ml de sangre periférica que se extraen fácil y repetidamente de un individuo se obtienen por cada ml de  $1$  a  $3 \times 10^6$  linfocitos.
2. Los linfocitos se distribuyen en todo el cuerpo, circulando en todos los tejidos y una proporción tiene vida larga.
3. Virtualmente todos los linfocitos de sangre periférica son una población celular sincronizada en el mismo estado G0 o G1 de la interfase, y en individuos sanos, estas células no se encuentran en proliferación mitótica *in vivo*.
4. Una proporción de los linfocitos puede ser estimulada por mitógenos para inducirlos a la división en cultivo, son fácilmente cultivables y esto provee de una fuente rápida de células en división para la evaluación de parámetros citogenéticos como las aberraciones cromosómicas numéricas (ACN) y estructurales (ACE) y los intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), el índice mitótico (IM), la cinética del ciclo celular (CCC) el índice de replicación (IR), tasa de proliferación linfocítica (TPL), cromosomas satelitados asociados (AS), etc. (Roldán y Altamirano, 1990)

## 2. JUSTIFICACIÓN

En experimentos previos se ha mostrado que el pentóxido de vanadio no aumenta la frecuencia de ICHs, sin embargo cuando se combina con cafeína se obtiene un incremento en la frecuencia de este parámetro. Se sabe que la cafeína es un agente que inhibe los mecanismos de reparación post-replicativos y por escisión y amplifica el daño producido por agentes mutagénicos tanto físicos como químicos, por lo tanto el incremento en la frecuencia de ICHs es posible que se deba a la acción de la cafeína sobre los mecanismos de reparación, los cuales dependen de la fase del ciclo y del número de divisiones celulares en los que actúe la cafeína, expresándose de esta manera las lesiones producidas por el pentóxido de vanadio en forma de ICHs.

Por estos motivos y conociendo el hecho de que la cafeína presenta un consumo significativo entre las poblaciones, el presente trabajo pretende elucidar cuál es el mecanismo de acción de la cafeína y su papel en la expresión de lesiones inducidas por el pentóxido de vanadio en cultivo de linfocitos humanos y que son capaces de manifestarse como ICHs, así como caracterizar su comportamiento metabólico en los mismos cultivos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. HIPOTESIS

El pentóxido de vanadio es un agente metálico que no incrementa la frecuencia de ICHs en linfocitos humanos *in vitro*, sin embargo es capaz de producir lesiones en el ADN que son eliminadas rápidamente por los mecanismos de reparación de las células. La cafeína es un compuesto que inhibe los mecanismos de reparación por escisión y post-replicativos. Por lo tanto si cultivos de linfocitos humanos son tratados con  $V_2O_5$  y con cafeína en diferentes tiempos y etapas del ciclo celular, esta combinación favorecerá que las lesiones producidas por el vanadio se expresen como ICHs debido a la acción de la cafeína o alguno de sus metabolitos sobre los mecanismos de reparación.

### OBJETIVOS

#### Generales:

1. Estudiar el comportamiento metabólico de la cafeína en cultivo de linfocitos humanos.
2. Evaluar el papel de la cafeína en la expresión de lesiones inductoras de ICHs producidas por el  $V_2O_5$

#### Específicos:

1. Analizar el posible metabolismo de la cafeína en cultivos de linfocitos humanos.
2. Establecer la vida media de la cafeína en los cultivos de linfocitos humanos.
3. Estudiar el efecto del vanadio en la inducción de ICHs en diferentes ciclos de replicación.
4. Estudiar el papel de la cafeína sobre la frecuencia de ICHs inducida por el vanadio en diferentes etapas del ciclo celular y diferentes ciclos de replicación.

## 4. METODOLOGÍA

### **4.1 Cultivo de linfocitos humanos**

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

A las 24 horas de iniciados los cultivos, se les adicionó 0.1 ml de una solución de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma) en una concentración de 5 µg/ml. A las 70 horas se le adicionó 0.1 ml de una solución de colchicina en una concentración de 4 µg/ml (Merck) y se le dejó actuar 2 h.

Una vez transcurrido este tiempo los cultivos se centrifugaron a 1000 RPM durante 5 min y el paquete celular se sometió a un choque hipotónico con una solución de KCl (Merck), 0.075 M por 20 min a 37° C. Posteriormente se realizó otra centrifugación y las células se fijaron en una solución de metanol-ácido acético (3:1) (Merck), con tres cambios de la mezcla fijadora, 20, 15 y 10 min respectivamente. Se hicieron preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire.

### **4.2 Tratamientos**

**Lotes :** Por cada concentración utilizada se realizaron dos experimentos y cada uno por duplicado, contando con lotes testigo y tratados, distribuidos de la siguiente manera:

- 1) testigo
- 2) cafeína (20 µg/ml)
- 3) vanadio (2 µg/ml)
- 4) vanadio (4 µg/ml)

- 5) vanadio (6  $\mu\text{g/ml}$ )
- 6) cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ) + vanadio (2  $\mu\text{g/ml}$ )
- 7) cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ) + vanadio (4  $\mu\text{g/ml}$ )
- 8) cafeína (20  $\mu\text{g/ml}$ ) + vanadio (6  $\mu\text{g/ml}$ )

a) Para determinar el efecto del pentóxido de vanadio sobre la división celular y de la cafeína sobre los mecanismos de reparación del ADN, a las cero h (fase de adaptación) se adicionaron tres concentraciones de pentóxido de vanadio (2, 4 ó 6  $\mu\text{g/ml}$ ). La cafeína (Sigma, Co.) se adicionó a las cero, 24 y 48 h respectivamente. La bromodesoxiuridina (Sigma) se adicionó a las 24 h (Figura 6 A).

b) Para determinar el efecto del pentóxido de vanadio (Merck) sobre el primer ciclo de replicación, este se adicionó a las 24 h de iniciados los cultivos, a las mismas concentraciones. La cafeína (Sigma, Co) (20  $\mu\text{g/ml}$ ), se adicionó a las cero, 24 y 48 h de iniciados los cultivos (Figura 6 B).

c) Para determinar el efecto del pentóxido de vanadio en el segundo ciclo éste se adicionó a las 48 h de iniciados los cultivos y la cafeína en las condiciones antes mencionadas (Figura 6 C).

d) Para evaluar el efecto de la cafeína (Sigma Co.) en los mecanismos de reparación postreplicativos, esta se adicionó en G2 del primero ó del segundo ciclo de replicación, en cultivos tratados con pentóxido de vanadio a las cero, 24 y 48 h de cultivo. En todos los casos los cultivos se dejaron hasta completar 72 h (Figuras 7 A,B y C).

#### **4.3 Tinción diferencial de cromátidas hermanas (ICHs)**

Una vez hechas las preparaciones, se irradiaron con luz ultravioleta (UV) por 20 min sumergidas en una solución citrato salina 2XSSC (Cloruro de sodio 0.30M + citrato sodio 0.03 M) (Merck) Transcurrido este tiempo se incubaron por 20 min en una solución citrato salina 2XSSC, a 60° C. Finalmente las preparaciones se lavaron y tiñeron con una solución de Giemsa (Sigma) (1:10) en agua durante 10 min, después se lavaron en agua corriente y se dejaron secar al aire. Todas las evaluaciones se realizaron en doble ciego en un microscopio de campo claro.



El análisis de la frecuencia de ICHs se realizó en 50 metafases bien extendidas en segundo ciclo de duplicación. Se cuantificó el número y tipo de ICHs, considerando a los intercambios terminales como uno y a los intersticiales como dos (FIGURA 2b).

Para la determinación del Índice de Replicación (IR) se observaron al azar 100 células en metafase por tratamiento y se cuantificaron las células en primera, segunda y tercera divisiones sucesivas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IR = 1(M_1) + 2(M_2) + 3(M_3)/100$$

donde  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  son células en primera, segunda y tercera división respectivamente. En el caso del IM, se evaluaron 1000 células por tratamiento incluyendo células en división y en interfase, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$IM = \text{No. de células en división} / \text{No. Total de células} \times 100$$

#### ***4.4 Determinación de metabolitos de cafeína***

Los metabolitos de la cafeína se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la siguiente manera. Se realizó la siembra con una muestra de sangre periférica heparinizada de donadores clínicamente sanos, en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, Co. USA) suplementado con 1.5 ml de fitohemaglutinina (Sigma, Co. USA), durante cero, 24, 48 y 72 h a 37° C.

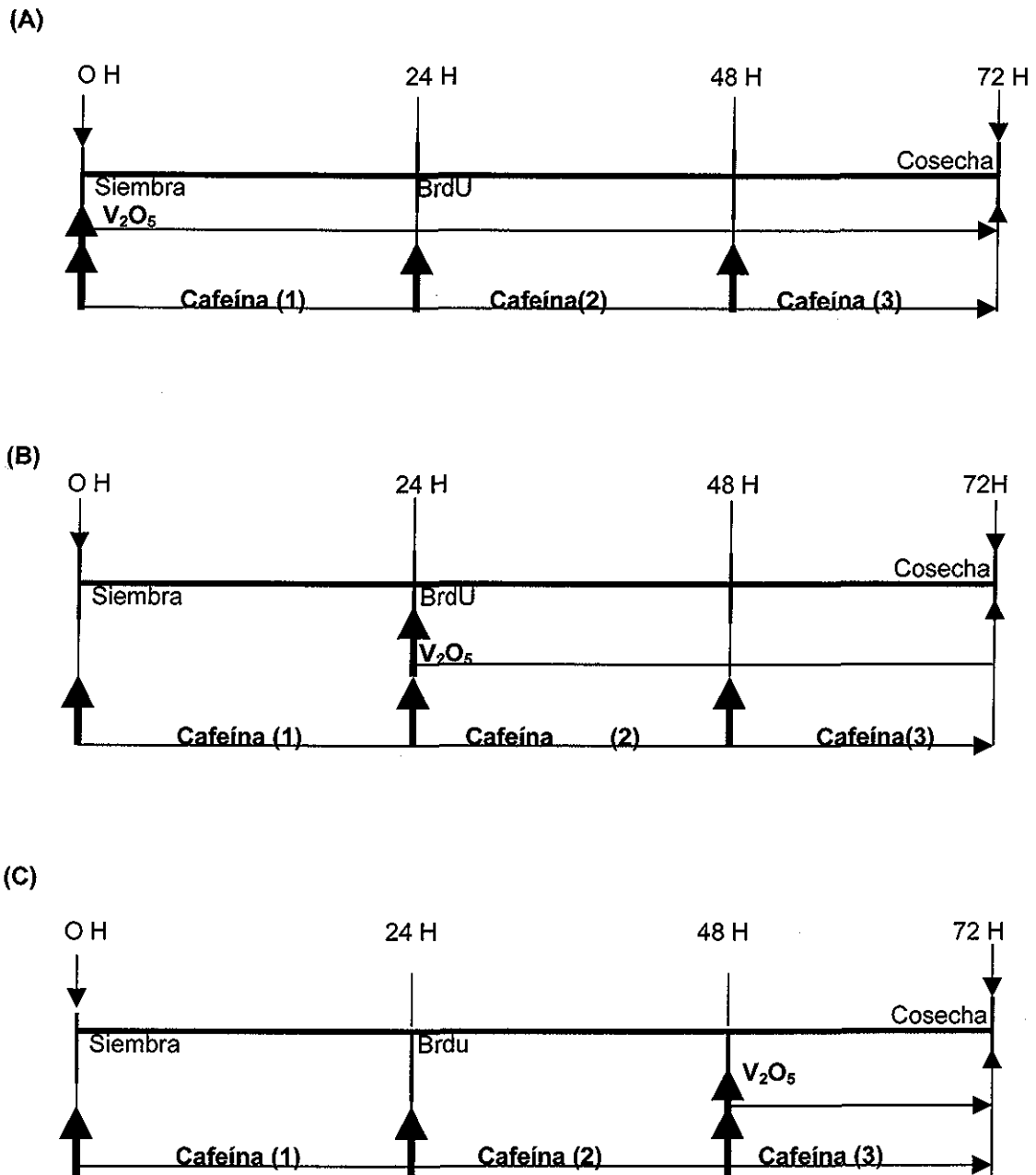
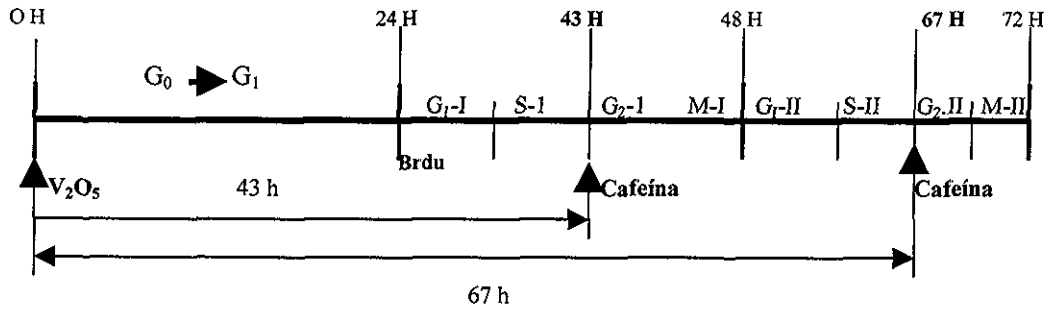
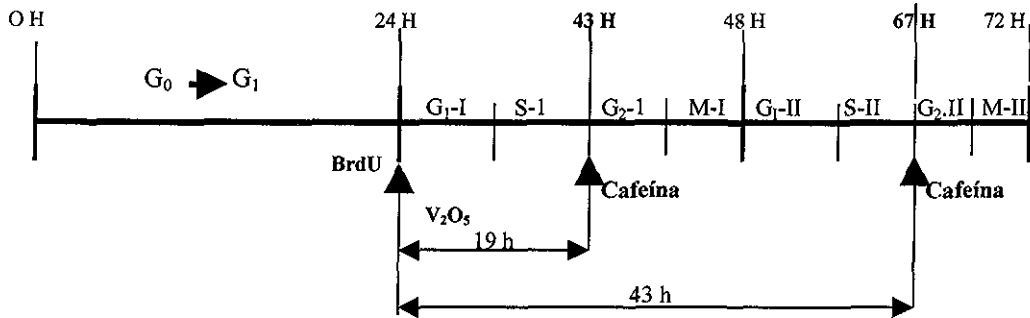


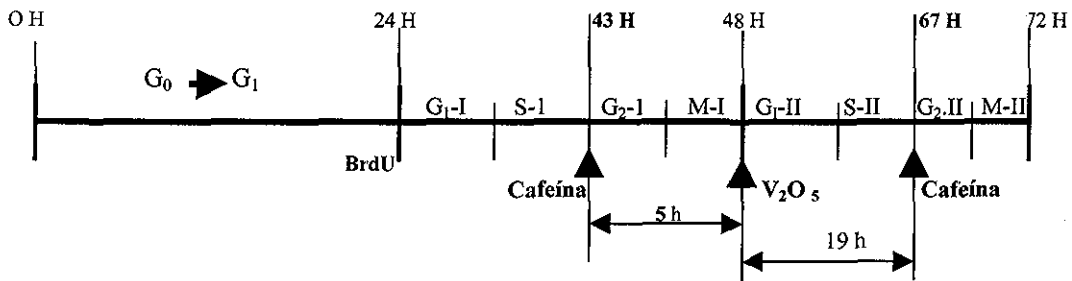
Figura 6. Diagrama de tratamientos de  $V_2O_5$  más cafeína a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h) en cultivo de linfocitos humanos *in vitro*.



(A)



(B)



(C)

Figura 7. Esquema de tratamientos: (A) primer tratamiento  $V_2O_5$  presente durante 72 h (0 de iniciados los cultivos) y cafeína a las 43 o las 67 h de cultivo. (B) segundo tratamiento:  $V_2O_5$  presente durante 48 h (aplicado a las 24 h de iniciados los cultivos) y cafeína a las 43 y 67 h de cultivo. (C) tercer tratamiento:  $V_2O_5$  presente durante 24 horas (aplicado a las 48 h de iniciados los cultivos y cafeína a las 43 y 67 h.

### ***Tratamientos:***

Los cultivos se dividieron en tres grupos y en todos los casos se realizaron dos experimentos y cada uno por duplicado, de la siguiente forma:

Grupo A: A todos los cultivos, se les adicionó cafeína a las cero h y los tiempos de cosecha fueron a las 2 y 72 h (Figura 8 A).

Grupo B: Se adicionó cafeína a las 24 h y los tiempos de cosecha fueron 26 y 72 h después del tratamiento (Figura 8 B).

Grupo C: La cafeína se agregó a las 48 h, y la cosecha se realizó 50 y 72 h después del tratamiento (Figura 8 C).

### ***Cosecha y tratamiento de la muestra para someterla a HPLC:***

La cosecha de cada uno de los tratamientos se realizó en los tiempos antes mencionados. Las muestras se sonicaron aproximadamente durante 30 seg. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 RPM durante 10 min, se desechó el botón y se trabajó con el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 1.5 ml y se filtró tres veces, la primera con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y las otras dos con 0.22  $\mu\text{m}$ . Después se realizó una dilución 1:9 con fase móvil, y finalmente se inyectó en el HPLC.

### ***Fase móvil***

Se preparó un amortiguador de fosfato de potasio de la siguiente forma: 94% de una solución 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH de 4.8, con agua grado HPLC, se ajustó el pH y se filtró tres veces a través de membranas (Millipore) de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ . Inseguida se degasificó en una corriente de Helio durante 10 ó 15 min; posteriormente se degasificó con vacío en el baño de ultrasonido (aproximadamente 10 min o hasta que desaparecieran las burbujas). Finalmente se preparó una solución (v/v) con acetonitrilo (4%) y tetrahidrofurano (2%) y de agua (96%) grado HPLC. Se filtró con membranas (Millipore) de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de cada uno y se llevaron a 1 ml con agua grado HPLC.

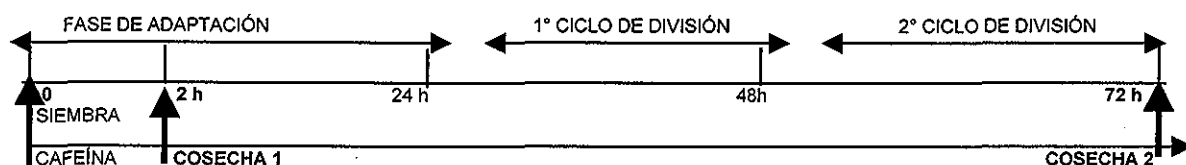
### ***Preparación de Estándares***

Los estándares utilizados fueron: cafeína, teobromina, 1,7-dimetilxantina, teofilina y  $\beta$ -hidroxietilteofilina (Sigma-Chemical Co.) las concentraciones utilizadas fueron 10 mg/10 ml de fase móvil, respectivamente. Primeramente se inyectó uno por uno y posteriormente se hizo una mezcla de todos. Se utilizaron los tiempos de retención (TR) para cada uno de los estándares por separado y en la mezcla. El método seguido fue el de estándar externo.

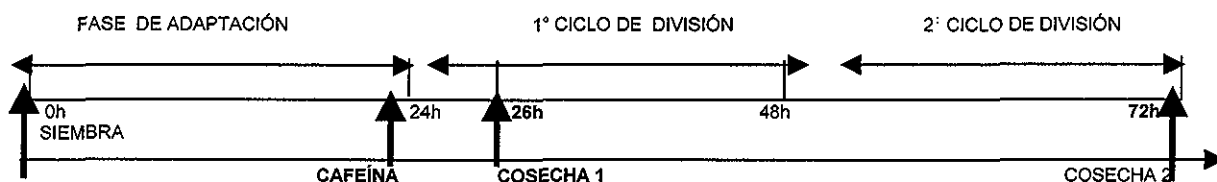
### ***Condiciones del HPLC:***

El HPLC (Perkin-Elmer) fue utilizado a temperatura ambiente, en el detector de luz ultravioleta (UV) se seleccionó la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm, la velocidad de flujo fue de 1.5 ml/min, 1500 P.S.I. (pound square inches), se utilizó una bomba isocrática y 0.2 A.U.F.S. (Absorbance units, full scale). El sistema de registro fue automatizado y se obtuvo la impresión de los cromatogramas.

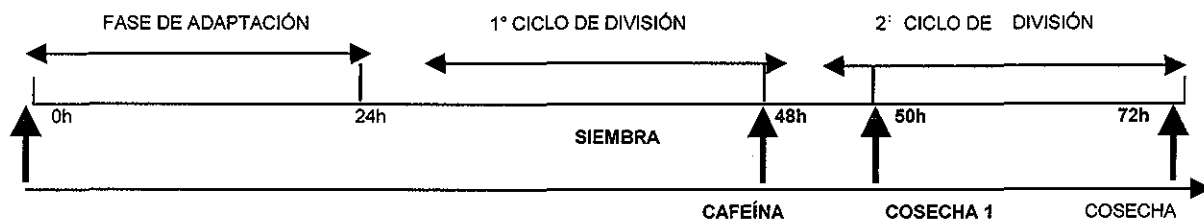
**(A) CAFEÍNA 0h**



**(B) CAFEÍNA 24h**



**(C) CAFEÍNA 48h**



2

Figura 8. Diagrama de tratamientos de cafeína para determinar su comportamiento metabólico en linfocitos humanos *in vitro*, mediante HPLC. (A) cafeína 0h, (B) cafeína 24h y (C) cafeína 48h. Con diferentes tiempos de cosecha a las 2, y 72h (tomando en cuenta el tiempo en que se trata con cafeína).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ÍNDICE MITÓTICO

En la tabla 1 y la figura 9 A, B, C se presentan los resultados obtenidos de los tratamientos con  $V_2O_5$  por 72, 48 ó 24 h en combinación con los tratamientos con cafeína por 72, 48 ó 24 h (Figura 6 A, B y C). Como se puede observar cuando el tiempo de tratamiento con vanadio fue de 72 h, el IM muestra una tendencia a disminuir, y es significativo ( $p < 0.05$ ) sólo con la dosis de 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio en combinación con los tratamientos de cafeína por 72 y 24 h.

Cuando se analizaron los resultados de los tratamientos realizados con  $V_2O_5$  por 48 h. en combinación con los de cafeína (Figura 6B) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el IM, excepto con 6  $\mu\text{g/ml}$  vanadio con cafeína a las 48 h en donde se observó una disminución estadísticamente significativa del IM en comparación con el testigo negativo (Tabla 1).

En los resultados con vanadio por 24 horas en combinación con los diferentes tratamientos con cafeína (figura 6C), se observó que el IM tiende a disminuir, aunque los únicos casos en los que se muestran diferencias significativas fueron en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$  de vanadio en combinación con los tratamientos de cafeína durante 48 y 24 horas.

En la tabla 2 y la figura 10 A, B, C se presentan los resultados de IM después de 72, 48 y 24 horas de tratamiento con  $V_2O_5$  en combinación con cafeína aplicada a las 43 horas (fase S/G2 del primer ciclo celular) y a las 67 horas (S/G2 del segundo ciclo celular) (protocolos en la figura 7A,B y C). Cuando se agregó el  $V_2O_5$  solo por 72 horas el IM disminuyó significativamente en las concentraciones de 4 y 6  $\mu\text{g/ml}$  en comparación con el testigo, sin embargo cuando se realizaron los tratamientos de vanadio por 72 horas en combinación con cafeína no se observaron diferencias. Los resultados del IM en linfocitos humanos después de 48 y 24 horas de tratamiento con

vanadio en combinación con tratamientos de cafeína a las 43 y 67 horas muestran que en ambos casos el IM tiene una tendencia a disminuir de manera significativa en la mayoría de los tratamientos.

