

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“ESTUDIO DE LOS EFECTOS INDUCIDOS IN VITRO POR TRES
ÓXIDOS DE VANADIO A NIVEL CELULAR Y SOBRE EL ADN”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO DE EXAMEN:

PRESIDENTE: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

VOCAL: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

VOCAL: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

VOCAL: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO

SECRETARIO: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

SUPLENTE: DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA

SUPLENTE: DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

COMITÉ TUTORAL:

DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

Tesis desarrollada dentro de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, y en el laboratorio (6) de Inmunomoduladores de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Durante el desarrollo de esta investigación se recibió el apoyo de la DGEP y CONACyT como becario con No. de Exp. 500962012 y No. de registro 16986, respectivamente y con el financiamiento de PAPIIT-DGAPA proyectos IN-206104, IN-214706.

*A mis cómplices Alejandra Hipólito González y Frida Rodríguez Hipólito,
dos entre miles de genomas.
Son la dineína que me impulsa "las amo"*

*A mis hermanos, mis sobrinos y familia.
Les deseo un mundo lleno de vida*

*A todas las personas que siempre están a mi lado
y a las que físicamente ya no lo están.*

Han pasado días, semanas, meses... y aun te sigo amando

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario A. Altamirano Lozano por brindarme la oportunidad de crecer en su laboratorio, con gente que tiene calidez humana y mucho que enseñar. Muchas gracias por la dirección, la asesoría y la confianza.

De manera especial a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y a la Dra. Patricia Ramos Morales por la asesoría, sus importantes comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este estudio.

De la misma forma, agradezco al Dr. Jorge A. Reyes Esparza por introducirme al mundo de la citometría de flujo y permitirme trabajar en su laboratorio.

A cada uno de los miembros del jurado por sus observaciones, comentarios y recomendaciones al presente escrito.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera, Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez, Dr. Andrés Aragón Martínez y en especial a la Dra. Elia Roldán Reyes por la disposición y el tiempo que siempre me ha dado.

A la Biol. Diana Florín Ramírez y a los futuros biólogos Beatriz Fajardo Morales y José Raúl Cermeño García por formar parte fundamental de este desenlace.

Con el mismo entusiasmo a todos y cada uno de los profesores y estudiantes por hacer de las aulas y los laboratorios de investigación lugares de inspiración y enseñanza.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCCIÓN	3
3.1 Contaminación y su impacto en los organismos	3
3.2 Genética toxicológica	5
3.2.1 Pruebas de toxicidad celular	6
3.2.2 Aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas	6
3.2.3 Electroforesis unicelular en gel	8
3.2.4 Daño al ADN y ciclo celular	10
3.2.5 Citometría de flujo y síntesis de ADN	12
3.3 Toxicidad de los metales	13
3.4 Vanadio	14
3.4.1 Propiedades y usos	14
3.4.2 Contaminación por vanadio	17
3.4.3 Vanadio en los alimentos	18
3.4.4 Biocinética y metabolismo	19
3.4.5 Exposición y toxicidad	20
3.4.6 Genotoxicidad en procariontas	22
3.4.7 Genotoxicidad en levaduras, plantas e insectos	22
3.4.8 Genotoxicidad en mamíferos expuestos <i>in vivo</i>	23
3.4.9 Genotoxicidad en células de mamíferos expuestas <i>in vitro</i>	25
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.1.1 Primer objetivo particular	33
4.1.2 Segundo objetivo particular	33
4.1.3 Tercer objetivo particular	33

5	HIPÓTESIS	34
6	MATERIAL Y MÉTODO	35
6.1	Protocolo I: Estudio del efecto genotóxico inducido por el tetróxido de vanadio en leucocitos humanos de sangre periférica	35
6.1.1	Análisis citogenético	35
6.1.2	Resultados	37
6.2	Protocolo II: Comparación de los efectos genotóxico y citotóxico inducido por tres óxidos de vanadio en leucocitos humanos de sangre periférica	42
6.2.1	Análisis citogenético	42
6.2.2	Análisis con la electroforesis unicelular en gel	42
6.2.3	Resultados	46
6.3	Protocolo III: Estudio del efecto sobre progresión del ciclo celular producido por tres óxidos de vanadio en linfocitos humanos de sangre periférica	56
6.3.1	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	56
6.3.2	Resultados	58
7	DISCUSIÓN	66
7.1	Análisis citogenético	66
7.1.1	Índice mitótico e índice de replicación	66
7.1.2	Aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas	67
7.2	Electroforesis unicelular en gel	70
7.2.1	Viabilidad celular	70
7.2.2	Daño y reparación en el ADN	71
7.2.3	Rupturas de hebra doble en el ADN	76
7.3	Ciclo celular e incorporación de BrdU	78
8	CONCLUSIONES	81
9	COMENTARIOS FINALES	82
10	REFERENCIAS	83
11	ANEXOS	99
11.1	Artículos publicados	99

1 RESUMEN

El vanadio es un metal de la serie de transición ubicado dentro del grupo VB de la tabla periódica y se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Este elemento es un agente tóxico que representa un riesgo para el humano por exposición natural, ocupacional y ambiental. Es considerado un mutágeno de acción débil y agente aneuploidógeno, sin embargo, la información acerca de sus efectos clastógenos es limitada y controvertida. Uno de los objetivos en la actualidad es el poder discernir el mecanismo por el cual el vanadio y sus compuestos producen toxicidad, por tal motivo en el presente proyecto se estudió la genotoxicidad, las alteraciones sobre la división celular y en la progresión de ciclo celular producidas por el trióxido, el tetróxido y el pentóxido de vanadio en cultivos leucocitos humanos.