**TABLA 1. ÍNDICE MITÓTICO DE LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS 72, 48 Y 24 H EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 72, 48 Y 24 H.**

CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE TRATAMIENTO DE VANADIO (µg/ml)		TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFEÍNA		
		72 HORAS	48 HORAS	24 HORAS
[ ] DE CAFEÍNA (20 µg/ml)		ÍNDICE	MITÓTICO	(%)
<b>72 HORAS</b>				
-----	----	3.63	3.63	3.63
-----	+	3.10	3.35	2.90
2	+	2.70	3.15	2.60
4	+	3.30	2.65	3.30
6	+	2.05 <sup>ab</sup>	2.70	2.05 <sup>a</sup>
<b>48 HORAS</b>				
-----	----	3.28	3.28	3.28
-----	+	3.15	3.15	2.90
2	+	3.60	3.60	3.05
4	+	3.65	3.65	2.70
6	+	2.70	2.20 <sup>a</sup>	2.65
<b>24 HORAS</b>				
-----	----	3.26	3.26	3.26
-----	+	3.10	3.15	2.90
2	+	2.40	2.20	2.30
4	+	2.30	1.80 <sup>bc</sup>	2.00 <sup>a</sup>
6	+	2.25	1.50 <sup>b</sup>	1.80 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo (-----) <sup>b</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína <sup>c</sup> p < 0.05 Vs 4 µg/ml de vanadio 0hs, prueba de "Z" para proporciones



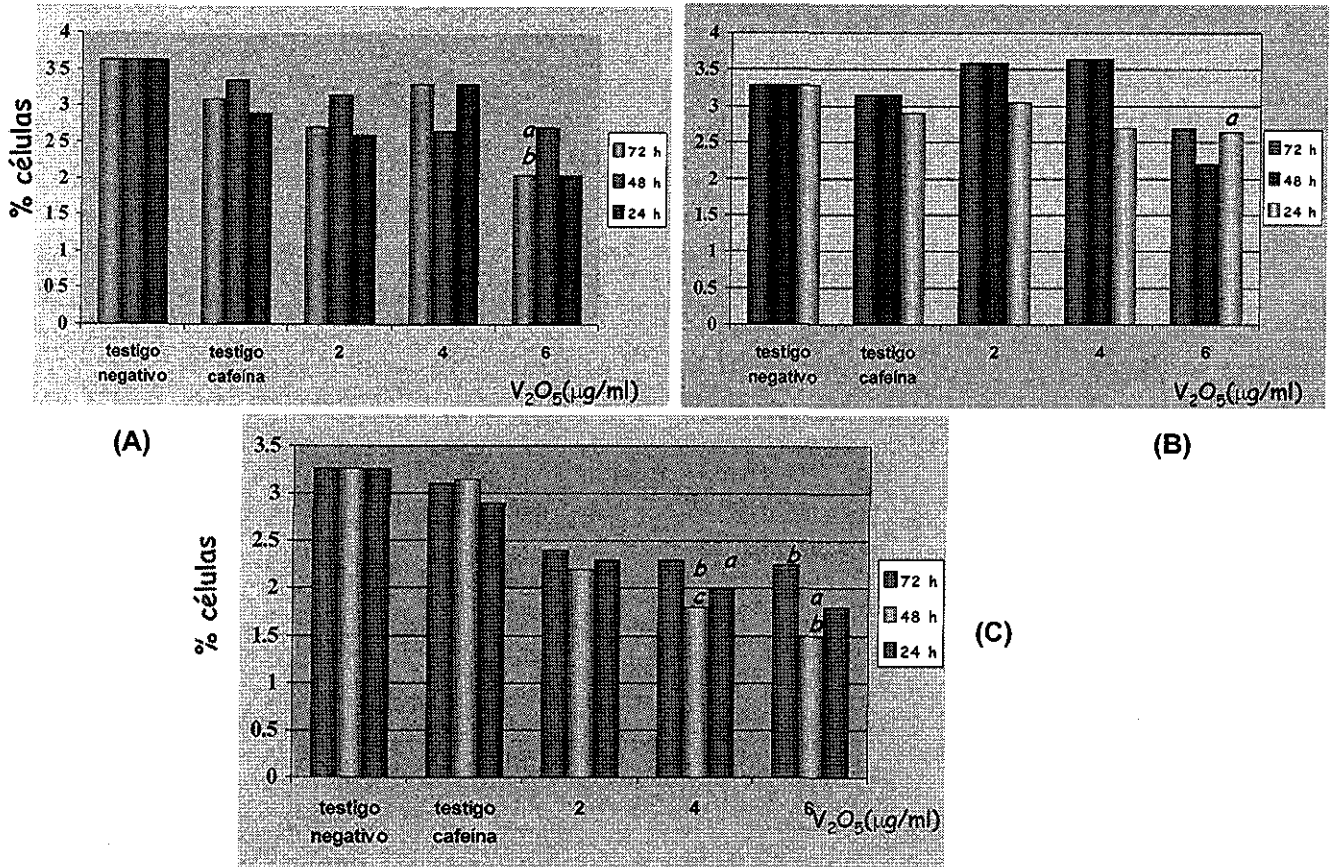


Figura 9. Índice mitótico de de linfocitos humanos *in vitro* con 72 (A), 48 (B) y 24(C) h de tratamiento de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en combinación con cafeína durante 72, 48 y 24 h

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo <sup>b</sup> p < 0.05 Vs testigo cafeína, <sup>c</sup> p < 0.05 Vs 4 µg/ml vanadio 72 h. 'Z' para proporciones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 2. ÍNDICE MITÓTICO (IM) EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* DE 72, 48 Y 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON VANADIO EN COMBINACIÓN CON CAFÉINA EN LA FASE DE S/G2 DEL PRIMERO Y SEGUNDO CICLOS DE DIVISIÓN.**

TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFÉINA (20 µg/ml)	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (µg /ml)	ÍNDICE MITÓTICO (%)		
		(72 HORAS)	(48 HORAS)	24 (HORAS)
-	-	2.40 ± 0.51	2.40 ± 0.57	2.40 ± 0.57
-	2	1.90 ± 0.84	2.20 ± 0.23	1.85 ± 0.31
-	4	1.50 ± 0.58 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.54	1.80 ± 0.21
-	6	1.30 ± 0.48 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.48	1.70 ± 0.54
<b>G2 DEL PRIMERO CICLO DE DIVISIÓN (43 HS)</b>				
+	-	2.60 ± 0.35	2.60 ± 0.35	2.60 ± 0.35
+	2	2.40 ± 0.53	1.60 ± 0.21	1.40 ± 0.37 <sup>ab</sup>
+	4	1.80 ± 0.21	1.50 ± 0.37 <sup>ab</sup>	1.25 ± 0.42 <sup>ab</sup>
+	6	1.60 ± 0.32	1.15 ± 0.13 <sup>ab</sup>	0.80 ± 0.31 <sup>b</sup>
<b>G2 DEL SEGUNDO CICLO DE DIVISIÓN (67 HS)</b>				
+	-	2.30 ± 0.30	2.30 ± 0.30	2.30 ± 0.30
+	2	2.10 ± 0.79	0.80 ± 0.43 <sup>acd</sup>	1.05 ± 0.68 <sup>ac</sup>
+	4	2.05 ± 0.48	0.65 ± 0.37 <sup>acd</sup>	0.90 ± 0.58 <sup>bc</sup>
+	6	1.65 ± 0.20	0.60 ± 0.19 <sup>acd</sup>	0.40 ± 0.39 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo, <sup>b</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína en S/G2 (43 h), <sup>c</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína en S/G2 (67 h), <sup>d</sup> tratamientos de vanadio, prueba de "Z" para proporciones.

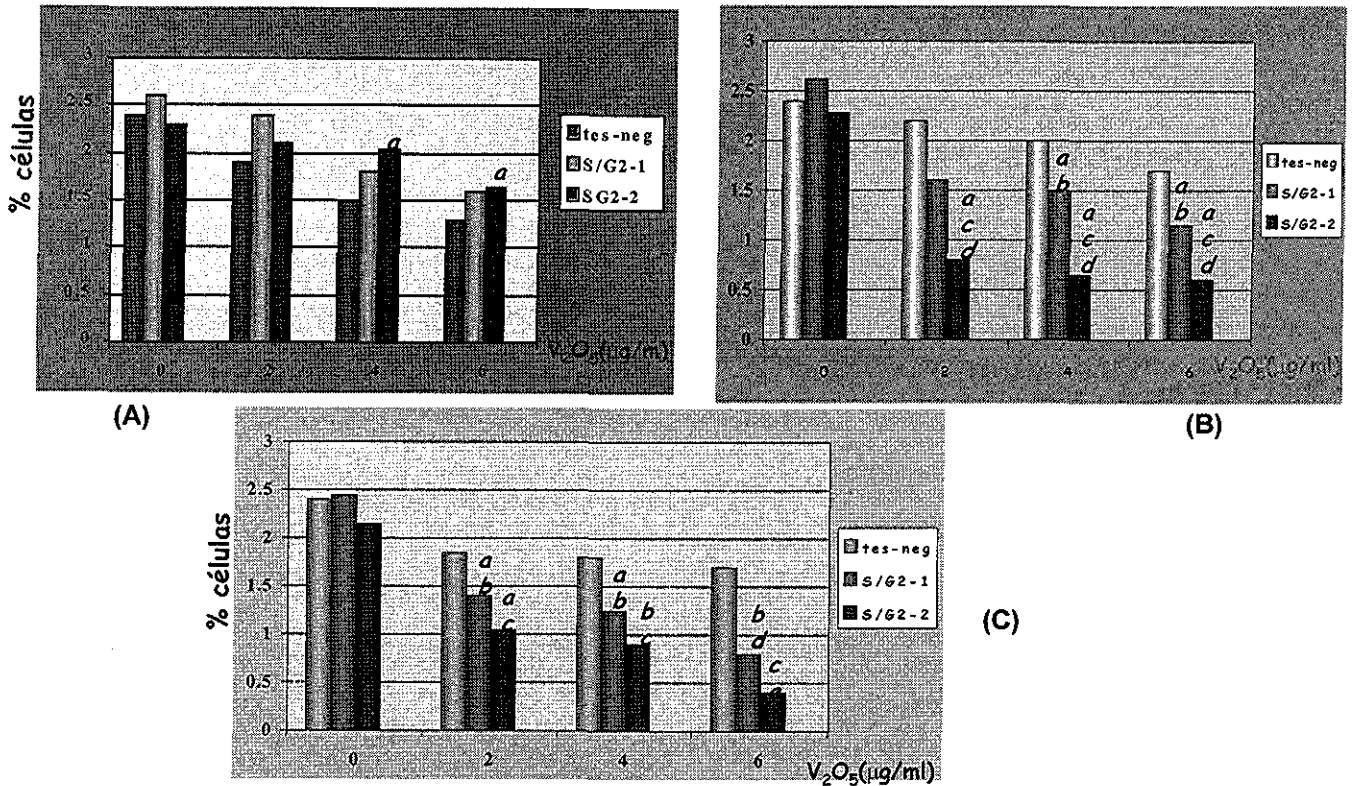


Figura 10.- Índice mitótico de linfocitos humanos *in vitro* de 72 (A), 48 (B) y 24 (C) h de tratamiento con vanadio en combinación con cafeína en la fase de S/G2 del primer y segundo ciclos de división

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo absoluto, <sup>b</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína en S/G2 (43 h) <sup>c</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína en S/G2 (67 h) <sup>d</sup> p < 0.05 Vs tratamiento de vanadio (respectivo) prueba de "Z" para proporciones

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **5.2 INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICHs)**

En la tabla 3 y la figura 11 A, B, C se presentan los resultados de la frecuencia de ICH en linfocitos humanos en cultivo tratados con  $V_2O_5$  durante 72, 48 ó 24 horas, en combinación con cafeína aplicada por 72, 48 ó 24 horas. Como se puede observar las frecuencias de ICH no se modificaron en la combinación de vanadio durante 72 horas ó 48 horas y los diferentes tratamientos de cafeína, sin embargo en los cultivos tratados por 24 horas con  $V_2O_5$  y cafeína a los tres tiempos se observó que solo en los tratamientos con cafeína por 48 ó 24 horas las dos dosis más altas de vanadio incrementaron de manera significativa la frecuencia de ICHs.

En la tabla 4 y la figura 12 A, B, C, se presentan los resultados al tratar durante 72, 48 ó 24 horas con  $V_2O_5$  a los cultivos de linfocitos en combinación con la cafeína aplicada a las 43 o 67 horas de iniciados los cultivos (en S/G2 del primero o segundo ciclo de división respectivamente) (Figura 7A, B y C).

Cuando el tiempo de tratamiento con vanadio fue de 72 horas la frecuencia de ICHs no se modificó en ninguno de los casos, sin embargo cuando el tiempo de tratamiento con vanadio fue de 48 horas o de 24 horas se observó que la frecuencia de ICHs tienden aumentar, siendo más evidente en el tratamiento de vanadio por 24 horas en combinación con la cafeína.

## **5.3 ÍNDICE DE REPLICACIÓN (IR)**

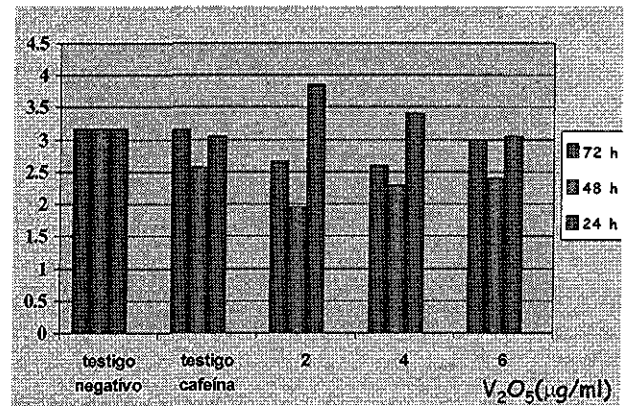
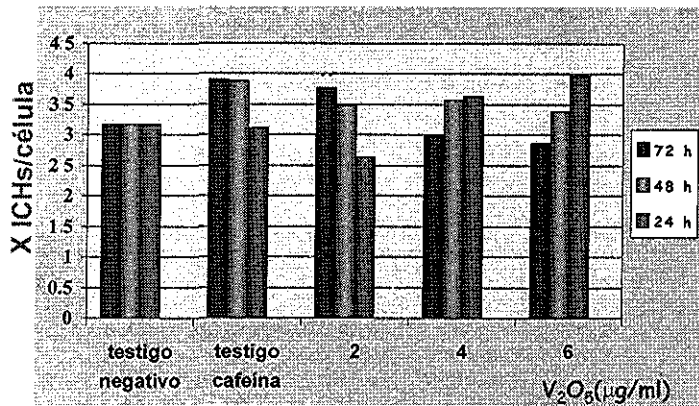
En la tabla 5 y la figura 13 A, B, C, se presentan los resultados del IR obtenido de los tratamientos con  $V_2O_5$  durante 72, 48 ó 24 horas en combinación con los tratamientos con cafeína a tres diferentes tiempos. Los datos encontrados muestran que el IR no se modificó debido a los tratamientos, aunque su comportamiento es irregular en todos los casos. Cuando se analizó el IR en los cultivos de linfocitos después de los tratamientos durante 72, 48 ó 24 horas con  $V_2O_5$  en combinación con tratamientos de cafeína a las 43 horas (S/G2 del primer ciclo de división) y a las 67 horas (S/G2 del segundo ciclo de

división), se encontró que el IR tiende a disminuir en todos los tratamientos, siendo más evidente cuando los linfocitos fueron tratados por 48 horas o por 24 horas en combinación con la cafeína agregada durante la fase de G2 del segundo ciclo (tabla 6 y Figura 14).

**TABLA 3. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICHs) EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS CERO, 24 Y 48 H EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS CERO, 24 Y 48 H.**

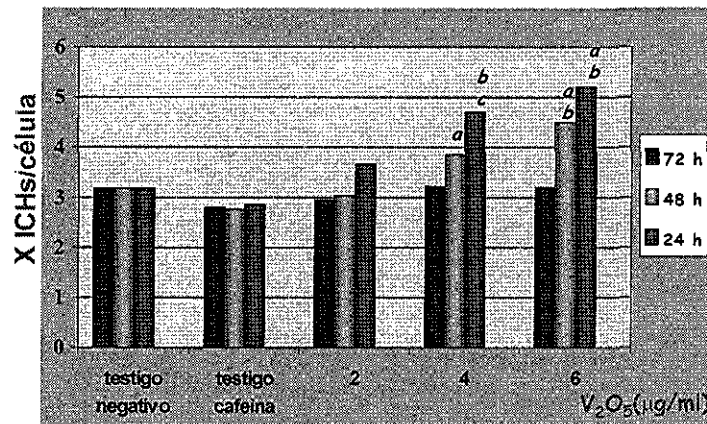
CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE APLICACIÓN DE VANADIO (µg/ml)	[ ] DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFEÍNA		
		72 HORAS	48 HORAS	24 HORAS
		<u>ICHs /CÉLULA (x ± e.e.)</u>		
<b>72 HORAS</b>				
-----	----	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09
-----	+	3.92 ± 0.23	3.89 ± 0.13	3.11 ± 0.34
2	+	3.77 ± 0.26	3.49 ± 0.35	2.64 ± 0.34
4	+	3.00 ± 0.23	3.57 ± 0.31	3.64 ± 0.34
6	+	2.87 ± 0.26	3.39 ± 0.25	3.97 ± 0.44
<b>48 HORAS</b>				
-----	----	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09
-----	+	3.15 ± 0.28	2.57 ± 0.24	3.06 ± 0.35
2	+	2.67 ± 0.32	1.96 ± 0.24	3.86 ± 0.42
4	+	2.60 ± 0.37	2.29 ± 0.20	3.40 ± 0.28
6	+	3.00 ± 0.34	2.39 ± 0.32	3.06 ± 0.32
<b>24 HORAS</b>				
---	----	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09	3.17 ± 0.09
---	+	2.80 ± 0.25	2.76 ± 0.33	2.86 ± 0.38
2	+	2.94 ± 0.24	3.03 ± 0.31	3.67 ± 0.37
4	+	3.23 ± 0.28	3.86 ± 0.28 <sup>a</sup>	4.70 ± 0.44 <sup>bc</sup>
6	+	3.20 ± 0.23	4.49 ± 0.29 <sup>ab</sup>	5.22 ± 0.44 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo absoluto y testigo de cafeína, <sup>b</sup> p < 0.01 Vs 6 µg de vanadio 72 h., <sup>c</sup> p < 0.002 Vs 4µg de vanadio 48 y 72 h, prueba de "t" de Student.



(A)

(B)



(C)

Figura 11.- Intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos *in vitro* de 72 (A), 48 (B) 24 (C) h de tratamiento con vanadio en combinación con cafeína durante 72, 48 y 24 h

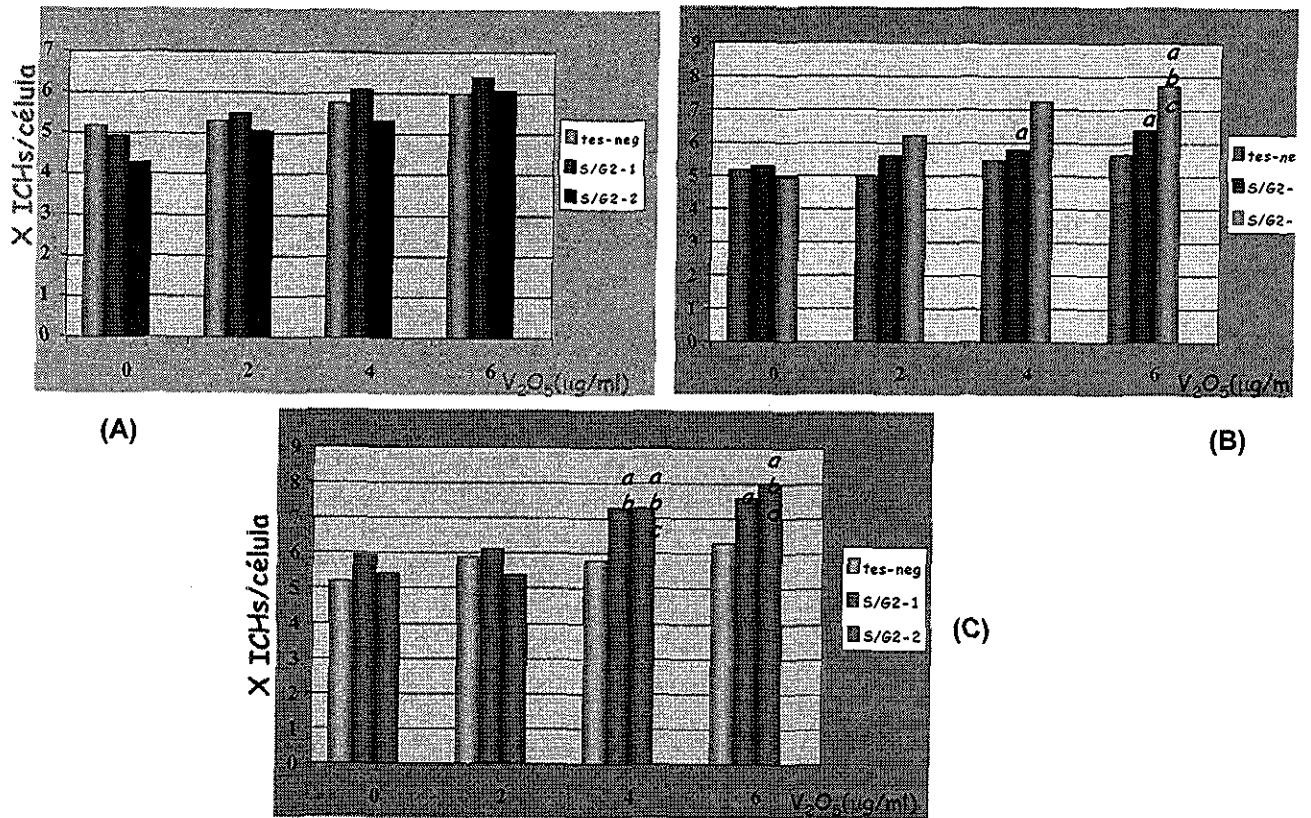
\*  $p < 0.05$  Vs testigo absoluto y testigo de cafeína <sup>b</sup>  $p < 0.01$  Vs 6  $\mu\text{g}$  vanadio 72 h <sup>c</sup>  $p < 0.002$  Vs 4  $\mu\text{g}$  vanadio 72 h <sup>t</sup> de Student

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TABLA 4. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICHs) EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* DE 72, 48 Y 24 HORAS DE TRAMIENTO CON VANADIO EN COMBINACIÓN CON CAFÉINA EN LA FASE DE S/G2 DEL PRIMERO Y SEGUNDO CICLOS.**

TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFÉINA (20 µg/ml)	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (µg/ml)	ICHs/CÉLULA (X ± e.e.)		
		(72 HORAS)	(48 HORAS)	(24 HORAS)
-	-	5.19 ± 0.28	5.19 ± 0.28	5.19 ± 0.28
-	2	5.32 ± 0.36	5.00 ± 0.36	5.90 ± 0.36
-	4	5.77 ± 0.44	5.48 ± 0.29	5.80 ± 0.29
-	6	6.00 ± 0.29	5.66 ± 0.28	6.30 ± 0.37
<b>G2 DEL PRIMERO CICLO DE DIVISIÓN (43 H)</b>				
+	-	4.95 ± 0.44	5.30 ± 0.48	5.94 ± 0.82
+	2	5.50 ± 0.40	5.62 ± 0.40	6.14 ± 0.61
+	4	6.09 ± 0.83	5.88 ± 0.50	7.30 ± 0.61 <sup>ac</sup>
+	6	6.40 ± 0.65	6.38 ± 0.34 <sup>a</sup>	7.60 ± 0.59 <sup>a</sup>
<b>G2 DEL SEGUNDO CICLO DE DIVISIÓN (67 H)</b>				
+	-	4.30 ± 0.51	4.95 ± 0.44	5.43 ± 0.49
+	2	5.07 ± 0.57	6.25 ± 0.70	5.40 ± 0.52
+	4	5.33 ± 0.68	7.25 ± 0.48 <sup>bcd</sup>	7.30 ± 0.55 <sup>ace</sup>
+	6	6.07 ± 0.65	7.71 ± 0.68	8.00 ± 0.69 <sup>acd</sup>

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo, <sup>b</sup> p < 0.05 testigo de cafeína S/G2 (67 h), <sup>c</sup> p < 0.05 Vs 4µg de vanadio solo, <sup>d</sup> p < 0.05 Vs 6µg de vanadio solo, con "t" de Student



**Figura 12. Intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos *in vitro* de 72,48 y 24 h de tratamiento con vanadio en combinación con cafeína en la fase de S/G2 del primero y segundos ciclos de división**

a  $p < 0.05$  VS testigo negativo, b  $p < 0.05$  VS testigo de cafeína  $G_2$  (67 h), c  $p < 0.01$  VS 4  $\mu\text{g}$  de vanadio solo, d  $p < 0.05$  VS 6  $\mu\text{g}$  de vanadio solo "t" de Student

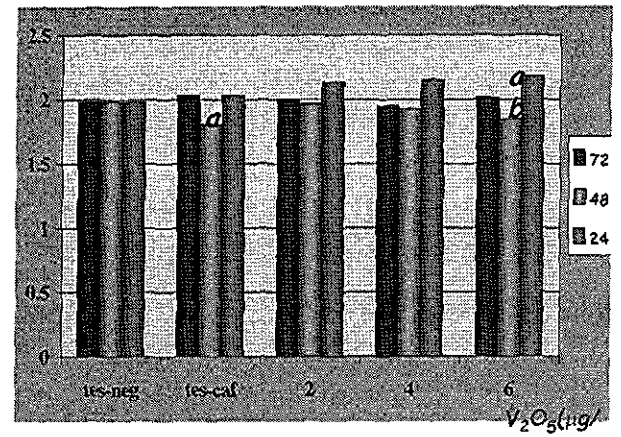
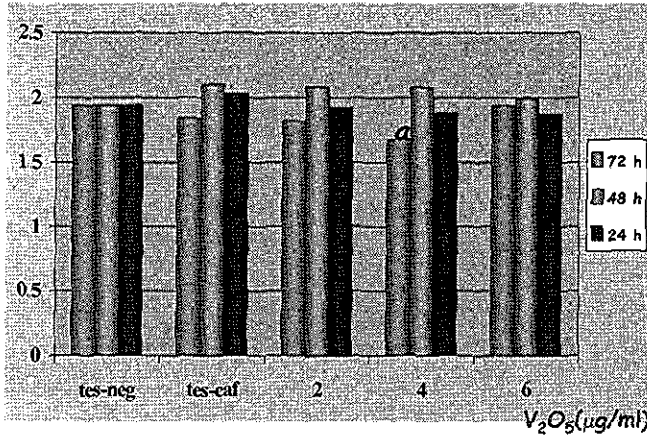
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**TABLA 5. ÍNDICE DE REPLICACIÓN (IR) EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* TRATADOS CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS 72, 48 Y 24 H EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 72, 48 Y 24 H.**

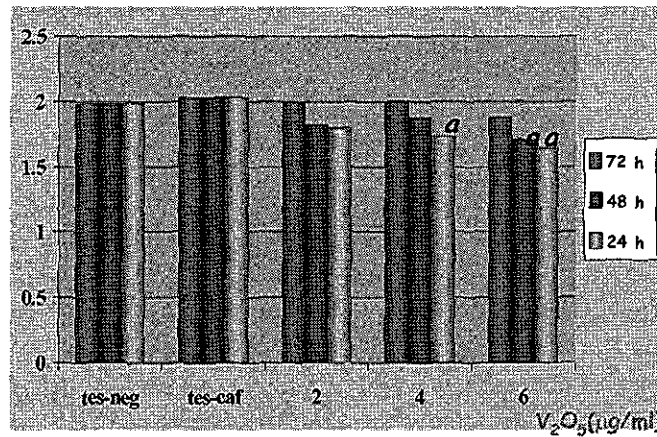
CONCENTRACIÓN Y TIEMPO DE TRATAMIENTO CON VANADIO (µg/ml)	[ ] DE CAFEÍNA (20 µg /ml)	TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFEÍNA		
		72 HORAS	48 HORAS	24 HORAS
		<u>ÍNDICE DE REPLICACIÓN</u>		
<b>72 HORAS</b>				
-----	----	1.94	1.94	1.94
-----	+	1.84	2.10	2.03
2	+	1.82	2.08	1.92
4	+	1.68 <sup>a</sup>	2.08	1.88
6	+	1.94	1.98	1.87
<b>48 HORAS</b>				
-----	---	1.98	1.98	1.98
-----	+	2.03	1.81a	2.03
2	+	2.01	1.97	2.14
4	+	1.95	1.93	2.15
6	+	2.02	1.85	2.18 <sup>ab</sup>
<b>24 HORAS</b>				
----	----	1.98	1.98	1.98
----	----	2.03	2.03	2.03
2	+	2.00	1.82	1.80
4	+	2.00	1.88	1.73 <sup>a</sup>
6	+	1.88	1.71 <sup>a</sup>	1.64 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo (-----), <sup>b</sup> p < 0.05 Vs testigo de cafeína (24 h) y 6µg de vanadio (24 h), con X<sup>2</sup>



(A)

(B)



(C)

Figura 13. Índice de replicación en cultivo de linfocitos humanos *in vitro* con 72, 48 y 24 h de tratamiento con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en combinación con cafeína durante 72, 48 y 24 h

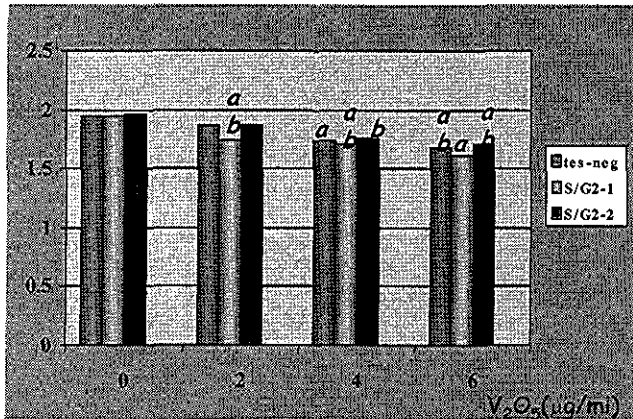
<sup>a</sup> p < 0.05 VS testigo negativo <sup>b</sup> p < 0.05 VS testigo de cafeína y 6 µg de vanadio (24 h) con X<sup>2</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

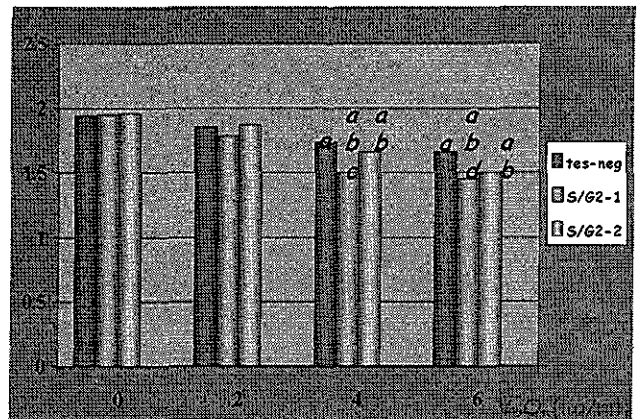
**TABLA 6. ÍNDICE DE REPLICACIÓN EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO DE 72, 48 Y 24 H DE TRATAMIENTO CON VANADIO EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA EN LA FASE DE S/G2 DEL PRIMERO Y SEGUNDO CICLOS DE DIVISIÓN.**

TIEMPO DE TRATAMIENTO CON CAFEÍNA (20 $\mu\text{g/ml}$ )	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO ( $\mu\text{g /ml}$ )	ÍNDICE DE REPLICACIÓN		
		(72)	(48)	(24)
-	-	1.94	1.94	1.94
-	2	1.87	1.85	1.73 <sup>a</sup>
-	4	1.74 <sup>a</sup>	1.73 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>
-	6	1.67 <sup>a</sup>	1.66 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>
<b>G2 DEL PRIMER CICLO DE DIVISIÓN (43 H)</b>				
+	-	1.95	1.95	1.95
+	2	1.74 <sup>ab</sup>	1.78	1.81
+	4	1.71 <sup>ab</sup>	1.50 <sup>abc</sup>	1.77
+	6	1.62 <sup>ab</sup>	1.45 <sup>abd</sup>	1.74 <sup>ab</sup>
<b>G2 DEL SEGUNDO CICLO DE DIVISIÓN (67 H)</b>				
+	-	1.96	1.96	1.96
+	2	1.86	1.87	1.65 <sup>ab</sup>
+	4	1.75 <sup>b</sup>	1.66 <sup>ab</sup>	1.59 <sup>ab</sup>
+	6	1.71 <sup>ab</sup>	1.50 <sup>ab</sup>	1.38 <sup>abd</sup>

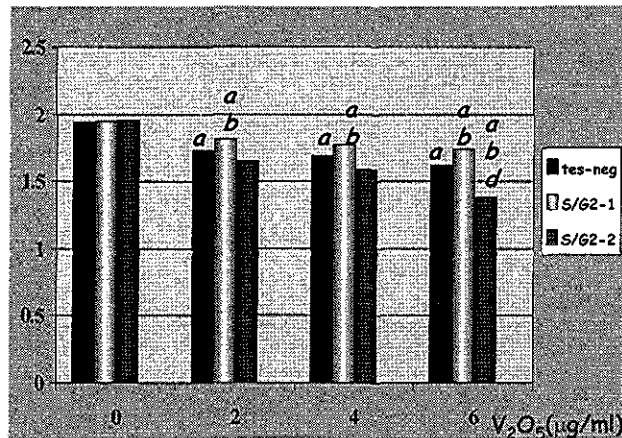
<sup>a</sup>  $p < 0.05$  Vs testigo negativo, <sup>b</sup>  $p < 0.05$  testigo de cafeína correspondientes  $p < 0.05$  Vs 4  $\mu\text{g}$  de vanadio en S/G2 primer ciclo (43 h), <sup>d</sup>  $p < 0.05$  Vs 6  $\mu\text{g}$  de vanadio solo, prueba de  $X^2$ .



(A)



(B)



(C)

Figura 14. Índice de replicación en linfocitos humanos *in vitro* de 72 h de tratamiento con vanadio en combinación con cafeína en la fase de S/G2 del primer y segundo ciclos de división

<sup>a</sup> p < 0.05 Vs testigo negativo, <sup>b</sup> p < 0.05 testigo de cafeína, <sup>c</sup> p < 0.05 vanadio solo (6 µg), <sup>d</sup> p < 0.05 Vs 4 µg de vanadio en S/G2 primer ciclo (43 h) prueba de X<sup>2</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 5.4 METABOLISMO DE CAFEÍNA

Para establecer la posible biotransformación de la cafeína, cultivos de linfocitos humanos tratados con cafeína durante 72, 48 ó 24 horas, fueron cosechados 2 horas después de los tratamientos (2, 26 y 50 horas de cultivo; protocolos en la figura 8A, B y C) y analizados mediante HPLC. Del análisis de los cromatogramas, se obtuvieron los tiempos de retención y se presentan en la tabla 7, y en la figura 15 el cromatograma de la cafeína. Como se puede observar en el tratamiento con cafeína (10 mg/10ml) a las cero horas de iniciados los cultivos y cuya cosecha se realizo a las dos horas, se encontraron metabolitos como la teobromina con un tiempo de retención (Tr) de 1.1, la teofilina Tr = 1.59 y la presencia de la cafeína con un Tr = 2.0. En el mismo tratamiento pero con tiempo de cosecha de 72 horas obtuvimos teobromina (Tr = 1.20). En el tratamiento de 24 horas con tiempo de cosecha a las 26 horas se detecto teobromina (Tr = 1.17), teofilina (Tr = 1.58) y cafeína (Tr = 2.10). Cuando la cosecha de este mismo tratamiento se realizo a las 72 horas solo se encontró teobromina (Tr = 1.16). En el tratamiento en el que se adiciono cafeína a las 48 horas se detecto teofilina (Tr = 1.58), cafeína (Tr = 2.01). Y en la cosecha a las 72 horas de este mismo tratamiento se encontraron los metabolitos teobromina (Tr = 1.20), teofilina (Tr = 1.57) y cafeína ((Tr = 2.09).

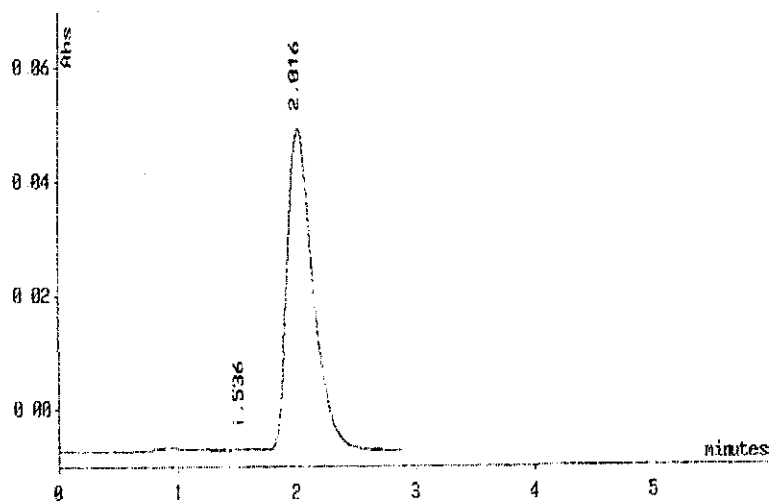


Figura 15. Cromatograma de una muestra estándar de cafeína

**TABLA 7. DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LA CAFEÍNA Y LOS METABOLITOS PRIMARIOS EN LINFOCITOS HUMANOS *IN VITRO* MEDIANTE HPLC**

		Adición de cafeína a los cultivos					
		A		B		C	
		0 h		24 h		48 h	
		Cosecha (h)		Cosecha (h)		Cosecha (h)	
		2	72	26	72	50	72
Estándares TR (min/abs)		Tratamientos TR (min/abs)					
Teobromina	1.11	1.11	1.20	1.17	1.20	0.0	1.20
Teofilina	1.59	1.59	0.0	1.58	0.0	1.58	0.0
Cafeína	2.01	2.00	0.0	2.10	0.0	2.01	0.0
Testigo	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65

TR = Tiempo de retención, as = absorbencia, h = hora, in = minutos.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 INTERCABIO DE CROMATIDAS HERMANAS

Estudios previos, han mostrado que el  $V_2O_5$  no induce ICHs en linfocitos humanos (Roldán y Altamirano 1990, Altamirano *et al.*, 1998), sin embargo en este mismo sistema de prueba y mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina se pudo demostrar que provoca rupturas de cadena sencilla del ADN (Rojas *et al.*, 1996). Así mismo cuando el  $V_2O_5$  se combinó con cafeína se observó un incremento en la frecuencia de intercambios. Estos resultados fueron presumiblemente atribuidos al  $V_2O_5$ , debido a que la dosis de cafeína empleada en ése trabajo (1mM) fue baja (Roldán *et al.*, 1997), en comparación con lo reportado por otros autores para la inducción de ICHs y de aberraciones cromosómicas y utilizando el mismo sistema de prueba (Weinstein *et al.*, 1975).

Por otro lado Aida y Bodell (1987) al tratar líneas celulares 9L y 9L2 con varias concentraciones de 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) y que son respectivamente sensibles y resistentes a este compuesto, seguido de tratamientos con 1mM de cafeína, encontraron que había un incremento adicional en la acumulación de las células en S-G2-M del ciclo celular que inducía el BCNU. Estos autores concluyeron que la cafeína potencia la citotoxicidad de la BCNU y la inducción de ICHs por un mecanismo que es independiente de la reparación de productos de alquilación, pero que puede depender de las alteraciones en la replicación de las células tratadas con dicho compuesto.

Los resultados encontrados en el presente trabajo mostraron un incremento en la frecuencia de ICHs en los tratamientos con vanadio por 24h en combinación con los tratamientos con cafeína por 48 ó 24 h. Esto indica que cuándo ambos compuestos están más próximos al tiempo de cosecha hay una mayor inducción de intercambio de cromátidas hermanas en comparación con los otros protocolos empleados. Esto sugiere que el vanadio tiene un tiempo corto de acción (de menos de 24 h) y que se es posible que se requiera de lesiones frescas para que se puedan originar los ICHs. Por otro lado a partir de estos datos también se puede inferir que las lesiones que este compuesto

produce en el ADN son eficientemente reparadas por los mecanismos de reparación intrínsecos a la célula, por lo cual no es posible observar ICHs en los otros protocolos.

A pesar de que se sabe que el vanadio es capaz de interactuar con una gran cantidad de enzimas, incluyendo a la topoisomerasa II, enzima esencial para la replicación del ADN y que se ha propuesto que está implicada en la formación de los ICHs (Painter, 1980 a; Cleaver, 1981), no hay muchas evidencias de daño genotóxico por este metal (Roldán y Altamirano, 1990; Migliore *et al.*, 1993; Altamirano *et al.*, 1998), sin embargo hay datos que muestran que este elemento es capaz de producir estrés oxidativo, por lo que las lesiones producidas al ADN y que pueden originar intercambio de cromátidas hermanas pueden estar relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno por el vanadio (Cortizo *et al.*, 2000). Estas evidencias están apoyadas por los trabajos de Rojas *et al.*, (1996) y Altamirano *et al.*, (1998) los cuales encuentran rupturas de cadena sencilla del ADN en linfocitos humanos en G0 así como en linfocitos inducidos a la división (con fitohemaglutinina), tratados con pentóxido de vanadio (3000, 30 y 0.3  $\mu\text{M}$  y evaluados mediante la técnica de electroforesis unicelular alcalina, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrándose además que *in vitro*, hay una rápida reparación de este daño (Rojas *et al.*, 1996).

## **6.2 TRATAMIENTOS EN S/G2**

Cuando se realizaron los tratamientos con el  $\text{V}_2\text{O}_5$  o la cafeína por separado durante el periodo de S/G2 del primero o del segundo ciclo, no se observó un incremento de las frecuencias de ICHs, datos que confirman lo previamente reportado tanto *in vitro* como *in vivo* (Aeschbacher *et al.*, 1984; Krishna *et al.*, 1985; Roldán y Altamirano, 1990; IARC, 1991; Altamirano-Lozano *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1994). Sin embargo, en los experimentos realizados en los que la cafeína fue aplicada durante la fase de S/G2 del primero o del segundo ciclo de división en combinación con el  $\text{V}_2\text{O}_5$  se observó un aumento significativo en la frecuencia de ICHs.

Hay evidencias experimentales que demuestran que la cafeína puede ser integrada en los sitios dañados del ADN (Lehmann, 1972), lo que ocasionaría que las enzimas de reparación ya no sean capaces de reconocer el daño y por lo tanto de participar en la



restauración de la estructura del ADN, originando que ese daño se traduzca como ICHs. Este mecanismo es posiblemente el que está sucediendo en nuestro caso.

En los cultivos expuestos a  $V_2O_5$  por 72 horas más cafeína, no hubo diferencias en la frecuencia de ICHs. Sin embargo, cuando se aplicó la cafeína en S/G2 del primer ciclo o en S/G2 del segundo ciclo los resultados mostraron que en los tratamientos con vanadio por 48 h o por 24 h hubo un incremento en las frecuencias de ICHs, siendo más evidente en los tratamientos con vanadio por 24 h. El hecho de que los tratamientos efectuados durante S/G2 del primero y segundo ciclos de división, en tratamientos cortos si se observaran ICHs y en los tratamientos largos no, apoyan la idea de que deben de existir lesiones frescas inducidas por el vanadio para que puedan ser transformadas en ICHs, por lo que en el primer tratamiento en el cual el tiempo de exposición fue muy largo con respecto a la adición de la cafeína disminuye la posibilidad de tener lesiones frescas. Se sugiere por lo tanto que el posible tiempo de actividad del  $V_2O_5$  para inducir lesiones es de aproximadamente 24 h (Roldán *et al.*, 1997).

Por otro lado el hecho de que en los tratamientos con cafeína en S/G2 del primer ciclo o en S/G2 del segundo ciclo y  $V_2O_5$  por 48 h se incrementará la frecuencia de ICHs, hace pensar que el compuesto fue capaz de inducir lesiones tempranamente las cuales están presentes cuando el tratamiento con cafeína fue aplicado (a las 43 h de iniciados los cultivos), y estas lesiones pudieron expresarse como ICHs al final de la primera fase de S (síntesis), mientras que cuando la cafeína se aplicó a las 67 h de cultivo, los incrementos observados pudieron deberse a la presencia de algunas lesiones persistentes (Morales-Ramírez *et al.*, 1995a) las cuales originaron los ICHs en el segundo ciclo. El hecho de que no hubiese diferencias significativas entre los tratamientos con cafeína de 43 y 67 h y los tratamientos con vanadio por 24 y 48 h es también evidencia de que estas lesiones no fueron acumulativas.

En estudios realizados con linfocitos humanos en cultivo, estimulados con fitohemaglutinina y a los cuales se les adicionó 2 mM de cafeína en el medio, se encontró que hay una inhibición de la poli(ADP-ribosa)polimerasa. Estos resultados son importantes debido a que las reacciones de poli ADP-ribosilación están distribuidas ampliamente entre los eucariontes e intervienen en el ciclo celular normal de células de mamíferos, particularmente en los eventos moleculares que ocurren en la fase de S. La inhibición de las reacciones de poli ADP-ribosilación por las metilxantinas puede dar

como resultado efectos genéticos y modular a su vez efectos de este tipo inducidos por otros agentes como luz UV, radiación ionizante y químicos mutágenos y carcinógenos. Estas reacciones están involucradas en la mayoría de las funciones de la cromatina, como son: reparación del ADN, actividades de replicación y transcripción del ADN (González-Fernández *et al.*, 1985; Shin *et al.*, 1990; IARC, 1991).

En el presente trabajo podemos suponer que la cafeína esta actuando como modulador del efecto que ocasiona el vanadio y que este efecto tiene que ver principalmente con la reparación del ADN, aunque también es posible que la cafeína pueda actuar a nivel del pool de nucleotidos e interferir con la replicación, ocasionando así una fase S quizás más larga lo cual sería una explicación para la aparición de ICHs en algunos de nuestros tratamientos.

En este sentido González-Fernández (1985) propone que la cafeína ejerce dos efectos principales sobre las células con el ADN dañado en la fase de G2: éstas cancelan su retraso mitótico y tienen un efecto inhibitorio sobre las vías de reparación del ADN. Los agentes que acortan la G2 retrasada (ejemplo la cafeína y la hidroxurea (HU) que fue inducida por agentes mutágenos (el vanadio probablemente), pueden inducir condensación cromosómica prematura. Estos efectos explican porque la HU induce aberraciones en G2 temprana, amplifica el daño cromatídico y los ICHs en G2 tardía (Kihlman, 1966; Andersson, 1983). Posiblemente esto sea lo que este pasando en nuestro sistema con el vanadio y la cafeína y el porque tenemos ICHs cuando se combinan el vanadio más la cafeína en S/G2 del primero y segundo ciclos.

Así mismo se sabe que la exposición de células a algunos agentes mutagénicos puede inducir retraso en la reunión de grupos de replicones, éste retraso se puede reflejar en el retraso de G2 (inducida por la mayoría de agentes metálicos incluyendo al  $V_2O_5$ ). Cuando el ADN es reparado efectivamente las células entran en mitosis. Las alteraciones cromosómicas y los ICHs se pueden formar cuando la cromatina se entreteje y condensa para formar los cromosomas mitóticos antes de que los grupos de replicones sean ligados y pueden estar entre los replicones más que en los sitios de ADN dañado (Kihlman, 1966; Andersson, 1983).

En *E. coli* y otros microorganismos, existen mecanismos de reparación del ADN como la reparación por excisión que son sensibles a la cafeína (Timson, 1977). Este alcaloide

aplicado después del tratamiento con un agente clastogénico incrementa la inducción las aberraciones cromosómicas y se ha demostrado que es un inhibidor potencial de la reparación post-replicativa en la fase G2 del ciclo celular (González-Fernández y López Sáez, 1982). Dicho aumento de aberraciones se revierte parcialmente por efecto de la adenosina (González-Fernández *et al.*, 1985). Estos mismos autores postulan que la cafeína tiene dos efectos diferentes en la fase G2 de células, con ADN previamente dañado: 1) cancela el retraso mitótico y 2) inhibe algunas vías de reparación del ADN. Dados los resultados obtenidos se considera que ambos efectos son posibles, en este caso efectos que son alternativas que la célula tiene como posibilidad de sobrevivir sin mutaciones o alteraciones en el ADN y que estas alteraciones son ocasionadas por el vanadio y potenciadas por la cafeína.

Los estudios sobre los compuestos de vanadio y sus efectos mutagénicos han mostrado que modifican la síntesis y la reparación de ADN *in vitro* (WHO, 1988; Sabbioni *et al.*, 1983), e induce enlaces cruzados ADN-proteínas (Cohen, 1992). Sin embargo el tratamiento con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no mostró incremento en aberraciones cromosómicas o ICHs en linfocitos humanos (Roldán y Altamirano, 1990), médula ósea de ratón (Altamirano *et al.*, 1993) o células V79 de hámster Chino (Zhong *et al.*, 1994), sin embargo Rojas y colaboradores, (1996) establecieron que el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> induce rompimientos de una sola cadena y que este tipo de daño es reparado rápidamente. Estos resultados pueden explicar porque en estudios previos el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> no indujo ICHs.

Los ICHs ocurren durante la síntesis de ADN y su producción se inicia por daño primario al ADN. A partir de este momento el daño que permanece es reparado, de tal manera que cuando el ADN es suficientemente reparado, las células entran en mitosis. Las alteraciones cromosómicas y los ICHs se pueden formar cuando las fibras de cromatina se condensan en cromosomas mitóticos antes de que los grupos de replicones queden unidos, y pueden estar localizados entre los replicones más que en los sitios de daño del ADN (Kihlman, 1966; Andersson, 1983). Aunque no todas las lesiones son capaces de inducir ICHs, hay evidencias de que al menos algunas de estas lesiones son capaces de persistir y por lo tanto no son fácilmente reparables (Morales-Ramírez *et al.*, 1988, Morales-Ramírez *et al.*, 1995 a, b), induciendo ICHs en divisiones celulares sucesivas. Esto posiblemente este sucediendo en este caso sobre todo para los tratamientos efectuados con diferentes tiempos de vanadio más cafeína en S/G2 del primero y segundo ciclo de división.

Los resultados sugieren que el vanadio puede inducir lesiones al ADN. Sin embargo, esta actividad tiene un tiempo de vida media de 24 h y que una parte de estas lesiones son persistentes. Por otro lado las alteraciones en el proceso de reparación inducidas por la cafeína pueden ayudar parcialmente a incrementar el número de lesiones inducidas por el  $V_2O_5$  las cuales pueden en algún momento ser transformadas en ICHs. De acuerdo con algunos autores (Kihlman, 1966; Shiraishi *et al.*, 1979; Andersson, 1983) y tomando en cuenta los datos aquí presentados, es posible que, la inducción de ICHs en el segundo ciclo de división sea debida a un acortamiento en la fase de G2, por la acción de la cafeína, con un posible incremento en la duración de la fase S el tratamiento de vanadio.

### **6.3 METABOLISMO DE LA CAFEÍNA**

El hecho de haber detectado por medio del HPLC los diferentes metabolitos primarios de la cafeína como son: la teofilina y la teobromina a las 2 y 72 horas de iniciados los cultivos nos permite suponer que el sistema de cultivo de linfocitos humanos fue capaz de metabolizar a la cafeína y que dicha transformación está ocurriendo en un lapso no mayor de 2 h, lo cual concuerda con otros estudios realizados tanto *in vitro* (Goth y Cleaver, 1976), como *in vivo* (Daly, 1993), en los cuales se mencionan que la cafeína se metaboliza rápida y extensivamente en células en cultivo de humano y ratón. Algunos datos en la literatura muestran que algunos de los efectos atribuidos a la cafeína pudieran deberse en parte a sus productos metabólicos (Weinstein *et al.*, 1975, Renner, 1982).

Se sabe que la vía catabólica de la cafeína *in vivo* es la de las purinas y pirimidinas, de tal forma que los metilos de la cafeína son transferidos y utilizados en la síntesis de novo de la timina (purina), la guanina y de la adenina (pirimidina) (Cornihs y Christman, 1957; Goth y Cleaver, 1976), por lo tanto al metabolizarse se originan derivados o metabolitos que pueden estar facilitando la acción del vanadio e inducir los ICHs.

En el metabolismo de la cafeína está implicado el citocromo P450 1A2 (CYP1A2), enzima responsable de la primera reacción de metabolización vía desmetilación (N-3 de la cafeína a paraxantina). Pero no es el único, también participa el citocromo P450

2A6 (CYP2A6), en el paso de 1,7-dimetilxantina (paraxantina) a 1,7-ácido dimetilurico (Denaro *et al.*, 1996). Aunque no obtuvimos información suficiente en este trabajo para mostrar cual de los metabolitos podría ser el responsable de los efectos que estamos encontrando, este aspecto se podría profundizar más y sería interesante seguir investigándolo.

Por otro lado es necesario mencionar que la teofilina es un metabolito que se encuentra en una concentración máxima a las dos primeras horas y que tiene una vida media de 7 h *in vivo*, y esta es metabolizada por el CYP1A2 (Colberberk y Back 1995), citocromo que se encuentra principalmente en los hepatocitos (90%) y en un 2% en células extrahepáticas. Esto nos ayuda para podería descartar como uno de los responsables de los efectos observados, sin embargo hay que realizar otros experimentos.

A diferencia de la teofilina, la teobromina es metabolizada por el citocromo de la familia CYP1A y no se sabe específicamente cual, pero es principalmente extra-hepático, lo cual hace factible su participación en los resultados encontrados. Así mismo Kalow y Tang, (1991) proponen que el 12% de la cafeína total es desmetilado a teobromina y el 3.7% se transforma en teofilina. Con los resultados y los antecedentes anteriores suponemos que la teobromina es un metabolito más estable y con una vida media mayor a la de la teofilina (ya que se detecto a las 2 y 72 h de cosecha) mientras que la teofilina solo se registro en el primer tiempo de cosecha (2h de iniciados los cultivos), debido posiblemente a que a las 72 h estos este compuesto se había transformado en otros sub-metabolitos que no se evaluaron.

Tomando en consideración los antecedentes anteriormente mencionados y sabiendo que tipo de citocromos son los que expresan los leucocitos y cuales son los que se requieren en el metabolismo de la cafeína, podemos decir que en una muestra de sangre completa donde tenemos diferentes tipos celulares (plaquetas, células blancas, y células rojas), es posible que las células que se están encargando del metabolismo de la cafeína sean los linfocitos (células blancas), ya que son los que presentan los citocromos que se requieren para tal proceso, los cuales ya han sido mencionados.

Se conoce relativamente poco acerca de los sistemas metabólicos de linfocitos humanos para otras drogas. No obstante se sabe que opera el sistema enzimático vía citocromos P-450 de los cuales puede haber diferentes isoenzimas. Así mismo los

niveles de cofactores y de enzimas responsables de su producción (por ejemplo: glutatión reductasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa) también pueden tener importancia en la determinación de la proporción y naturaleza del metabolismo de xenobióticos por linfocitos humanos (Kellerman *et al.*, 1973; Glatt *et al.*, 1980; Glatt *et al.*, 1983; Seidegard *et al.*, 1984, Hosfra y Uetrech, 1993) Hay evidencias de que de las células blancas y en particular los linfocitos son los que exhiben el mayor número de citocromos P-450, incluyendo: CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1, CYP2D6 y CYP3A5 (Raucy *et al.*, 1999), aunque otras células blancas como los monocitos y los macrófagos también tienen la capacidad de expresar constitutivamente isoenzimas P450, principalmente el CYP1B1, (Sutter *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1996; Baron *et al.*, 1998), sin embargo este citocromo no está implicado en el metabolismo de cafeína. Así mismo los neutrófilos y eosinófilos presentan los CYP1A y CYP1B (familia CYP1 principalmente) (Raucy *et al.*, 1999).

En algunos casos se le han atribuido a los eritrocitos las funciones de metabolismo de algunos compuestos químicos. Los eritrocitos contienen actividad NADH-citocromo-C reductasa, así como del citocromo b-5 a nivel de membrana (Kimura *et al.*, 1984; Constantinescu *et al.*, 1993), con funciones aún desconocidas. Se han aislado y caracterizado cuatro tipos de citocromos b-558 (solubles), los cuales fueron purificados del suero sanguíneo (cyt. b-558 (I), b-558 (II)) y de la membrana de estas células (cyt. b-558 (III), b-558(IV)) (Lloyd, *et al.*, 1994; Simonian *et al.*, 1995). De tal forma podemos afirmar que los eritrocitos no están implicados en este caso en el metabolismo de la cafeína.

En el presente trabajo la cafeína es una sustancia que sufre metabolismo en los linfocitos humanos en un tiempo corto que no va más allá de dos horas, sin embargo como potenciadora de daño juega un papel muy importante ya que el vanadio por si solo no es capaz de inducir daño genotóxico, sin embargo cuando se combinan ambos este efecto se hace evidente como un aumento en la frecuencia basal de ICHs. Por tal motivo una de las interrogantes encontradas en el proyecto es ¿la molécula de cafeína como tal esta actuando como potenciador de daño? o ¿es alguno de sus metabolitos?. Hasta el momento no tengo una respuesta concreta basada en datos experimentales propios, sin embargo, una característica importante en muchas de las interpretaciones que se le hace a los efectos pleiotrópicos de la cafeína en células animales como vegetales, es que la cafeína es activa por sí misma (Domon y Rauth, 1969; Kihlman *et*

*al.*, 1971; Lehmann *et al.*, 1975; Walters *et al.*, 1974) y a pesar de que existe un metabolismo de ésta, el daño sobre los mecanismos de reparación pueden ser a largo plazo.

La acción del vanadio puede situarse dentro del ciclo celular desde G1, sin embargo también es cierto que este daño es rápidamente reparado por las enzimas implicadas en los diferentes mecanismos de reparación, sugiriendo que el daño inducido no se acumula, sino que las lesiones que producen los ICHs deben ser frescas, por eso no tenemos una frecuencia de ICHs diferente a la basal, en los experimentos en los cuales las células permanecen en contacto con el vanadio y la cafeína por 72 horas.

Aunque la citotoxicidad del vanadio quedó nuevamente de manifiesto, también se pudo apreciar que cuando se combinó con la cafeína ésta respuesta se incremento. El IM es el porcentaje de células en cultivo las cuales están en proceso de división y dicho parámetro ha sido propuesto como un buen indicador para evaluar y comparar la proliferación celular (Frias y Carnevale, 1983; Rojas *et al.*, 1992 y 1993). La proliferación celular normal puede ser afectada por agentes físicos, químicos y biológicos, lo cual puede conducir a la muerte de la célula o a detener muchas de sus funciones vitales, como su capacidad de división, la síntesis del ADN y del ARN, etc. Esto también podría afectar la genotoxicidad del compuesto en estudio y puede explicar el porque no observamos una frecuencia mayor de ICHs en los tratamientos con 72 horas de permanencia del vanadio en el medio.

Los resultados que se presentan nos indican que tanto el vanadio como la cafeína tienden a disminuir el porcentaje del índice mitótico, hecho que puede explicarse por diferentes eventos: está bien establecido que varios procesos fisiológicos entre los cuales se encuentra la proliferación celular, son regulados por cambios transitorios en las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$ , los cuales son favorecidos por hormonas y factores del crecimiento (Berridge, 1987). Otros estudios han mostrado que los xenobióticos pueden interferir con algunas señales de transducción a diferentes niveles provocando una pérdida en la respuesta normal del  $Ca^{2+}$  a las hormonas y a factores de crecimiento (Bellomo *et al.*, 1987; Kass *et al.*, 1989). Los metales ejercen sus efectos citotóxicos al reaccionar con los componentes implicados en las señales de transducción e interfieren con el movimiento del  $Ca^{2+}$  transitorio, por lo que de esta forma impiden la estimulación celular normal y afectan el crecimiento y la diferenciación

celular (Rossi *et al.*, 1991). Quizás un mecanismo similar podría estar ocurriendo en los ensayos que se realizaron en el presente trabajo con el vanadio.

Se sabe que la toxicidad *in vitro* del vanadio y algunos de sus compuestos, dependen de la valencia, lo que se relaciona con su solubilidad y su densidad, siendo la forma pentavalente la más tóxica para los mamíferos (Galli *et al.*, 1991). Sharma y colaboradores en 1987, señalan que la mayoría de los metales inducen alteraciones en la división celular, en el huso mitótico, arresto en metafase y disminución del IM, lo cual coincide con nuestros resultados.

La cafeína ha sido extensivamente examinada por sus posibles efectos genéticos en una variedad de sistemas eucarióticos (Timson, 1970; Thayer y Palm, 1975; Kihlman, 1977; Legator y Zimmering, 1979). Está bien documentada la habilidad de la cafeína para inducir aberraciones cromosómicas e inhibir el crecimiento de células humanas en proliferación *in vitro* (Ostertag *et al.*, 1965, Kuhlmann, *et al.*, 1968; Timson, 1970; Lee, 1971; Weinstein *et al.*, 1975). Se sabe que las dimetilxantinas con el grupo metilo en la posición 1 (grupo al cual pertenece la cafeína) en concentraciones altas (750 µg/ml), son las más citotóxicas (Weinstein, 1975). Investigaciones previas han observado una disminución significativa en el IM en cultivo de linfocitos humanos expuestos a concentraciones milimolares de cafeína (Timson, 1970; Weinstein *et al.*, 1975).

Los resultados observados en nuestros tratamientos están de acuerdo con los comportamientos señalados para ambas sustancias de manera independiente, por lo que ya combinados, el vanadio y la cafeína al parecer están ejerciendo un efecto de tipo sinérgico sobre el IM.

Por su lado, la cinética de proliferación celular (CPC) que sería la base para obtener el IR, junto con el IM, son parámetros que han sido utilizados ampliamente para evaluar la proliferación y los Toxicogenetistas los utilizan para complementar la evaluación del daño al ADN tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudios previos, han mostrado que ambos parámetros son reproducibles y pueden ser utilizados como biomarcadores tempranos de la exposición a xenobióticos (González *et al.*, 1990; Rojas *et al.*, 1992; Ostrosky, 1994).

La adición de la bromodesoxiuridina a los cultivos de linfocitos permite que al incorporarse este análogo en lugar de timina en el ADN de nueva formación, se



diferencien las cromátidas hermanas y se puedan identificar las células en metafase que se han duplicado, una, dos o más veces haciendo posible el examen de la cinética de poblaciones celulares en división (Tice *et al.*, 1996). Los tratamientos realizados con vanadio y cafeína muestran que el índice de replicación (IR), tiene un comportamiento irregular aunque de manera general se observó una tendencia a aumentar lo cual concuerda con la cinética de proliferación (datos que no se presentan), de tal forma que la velocidad de división se vio disminuida (es decir tardan más en dividirse) en relación con los testigos. Esto nos está indicando que los compuestos que estamos combinando están retrasando la capacidad de proliferación del linfocito lo cual puede afectar la genotoxicidad inducida por el pentóxido de vanadio en ciertas condiciones de tratamiento.

Finalmente, se sabe que el vanadio tiene efectos complejos y diversos sobre las funciones biológicas las cuales se originan de su habilidad para actuar como oxianión, oxication, o prooxidante (Stern *et al.*, 1993). En este caso se trabajó con el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) que es un vanadato, el cual se puede comportar como un oxianión y como un oxication ya que al intracelularmente es reducido a vanadilo (V (V) a V (IV)), pero como prooxidante probablemente no porque es un compuesto neutro.

Actualmente se piensa que la acción del vanadio sobre la actividad enzimática simple, es inadecuada para explicar el amplio espectro de sus efectos celulares. Se puede proponer acciones sobre la expresión de los genes. Consistente con su actividad mitogénica, el vanadio estimula la expresión de al menos dos oncogenes. Sin embargo, las acciones de las especies activas derivadas del oxígeno sobre la expresión de oncogenes es consistente con el papel de al menos uno de estos genes (c-jun), en mediar el impacto de los radicales libres en la promoción tumoral (Stern *et al.*, 1993).

El vanadio puede amplificar acciones mitogénicas de los factores de crecimiento, modificar la expresión de genes implicados en la promoción tumoral, e inactivar genes supresores de tumores. Tal multiplicidad de acciones del vanadio refleja la variedad de mecanismos químicos por los cuales puede modular los procesos celulares.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados del índice mitótico permiten corroborar el hecho de que el pentóxido de vanadio es citotóxico para los linfocitos humanos *in vitro*.
- ❖ De la misma forma podemos decir que la combinación vanadio-cafeína resulto ser citotóxica para el mismo sistema de prueba siendo la cafeína un potenciador de la acción del vanadio en cuanto al IM.
- ❖ La combinación vanadio más cafeína resulto ser genotóxica excepto en los tratamientos donde los tiempos de contacto del compuesto metálico con las células fue más largo (72 h desde el inicio del cultivo), debido a que las lesiones producidas por el vanadio (observadas en los otros protocolos) son reparadas.

Para los tratamientos en S/G2 proponemos que:

- ❖ Las lesiones inducidas por el vanadio deben ser frescas para obtener el efecto potenciador de la cafeína, y tener contacto con ésta en la ultima fase-S. El hecho de no haber encontrado diferencias en la frecuencia de ICHs entre ambos tratamientos vanadio-cafeína (24 y 48 h de vanadio más cafeína 43 ó 67 h) indican que no hubo acumulación del daño. Esto evidencia que el  $V_2O_5$  tiene una vida media corta como inductor de lesiones al ADN (24 h aproximadamente).
- ❖ El incremento en la frecuencia de ICHs en el cultivo de linfocitos tratados con cafeína a las 43 h confirma que el  $V_2O_5$  puede inducir lesiones al ADN y que un número considerable de ellas son eficientemente reparadas por los mecanismos inhibido por la cafeína.
- ❖ La cafeína tiene un tiempo de acción que también es "corto" (máximo 2 h) para ejercer su efecto sobre los mecanismo de reparación, debido a que después de este tiempo es metabolizada y es posible que alguno de los metabolitos que se generen tengan un tiempo de acción mayor a las 2 h.

- ❖ Las lesiones que persisten, son las que no son reparadas fácilmente conduciendo a la formación de ICHs en divisiones celulares sucesivas.
- ❖ Los cultivos tratados con  $V_2O_5$  por 48 horas mostraron que este compuesto puede inducir una cierta frecuencia de lesiones, las cuales estuvieron presentes cuando el tratamiento de cafeína fue aplicado a las 43 h o a las 67 h y ser expresadas como ICHs. Estos incrementos observados pudieron deberse a la persistencia de algunas de estas lesiones y a la posible falta de acción de los mecanismos de reparación.
- ❖ El hecho de que las alteraciones en los procesos de reparación por la cafeína puedan contribuir parcialmente a incrementar el número de lesiones inducidas por el  $V_2O_5$ , las cuales pueden en su momento ser transformadas en ICHs, hace posible que la inducción de ICHs en S/G2 del segundo ciclo de división se deba a un acortamiento en la fase de G2 inducido por la cafeína junto con un incremento en la duración de la fase-S inducido por la acción del vanadio.
- ❖ La cafeína es metabolizada *in vitro*, en un lapso no mayor de 2 horas. Los datos obtenidos mediante el análisis de los cromatogramas del HPLC mostraron que la teobromina aparece como metabolito de la cafeína desde el primer tiempo de cosecha (2 horas de iniciados los cultivos), seguida de la teofilina.
- ❖ El hecho de que hayamos encontrado metabolismo de la cafeína por parte de los linfocitos nos permite concluir que estas células presentan los citocromos 1A2 y 2A6 responsables de la transformación de la cafeína.
- ❖ En relación con los metabolitos de la cafeína, detectados en el cultivo de linfocitos humanos, no se debe descartar la posibilidad de que algunos de los efectos observados pueden ser debidos a ellos.

## 8. REFERENCIAS

- Aeschbacher, H.U.** y Würzner, H. P. (1975). Effect of Methylxanthines on hepatic microsomal enzymes in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 33:575-581.
- Aeschbacher, H. U.**, Meier, H., Ruch, E. y Würzner, H.P. (1984). Investigation of coffee in sister chromatid exchange and micronucleus test *in vivo*. *F. Chem. Toxic.* 22:803-807.
- Aida, T.** y Bodell, W.J. (1987). Effect of caffeine on cytotoxicity and sister chromatid exchange induction in sensitive and resistant rat brain tumor cells treated with 1,3-bis(2-chloroethyl)1-nitrosourea. *Cancer Res* 47:5052-8.
- Ajchenbaum, F.**, Ando, K., De Caprio, J. A., Griffin, J.D. (1993). Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268:4113-4119.
- Aldridge, A.** y Neims, A. H. (1979). The effect of Phenobarbital and  $\beta$ -naphthoflavone on the elimination kinetics and metabolic pattern of caffeine in the beagle dog. *Drug Metab Dispos* 7:378-382.
- Aldridge, A.**, Parsons, W.D., Neims, A.H. (1977). Stimulation of caffeine metabolism in the rat by 3-methylcholantrene. *Life Sci.* 21:967-974.
- Alessio, L.**, Maroni, M., y Dell'Orto, A (1988). Biological monitoring of vanadium. En: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Clarkson, T.W., Friberg, L., Nordberg, G.F. y Sager, P.R. (Eds.). Plenum Press, N.Y.
- Altamirano-Lozano, M.**, Alvarez-Barrera, L. Basurto-Alcántara, F., Valverde, M. y Rojas, E. (1996). Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogen Carcinog. Mutagen.* 16:7-17.
- Altamirano-Lozano, M.**, Alvarez-Barrera, L. y Roldán-Reyes, E. (1993). Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.* 21:711-713.
- Altamirano-Lozano, M.**, Roldán-Reyes, E. y Rojas, E. (1998) Genetic toxicology of vanadium compounds. En: Nriagu, J.O. (ed.) *Vanadium in the environment*. Part two. Health effects. Vol. 3 A Wiley-Interscience Publication JOHN WILEY & SONS, N.Y.
- Andersson, A. C.** (1983). Hydroxyurea induces sister chromatid exchanges in G<sub>2</sub>: Implications for the formation of chromosomal aberrations. *Hereditas* 98:61-64.
- Aranda, J.V.**, Collinge, J.M., Zinman, R., Watters, G (1979). Maturation of caffeine elimination in infancy. *Arch Dis Child* 54:946-949.
- Arion, D.**, Meijer, L. Brizuela, L. Beach, D. (1988). Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* 58:833-846.
- Arnaud, M.J.** (1985). Pharmacokinetics in animal chronic toxicological studies. *J. Pharm. Clin.*, 4:259-268
- Arnaud, M. J.** y Welsh, C. (1980). Comparison of caffeine metabolism perfused rat liver and isolated microsomes. En: Coon, M.J., Conney, A.H., Estabrook, R.W., Gelboin, H.V. Guillelte,

J.R. y O'Brien, P.J., (eds.), *Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis*, Vol., New York, Academic Press, pp. 813-816.

**Arnaud, M. J.** (1993). Metabolism of caffeine and Other Components of Coffee. En: *Caffeine, Coffee and Health*. Garattini, S. (eds.), Raven Press, NY.

**Balansky, R.** (1992). Effects of sodium selenite and caffeine on mutagenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and aflatoxin B1 in *S typhumirum*. *Mutat. Res* 269:307-317.

**Barale, R., Barra, I., Sbrana, I., Migliore, L., Marrazzini, A., Scarcelli, V., Bacci, E., Di Sibio, A., Tessa, A., Cocchi, L., Lumbrano, V., Vassale, C. y He, J.** (1993). Monitoring human exposure to urban air pollutants. *Environ. Health Perspect. Suppl.*, 101:(Suppl, 3),89-95.

**Baroch, E.F.** (1983). Vanadium and vanadium alloys. En: *Encyclopedia of Chemical Technology*. vol. 23 Ed Wiley and Sons.

**Baron, J.M., Zwadlo-Klarwasser, G., Jugert, F. Hamann, W., Rubben, A. Mukhtar, H. y Merk, F.** (1998) Cytochrome p450 1B1: A major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets. *Biochem, Pharmacol.* 56:1105-1110.

**Baserga, R.** (1985). The biology of cell reproduction. Cambridge, MA: Harvard University Press.

**Beamish, H., Williams, R., Chen, P., Lavin, M. F.,** (1996). Defect in multiple cell cycle checkpoints in ataxia-telangiectasia postirradiation. *J. Biol. Chem.* 271:20486-20493.

**Beaulacu-Bailargeon, L.Ph.D. y Desrosiers, C.B.Sc** (1987). Caffeine-cigarette interaction of fetal growth. *Am. J. Obst. Gynecol.* 157:1236-1240.

**Bellomo, G., Thor, H. y Orrenius, S.** (1987). Alterations in inositol phosphate production during oxidative stress in isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 262:1530-1534.

**Berridge, M.J.** (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: Two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56:159-193.

**Berthou, F., Ratanasavanh, D. Riche, C., Voirin, T., Guillouzo, A.** (1989). A comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica* 19:401-417.

**Berthou, F., Flinois, J-P, Ratanasavanh, D., Beaune, P., Riche, C. y Guillouzo, A.** (1991). Evidence for the involvement of several cytochromes p-450 in the first steps of caffeine metabolism by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 19:561-567.

**Betancourt, M., Ortíz, R. y González, C** (1992) Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutation Res.* 283:173-177.

**Bonati, M., Latini, R., Marzi, E., Cantoni, R., Belvedere, G.** (1982). [2-<sup>14</sup>C]Caffeine metabolism in control and 3-methylcholanthrene induced rat liver microsomes by high pressure liquid chromatography. *Toxicol Lett* 7:1-7.

**Boynton, A.L. Evans, T.C. y Crouse, D.A.** (1974). Effects of caffeine on radiation-induced mitotic inhibition in S-180 Ascites tumor cells. *Radiat. Res.*, 60:89-97.

**Buckton, K.E.** y H J Evans (Eds.) (1973) *Methods for Analysis of Human Chromosome Aberrations*, World Health Organization, Geneva

**Busse , P.M.**, Bose, S.K., Jones, R.W. y Tomach, L.J (1978). The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells III. Enhancement of X-ray-induced killing during G<sub>2</sub> arrest. *Radiat. Res.*, 76:292-307.

**Butler, M.A.**, Iwasaky, M. Guengerich, F.P. Kadlubar, F.F. (1989). Human cytochrome P-450 (p-450-IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7696-7700.

**Cande, W.Z.** y Wolniak, S. M (1980). Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate. *J Cell Biol.*, 79: 573-580

**Chaganti, R.S.K.**, Schonberg, S. y German, J. . (1974). A many fold increase in sister chromatid exchanges in Blom's Syndrome lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 71:4508-4512.

**Chang, T.H.T.**, Ray, F.A., Thompson, D.A., Schlegel, R., (1997). Disregulation of mitotic checkpoints and regulatory proteins following acute expression of SV40 large T antigen in diploid human cells. *Oncogene*. 14:2383-2393.

**Chao, Y.**, Shin, Y.L., Chiu, J.H., Chau, G.Y., Lui, W.Y., Yang, W.K., Lee, S.D., Huang, T.S. (1998) Overexpression of cyclin A but not Skp 2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 58:985-990.

**Cleaver, J.E.** (1981). Correlations between sister chromatid exchange frequency and replicon sizes, *Exp. Cell Res*. 136:27-30.

**Cohen, M.D.** (1992). Forward mutatis and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in culture mammalian cells. *Mutat Res*. 269:141-148.

**Colbert, J.** y Back, D.J. (1996) Theophylline metabolism human liver microsomes: inhibition studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 276:912-917.

**Consumers Union.** (1990). *US Pharmacopeia. Drug Information for the Consumer*, Easton, PA, Mack Publishing, pp. 274-277, 287-289.

**Constantinescu, A.**, Han, D. y Packer, L. (1993) Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J. Biol. Chem*, 268(15):10906-13.

**Cortés, F.**, Daza, P. Piñero, J. y Escalza, P. (1994). Evidence that SCE induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24:203-207.

**Cornish, H.H.** y Christman, A.A. (1957). A Study of the metabolism of theobromine, theophylline, and caffeine in man. *J. Biol. Chem.* 228:315-323.

**Cortizo, AM.**, Bruzzone, L , Molinuevo,, S., Etcheverry, S.B. (2000) A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology*, 147(2):89-99.

**Daly, J.W.** (1993). Mechanism of Action of Caffeine. En: *Caffeine, Coffee, and Health*. S. Garattini (Eds.) Raven Press, Ltd., NY

**Daza, P., Ezcalza, P. Mateos, S y Cortés, F. (1992)** Mytomicyn C, 4-nitroquinoline- 1- oxide and ethyl methanesulfonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCE during successive cell cycles in human lymphocytes. *Mutation Res.* 270:177-183.

**Deknudt, Gh y Deminnatti, M. (1978).** Chromosome studies in human lymphocytes after *in vivo* exposure to metal salts. *Toxicology* 10:65-70.

**Denaro, Ch.P., Wilson, M., Peyton, J. y Benowitz, N L ( 1996).** Effect of liver disease on urine caffeine metabolite ratios. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 59: 624-635

**De Weerd-Kastelein, E.A., Keijzer, W , Rainaldi, G. y Bootsma, D. (1977).** Induction of sister chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum cells after exposure to ultraviolet light. *Mutat Res.* 45:253-61.

**Dou, Q.P., Fridovich, Keil., J.L., Pardee, A. B.. (1991).** Inducible proteins binding to the murine thymidine kinase promotor in late G1/S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1157-1161.

**Domon, M. y Rauth, M.A. (1969)** Effects of caffeine on ultraviolet-irradiated mouse L cells, *Radiation Res.* , 39:207-221.

**Donovan, P.J., Smith, G.T., Lawlor, T.E., Cifone, M.A., Murli, H. y Keefer, L.K. (1997).** Quantification of diazeniumdiolate mutagenicity in four different *in vitro* assays. *Nitric Oxide* 1:158-166.

**Dyson, N , (1998).** The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262.

**Dulic, V., Lees, E., Reed, S. (1992)** Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257:1958-1961. ,

**ECETOC, (1983).** Identification and assessment of the effects of chemicals on production and development reproductive toxicology. Monograph No. 5.

**Elinder, C.G., Gerhardsson, L. y Oberdoesrster, G. (1988).** Biological Monitoring of Toxicol Metals-Overviw. En: *Biological Monitoring of Toxicol Metals.* Carkson, T.W., Friberg, Norderber, G.F. y Sager, P.R. Plenum Press. New York. 3d.

**Evans, H.J. (1970)** Population cytogenetics and environmental factors. En: Pfizer Medical Monographs Vol. 5, Edinburgh University Press, pp.192-216

**Evans, H.J. (1982)** Chromosomal mutations in human populations. *Cytogenet. Cell Genet* 33:48-56.

**Evans, H.J. K. E. Buckton, G.E. Hamilton y A. Carothers (1979)** Radiation -induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Nature*, 277:531-534.

**Eliopoulos, P. y Mourelatos, D. (1998).** Lack of genotoxicity of silver iodide in the SCE assay *in vitro* and *in vivo*, in the Ames/microsome test. *Teratog Carcinog Mutagen* 18:303-308.

**Elledge, S.J. (1996).** Cell cycle checkpoints:preventing an identity crisis. *Science* 274:1664-1672.

**Fingert, H.J., Chang, J.D., Pardee, A.B., (1986).** Citotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res.* 46:2463-2467.

**Ford, J.B. (1998).** The earliest views. *Sci Am.* 278(4):50-53

- Frias, S.** y Carnevale, A. (1983). Cell cycle in normal individuals and patients with Down, Cry-du-chat and Turner syndromes.
- Gallan, P.**, Nigg, E. A. (1992). Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear traslocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 117:213-224.
- Galli, A.**, Velloso, R., Fiorio, R., Della Croce, C., Del Carratore, R., Morichetti, E., Giromini, L., Rosellini, D. Y Bronzetti, G. (1991) Genotoxicity of vanadium compounds in yeast and cultured mammalian cell. *Teratogen. Carcinocen. Mutagen.* 11:175-183.
- Gautier, J.** Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. Maller, J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60:487-494
- Gautier, J.** Solomon, M., J., Booher, R. N. Bazan, J. F. Kirschner, M. W. (1991). Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* 67:197-211.
- Gennaro, A.R.** (eds.) (1985). Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Easton, PA, Mack Publishing, pp. 1133-1135.
- Gennart, J. Ph.**, Baleux, Ch. Verellen-Dumoulin, J.P., Buchet, R., de Meyer y Lauwerys, R. (1993). Increased sister-chromatid exchanges and tumor markers in workers exposed to elemental chromium-cobalt-and nickel-containing dusts. *Mutation Res.*, 299:55-61
- Gilbert, S.G.**, Stavric, B., Klassen, R.D. y Rice, D.C. (1985). The fate of chronically consumed caffeine in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5:578-587.
- Gilbert, S.G.**, So, Y, Klassen, R.D., Geoffroy, S., Stavric, B. y Rice, D.C. (1986). Elimination of chronically consumed caffeine in the pregnant monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 239:891-897.
- Giri, A. K.**, Sanyal, R., Sharma, A. y Talukder, G. (1979). Cytological and cytochemical changes induced through certain heavy metals on mammalian systems. *Natl Acad. Sci. Lett* 2: 391-394.
- Giri, A.K.** y Mukhopadhyay, A. (1998). Mutagenicity assay in *Salmonella* and *in vivo* sister chromatid exchange in bone marrow cells of mice for four pyrazolone derivatives. *Mutat Res.* 420(1-3):15-25.
- Glatt, H.**, Kaltenbach, E., y Oesch, F. (1980). Epoxide hydrolase activity in native and in mitogen-stimulated lymphocytes of various human donors. *Cancer Res.* 40:2552-2556.
- Glatt, H.**, Wolfel, T., y Oesch, F. (1983). Determination of epoxide hydrolase activity in whole cells (human lymphocytes) and activation by benzoflavones. *Biochem. Biophys. Res, Commun.* 110: 525-529.
- González-Fernández, P.**, y López-Sáez, J.F. (1982). Effect of caffeine on G2 repair and its reversion by adenosine. *Mutat Res* 106:255-264.
- González-Fernández, P.**, Hernández, P. y López-Saez, J.F. (1985). Effect of caffeine and adenosine on G<sub>2</sub> repair: Mitotic delayed and chromosome damage. *Mutat. Res.* 149:275-281
- González, C.**, Villaseñor, L. y Betancourt, M. (1990). Cinética de la proliferación *in vitro* de linfocitos de niños desnutridos. *Rev. Invest Clin.* 42:18-22.



- Goth, R.** y Cleaver, J.E. (1976). Metabolism of caffeine to nucleic acid precursors in mammalian cells. *Mutation Res* 36: 105-114.
- Graedel, T.E.**, Hawkins, D.T., y Claxton, L.D. (1986). *Atmospheric Compounds*. Academic Press NY.
- Grant, D.M.**, Campbell, M. E., Tang, B K, Kalow, W. (1987). Biotransformation of caffeine by microsomes from human liver. Kinetics and inhibition studies. *Biochem Pharm* 36:1251-60.
- Griffith, H.W.** (1989). Complete Guide to Prescription and Nonprescription Drugs, Los Angeles, The body Press, pp. 1044-1045.
- Hansen, K.** y Stern, R.M. (1984). A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *Toxicol. Environ. chem.* 9:87-91.
- Hartmann, A.**, Herkomer, K., Gluck, M. y Speit, G. (1995). DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet assay ), *Environ. Mol. Mutagen.* 25:180-187.
- Hartwell, L.H.** Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629-633.
- Haynes, R.H.** y Collins J.D.B. (1984). The mutagenic potential of caffeine. En: Dews, P.B. ed. *Caffeine perspectives from research*. Berlin, Springer. Pp.221-238.
- Hedlund, E.**, Gustafsson, J.A., Warner, M. (1998) Cytochrome P450 in the brain: 2B or not 2B. *Trends Pharmacol. Sci.* 19:82-85.
- Herwig, S.**, Strauss, M. (1997). The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem* 246:581-601.
- Herzinger, T.**, Funk, J.O., Hilmer, K., Elick, D., Wolf, D.A. Kind, P. (1995). Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the Cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene* 11:2151-2156.
- Hofstra, A.H.** y Uetrecht, J.P. (1993). Myeloperoxidase-mediated activation of xenobiotics by human leukocytes. *Toxicology* 82:221-242
- Hopkins, L.L.** y Mohr, H.E. (1974). Vanadium as and essential nutrient. *Fed. Proc.* 33:1173-1175
- Hori, Ch.** y Oka, T. (1981). Vanadate enhances the stimulatory action of insulin on DNA synthesis in cultures mouse mammary gland. *Biochim, Biophys. Acta.* 610:235-240.
- Howard, A.** , Pelc, S.R. (1953). Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage, *Heredity* 6:261-273.
- IARC**, (1987). IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Supp. 7. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updatin of IARC Monographs Volumes 1 to 42, Lyon.
- IARC**, (1990). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 50, Pharmaceutical Drugs, Lyon pp. 307-332
- IARC**, (1991). Methylxanthines. En: Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. Volume 51 *Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyosal*. Lyon France.

**Iannuzzi, L., Di Meo, G.P., Perucatti, A., Ferrara, L. Gustavsson, I. (1991).** Sister chromatid exchange in chromosome of cattle from three different breeds under similar conditions. *Hereditas* 114:201-205.

**Iliakis, G. (1995).** Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin. Oncol.* 24:602-615.

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

**Kalow, W. y Tang, B.K. (1991)** Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* 50:508-519.

**Kanematsu, N., Hara, M. y Kada, T. (1980)** Recuassay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutation Res.* 77:109-116.

**Kass, G.E., Duddy, S.K., Moore, G.A. y Orrenius, S. (1989).** 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone rapidly elevates cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration by mobilizing the inositol 1,4,5-trisphosphate sensitive  $Ca^{2+}$  pool. *J Biol Chem* 264(26):15192-8.

**Kastan, M.B., Onykere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991).** Participation of p53 protein en the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51:6304-6311.

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

**Kaufmann, W.K. y Paules, R. S. (1996).** DNA damage an cell cycle checkpoints. *FASEB J.* 10:238-247.

**Kesavan, P.C. y Natarajan, A.T. (1985).** Protection an potentiation of radiation clastogenesis by caffeine: Nature of possible initial events. *Mutation Res.* 143:61-68.

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

**Kazantzis, G. y Lilly, L. (1986).** Mutagenic and carcinogenic effects of metals. En: *Handbook on the Toxicology of Metals.* L. Friberg, Gunnar F. Nordberg, Velimir, B. Vouk,(Eds.) Segunda Edición. De Elsevier, Amsterdam-Oxford. Pp 319-390.

**Kellerman, G., Luyten-Kelleman, M y Shaw, C. R. (1973).** Presence and induction of epoxide hydrase in cultured human leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Common.,* 52:712-716.

**Kihlman, B.A. (1966).** Action of chemicals on dividing cells. "Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall, Inc. pp.260.

**Kihlman, B.A., Norlen, K., Sturelid, S. y Odmark, G. (1971).** Caffeine and 8-ethoxycaffeine produce different types of chromosome-breaking effects depending on the treatment temperature. *Mutation Res.*

**Kihlman, B. A. (1977).** Caffeine and chromosomes (Elservier, New York). Kligerman, A. D., Bryant, M. F , Erexson, G L. Y Rabinowitz, J.R. (1984) Development of rodent peripheral blood lymphocyte culture systems to detect cytogenetic damage *in vivo*. En: *Sister Chromatid Exchanges* (Tice, R.R., Hollanender, A. (Eds.) Plenum Press, N.Y. pp. 569-584.

**Kimura, S., Abe, K. y Sugita, Y. (1984).** Differences in C-terminal amino acid sequences between erythrocyte and liver cytochrome B5 isolated from pig and human. Evidence for two tissue-specific forms of cytochrome b5.

**Kimler, B.F., Leeper, D.B., Snyder, M.H., Rowley, R., y Schneiderman, M.H. (1982).** Modification of radiation-induced division delay by caffeine analogues and dibutyryl cyclic AMP. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 41(1):47-58.

**Kiyokawa, H., Busquets, X., Powell, C.T., Ngo, L., Rifkind, R.A., Marks, P.A., (1992).** Cloning of a D-type cyclin from murine erythroleukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2444-2447

**Kligerman, A.D., Bryant, M.F., Erexson, G.L. y Rabinowitz, J.R. (1988).** Persistence of ICH-inducing lesions in lymphocytes of mice exposed to diaziquone. *Environ. Molecular Mutagen.* 12:185-199.

**Klug, W.S. y Cummings, M.R. (1996)** *Essential of Genetics*. Segunda Edición, Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.

**Klug, W.S. y Cummings, M.R. (1999)** *Conceptos de Genética*. Quinta Edición, Ed. Printice Hall. México.

**Knuutila, S. (1979).** Human bone marrow cells in the study of cytogenetic abnormalities. Dissertation, University of Helsinki, pp. 18-19.

**Kolb, C.A. y Mansfield, J.M. (1980).** Effect of theophylline treatment of mouse B-6 melanoma cells *in vitro*. *Oncology*, 37:343-352.

**Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D. O., Franza, B.R., Roberts, J.M. (1992).** Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257:1689-1694.

**Krishna, G., Xu, J., Nath, J. y Ong, T. (1985)** *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* 158:81-87.

**Kuhlmann, W., Fromme, H-G, Heege, E-M., Ostertag, W. (1968)** The mutagenic action of caffeine in higher organisms. *Cancer Res.* 28:2375-2389.

**Lakhanisky, T., Bazzoni, D., Jadot, P., Joiris, I., Laurent, C., Ottogali, M., Pays, A., Planard, C., y Vlemynck, C. (1993)** Cytogenetic monitoring of a village population potentially exposed a low level of environment pollutants. Phase 1: SCE analysis. *Mutat Res.*, 319:317-323.

**Lang, H. (1975).** Model for repair inhibition by caffeine. *Studia Biohys.* 50:213-221.

**Lau, C.C., Pardee, A.B. (1982)** Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen Mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2942-2946.

**Lee, S. (1971).** Chromosome aberrations induced in cultured human cells by caffeine. *Japan. J. Genetics* 46:337-344.

**Legator, M.S., y Zimmering, S. (1979).** Review of the genetic effects of caffeine. *J. Environ. Science Hlth. Part c.* 13:135-185.

**Lehman, A.R. (1972).** Effect of caffeine on DNA synthesis in mammalian cells. *Biophys. J.* 12:1316-1325.

- Lehman, A.R.**, Kirk-Bell, S., Arlett, C.F., Paterson, M.C., Lohoman, P.H.M., de Weerd-Kastelein, E.A. y Bootsma, D. (1975). Xeroderma pigmentosum cell with normal levels of excision repair have a defect in DNA synthesis after UV-irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.)*. 72:219-223.
- Leonard, A.I.** y Gerber, G.B. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317:81-82.
- Levine, A. J.**, Momand, J., Finlay, C.A. (1991) The p53 tumor suppressor gene. *Nature*. 351:453-456.
- Li, J.**, Meyer, A.N. Donoghue, D.J. (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94:502-507.
- Lloyd, E.**, Ferrer, J. C., Funk, W.D. Mauk, M.R., y Mauk, A.G. (1994). Recombinant human erythrocyte cytochrome b5. *Biochemistry* Sep 27,33(38):11432-7.
- Loch, R.B.** y Ross, W.E. (1990a). Inhibition of p34<sup>cdc2</sup> kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50:3761-3766.
- Loch, R.B.** y Ross, W.E. (1990b). Possible role for p34<sup>cdc2</sup> kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of G2 arrest in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 50:3767-3771.
- Lucke-Huhle, C** (1982). Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery. *Radiat. Res.* 89:298-308
- Lucke-Huhle, C.**, Heiber, L. y Wegner, R. (1983). Caffeine-mediated release of alpha-radiation-induced G2 arrest increases the yield of chromosome aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.* 43:123.
- Lundberg, A.S.** y Weinberg, R.A. (1998). A function inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-Cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* 18:753-761.
- Maltzman, W.**, Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:1689-1694.
- Madle, E.**, Obe, G., Hansen, J. y Ristow, H. (1981). Harman and norharman: induction of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes *in vitro* and interaction with isolated DNA. *Mutat Res.* 90(4):433-42.
- Matsushime, H.**, Roussel, M. F. Ashmun, R. A., Sherr, C.J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 65:701-713.
- Matsushime, H.**, Roussel, M. F., Sherr, C.J. (1991). Novel mammalian cyclins (CYL genes) expressed during G1. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 56:69-74.
- McElvoy, G.K.** (1989) American Health Formulary Service (AHFS). drug information, Bethesda, M.D American Society of Hospital Pharmacists, pp. 1179-1181.
- Migliori, L.**, R. Bocciardi, C. Macri y F. Lo Jocono (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Res.*, 319:205-213.
- Minshull, J.** Golsteyn, R. Hill, C.S., Hunt, T. (1990). The A and B-type cyclin associated Cdc2 kinases in xenopus turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J.* 9.2865-2875.

- Miller, E.C** y **Miller, J.A** (1981) *Cancer*, 47: 1055-1064.
- Moffat, A.C.** (ed.) (1986) *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, 2nd ed. , London, The Pharmaceutical Press, pp. 420-422.
- Mollinari, M.** (2000) Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif.* 33:261-274.
- Morales-Ramírez, P.,** Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T. (1987), Analysis of spontaneous sister-chromatid exchanges *in vivo* by three-way differentiation. *Mutation res.* 178:49-56.
- Morales-Ramírez, P.,** T. Vallarino-Kelly y R. Rodríguez-Reyes (1988). Occurrence *in vivo* of sister chromatid exchange at the same locus in successive cell divisions causing by no repairing lesion induced by gamma rays. *Environ Mol. Mutagen.*, 11:183-193.
- Morales-Ramírez, P.,** Cruz-Vallejo, V, L., Vallerino-Kelly, T. y Rodríguez-Reyes, R. (1995a). Persistence during G1 of gamma rays or mitomycin C-induced lesions eliciting SCE in murine salivary gland cells *in vivo*. *Som. Cell and Mol. Genet.* 21:33-41.
- Morales-Ramírez, P.,** Rodríguez-Reyes, R. y Vallarino-Kelly, T. (1995b). Fate lesions that elicit sister chromatid exchanges (FLE-SCE) produced in DNA by alkylating agents *in vivo*. *Mutation Res.* 344:13-26.
- Motokura, T.,** Bloom, T. Kim, H.G., Juppner, H. Ruderman, J.V., Kronenberg, H.M., Arnold, A., (1991) Anovel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350:512-515.
- Murray, A** Hunt, T. (1993). *The Cell cycle: an introduction*. New York: W.H. Freeman and Co.
- Navas, P.,** Hidalgo, A. y Garcia Herdurgo, G. (1986). Cytokinesis in onion roots: inhibition by vanadate and caffeine. *Experientia*, 42:437-439.
- Nechay, B.R.** (1984). Mechanism of action by vanadium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24, 501-524.
- Nigg, E. A.** (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471-480.
- Nolan, L.L.** y Kidder, G.W. (1979). Caffeine: Its action on purine metabolizing enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91:253-262.
- O'Connor, P.M.,** Ferris, D.K., Hofmann, I., Jackman, J., Draetta, G., Kohn, K.W. (1994). Role of the Cdc25 phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9480-9484.
- Okoyoma R.** y Kitao, Y. (1981). Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hydrazine on chromosome damage induced by mitomycin C in human lymphocytes. *Mutat Res.* 81:75-80.
- Olive. P.L.,** Vanath, J.P. y Durand, R.E. (1990) Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:779-783.
- Ortiz, R.** y Betancourt, M. (1984) Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J.Nutr* 114:472-476.

- Ortiz-Monasterio, P.F.**, Cortinas de Nava, C. y Maffey, G.M.L. (1987) *Manejo de los desechos industriales peligrosos en México*. Ed. Universo 21, México
- Ostertag, W.**, Duisberg, E., y Sturmman, M. (1965). The mutagenic activity of caffeine in man. *Mutation Res.* 2:293-296.
- Ostrosky, W.P.** (1994). El índice mitótico y la cinética de proliferación linfocitaria en el monitoreo biológico. *Gaceta Médica de México*, 130(6):432-437.
- Oikawa, A.**, Tohda, H., Kanai, M., Miwa, M. y Sugimura, T. (1980). Inhibitors of poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase induce sister chromatid exchanges. *Biochem Biophys Res Commun.* 97(4):1311-6.
- Owusu-Yaw, J.**, Cohen, M.D., Fernando, S.Y. y Wei, C.I. (1990) An assessment of genotoxicity of the vanadium pentoxide. *Toxicol Lett.* 50, 327-336
- Painter, R.B.** (1980a). A replication model of sister chromatid exchange. *Mutat Res.* 70:337-341.
- Painter, R.B.** (1980b). Effect of caffeine on DNA synthesis in irradiated and unirradiated mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 143:289-301.
- Pardee, A.B.** Dubrow, R. Hamlin, J.L., Kletzien, R.F. (1978). Animal cell cycle. *Ann Rev. Biochem* 47:715-750.
- Paules, R.S.**, Levadokou, E. N., Willson, S.J., Innes, C.L., Rhodes, N., Tlsty, T.D., Galloway, D.A., Donehower, L.A., Tainsky, M.A., Kaufman, W.K. (1995). Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. *Cancer Res.* 55:1763-1773.
- Phillips, T.D.**, Nechay, B.R. y Herdelbaugh, N.D. (1983). Vanadium chemistry and the kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973
- Pines, J.** y Hunter, T. (1989). Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cycle and for interaction with p34<sup>cdc2</sup>. *Cell* 58:833-846.
- Pines, J.** y Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Natur* 346:760-763.
- Pines, J.**, Hunter, T (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 115:1-17.
- Pollard, I.**, Jabbour, H. y Mehrabani, P.A.(1987). Effects of caffeine administered during subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. *Toxicol. Environm. Health* 22:1-15.
- Poon, R. Y.C.**, Chau, M.S., Yamashita, K., Hunter, T. (1996). The role of Cdc2 feedback loop Control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells. *Cancer Res.* 57:5168-5178.
- Rajaraman, R.** y Fulkner, G. (1984). Reverse transformation of Chinese hamster ovary cells by methyl xanthines. *Exp. Cell Res.* 154:342-356.
- Ratanasavanh, D.**, Berthou, F, Dreno, Y., Mondine, P., Guillouzo, A., y Riche, C. (1990). Methylcholanthrene but not Phenobarbital enhances caffeine and theophylline metabolism in cultured adult human hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 39:85-94.

**Rao, P. N.** Johnson, R. T. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 225: 159-164.

**Raucy, J.L.**, Ingelman-Sundberg, M., Carpenter, S., Rannug, A., Rane, A., Franklin, M. y Romkes, M. (1999). Drug metabolizing enzymes in lymphocytes *J. Biochem Molecular Toxicology* 13(3/4):223-226.

**Reichard, P.** (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis *Ann Rev Biochem.* 57:349-374. Review.

**Renner, H.W.** (1982) Sister chromatid exchanges induced by methylxanthines contained in coffee, tea and cocoa. *Experientia* 38:600.

**Roberts, J.J.** (1984). Mechanism of potentiation by caffeine of genotoxic damage induced by physical and chemical agents: possible relevance to carcinogenesis. En: Dews, P.B., ed., *Caffeine perspectives from Recent Research*, Berlin, Springer, pp. 77-85.

**Rojas, E.**, Montero, R., Herrera, L.A., Sordo, M. Gonsebatt, M.E., Rodríguez, R. y Ostrosky-Wegman, P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible end points in genetic toxicology testing. *Mutation Res.*, 282:283.

**Rojas, E.**, Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodríguez, R. y Ostrosky-Wegman, P. (1993). Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of anteneoplastic activity. *Anti-Cancer drugs* 4:637-640.

**Rojas, E.**, Valverde, M. Herrera, L.A., Altamirano-Lozano, M. y Ostrosky-Wegman, P. (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 359: 77-84.

**Roldán, R.E.** y Altamirano, L.M.A. (1990) Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*, 245:61-65.

**Roldán, R.E.** (1992). Efectos Mutagénico y Teratogénico del Pentóxido de Vanadio. Tesis De Maestría, ENEP-Zaragoza, UNAM.

**Roldán, R.E.** y Altamirano, L.M.A. (1990). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Res.* 245:61-65.

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

**Roschin, I.V.** (1967). Toxicology of Vanadium Compound Used in Modern Industry. *Water Res.* 32:26-32

**Roschin, I.V.** (1968). Vanadium and its compounds. Moscow Medicine Publishing House.

**Rosenblatt, J.**, Gu., Y., Morgan, D.O. (1992). Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl.Acad.Sci. USA* 89:2824-2828.

**Rossi, A.**, Manzo, L., Orrenius, S., Vahter, M. y Nicotera, P. (1991). Modifications of cells signaling in the cytotoxicity of metals. *Pharmacology & Toxicology*, 68:424-429.

**Rowley, R.** (1992). Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. *Radiation Research* 129:224-227.

**Russell, K.J.,** Wiens, L.W., Demers, G.W., Gallows, D.A. Plon, S.E., Groudine, M. (1995). Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res.* 55:1639-1642.

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

**Sabbioni, E.,** Pozzi, G. Pintar, A. Casella, L. y Garattini, S. (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 DNA cleavage by vanadyl complex: Implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health. Perspect.* 102:35-36.

**Samson, L.,** Thomale, R. y Rajewsky, M. (1988) Alternative pathway for the *in vivo* repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 287:861-863.

**Schvarzman, J.B.,** Cortes, F., González-Fernández, A. Gutiérrez, C. y López-Sáez, J.F. (1979). On the nature of sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted chromosomes. *Genetics* 92:1251-1264.

**Seidegard, J.,** DePierre, J. W. y Pero, R.W (1984). Measurement and Characterization of Membrane-bound and soluble epoxide hydrolase activities in resting mononuclear leukocytes from human *Cancer Res.* 44: 3654-3660.

**Selby, P.** y Sancar, A. (1990a). Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3522-3525.

**Selby, Ch. P.** y Sancar, A. (1990b). Mechanisms of caffeine inhibition of DNA repair in *E. coli*. *Mutation Environment. Part A,* pages 179-193.

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

**Shin, Ch.G.,** Strayer, J.M., Wani, M.A y Snapka, R.M. (1990). Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: Caffeine inhibition of topoisomerases *in vivo* *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 10:41-52.

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

**Singh, N.P.,** Danner, D.B., Tice, R.R., Brant, L. y Schneider, E.L. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, *Mutat. Res.* 237:123-130.

**Shiraishi, Y.,** Yamamoto, K., y Sanberg, A.A. (1979). Effects of caffeine on chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges induced by mitomycin-C in BrdU labeled human chromosomes. *Mutation Res* 62:139-149.

**Shiraishi, Y** y Sandberg, A.A. (1980). Effects of caffeine-induced defective DNA replication on SCE and chromosome aberrations produced by alkylating agents. *Mutat Res* 72(2):251-6.

**Siemon, H.,** Schneider, H. y Fuhrmann, G.F. (1982). Vanadium increased selective K<sup>+</sup> permeability in human erythrocytes. *Toxicology* 22:272-278.



**Simonian, M.A.**, Babian, M.A. y Simonian, G.M. (1995). Cytochrome b-558 from blood serum and erythrocyte membranes. Isolation, purification, and brief characteristics. *Biokhimiya*, 60(12):1977-87.

**Sivikova, K.** y Dianovsky, J. (1995). Sister-chromatid exchanges after exposure to metal-containing emissions. *Mutat. Res.* 327:17-22.

**Smeets, M.F.**, Mooren, E.H., Begg, A.C. (1994). The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and Cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother. Oncol.* 33: 217-227.

**Snyder, M. H.**, Kimler, B.F. y Leeper, D. B. (1977) The effect of caffeine on radiation-induced division delay. *Int. J. Radiat. Biol* 11:173-210.

**Stavric, B.** (1988). Methylxanthines: toxicity to humans 2.Caffeine. *Food chem. Toxicol.*, 26:645-662.

**Steiner, W.W.** y Kuempel, P. L. (1998). Sister chromatid exchange frequencies in *Escherichia coli* analyzed by recombination at the different resolvase site. *J. Bacteriol* 180(23):6269-6275.

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

**Strausfeld, U.**, Labbe, J. C. Fesquet, D. Cavadore, J.C., Picard, A. Sadhu, K. Russell, P. Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351:242-245.

**Sun, M.** (1987). Toxicity of vanadium and its environmental health standar Changdu West China University of medical Sciences, Report.

**Sutter, T.R.**, Tang, Y.M., Hayes, C.L., Wo, Y.P., Jabs, W., Li, X., Yin, H., Cody, C.W. y Greenlee, W.F. (1994). Complete cDNA sequence of a human diosin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome p450 that maps to chromosome 2. *J. Biol Chem* 269:1309213099.

**Tang, Y.M.**, Wo, Y.P., Stewart, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Sutter, T.R. y Greenlee, W.F. (1996). Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem* 271:28324-28330.

**Tang-Liu, D.D.S.** y Riegelman, S. (1981). Metabolism of theophylline to caffeine in adults. *Res Commun in Chemical Pathol and Pharmacol* 34:371-380.

**Tice, R.R.**, Scheneider, E.L. y Rary, J.M. (1996). The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp. Cell. Res.* 102:232.

**Thayer, P.S.** y Palm, P.E., (1975). A current assessment of the mutagenic and teratogenic effects of caffeine. *CRC Critical Rev. Toxicology* 10:345-369.

**Timson, J.** (1970). The effect of caffeine on the mitosis of human lymphocytes in cultures. *Br. J. Pharmac.* 38:731-734.

**Timson, J.** (1977) Caffeine *Mutat Res* 47:1-52

**Tohda, H** y **Oikawa, A.** (1988). Characterization of the enhancing effect of caffeine on sister-chromatid exchanges induced by ultraviolet radiation in excision-proficient Xeroderma pigmentosum lymphoblastoid cells. *Mutat Res.* 201:1-8.

**Tolmach, L.J.**, Jones, R.W. y **Busse, P.M.** (1977). The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. I. Delayed inhibition of DNA synthesis. *Radiat. Res.* 71:653-665

**Tomasovic, S.P.** y **Dewey, W.C.** (1978). Comparative studies of the effects of drugs on X-ray-induced G<sub>2</sub> delay. *Radiat. Res.* 74:112-128.

**Toyoshima, F.**, Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., Nishida, E. (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G<sub>2</sub> checkpoint. *EMBO J.* 17:2728-2735.

**Tsuji, H.**, **Heartlein, M.W.** y **Latt, S.A.** (1988). Disparate effects of 5-bromodeoxyuridine on sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Bloom syndrome fibroblasts. *Mutat Res.* 198:241-253.

**Tucker, J.D.**, **Auleta, A.**, **Cimino, M.C.**, **Desifield, K.L.**, **Jacobson-Kram, D.**, **Tice, R.R.**, y **Carrano, A.V.** (1993). Sister chromatid exchange, second report gene-tox program. *Mutat Res* 297:101-180.

**Tucker, J.D.** y **Preston, J.R.** (1996). Chromosomal aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res.* 365:147-159.

**Tyson, J.** (1999) Models of cell cycle control in eukaryotes. *J. Biotechnology* 71:239-244.

**US Food and Drug Administration** (1980). Caffeine Content of Various Products (FDA Talk Paper T80-45), Rockville, MD.

**US Pharmacopeial Convention** (1990). *US Pharmacopoeia The National Formulary*, 22nd ed., Rockville, MD, pp.204-205.

**Villanueva, S.**, **Botello, A.V.** y **PáezuOsúna, F.** (1988). Evaluación de algunos metales pesados en organismos del río Coatzacoalcos y de la laguna del ostión, Veracruz, México. *Contam. Ambiental.* 4:19-31.

**Vouck, V.** (1990) General chemistry of metals. En: *Handbook on the toxicology of metals.* Frieberg, L., Nordberg y Vouk, V. (Eds.) Elsevier Science Publisher B.V.

**Waldren, C.A.**, **Patterson, D.**, **Kato, H.** y **Rumsby, P.** (1983). Nucleoside metabolism, caffeine and repair. En: *Nygaard, O. F. and Simic, M. G. (eds.), Radiprotection and Anticarcinogens.* Academic Press, NY.

**Walters, R.A.**, **Gurley, L.R.** y **Tobey, R.A.** (1974). Effects of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell-cycle traverse of mammalian cells. *Biophys J.* 14:99-118.

**Waters, M.D.** (1977). Toxicology of vanadium. *Adv. Mod. Toxicol.*, 2147-189.

**Watt, J.L.** y **Stephen, G. S.** (1986). Lymphocyte Culture for Chromosome Analysis. En: *Human Cytogenetics.* Rooney D.E. y Czeepulkowski, B.H. (Eds.), IRL PRESS, Oxford Washington DC.

**Weinsten, D.**, **Mauer, M.**, **Katz, M.L.** y **Kazner, S.** (1975). The effect of methylxanthines on chromosomes of human lymphocytes in culture. *Mutation Res.* 31:57-61.

**Wheeler, C.W.** y Guenther, T.M. (1991) Cytochrome P450-dependent metabolism of xenobiotics in human lung. *J. Biochem Toxicol.* 6:163-169.

**Wietholtz, H.** Voegelin, M., Arnau, M J., Bircher, J., Preisig, R. (1981). Assessment of the cytochrome P-448 dependent liver enzyme system by a caffeine breath test. *Eur J Pharmacol* 21: 53-59.

**WHO (1988).** (World Health Organization) Vanadium. *Environmental Health Criteria* 81, Geneva.

**Won, K.-A,** Xiong, Y., Beach, d. Gilman, M.Z. (1992). Growth regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9910-9914.

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

## 9. PUBLICACIONES

**DEL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TESIS DOCTORAL SE DERIVARON LOS SIGUIENTES TRABAJOS PUBLICADOS:**

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

**Elia Roldán-Reyes**, Catia Aguilar-Morales, Sara Frías-Vazquez y Mario Altamirano-Lozano (1997) Efecto de la cafeína en la fase G2 de linfocitos humanos *in vitro* tratados a diferentes tiempos con pentóxido de vanadio. *Tópicos de Investigación y Posgrado.* V(3):170-179.

# Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by vanadium pentoxide in combination with caffeine

E. Roldán-Reyes<sup>1</sup>, C. Aguilar-Morales<sup>1</sup>, S. Frías-Vázquez<sup>2</sup> and M. Altamirano-Lozano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza UNAM, <sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética Instituto Nacional de Pediatría SS. México

**Keywords:** Vanadium pentoxide, caffeine, sister chromatid exchanges

**Abstract:** We used cultured human lymphocytes to analyse the effect of caffeine on sister chromatid exchanges induced by vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ). In comparison with controls, the mitotic index and replicative index decreased in cultures treated at different times with  $V_2O_5$  or caffeine. However, the frequency of sister chromatid exchanges was not modified by either treatment. In experiments carried out with  $V_2O_5$  in combination with caffeine, the frequency of sister chromatid exchange increased.

**Introduction:** Research on the biological effects of vanadium has increased rapidly during the last decade due to its toxicological, genotoxic and reprotoxic impact in mammals [1]. Data on the genotoxicity of several vanadium compounds were reviewed recently by Leonard and Gerber [2], who showed conflicting results with regard to the mutagenic and clastogenic activity of vanadium in different assay systems.

The effect of vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ) on mammalian cells has been assessed using both *in vitro* and *in vivo* animal models. In Chinese hamster V79 cells and CHO cells,  $V_2O_5$  has been reported to be clastogenic, inducing a high incidence of structural chromosomal aberrations (SCA), micronuclei and sister chromatid exchanges (SCE) but not gene mutation [3,4]. In contrast, in human lymphocytes and bone marrow cells of mice,  $V_2O_5$  does not raise the frequency of these endpoints [5,6]. In human lymphocytes, however,  $V_2O_5$  treatment increases the frequency of polyploid cells and cells with satellite associations [5].

Sun [7] observed micronuclei in mouse bone marrow cells after the administration of  $V_2O_5$  by intraperitoneal (i.p.) or subcutaneous injection or after inhalation. Oral administration yielded negative results. In the dominant lethal assay (DL) in mice treated with  $V_2O_5$ , Sun [7] found negative results. However, Altamirano-Lozano *et al* [8] reported a low frequency of DL in mice treated i.p. with  $V_2O_5$ . Recent reports by Rojas *et al* [9] and Altamirano-Lozano *et al* [8], indicate that  $V_2O_5$  can induce single strand breaks (SSB) in the DNA of human lymphocytes and mice germ cells.

In many cases, primary lesions induced in DNA are efficiently restored by various repair mechanisms, though their inhibition could increase the frequency of DNA damage (e.g. chromosomal aberrations or sister chromatid exchanges) [10]. When a mutagen interacts with a compound with repair-inhibiting action, the frequency of DNA damage is higher than that induced by the mutagen alone (enhancement effect induced by the repair-inhibitor agent) [10-13].

There is evidence that caffeine produces a variety of pharmacological and cellular responses in a wide spectrum of biological systems [10,11]. Caffeine is a well-known mutagenic-enhancing compound of many DNA-damaging agents, presumably acting by shortening the duration of the cell cycle and/or by reducing the ability of cells to repair DNA lesions [10-13].

The aim of the present study was to evaluate the effects of a mutagenic-enhancing compound, caffeine, on the DNA damage induced by  $V_2O_5$  using human lymphocytes as a working model.

**Materials and methods:** Lymphocyte cultures were prepared by adding 0.25 mL of heparinised blood from two non-smoking, healthy 25-30 year-old males, to 4.5 mL of RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Company, St Louis MO, USA) and 0.25 mL of phytohemagglutinin-P (Sigma). The cultures were incubated for 72 h at 37°C, and 24 h after initiation, 5-bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma) was added at a final concentration of 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

At 70 h of incubation, 0.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of colchicine (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA) was added. Two hours later, the cells were harvested by centrifugation, treated with hypotonic shock, and fixed. Slides were made by dropping single drops of the cell suspension, air-dried, immersed in KCl (0.075 M) and irradiated with UV-light. The slides were then incubated for 20 min in 2 x SSC 60°C and stained with Giemsa for differential staining of sister chromatids [6]. The same donor blood was used in both the experiment and its replicate. All slides were coded before analysis.

Working solutions of  $V_2O_5$  were: 2, 4 and 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (99.6% pure, Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wis., USA). That of caffeine was 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Sigma). They were selected on the basis of preliminary experiments, prepared in distilled water, and sterilised by filtration. The cultures were treated with vanadium alone (at 0, 24 or 48 h after beginning the cultures), caffeine alone at 43 h or 67 h after beginning the cultures, or vanadium (at 0, 24 or 48 h after beginning the cultures) in combination with caffeine treatment (43 or 67 h after beginning the cultures) (Figure 1).

For every concentration and experiment, 1,000 cells were analysed for mitotic index (MI). SCE frequency was analysed in 30 second-division mitotic figures, and the replicative index (RI) was calculated as follows:  $RI = (1M_1 + 2M_2 + 3M_3)/100$ , where  $M_1$ ,  $M_2$  and  $M_3$  represent percentages of first-, second-, and third-division metaphases, respectively [14].

We used Student's *t*-test to evaluate the significance of differences in frequency of sister chromatid exchanges. The replicative index was evaluated using the Chi-square test and for the mitotic index the 'Z' test was used.

**Results:** In comparison with controls, the MI and RI decreased in lymphocyte cultures treated at different times with  $V_2O_5$  or caffeine, while the sister chromatid exchange frequency was not modified by either treatments (Tables 1, 2 and 3)

Table 1 shows the effects of caffeine added to the cultures after  $V_2O_5$  treatment at time 0 (72 h of treatment) in the first experiment. We found no differences in the sister chromatid exchanges. The MI in lymphocyte cultures exposed to  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  of  $V_2O_5$  and caffeine at 43 h was lower than in the controls. The RI was also lower in all treated cultures than in controls.

In lymphocytes treated with  $V_2O_5$  24 h (experiment 2) or 48 h (experiment 3) after beginning the cultures (48 or 24 h of vanadium treatment) with caffeine at 43 h or 67 h, almost all of the  $V_2O_5$  doses significantly lowered the MI. The RI also declined (Tables 2 and 3). When treatment with  $V_2O_5$  began 24 h after the initiation of the lymphocyte culture, and with caffeine at 43 h, the sister chromatid exchange frequency increased significantly at  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . With caffeine treatments at 67 h, the SCE frequency rose significantly at  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Table 2). When vanadium was added the last 24 h to lymphocyte cultures, the sister chromatid exchange frequency increased significantly in the two highest doses in both caffeine treatments (Table 3).

**Discussion:** These findings agree with those of previous *in vivo* and *in vitro* studies [3,5,6,11,15] in which treatment with  $V_2O_5$  or caffeine did not raise the sister chromatid exchange frequency in human lymphocyte cultures. However, in the experiments with caffeine in combination with vanadium pentoxide, the sister chromatid exchange frequency did increase.

The SCE test is a sensitive technique for detecting exposure to mutagenic agents [16,17]. Nevertheless, the mechanism of formation and the biological significance of sister chromatid exchanges have not been established. Clearly, DNA lesions leading to SCE occur during DNA duplication and can differ in their nature [18]. The DNA lesions can be lost by cell death, dilution of lesions through division of precursor stem cells, or DNA repair. Kligerman *et al* [19]

Table 1. Mitotic index, sister chromatid exchanges and replicative index in human lymphocytes after 72 h of  $V_2O_5$  treatment in combination with caffeine treatment at 43 h or 67 h of culture time (means  $\pm$  SD)

Treatment time with caffeine ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentration treatment with vanadium ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mitotic index (%)	Sister chromatid exchanges	Replicative index
-	-	$2.40 \pm 0.51$	$5.19 \pm 0.28$	1.94
-	2	$1.90 \pm 0.84$	$5.32 \pm 0.36$	1.87
-	4	$1.50 \pm 0.58^*$	$5.77 \pm 0.44$	1.74
-	6	$1.30 \pm 0.48^*$	$6.00 \pm 0.29$	1.67*
43 h	-	$2.60 \pm 0.35$	$4.95 \pm 0.44$	1.95
+	2	$2.40 \pm 0.53$	$5.50 \pm 0.40$	1.74
+	4	$1.80 \pm 0.21$	$6.09 \pm 0.83$	1.71
+	6	$1.60 \pm 0.32$	$6.40 \pm 0.65$	1.62***
67 h	-	$2.30 \pm 0.30$	$4.30 \pm 0.51$	1.96
+	2	$2.10 \pm 0.79$	$5.07 \pm 0.57$	1.86
+	4	$2.05 \pm 0.48$	$5.33 \pm 0.68$	1.75
+	6	$1.65 \pm 0.20$	$6.07 \pm 0.65$	1.71

\*As compared with negative control,  $p < 0.05$ .

\*\*As compared with caffeine 43 h control  $p < 0.05$

found that a percentage of these lesions in DNA, which can elicit sister chromatid exchanges, may persist throughout successive cell generations [18,20].

In cultures exposed to  $V_2O_5$  for 72 h plus caffeine (Figure 1A), there were no differences in sister chromatid exchange frequency. However, when  $V_2O_5$  was added at 24 or 48 h, plus caffeine (Figure 1B-C), lesions induced could be transformed in SCEs. The significant increase in SCE frequency observed only in the  $V_2O_5$  treatments at 24 and 48 h in combination with caffeine at 43 or 67 h, in comparison with control cultures, indicates that lesions induced by vanadium pentoxide must be fresh to obtain the caffeine-potential effect and have contact with caffeine in the late S phase. The lack of differences between sister chromatid exchange frequencies in both  $V_2O_5$ -caffeine treatments indicates no accumulation of DNA damage. It is evidence that  $V_2O_5$  has a short life-time of activity as a lesion-inducer.

Table 2. Mitotic index, sister chromatid exchanges and replicative index in human lymphocytes after 48 h of  $V_2O_5$  treatment in combination with caffeine treatment at 43 h or 67 h of culture time (means  $\pm$  SD)

Treatment time with caffeine ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentration treatment with vanadium ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mitotic index (%)	Sister chromatid exchanges	Replicative index
-	-	$2.40 \pm 0.51$	$5.19 \pm 0.28$	1.94
-	2	$2.20 \pm 0.23$	$5.00 \pm 0.36$	1.85
-	4	$2.00 \pm 0.54$	$5.48 \pm 0.29$	1.73
-	6	$1.70 \pm 0.48$	$5.66 \pm 0.28$	1.66
43 h	-	$2.62 \pm 0.34$	$5.30 \pm 0.48$	1.95
+	2	$1.60 \pm 0.21$	$5.62 \pm 0.40$	1.78
+	4	$1.50 \pm 0.37^{***}$	$5.88 \pm 0.50$	1.50***
+	6	$1.15 \pm 0.13^{***}$	$6.38 \pm 0.34^*$	1.45***
67 h	-	$2.28 \pm 0.35$	$4.95 \pm 0.44$	1.96
+	2	$0.80 \pm 0.43^{*****}$	$6.25 \pm 0.70$	1.87
+	4	$0.65 \pm 0.37^{*****}$	$7.25 \pm 0.48^{***}$	1.66*****
+	6	$0.60 \pm 0.19^{*****}$	$7.71 \pm 0.65^{***}$	1.50*****

\*As compared with negative control,  $p < 0.05$ ; \*\*As compared with caffeine 43 h control,  $p < 0.05$ ; \*\*\*As compared with caffeine 67 h control  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*As compared with vanadium treatment,  $p < 0.05$ ; \*\*\*\*\*As compared with negative control  $p < 0.01$ ; \*\*As compared with caffeine 67 h control,  $p < 0.005$ ; \*\*\*As compared with vanadium 4  $\mu\text{g}$  treatment  $p < 0.05$

Table 3: Mitotic index, sister chromatid exchanges and replicative index in human lymphocytes after 24 h of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> treatment in combination with caffeine treatment at 43 h or 67 h of culture time (means ± SD).

Treatment time with caffeine (20 µg mL <sup>-1</sup> )	Concentration treatment with vanadium (µg mL <sup>-1</sup> )	Mitotic index (%)	Sister chromatid exchanges	Replicative index
-	-	2.40 ± 0.51	5.19 ± 0.28	1.94
-	2	1.85 ± 0.31	5.90 ± 0.36	1.73
-	4	1.80 ± 0.21	5.80 ± 0.29	1.69
-	6	1.70 ± 0.54	6.30 ± 0.37	1.62*
43 h	-	2.45 ± 0.45	5.94 ± 0.82	1.95
+	2	1.40 ± 0.37* ****	6.14 ± 0.61	1.81
+	4	1.25 ± 0.42* ****	7.30 ± 0.61* †	1.77
+	6	0.80 ± 0.31* ** †	7.60 ± 0.59*	1.74
67 h	-	2.15 ± 0.14	5.43 ± 0.49	1.96
+	2	1.05 ± 0.68* **	5.40 ± 0.52	1.65* ****
+	4	0.90 ± 0.58* **	7.30 ± 0.55* ** †	1.59* ****
+	6	0.40 ± 0.39* ** †	8.00 ± 0.69* ** †	1.38* ****

\*As compared with negative control, p < 0.05. \*\*As compared with negative control, p < 0.01. \*\*\*As compared with negative control p < 0.005. \*\*\*\*As compared with caffeine 43 h control, p < 0.05. †As compared with caffeine 43 h control, p < 0.01. ‡As compared with caffeine 67 h control, p < 0.05. §As compared with caffeine control, p < 0.01. ¶As compared with vanadium 4µg treatment, p < 0.05. ††As compared with vanadium 6µg treatment, p < 0.05.

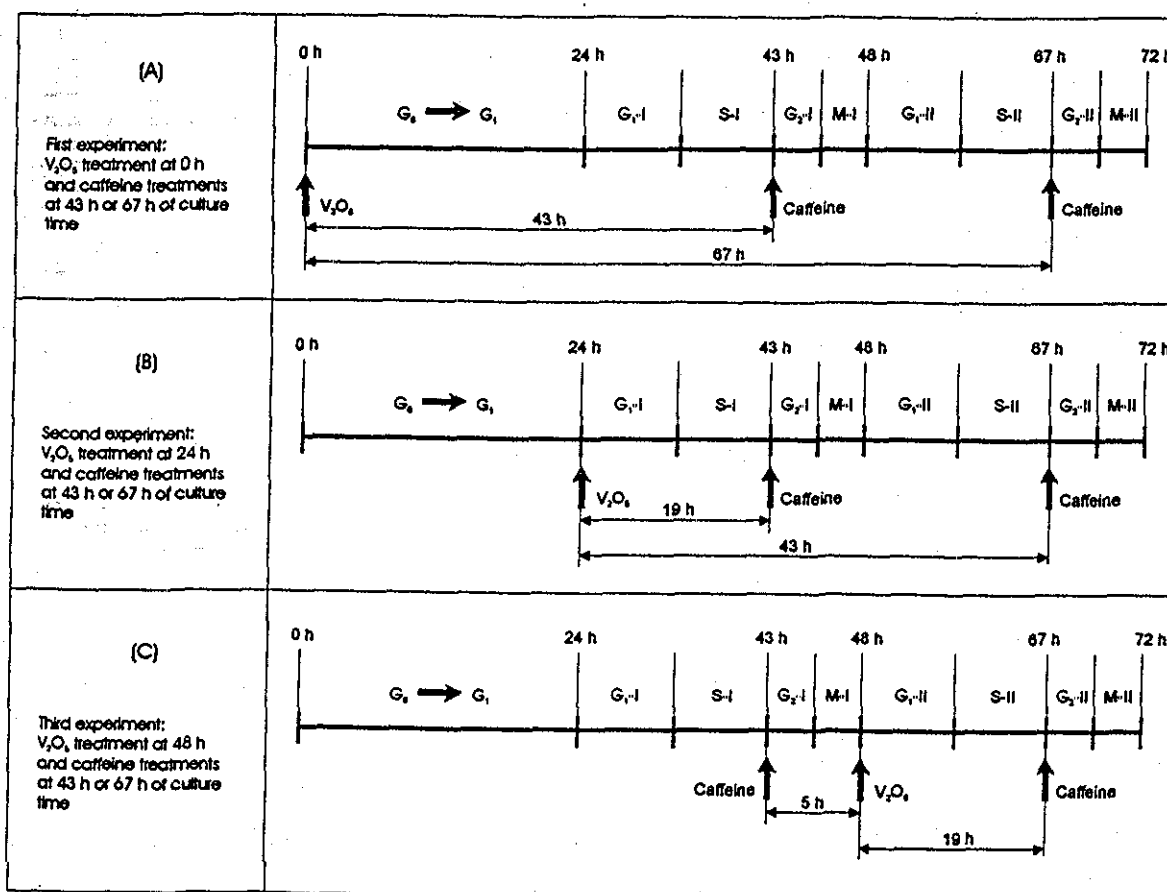


Figure 1. Schematic diagram of sister chromatid exchange experiments with vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and caffeine treatments

The increase in SCE frequency in lymphocyte cultures treated with caffeine at 43 h confirms that V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> can induce DNA lesions and that a considerable number of them are efficiently repaired by the mechanisms inhibited by caffeine

Caffeine has a similar chemical structure to DNA-purines [19] It blocks adenosine receptors, inhibits cyclic-AMP phosphodiesterase, binds to single-stranded DNA, modifies the intracellular distribution of calcium and inhibits the

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

al

activity of poly(ADP) polymerase, topoisomerase II and phosphorylases [11].

All of these actions can be linked to one or several major cellular processes or events including DNA repair (excision, photoreactivation and postreplicative) and cell division [11,21,22]. Some studies have shown that caffeine may affect DNA precursor metabolism [23], as it inhibits purine metabolism enzymes and may thereby alter the normal ratio in the DNA precursor pool, thus causing errors in pairing. Caffeine also inhibits both *de novo* synthesis and the utilisation of exogenous purines. The fidelity of DNA replication is affected by relatively low concentrations of deoxyribonucleosides triphosphates (dNTPs), and both imbalances in the supply of dNTPs and a malfunction of repair systems produce mutations, chromosome aberrations and SCEs in mammalian cells in culture [11,24].

Our study showed no induction of SCE in the 72 h V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-caffeine treatments, and a non-accumulative increase of this endpoint in the 24h V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-caffeine treatments as compared with 48 h V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-caffeine treatments. In the first treatment, caffeine was added at 43 or 67 h after the commencement of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> treatment. In these cases there were no fresh lesions to be expressed as SCEs because the time of activity of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> as lesion-inductor lasts less than 43 h.

24 hours after the cultures were tested with V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> this compound was capable of inducing lesions, which were found present when treatment with caffeine was applied at 43 h. These are expressed as SCEs at the end of the first S phase. When caffeine was added to the 67 h cultures, the observed increase could have been due to the persistence of some lesions.

Finally, the rise in SCE frequency in cells treated with V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> at 48 h from the beginning of the culture are all products of fresh lesions and as a result of the interaction of this lesion with caffeine in the second S phase. The absence of significant differences between 43 and 67 h caffeine treatments in both 24 and 48 h V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> treatments is also evidence that these lesions were not accumulative.

Studies on vanadium compounds and mutagenesis have shown that *in vitro* they modify DNA synthesis and repair [1,25], and induce DNA-protein crosslinks [26]. However, treatment with V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> showed no increase in chromosome aberrations or SCEs in human lymphocytes [5], mice bone marrow cells [6] or Chinese hamster V79 cells [3]. On the other hand, Rojas *et al.* [9] found that V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> induced DNA single strand breaks, and that this kind of damage is repaired very quickly. These results could explain why V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> did not induce SCEs or other chromosomal aberrations in previous studies.

SCEs occur during DNA synthesis, and their production can be stimulated by DNA damage. When the DNA is sufficiently repaired, the cells proceed to mitosis. Chromosomal alterations and SCEs would be formed when the chromatin threads condense into mitotic chromosomes before the replication clusters are ligated, and would be located between replicons rather than at sites of DNA damage [27,28]. Although not all lesions can induce SCEs, there is evidence that at least some of the lesions involved in this process are capable of persisting, and are therefore not easily repaired [29], and of inducing SCEs in successive cell divisions.

Our results suggest that vanadium can induce DNA lesions. However, its activity has a 24 h half-life time, and

these lesions are persistent. On the other hand, alterations in repair processes induced by caffeine may partially help to increase the number of lesions induced by V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, which in turn may be transformed in SCEs. According to some authors [27,28,30], and taking into account data presented here, it is possible that the induction of SCEs in the second cell division was due to a shortening of G<sub>2</sub> phase induced by the caffeine with a possible increase in the length of S phase caused by vanadium treatment.

- 1 WHO 1988. *Environmental Health Criteria*, No. 81. WHO Geneva
- 2 Léonard, A. and Gerber, G.B 1994. *Mutat Res.* 317 8-88
- 3 Zhong B.-Z. Gu Z.-W., Wallace W.E *et al* 1994. *Mutat Res.* 321 35-42
- 4 Owusu-yaw, J., Cohen, M.D., Fernando, S.Y. and Wei, C.I 1990. *Toxicol Lett.* 50 327-336
- 5 Roldán, R.E. and Altamirano, L.M.A 1990. *Mutat Res.* 245, 61-65
- 6 Altamirano-Lozano, M., Alvarez-Barrera, I. and Roldán-Reyes, E. 1993. *Med. Sci Res.* 21 711-713
- 7 Sun, M. (ed.). 1987. *Toxicity of Vanadium and its Environmental Health Standard*. Changdu West China University of Medical Sciences Report
- 8 Altamirano-Lozano, M., Alvarez-Barrera, L., Basurto-Alcántara, F. *et al* 1996. *Teratog. Carcinog. Mutag.* 16 7-17
- 9 Rojas, E., Valverde, M., Herrera, L.A. *et al* 1996. *Mutat Res.* 359 77-84
- 10 Graças, M. and Takahashi, C.S. 1994. *Mutat Res.* 307, 285-292
- 11 International Agency for Research on Cancer 1991. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*. Vol 51. Coffee, Tea Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal. IARC, Lyons
- 12 González-Fernández, A., Hernández, P. and López-Sáez, J.F. 1985. *Mutat Res.* 149, 275-281
- 13 Kihlman, B.A. and Andersson, H.C. 1985. *Mutat Res.* 150, 313-325
- 14 Krishna, G., Xu, J., Nath, J. and Ong, T. 1985. *Mutat Res.* 158, 81-87
- 15 Aeschbacher, H.U., Meier, H.E., Ruch, E. and Würzner, H.P. 1984. *Fd Chem Toxicol.* 22, 803-807
- 16 Šivkovič, K. and Dianovský, J. 1995. *Mutat Res.* 327, 17-22
- 17 Hurtmann, A., Herkomer, K., Glück, M. and Speit, G. 1995. *Environ Mol Mutagen.* 25, 180-187
- 18 Cortés, F., Daza, P., Piñero, J. and Escalza, P. 1994. *Environ. Mol Mutagen.* 24, 203-207
- 19 Kligerman, A.D., Bryant, M.F., Erexon, G.I. and Rabinowitz, J.R. 1988. *Environ. Mol Mutagen.* 12, 185-199
- 20 Daza, P., Escalza, P., Mateos, S. and Cortés, F. 1992. *Mutat Res.* 270 177-183
- 21 Selby, C.P. and Sancar, A. 1990. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 3522-3525
- 22 Rowley, R. 1992. *Radiat Res.* 129 224-227
- 23 Haynes, R.H. and Collins, J.D.B. 1984. In: Dewes, P.B. (ed.) *Caffeine Perspectives from Recent Research* pp. 221-238. Berlin: Springer
- 24 Reichard, P. 1988. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 349-374
- 25 Sabbioni, E., Clerici, L. and Brazzelli, A. 1983. *J. Toxicol. Environ Health* 12 737-748
- 26 Cohen, M.D., Kein, C.B. and Costa, M. 1992. *Mutat Res.* 269, 141-148
- 27 Andersson, H.C. 1983. *Hereditas*, 98 61-64
- 28 Kihlman, B.A. 1966. *Action of Chemicals on Dividing Cells*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- 29 Morales-Ramírez, P., Vallarino-Kelly, T. and Rodríguez-Reyes, R. 1988. *Environ. Mol Mutagen.* 11, 183-193
- 30 Shiraiishi, Y., Yamamoto, K. and Sandberg, A.A. 1979. *Mutat Res.* 62 139-149

This study was supported by DGAPA-UNAM grant IN-202593 and PADEP 500304.

Reprint requests to: Dr E Roldán-Reyes, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM A.P. 9-020, México 15000 D.F., México

Paper received: 4th March 1997, amended 31st May 1997



## EFECTO DE LA CAFEÍNA EN LA FASE G<sub>2</sub> DE LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO TRATADOS A DIFERENTES TIEMPOS CON PENTÓXIDO DE VANADIO

Elia Roldán-Reyes<sup>1</sup>, Catia Aguilar-Morales<sup>1</sup>,  
Sara Frías-Vazquez<sup>2</sup>, Mario Altamirano-Lozano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva  
de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR.), FES Zaragoza UNAM

<sup>2</sup>Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría 55

### RESUMEN

El cultivo de linfocitos humanos ha sido usado para conocer el efecto de la cafeína en combinación con el pentóxido de vanadio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) aplicados a diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas de cultivo) en el Intercambio de Cromátidas Hermanas. En comparación con el grupo testigo el Índice Mitótico disminuyó en los cultivos tratados a diferentes tiempos con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ó cafeína y la Tasa de Proliferación Linfocítica en todos los casos mostró una tendencia a aumentar, sin embargo la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas no fue modificada por ambos tratamientos cuando se aplicaron por separado. En los experimentos realizados con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en combinación con cafeína se observó un incremento en dichos eventos.

**Palabras Clave:** *Pentóxido de vanadio, cafeína, intercambio de cromátidas hermanas, índice mitótico.*

### ABSTRAC

Cultured human lymphocytes were used to analyse the effect of caffeine on sister chromatid exchanges induced by vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). In comparison with controls, the mitotic index and replicative index decreased in cultures treated at different times with V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> or caffeine. However the frequency of sister chromatid exchanges was not modified by either treatment. In experiments carried out with V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in combination with caffeine there was an increase in sister chromatid exchanges frequency.

**Key Words:** *Vanadium pentoxide, caffeine, sister chromatid exchanges, mitotic index.*

### INTRODUCCIÓN

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

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

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

Entre las propiedades químicas de más importancia tenemos la solubilidad y densidad. Desde el punto de vista toxicológico, la solubilidad de los compuestos metálicos está en relación a la presencia de iones H<sup>+</sup> en los disolventes que generalmente son

agua, lípidos u otro tipo de fluido biológico, que transportan los iones y favorecen la absorción de estos elementos en los tejidos (Duffus, 1983; Vecruysse, 1984; Vouk, 1986) De acuerdo a su densidad los metales se clasifican en pesados y ligeros, los primeros son elementos cuya densidad es por los menos cinco veces mayor a la del agua, es decir mayor a 5 g/cm<sup>3</sup>, mientras los ligeros presentan densidades menores (Bolaños, 1990; Duffus, 1983)

Uno de los metales que se ha acumulado gradualmente en el ambiente y en los organismos es el vanadio. Su amplio uso y liberación ha recibido la atención como contaminante ambiental, y por su elevado potencial toxicológico ha sido considerado como peligroso (Baroch, 1983; Leonard & Gerber, 1994; Phillips et al., 1983).

El vanadio es miembro del grupo V-B primer elemento de la serie de transición de la tabla periódica, seguido del niobio y el tantalio. Es un metal de color grisáceo, con densidad de 6.11 g/cm<sup>3</sup> (Baroch, 1983), está presente en dos formas en la naturaleza como isótopo <sup>50</sup>V y <sup>51</sup>V sus estados de oxidación van de V<sup>0</sup>, V<sup>2+</sup>, V<sup>3+</sup>, V<sup>4+</sup>, V<sup>5+</sup>, de estos, los tres últimos son los más comunes y el V<sup>4+</sup> es su forma más estable y el V<sup>3+</sup> en forma de sales es fuerte reductor. Se disuelve en agua, ácidos y forma vanadatos con bases (Carson et al., 1987; Legerkvist et al., 1986; WHO, 1988).

Entre los usos del vanadio, encontramos que en la metalurgia del hierro de un 75 a 85% es usado como aditivo en aleaciones en varios tipos de acero. En la industria química orgánica e inorgánica, es usado como catalizador, donde el pentóxido de vanadio y los metavanadatos son de importancia especial en la producción de ácido sulfúrico, plásticos y en la oxidación de compuestos orgánicos (Baroch, 1983; Carson et al., 1987; Stokinger, 1981; WHO, 1988). Recientemente el uso del vanadio se ha extendido. En la medicina ha adquirido una importancia en la aplicación terapéutica en el control de la diabetes tipo I (Heiliger et al., 1985; Mongold et al., 1990), por su semejanza con el mecanismo de la insulina en la que se obtiene un mejoramiento en la homeostasis de la glucosa (Briehard et al., 1988; Strout et al., 1989).

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

El vanadio puede penetrar en los tejidos del cuerpo por dos vías: el medio y la dieta. El medio incluye la absorción cutánea y transpulmonar la cual contribuye a la mayor parte de la entrada y en la dieta la ruta de absorción es por medio de la ingesta de nutrientes esenciales. La cantidad de vanadio que se absorbe por la piel o por la vía del pulmón es directamente proporcional a la concentración en el ambiente. Se estima que cerca de 25% del vanadio soluble e inhalado se absorbe a través de pulmón, y del 5 a 10% de vanadio ingerido se absorbe por el tracto gastrointestinal, aunque algunos autores sugieren que es del 1 al 2% y el restante es eliminado con las heces (Elinder et al., 1988; French & Jones, 1993).

La toxicidad del vanadio depende de la ruta de entrada, absorción, distribución y solubilidad de los compuestos. Sus sales son las más usadas y las menos tóxicas, la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), en ratón es de 130 g/g para el trióxido de vanadio (V<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), de 23 µg/g para el tricloruro (VCl<sub>3</sub>), y el pentóxido de vanadio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y de 95.4 y 36.33 µg/g para el sulfato de vanadilo (VSO<sub>4</sub>) y el metavanadato de sodio (NaVO<sub>3</sub>) respectivamente, mientras que la concentración tóxica media (CT<sub>50</sub>) en células de hámster Chino del trióxido de vanadio sulfato de vanadilo y metavanadato de amonio (NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>) es de 25, 23 y 16 µg/g respectivamente (Carson et al., 1987; Jones & Basinger, 1983; Leonard & Gerber, 1994; Owusu Yaw et al., 1990; WHO, 1988).

Bioquímicamente, se ha comprobado que el vanadio pentavalente y tetravalente tiene acción múltiple en las células tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conoce que es capaz de inhibir o estimular la actividad de enzimas, entre las que se incluyen las ATPasas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> de varios sistemas de membranas (Cantley et al., 1977; Mourek, 1987), la 2,6-biofosfatasa y 6-fosfofructo-2-cinasa importante en el metabolismo de la glucosa (Gil et al., 1988), las fosfatasa y cinasa de tirosina involucradas en la recepción de insulina y en la transformación y proliferación celular (Inazu et al., 1990) y la fosfatasa alcalina la cual hidroliza ésteres monofosfóricos (Cantley, 1977; López et al., 1976).

Desde el punto de vista mutagénico, el vanadio tiene un impacto biológico importante en el banco genético de los organismos. Estudios de tipo molecular revelan que este elemento en concentraciones micromolares (µM), inhibe o estimula la incorporación de timidina dentro del ADN, provoca cambios en la reparación e induce fuertemente infidelidad en la síntesis del mismo, así como modificar la actividad de la regulación de la división celular de forma dosis dependiente (Canalis, 1985; Carpenter, 1981).

Los resultados de la genotoxicidad del vanadio son poco concluyentes y hasta cierto grado contradictorios y los estudios en linfocitos humanos no excluyen esta ambigüedad. Linfocitos humanos tratados *in vitro* con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en concentraciones de 2.4 y 6 µg, incrementan significativamente la frecuencia de aberraciones cromosómicas numéricas (poliploidias) y la de

asociaciones de satélites por célula y por cromosoma, incrementa el tiempo generacional promedio y disminuye el índice mitótico pero no la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales e intercambio de cromátidas hermanas (Roldán & Altamirano, 1990). Sin embargo, el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> aplicado en combinación con cafeína, en diferentes ciclos de división, las mismas concentraciones del pentóxido incrementan la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas cuando la cafeína es aplicada a las 24 y 48 horas de iniciados los cultivos en las concentraciones de 6 y 4-6 µg respectivamente (Roldán 1992), y en la concentración de 6 cuando se aplica el compuesto metálico a las cero horas y la cafeína a las 48 horas (Roldán *et al.*, 1994).

La cafeína es el principal componente del café, té y muchos refrescos, principalmente los de cola, chocolates, analgésicos y otras drogas (Pollard *et al.*, 1987), y su consumo es amplio entre un gran número de personas. Se le conoce como 1,3,7-trimetilxantina, guaranina y metil-teobromina (Merck, 1989). Además sirve como fungicida, herbicida e insecticida, para las plantas que lo producen (Shin *et al.*, 1990). Asimismo la cafeína tiene una estructura química, similar a las purinas que constituyen al ADN, por lo tanto, tiene el potencial de interferir con la división y metabolismo celular (Alder, 1970).

En linfocitos humanos la cafeína (0.1, 0.5 y 1.0 mM) en combinación con Mitomicina-C, inhibe la reparación posreplicativa (Okoyama y Kitao, 1981), y se ha establecido que amplifica la inducción mutagénica por parte de la N-metil N-nitrosourea y la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en *Salmonella typhimurium* en una concentración de 1.0 mM, esto se efectúa durante la replicación del ADN (Balansky, 1992). En células de hámster Chino, se ha reportado que la cafeína convierte lesiones de cadena doble de ADN, ocasionadas por mutágenos, en aberraciones cromosómicas y fragmentaciones, durante la replicación (Roberts & Kottasaki-Kovatsi, 1986). Los efectos mutagénicos, comutagénicos y anti-mutagénicos mostrados por la cafeína han despertado un gran interés, debido al amplio uso de ésta.

La cafeína potencializa los efectos mutagénicos y letales de agentes genotóxicos. Se sabe que esto se debe, al menos en algunos organismos, a la inhibición de la reparación del ADN (Selby & Sancar, 1990). En *E. coli*, la cafeína (de 10 a 100 mM), inhibe los mecanismos de reparación de fotoreactivación y de escisión de nucleótidos *in vivo* (Witkin, 1969). También ha sido demostrado que la cafeína (10 mM), inhibe el proceso de reparación por escisión de nucleótidos en células HeLa (Selby & Sancar, 1990). De tal forma que la cafeína, induce una variedad de respuestas celulares y farmacológicas en un amplio espectro de sistemas; amplifica los efectos mutagénicos de agentes que dañan al ADN, probablemente por acortamiento del ciclo celular o por reducción de la habilidad de las células para reparar las lesiones. De tal forma que las investigaciones

sobre los efectos amplificadores de las drogas pueden contribuir de forma importante a la quimioterapia en humanos porque la combinación de un inhibidor de la reparación del ADN, como la cafeína, y un agente antitumoral pueden incrementar la citotoxicidad de las células neoplásicas, sin embargo, una combinación de un inhibidor de la reparación y un agente genotóxico puede estar ocurriendo en la vida diaria.

Por otro lado la importancia de elucidar el daño que puedan causar los agentes ambientales sobre el ADN y las consecuencias derivadas para el futuro inmediato de las células y en general de la especie, es estudiado por la Genética Toxicológica (Brusick, 1987; Moutschen, 1985). El hecho de que la naturaleza del material genético sea esencialmente la misma en todos los organismos, ha permitido el uso de modelos biológicos para obtener información del potencial mutagénico y carcinogénico que puedan tener dichos agentes, y de esta forma obtener un parámetro de evaluación de riesgo a las poblaciones humanas (Hoffman, 1981; Moutschen, 1985; Prival, 1980).

Entre los diferentes sistemas de prueba utilizados, los sistemas *in vitro* ocupan el eje central en el estudio del proceso toxicológico (Frazier, 1992). Las fallas en los componentes moleculares y celulares, pueden ser estudiados con sistemas ideales como el cultivo de células de mamífero, en donde se pueden evaluar efectos citogenéticos de sustancias químicas de actividad mutagénica o carcinogénica (Maher & McCormick, 1982; Natarajan & Obe, 1982). De los sistemas *in vitro*, los linfocitos humanos son uno de los más utilizados tanto para estudios citogenéticos como estudios de diagnóstico genético clínico (Lerner & Dixon, 1973), y por las bondades que presenta el cultivo al ser estimulados *in vitro* con un mitógeno como la fitohemaglutinina (Natarajan & Obe, 1982; Klein, 1990).

Para la evaluación de agentes mutagénicos, el sistema *in vitro* de linfocitos humanos ofrece grandes ventajas como: representar una parte del cuerpo en exposición; el núcleo ocupa el 90% del volumen celular; presentan una vida media de 2 a 4 años, lo que permite observar lesiones en su ADN por exposiciones crónicas a bajas dosis (Carrano & Moore, 1982; Klein, 1990; Latt *et al.*, 1981); presentan una actividad de reparación baja en comparación con otros que ciclan normalmente; la mayoría de los linfocitos están en fase de G<sub>2</sub> del ciclo celular, y en cultivo estimulados con un mitógeno con o sin activación metabólica, permite analizar aberraciones cromosómicas de G<sub>2</sub> ó G<sub>1</sub> y aberraciones cromatídicas producidas en S ó G<sub>2</sub> del ciclo celular, intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), cinética del ciclo celular (CCC) y asociaciones de satélites en células en mitosis, y micronúcleos en células en interfase (Carrano & Natarajan, 1988; Latt *et al.*, 1981), así como modificaciones en el número de células que pasan por mitosis (Sharma & Talukder, 1987) mutaciones puntuales e infidelidad en la síntesis de ADN (Moutschen 1985; Natarajan & Obe, 1982; Prival, 1980).

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

Como su nombre lo indica, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH's) son transposiciones simétricas y equivalentes del ADN entre las cromátidas de un mismo cromosoma, involucran rupturas de doble cadena en *locus* homólogos de ambas cromátidas, con su posterior unión y reparación, las rupturas tienen una nueva localización dentro del cromosoma, en las que se mantienen su polaridad sin alterar la morfología cromosómica (Latt, 1979; Latt *et al.*, 1981; Mundry *et al.*, 1981; Taylor, 1958; WHO, 1988).

En vista de la relevancia de estos datos en la literatura, en el presente estudio se evaluó la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos tratados con  $V_2O_5$  ó  $V_2O_3$  en combinación con cafeína aplicada durante la fase de S/G<sub>2</sub> del primero y segundo ciclo celular

### MATERIAL Y MÉTODOS

El cultivos de linfocitos humanos se realizó de la siguiente forma: la sangre heparinizada obtenida de donadores masculinos clínicamente sanos no fumadores de 25 a 30 años de edad fue puesta en 4.25 ml de medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo, USA) y 0.25 ml de Fitohemaglutinina P (Sigma Chemical Co., St. Louis MO; USA). Los cultivos fueron incubados por 72 h a 37°C Veinticuatro horas después de la iniciación, se adicionó a los cultivos una concentración final de 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA). A las 71 horas de incubación se le adicionaron 0.4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de colchicina (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA). Dos horas después las células fueron cosechadas por centrifugación, tratadas con un shock hipotónico y fijadas. Las láminas fueron hechas por goteo, secadas al aire, sumergidas en KCl (0.075 M) e irradiadas con luz ultravioleta (UV), las láminas fueron incubadas por 20 minutos en una solución doble de citratos-salina (2X SSC) a 60°C y teñidas con Giemsa mediante la técnica de Tinción Diferencial para Cromátidas Hermanas (Altamirano-Lozano *et al.*, 1993). Se utilizaron los mismos donadores para todos los experimentos y sus duplicados. Todas las láminas fueron codificadas antes de su análisis.

Para cada concentración y experimentos, se analizaron 1000 células para Índice Mitótico (IM). La frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH's), fue analizada en 30 mitosis de segunda división, la tasa de proliferación linfocítica (TPL) fue calculada de la siguiente forma:  $TPL = 48 \text{ hs de BrdU} / (1M1 + 2M2 + 3M3) \times 100$ , donde M1, M2 y

M3 representan los porcentajes de células en las primeras segundas y terceras divisiones, respectivamente (Figuras 1, 2 y 3) (Krishna *et al.*, 1985).

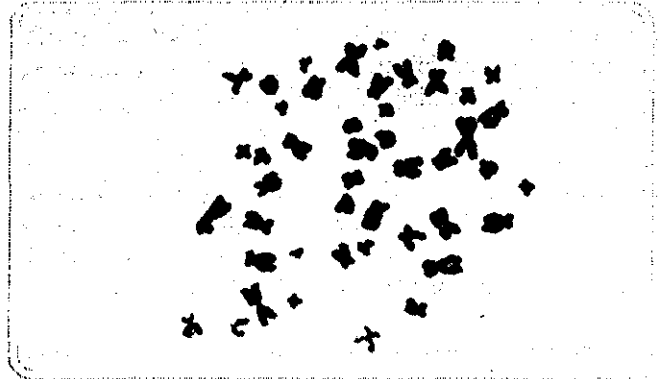


FIGURA 1. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA METAFASE EN PRIMER CICLO DE DIVISIÓN.



FIGURA 2. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA METAFASE EN SEGUNDO CICLO DE DIVISIÓN.

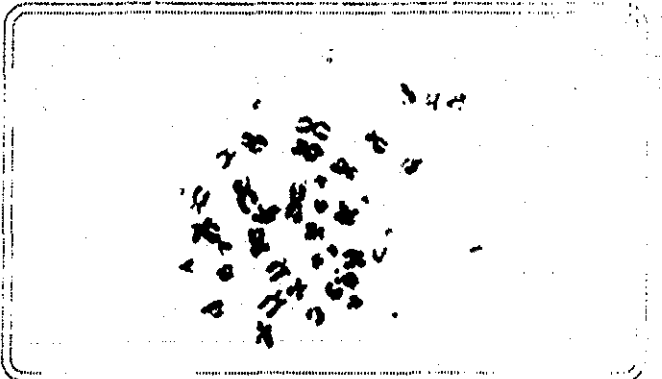


FIGURA 3. FOTOMICROGRAFÍA DE UNA METAFASE EN TERCER CICLO DE DIVISIÓN.

Las concentraciones a partir de la solución de trabajo de pentóxido de vanadio que se utilizaron fueron: 2, 4 y 6  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (99.6% de pureza, Aldrich Chemical Co. Milwaukee, Wis., USA) la cafeína: 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), fueron preparados en agua destilada, y esterilizados por filtración. Los cultivos fueron tratados con vanadio solo (a las 0, 24 y 48 horas después de iniciados los cultivos), la cafeína sola se adicionó a las

43 horas de iniciados los cultivos, en el límite de las fases S/G<sub>2</sub> del primer ciclo celular (S/G<sub>2</sub>-I), ó 67 horas después de iniciados los cultivos desde las fases S/G<sub>2</sub> del segundo ciclo celular (S/G<sub>2</sub>-II), o el vanadio (a las 0, 24 ó 48 h después de iniciados los cultivos) en combinación con los tratamientos con cafeína S/G<sub>2</sub>-I, ó S/G<sub>2</sub>-II. La prueba de "t" de Student fue utilizada para evaluar la significatividad de las diferencias de la frecuencia de ICH's y la TPL y para el IM se utilizó "Z" para proporciones.

## RESULTADOS

Los resultados de la evaluación del Índice Mitótico, Tasa de Proliferación Linfocítica, e Intercambio de Cromátidas Hermanas en cultivo de linfocitos tratados a diferentes tiempos con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o cafeína sola mostraron que estos compuestos no modifican estadísticamente la frecuencia de ICH's, sin embargo el vanadio disminuye el IM y aumenta la TPL (Cuadros I, II y III).

Los efectos de los tratamientos combinados con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> adicionado en los cultivos al tiempo 0 (72 horas de tratamiento) y cafeína, adicionada desde S/G<sub>2</sub>-I o S/G<sub>2</sub>-II, se presentan en el Cuadros I, no se observaron efectos sobre la frecuencia de ICH's, sin embargo, los resultados del IM mostraron que únicamente cuando la cafeína es adicionada a los cultivos expuestos a 6 g ml<sup>-1</sup> de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, se observó una pequeña pero significativa (P<0.05) disminución en este parámetro. En todos los casos la TPL mostró una tendencia a aumentar en comparación con los controles.

Cuando los linfocitos fueron tratados con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 24 ó 48 horas después de iniciados los cultivos (48 ó 24 h de tratamiento con vanadio) y cafeína, desde la fase S/G<sub>2</sub>-I o S/G<sub>2</sub>-II, el índice

mitótico disminuyó significativamente todas las dosis (Cuadros II y III), y se observó un aumento en la TPL.

En los tratamientos con vanadio a las 24 horas de iniciados los cultivos, la frecuencia de ICH's se incrementó significativamente en la concentración de 6 µg ml<sup>-1</sup> en combinación con cafeína en S/G<sub>2</sub>-I, mientras que con los tratamientos con cafeína en S/G<sub>2</sub>-II, la frecuencia aumentó significativamente en la concentración de 4 µg ml<sup>-1</sup> (Cuadro II). Cuando el vanadio se adicionó en las últimas 24 horas, la frecuencia de ICH's se elevó significativamente en las dos dosis más altas en ambos tratamientos con cafeína S/G<sub>2</sub>-I y S/G<sub>2</sub>-II (Cuadro III).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que los diferentes tiempos de tratamiento con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ó cafeína solos no incrementa la frecuencia de ICH's en cultivo de linfocitos humanos. Estos datos confirman los reportes en estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo* (Aeschbacher *et al.*, 1984; Altamirano Lozano *et al.*, 1993; IARC, 1991; Krishna *et al.*, 1985; Roldán & Altamirano, 1990; Zhong *et al.*, 1994). Sin embargo, en los experimentos realizados con cafeína aplicada durante el primera o segunda fase S/G<sub>2</sub> en combinación con pentóxido de vanadio se observó un aumento en la frecuencia de ICH's.

Por muchos años la prueba de ICH's ha sido considerada como una técnica más sensitiva para detectar exposición a agentes mutagénicos que la de aberraciones cromosómicas (Hartmann *et al.*, 1995; Siviková & Dianovsky, 1995). Los mecanismos de formación y el significado biológico no han

TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (µg/ml)	ÍNDICE MITÓTICO* (%)	ICH'S** (X ± E E)	TPL*** (X ± E E) (HORAS)
-	-	2.40 ± 0.51	5.19 ± 0.28	24.48 ± 0.96
-	2	1.90 ± 0.84	5.32 ± 0.36	25.63 ± 0.38
-	4	1.50 ± 0.58 <sup>a</sup>	5.77 ± 0.44	27.58 ± 0.31 <sup>a</sup>
-	6	1.30 ± 0.48 <sup>a</sup>	6.00 ± 0.29	28.80 ± 0.99 <sup>a</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 1 <sup>er</sup> ciclo de división (43 h)				
+	-	2.60 ± 0.35	4.95 ± 0.44	24.61 ± 0.53
+	2	2.40 ± 0.53	5.50 ± 0.40	27.58 ± 0.54 <sup>a</sup>
+	4	1.80 ± 0.21	6.09 ± 0.83	28.07 ± 0.38 <sup>a</sup>
+	6	1.60 ± 0.32	6.40 ± 0.65	29.62 ± 0.29 <sup>a</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 2 <sup>o</sup> Ciclo de división (67 h)				
+	-	2.30 ± 0.30	4.30 ± 0.51	24.48 ± 0.61
+	2	2.10 ± 0.79	5.07 ± 0.57	25.80 ± 0.85
+	4	2.05 ± 0.48	5.33 ± 0.68	27.42 ± 0.17 <sup>a</sup>
+	6	1.65 ± 0.20	6.07 ± 0.65	28.07 ± 0.47 <sup>a</sup>

CUADRO I. ÍNDICE MITÓTICO, INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's), Y TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA (TPL), EN LINFOCITOS HUMANOS DESPUÉS DE 72 H DE TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 43 Ó 67 HORAS DE CULTIVO.

(TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS CERO (0) HORAS DE INICIADOS LOS CULTIVOS).

ANALIZADOS CON: \* PRUEBA DE "Z" PARA PROPORCIONES; \*\* "t" DE STUDENT; \*\*\* CHI-CUADRADA.

COMPARADOS CON: <sup>a</sup> TESTIGO NEGATIVO, P<0.05; <sup>b</sup> TESTIGO NEGATIVO DE CAFEÍNA A LAS 43 H.

TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (µg/ml)	ÍNDICE MITÓTICO* (%)	ICH'S** (X ± E E)	TPL** (X ± E E) (HORAS)
-	-	2.40 ± 0.57	5.19 ± 0.28	24.74 ± 0.37
-	2	2.20 ± 0.23	5.00 ± 0.36	25.90 ± 0.56
-	4	2.00 ± 0.54	5.48 ± 0.29	27.74 ± 0.20 <sup>a</sup>
-	6	1.70 ± 0.48	5.66 ± 0.28	28.91 ± 0.30 <sup>a</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 1 <sup>er</sup> ciclo de división (43 h)				
+	-	2.60 ± 0.35	5.30 ± 0.48	24.61 ± 0.53
+	2	1.60 ± 0.21	5.62 ± 0.40	26.96 ± 0.48 <sup>a</sup>
+	4	1.50 ± 0.37 <sup>ab</sup>	5.88 ± 0.50	32.00 ± 0.71 <sup>a</sup>
+	6	1.15 ± 0.13 <sup>ab</sup>	6.38 ± 0.34 <sup>a</sup>	33.10 ± 0.42 <sup>a</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 2 <sup>o</sup> Ciclo de división (67 h)				
+	-	2.30 ± 0.30	4.95 ± 0.44	24.48 ± 0.61
+	2	0.80 ± 0.43 <sup>acd</sup>	6.25 ± 0.70	25.66 ± 0.39
+	4	0.65 ± 0.37 <sup>acd</sup>	7.25 ± 0.48 <sup>efg</sup>	28.91 ± 0.57 <sup>a</sup>
+	6	0.60 ± 0.19 <sup>acd</sup>	7.71 ± 0.68 <sup>gh</sup>	32.00 ± 0.71 <sup>a</sup>

CUADRO II. ÍNDICE MITÓTICO, INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's) Y TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA (TPL), EN LINFOCITOS HUMANOS DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 43 H Ó A LAS 67 H DE CULTIVO. (TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS 24 HS DE INICIADOS LOS CULTIVOS).

ANALIZADO CON: \* PRUEBA DE "Z" PARA PROPORCIONES; \*\* "t" DE STUDENT; \*\*\* CHI-CUADRADA.

COMPARADA CON: <sup>a</sup> TESTIGO NEGATIVO, P < 0.05; <sup>b</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 43 HS., P < 0.05; <sup>c</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 67 HS., P < 0.05; <sup>d</sup> TRATAMIENTOS DE VANADIO, P < 0.05; <sup>e</sup> TESTIGO NEGATIVO, P < 0.01; <sup>f</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 67 HS., P < 0.005; <sup>g</sup> TRATAMIENTO CON 4 µg DE VANADIO, P < 0.05, <sup>h</sup> TRATAMIENTO 6 µg DE VANADIO.

TIEMPO DE TRATAMIENTO DE CAFEÍNA (20 µg/ml)	CONCENTRACIÓN DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (µg/ml)	ÍNDICE MITÓTICO* (%)	ICH'S** (X ± E E)	TPL** (X ± E E) (HORAS)
-	-	2.40 ± 0.57	5.19 ± 0.28	24.74 ± 0.37
-	2	1.85 ± 0.31	5.90 ± 0.36	27.74 ± 0.62 <sup>a</sup>
-	4	1.80 ± 0.21	5.80 ± 0.29	28.40 ± 0.70 <sup>a</sup>
-	6	1.70 ± 0.54	6.30 ± 0.37	29.62 ± 0.87 <sup>a</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 1 <sup>er</sup> ciclo de división (43 h)				
+	-	2.60 ± 0.35	5.94 ± 0.82	24.61 ± 0.53
+	2	1.40 ± 0.37 <sup>ad</sup>	6.14 ± 0.61	26.51 ± 0.63
+	4	1.25 ± 0.42 <sup>ad</sup>	7.30 ± 0.61 <sup>ah</sup>	27.05 ± 0.68 <sup>u</sup>
+	6	0.80 ± 0.31 <sup>bv</sup>	7.60 ± 0.59 <sup>u</sup>	27.58 ± 0.49 <sup>n</sup>
Tratamiento en G <sub>2</sub> del 2 <sup>o</sup> Ciclo de división (67 h)				
+	-	2.30 ± 0.30 <sup>zz</sup>	5.43 ± 0.49	24.48 ± 0.61
+	2	1.05 ± 0.68 <sup>af</sup>	5.40 ± 0.52	29.09 ± 0.78 <sup>n</sup>
+	4	0.90 ± 0.58 <sup>bf</sup>	7.30 ± 0.55 <sup>bh</sup>	30.18 ± 0.67 <sup>n</sup>
+	6	0.40 ± 0.39 <sup>cz</sup>	8.00 ± 0.69 <sup>af</sup>	34.78 ± 0.86 <sup>u</sup>

CUADRO III. ÍNDICE MITÓTICO, INTERCAMBIO DE CROMÁTIDAS HERMANAS (ICH's) Y TASA DE PROLIFERACIÓN LINFOCÍTICA (TPL), EN LINFOCITOS HUMANOS DESPUÉS DE 24 HORAS DE TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> EN COMBINACIÓN CON CAFEÍNA A LAS 43 Ó 67 HORAS DE CULTIVO. (TRATAMIENTO CON V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> A LAS 48 HORAS DE INICIADOS LOS CULTIVOS).

ANALIZADO CON: \* PRUEBA DE "Z" PARA PROPORCIONES; \*\* "t" DE STUDENT; \*\*\* CHI-CUADRADA.

COMPARADA CON: <sup>a</sup> TESTIGO NEGATIVO, P < 0.05; <sup>b</sup> TESTIGO NEGATIVO, P < 0.01; <sup>c</sup> TESTIGO NEGATIVO P < 0.005;

<sup>d</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 43 H, P < 0.05; <sup>e</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 43 H, P < 0.01; <sup>f</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA A LAS 67 H, P < 0.05;

<sup>g</sup> TESTIGO DE CAFEÍNA, P < 0.01; <sup>h</sup> TRATAMIENTO CON 4 µg DE VANADIO, P < 0.05; <sup>i</sup> TRATAMIENTO CON 6 µg DE VANADIO, P < 0.05.

sido establecidos, sin embargo es claro que las lesiones en el ADN durante la duplicación de éste conducen a la aparición de ICH's y pueden diferir en naturaleza (Cortés et al., 1994), y estas lesiones pueden perderse por muerte celular, dilución de lesiones mediante la división de las células progenitoras,

o la reparación del ADN (Kligerman et al., 1988), encontrando que un porcentaje de estas lesiones en el ADN, capaces de inducir ICH's, pueden persistir en algunos casos a través de generaciones celulares sucesivas (Cortés et al., 1994; Daza et al., 1992).

En la presente investigación, el vanadio indujo un aumento en la IPL y un incremento en la frecuencia de ICH's cuando fue aplicado a las 24 ó 48 horas de iniciados los cultivos en combinación con cafeína (S/ $G_2$ -I ó S/ $G_2$ -II), sin embargo, cuando el tratamiento de vanadio fue aplicado a las cero horas simultáneamente con la cafeína, no hubo un incremento en la frecuencia de ICH's, porque hubo suficiente tiempo para la reparación del daño al ADN que induce la formación de ICH's

Estos resultados sugieren que las lesiones de vanadio en linfocitos en  $G_0$  pueden ser reparadas eficientemente antes de que las células entren en ciclo y que los tratamientos con cafeína, los resultados no mostraron un aumento en los ICH's, y cuando el vanadio es aplicado en linfocitos en proliferación (24 ó 48 horas después de iniciados los cultivos), las lesiones causadas son persistentes. Esta hipótesis concuerda con las observaciones en el ensayo de electroforesis de una sola célula con linfocitos humanos en  $G_0$  (Rojas *et al.*, 1996)

Estos autores observaron que el  $V_2O_5$  induce rompimientos de una sola cadena (SSB) de ADN, y que estas lesiones son reparadas eficientemente (60-80% en 90 minutos), estos concuerdan con lo reportados por Ishii & Bender (1978) quienes reportan que la cafeína incrementa la frecuencia de ICH's inducidas por Mitomicina-C, no obstante, se observó una disminución en la frecuencia de ICH's cuando las células tratadas con cafeína estuvieron en el medio antes de la estimulación con fitohemaglutinina, y antes de la síntesis de ADN. Esto indica que hay un sistema de reparación pre-replicativo sensibilizado por la cafeína, probablemente un mecanismo de excisión, dicha inhibición ya ha sido descrita por otros autores (Ishii & Bender, 1978; Selby & Sancar, 1990; Aeschbacher *et al.*, 1984)

La cafeína tiene una estructura química similar a las purinas (Figura 4) que constituyen al ADN (Kligerman *et al.*, 1988). Es decir, la cafeína bloquea los receptores de adenosina, inhibe la fosfodiesterasa del AMP-cíclico, se une a una sola cadena del ADN, modifica la distribución intracelular de calcio, inhibe la poli(ADP) polimerasa, inhibe la polimerasa II, y las fosforilasas. Todas estas actividades están relacionadas con uno o varios procesos celulares o eventos que incluyen la reparación del ADN (escisión, fotoreactivación y posreplicativa) y división celular (IARC, 1991; Rowley, 1992; Selby & Sancar, 1990).

Algunos estudios han mostrado que la cafeína puede afectar el metabolismo precursor del ADN (Haynes & Collins, 1994), estos compuestos inhiben las enzimas del metabolismo de las purinas y puede por lo tanto alterar la proporción normal en el acervo (pool) precursor, esto causa errores en el apareamiento. La cafeína también inhibe ambos procesos: síntesis *de-novo* y utilización de purinas exógenas. Es conocido que la fidelidad de la replicación del ADN es afectada por concentraciones relativamente bajas de desoxinucleósidos trifosfatados (dNTPS),

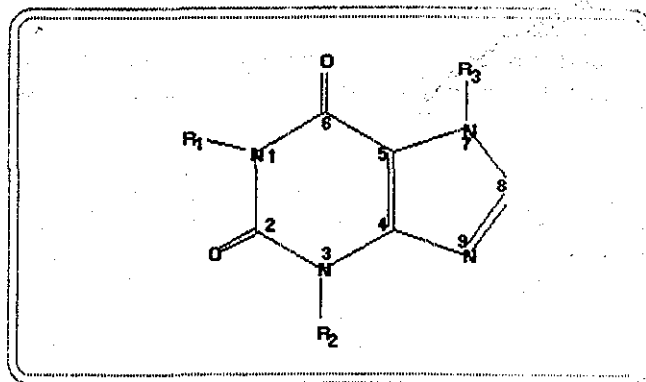


FIGURA 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA CAFEÍNA DONDE  $R_{1,2,3}$  SON GRUPOS METILO ( $CH_3$ ).

y ambos, provocan desbalances en el suministro de dNTPS y una disfunción de los sistemas de reparación produce: mutaciones, aberraciones cromosómicas e ICH's en células de mamífero en cultivo (IARC, 1991)

Los estudios mutagénicos sobre el vanadio (V) han mostrado que *in vitro*, éste modifica la síntesis de ADN y la reparación (Sabbioni *et al.*, 1983; WHO, 1988) e induce enlaces cruzados DNA-proteínas (Cohen *et al.*, 1992), pero los tratamientos con  $V_2O_5$  no incrementaron las aberraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos (Roldán & Altamirano, 1990), en células de médula ósea de ratón (Altamirano-Lozano *et al.*, 1993), o en células V79 de hámster Chino (Zhong *et al.*, 1994), sin embargo Rojas *et al.* (1996), estableció que el  $V_2O_5$  induce rompimientos de una sola cadena de ADN, y que este tipo de daño es reparado rápidamente. Estos resultados pueden explicar por qué el vanadio no puede inducir ICH's o aberraciones cromosómicas como se menciona en muchos reportes. Por otro lado, los postratamientos con cafeína en S/ $G_2$ -II también mostraron un incremento en la frecuencia de ICH's en los cultivos tratados con  $V_2O_5$ . Los postratamientos de células dañadas con mutágenos tales como la hidroxilurea (HU), 1- $\beta$ -D-arabinosafuranociltocina (ara-C) o fluorodesoxiuridina (FdUrd), han mostrado que una acumulación de rompimientos de una sola cadena del ADN, los cuales se inducen como resultado del proceso de reparación (Andersson, 1982). Andersson (1983) reporta que en los experimentos con *Vicia faba* los tratamientos con HU en la  $G_2$  previos a la mitosis, incrementaron la frecuencia de aberraciones cromatídicas inducidas por mutágenos así como un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas.

La exposición de células a algunos agentes mutagénicos puede inducir retraso en la reunión de grupos de replicones, este retraso se puede reflejar en el retraso de  $G_2$  (producida por la mayoría de agentes mutagénicos, incluyendo  $V_2O_5$ ). Cuando el ADN es reparado efectivamente, las células entran en mitosis. Las alteraciones cromosómicas y el intercambio de cromátidas hermanas se pueden formar cuando la cromatina se entreteje y



condensa para formar los cromosomas mitóticos antes de que los grupos de replicones sean ligados, y pueden estar localizados entre los replicones, más que en los sitios de ADN dañado (Andersson, 1983; Kihlman, 1966).

González-Fernández, et al., (1985), propone que la cafeína posee dos efectos sobre células en  $G_2$  con ADN dañado: éstas cancelan su retraso mitótico y tiene un efecto inhibitorio sobre las vías de reparación del ADN. Los agentes que acortan la  $G_2$  retrasada (ejemplo: cafeína y HU) que fue inducida por mutágenos, pueden causar condensación cromosómica prematura. Estos efectos explican porque la HU induce aberraciones en  $G_2$  temprana, amplifica el daño cromatídico y el intercambio de cromátidas hermanas en  $G_2$  tardía (Andersson, 1983; Kihlman, 1966).

Nuestros resultados sugieren que las alteraciones en los procesos de reparación por la cafeína pueden contribuir parcialmente a incrementar el número de lesiones inducidas por el  $V_2O_5$ , las cuales pueden, en su momento, ser transformadas en ICH's, y de acuerdo con algunos autores (Andersson, 1983; Kihlman, 1966; Shiraishi et al., 1979), y los datos presentados aquí, es posible que la inducción de ICH's en  $S/G_2-II$ , se deba probablemente al acortamiento de la fase de  $G_2$  inducida por la cafeína en combinación con un posible incremento en la longitud de la fase S causado por los tratamientos con vanadio. Sin embargo, es necesario verificar estos resultados en otros ensayos y con otros agentes mutagénicos en combinación con cafeína.

Nosotros creemos que la interpretación más adecuada de nuestros resultados es que los efectos observados de la cafeína sobre la frecuencia de ICH's inducidos por vanadio es consecuencia de tres eventos: 1) inhibición de la síntesis de ADN por el vanadio y la cafeína, 2) inhibición de la reparación del ADN por la cafeína y 3) persistencia de algún tipo de lesiones inducidas por el vanadio.

## REFERENCIAS

- Aeschbacher, H.U.; H.F. Meier; Ruch, E. & H.P. Würzner (1984). Investigation of coffee in sister chromatid exchange and micronucleus tests *in vivo*. *Fd. Chem. Toxicol.* 22:803-807.
- Alder, Y.D. (1970). The problem of caffeine mutagenicity. Chap. 24. In: Vogel, F. & G. Rohrborn (eds). *Chemical Mutagenesis in Mammalian and Man*. New York.
- Altamirano-Lozano, M.; L. Alvarez-Barrera & E. Roldán-Reyes (1993). Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.* 21:711-713.
- Andersson, H. (1982).  $G_2$  repair and the formation of chromosomal aberrations III. The effect of hydroxyurea, 5-fluorodeoxyuridine and caffeine on X-ray induced chromosome damage in *Vicia faba*. *Hereditas* 97:193-209.
- Andersson H.C. (1983). Hydroxyurea induces sister chromatid exchanges in  $G_2$ ; Implications for the formation of chromosomal aberrations. *Hereditas* 98:61-64.
- Balansky R. (1992). Effects of sodium selenite and caffeine on mutagenesis induced by N-metil-N-nitrosourea, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina and aflatoxin B<sub>1</sub> in *S. thiptmurtum*. *Mutat Res.* 269:307-317.
- Baroch, E.F. (1983). Vanadium and vanadium alloys. In: *Encyclopedia of chemical technology* John Wiley & Sons.
- Bolaños, F. (1990). El impacto biológico: problema ambiental contemporáneo. Caps 5 y 7 UNAM México.
- Brichard, S.M.; W. Okitolonda & C. Henquin (1988). Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. *Endocrinology* 123:2048-2053.
- Brusick, D. (1987). Consequences of genotoxic effects. In: *Principles of genetic toxicology* Chaps 1-3 Plenum Press, NY.
- Canalis, E. (1985). Effect of sodium vanadate on deoxyribonucleic acid and protein synthesis in cultured rat Calvarie. *Endocrinology* 116:855-862.
- Cantley, L.C.; L. Josephson; R. Warner; M. Yanagisawa; C. Lechene & G. Guidotti (1977). Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252:7421-7423.
- Carpenter, G. (1981). Vanadate epidermal growth factor and the stimulation of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1115-1121.
- Carrano, A.V. & D.H. Moore (1982). The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in human. Chap. 10. In: *Mutagenicity: New horizons in Genetic Toxicology* (Eds) J.A. Heddle. Acad Press, N.Y.
- Carrano, A.V. & A.T. Natarajan (1988). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 204:379-406.
- Carson, B.L.; H.V. Ellis & J.L. McCann (1987). *Toxicology and biological monitoring of metals in humans*. Lewis Publishers, Inc p 276-289.
- Cohen, M.D.; C. B. Kein & M. Costa (1992). Forward mutation and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 269: 141-148.
- Cortés, F.; P. Daza; J. Piñero & P. Escalza (1994). Evidence that SCEs induced by mutagens do not occur at the same locus in successive cell cycles: lack of cancellation in three-way stained CHO chromosomes. *Environm. Mol. Mutagen.* 24: 203-207.
- Daza, P.; P. Escalza; S. Mateos & F. Cortés (1992). Mytomicin C, 4-nitroquinoleine-1-oxide and ethyl methanesulfonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCEs during successive cell cycles in human lymphocytes. *Mutation Res.* 270:177-183.
- Duffus, J.H. (1983). *Toxicología ambiental*. Omega Barcelona España.
- Elinder, C.G.; L. Gerhardsson & G. Oberdoerster (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. In:



- Clarkson W. T., L. Friberg, F. Nordberg & R. Sanger (eds). Biological monitoring of toxic-metals. Plenum.
- Frazier, J.M. (1992). Scientific perspectives on the role of *in vitro* toxicity testing in chemical safety evaluation. Chap. 26. In: Jolles G. & A. Cordier (eds). *In vitro* methods in toxicology. Academic Press Ltd. Londres.
- French, R.J. & J.H. Jones (1993). Role of vanadium in nutrition: Metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif. Sci.* 52:339-346
- Gil, J.; M. Miralpeix; J. Carreras & R. Bartrons (1988). Insulin-like effects of vanadate on glucokinase activity and fructose 2,6-biophosphate levels in the liver of diabetic rats. *J. Biol. Chem.* 263:1868-1871.
- González-Fernández, A.; P. Hernández & J.F. López-Sáez (1985). Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: mitotic delayed and chromosome damage. *Mutation Res.* 149:275-281.
- Hartmann, A.; K. Herkomer; M. Glück & G. Speit (1995). DNA-damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vivo* and *in vitro* studied with the single-cell gel test (Comet assay). *Environ. Mol. Mutagen.* 25:180-187.
- Haynes, R.H. & J.D.B. Collins (1984). The mutagenic potential of caffeine. In: Dews, P.B. (ed) *Caffeine. Perspectives from Recent Research.* Berlin, Springer p 221-238.
- Heiliger, C.E.; A.G. Tahillani & J.H. McNeill (1985). Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227:1474-1476.
- Hoffman, G.R. (1981). Overview of genetic toxicology. In: *Genetic toxicology* Plenum Press NY
- Inazu, L.; G.P. Di Meo; A. Perucatti; & I. Gustavsson (1990). Protein-tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56:940-946
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (1991). Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk humans Vol. 51. Coffee, Tea, Methylxanthines and Methylglyoxal.
- shii, Y. & M. A. Bender (1978). Caffeine inhibition of prereplication repair of mitomycin-C induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Mutation Res.* 51:419-425
- Jones, M.M. & M.A. Basinger (1983). Chelante antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulfate intoxication in mice. *J. Toxicol. Environm. Health.* 12:749-756.
- Sihlman, B.A. (1966). *Action Chemicals on Dividing Cells*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs. N.J., USA.
- Klein, J. (1990). *Immunology* blakwell. Chaps 3 and 11. Scientific Publications. Gran Bretaña.
- Algerman, A.D.; M.F. Bryant; G.L. Erexon & J.R. Rabinowitz (1988). Persistence of ICH-inducing lesions in lymphocytes of mice exposed to diaziquone. *Environm. Mol. Mutagen.* 12:185-199.
- Irishna, G.; J. Xu; J. Nath & T. Ong (1985). *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to ethylene dibromide. *Mutat. Res.* 158:81-87
- Latt, S.A. (1979). Sister chromatid exchanges. *Genetics* 92:83-95.
- Latt, S.A.; J. Allen; S.E. Bloom; A. Carrano; E. Falke; D. Kram; E. Schneider; R. Schreck; R. Tice; B. Whitfield & S. Wolff (1981). Sister-chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutat. Res.* 87:17-62
- Legerkvist, G.; G.F. Nordberg & V. Vouk (1986). Vanadium. In: *Handbook the toxicology and metals*. Vol II Chap. 27 Elsevier Science Publishing Co Inc. Holanda
- Leonard, A. & G.B. Gerber (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317:81-88.
- Lerner, R.A. & F.J. Dixon (1973). The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228:82-91
- López, V.; T. Stevens & R.N. Lindquist (1976). Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 175:31-38.
- Maher, V.M. & J.J. McCormick (1982). Measurement of mutations in somatic cells in culture. Chap. 8. In: Heddles, J.A. (ed) *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology.* Acad. Press. NY
- Merck, S. (1989). *The Merck Index*, Merck y Co Inc 11th ed. Rahway N.J. USA.
- Mongold, J.J.; G.H. Cros; L. Vian; A. Tep; S. Ramanadham; G. Slou; J. Diaz & J.H. McNeill (1990). Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium levels and pancreatic B-cells morphologic. *Pharmacol. Toxicol.* 67:192-198.
- Mourek, J. (1987). Effects on vanadium on (Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>)-stimulated ATPase activity in the brain of rats of different ages. *Physiol. Bohemoslov.* 36:341-346
- Moutschen, J. (1985). *Introduction to genetic toxicology*. Chap. 1. John Wiley y Sons NY USA.
- Mundry, M.D.; M. Labal; I. Larripa; S. Brieux & O. Colillas (1981). *Medicina* (Buenos Aires) 41:173-176
- Natarajan, A.T. & G. Obe (1982). Mutagenic testing with cultured mammalian cells. *Cytogenetic assays* Chap. 7. In: Heddle, J.A. (ed). *Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology.* Acad. Press NY USA.
- Okoyama R. & Y. Kitao (1981). Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hidrazidde on chromosome damage induced by mitomicin C in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 81:75-80
- Owusu-Yaw, J.; M.D. Cohen; S.Y. Fernando & C.I. Wei (1990). Assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327-336.
- Phillips, T.D.; B.R. Nechay & N.D. Heidelbaugh (1983). Vanadium chemistry and kidney. *Fed. Proc.* 42:2969-2973.
- Pollard, Y.; H. Jabbour & P.A. Mehrabani (1987). Effects of caffeine administered during subsequent function in the adult rat: prolonged effects on a second generation. *J. Toxicol. Environm. Health.* 22:1-15
- Prival, M.J. (1980). *Genetic toxicology: regulatory aspects*. *J. Environm. Pathol. Toxicol.* 3:99-111
- Roberts, J.J. & V.P. Kottsaki-Kovatsi (1986). Potentiation of sulphur mustard or asplatin-induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with

- formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template. *Mutat Res.* 165:207-220.
- Roldán, R.E. & L.M.A. Altamirano (1990) Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Res.* 245:61-65.
- Roldán, R. E. (1992) Efectos mutagénico y teratogénico del pentóxido de vanadio. Tesis de Maestría. FES-Zaragoza, UNAM. México.
- Roldán, R.E.; C. Aguilar & L.M. Altamirano (1994) Efecto de la cafeína y el pentóxido de vanadio aplicado en diferentes ciclos de replicación sobre el índice mitótico, intercambio de cromátidas hermanas y ciclo celular en linfocitos humanos *in vitro*. Memorias, 2º Congreso Latinoamericano de Genética y 3º de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental. Pto Vallarta Jalisco, México No. 250.
- Rojas, E.; M. Valverde; L.A. Herrera; M. Altamirano-Lozano, & P. Ostrosky-Wegman (1996). Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutation Res.* 359:77-84.
- Rowley, R. (1992). Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. *Radiat Res.* 129:224-227.
- Sabbioni, E.; L. Clerect & A. Brazzelli (1983). Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolising enzymes. *J. Toxicol Environm Health.* 12:737-748.
- Selby, C.P. & A. Sancar (1990). Molecular mechanisms of DNA repair inhibition by caffeine. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 87:3522-3525.
- Sharma, A. & G. Talukder (1987). Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environm. Mutagen.* 9:191-226.
- Shin, Ch.G.; J.M. Strayer; M.A. Wani & R.M. Sanapka (1990) Rapid evaluation of topoisomerase inhibitors: caffeine inhibition of topoisomerase *in vivo*. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 10:41-52.
- Shiraishi, Y.; K. Yamamoto & A.A. Sandberg (1979). Effects of caffeine on chromosome aberrations and sister chromatid exchanges induced by Mitomicina-C in BrdU labelled human chromosomes. *Mutation Res.* 62:139-149.
- Siviková, K. & J. Dianovsky (1995) Sister-chromatid exchanges after exposure to metal-containing emissions. *Mutation Res.* 327:17-22.
- Stokinger, H.E. (1981) The metals. In: *Patty's industrial hygiene and toxicology*. Vol. IIA 3rd ed.
- Strout, H.V.; P.P. Vicario; R. Saperstein & E.E. Slater (1989). The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm *in vivo*. *Endocrinology* 123:1918.
- Taylor, H.J. (1958). Sister chromatid exchanges in tritium-labelled chromosomes. *Genetics* 43:515-529.
- Vercruyse, A. (1984). Metals in human toxicology. In: Vercruyse, A. (ed) *Hazardous metals in human toxicology*. Parte B. Sci. Pub. Holanda. p 3-15.
- Vouk, V. (1986). General chemistry of metals. Chap 1. In: Friberg, L., G.F. Nordberg & V. Vouk. *The Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Sci. Pub.
- WHO (World Health Organisation). (1988) *Environmental Health, Vanadium Criteria*, No. 81. Geneva.
- Witkin, E.M. (1969) Ultraviolet-induced mutation and DNA repair. *Ann. Rev. Genetics.* 3:525-552.
- Zhong, B.Z.; Z.W. Gu; W.E. Wallace; W.Z. Whong & T. Ong (1994). Genotoxicity for vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res.* 321:35-42.