Los primeros resultados obtenidos de este estudio (*Toxicology Letters* **144**:359-369, 2003), en donde se evaluó la actividad genotóxica del tetróxido de vanadio en el modelo de linfocitos humanos, en concentraciones de 2, 4, 8 y 16 µg/ml, se encontró que este agente químico es capaz de inhibir el índice mitótico (IM) de manera dosis dependiente y de modificar el índice de replicación. En el análisis de aberraciones cromosómicas (AC) estructurales e intercambio de cromátidas hermanas se observó incremento significativo en el grupo tratado comparado con el grupo testigo. Por otro lado, también se observó que el tetróxido de vanadio en tratamientos de 2 horas no induce daño al ADN con la prueba de electroforesis unicelular en gel (EUG).

Con el fin de conocer los mecanismos por el cual el tetróxido de vanadio produce AC estructurales y si otras formas químicas con diferente estado de oxidación pueden producir este efecto, se realizó un análisis comparativo de la acción de los tres óxidos de vanadio, en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 µg/ml. Los resultados obtenidos, mostraron que los tres compuestos pueden reducir el IM con una tendencia dosis dependiente, sin embargo, únicamente el trióxido de vanadio induce AC estructurales. Cuando se examinó el daño sobre el ADN mediante la EUG (pH>13) durante 2, 4 y 6 horas de exposición, se observó una respuesta positiva en los leucocitos de sangre completa tratados con trióxido o pentóxido de vanadio, en tanto, no se obtuvieron resultados positivos en las células expuestas durante 2 horas con tetróxido de vanadio, pero si, en 4 y 6 horas. De la misma manera, la evaluación de la cinética de reparación con 8 µg/ml del compuesto mostró que las lesiones producidas por el trióxido o el pentóxido de vanadio son reparadas en 90 minutos, mientras que las causadas por el tetróxido de vanadio requieren de más tiempo, además, con la prueba de EUG neutra se encontró que únicamente el tetróxido de vanadio es capaz de inducir rupturas de hebra doble.

Por otro lado, en este estudio se dieron tratamientos de 4 horas a cultivos de linfocitos humanos y se analizó el efecto de los tres óxidos de vanadio sobre la progresión del ciclo celular mediante la prueba de incorporación de un análogo de base y citometría de flujo, y no se presentó una respuesta contundente en la capacidad de producir retrasos o bloqueos en alguna de las fases G₀-G₁, S o G₂-M.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el trióxido, el tetróxido y el pentóxido de vanadio son citotóxicos y citostáticos. Además, los tres compuestos inducen daño primario en el ADN, en donde el tetróxido de vanadio induce rupturas de hebra doble y AC estructurales situación que lo coloca como un agente clastógeno.

2 ABSTRACT

Vanadium is a metal of VB group of transition metals in the periodic table, and some studies suggested that vanadium is a aneuploidogenic agent and a weak mutagen, however experimental evidences for the clastogenic potential of vanadium compounds are limited and controversial. Based on the above-mentioned uncertainties, in this study was evaluated the genotoxicity and the cell cycle alterations induced by three vanadium compounds, vanadium trioxide (V_2O_3), vanadium tetraoxide (V_2O_4), and vanadium pentoxide (V_2O_5) using human leukocytes treated in vitro. Cytogenetic and DNA damage (measured by the Comet assay) evaluations shown that only V_2O_4 induces structural chromosomal aberrations and double strand breaks in the DNA, meanwhile a dose-related mitotic index reduction and single strand breaks was observed in the treatments with all compounds. On the other hand no effects were observed on the cell cycle progression or in the DNA synthesis. Results shown that vanadium in its different oxidation states (III, IV, or V) is able to induce both, citotoxicity, and DNA damage, and only vanadium IV, produce chromosomal aberrations.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 CONTAMINACIÓN Y SU IMPACTO EN LOS ORGANISMOS

En la actualidad, la política económica en las sociedades modernas está antes que la ambiental. El desarrollo industrial, ha logrado incrementar la producción de granos, alimentos procesados, fibras sintéticas y una infinidad de artículos indispensables para cubrir las necesidades cotidianas de la población mundial. Pero además, el progreso unido al crecimiento demográfico ha propiciado el deterioro del agua, el aire y ha incrementado la erosión del suelo.

La emisión de substancias peligrosas generadas durante los procesos industriales y la de los compuestos tóxicos subproductos de la quema de combustibles fósil, como lo son el dióxido de azufre, dióxido de carbono, los óxidos nitrógeno, miscelánea de hidrocarburos, partículas suspendidas y metales, entre muchos otros contaminantes, unido a la radioactividad (resultado de la operación de reactores nucleares), el calor y el ruido, han propiciado aumento en los factores que alteran los nichos ecológicos.

Las pérdidas en la biodiversidad, la desaparición de especies y el incremento de enfermedades en el humano, están relacionadas con el impacto que tiene la contaminación sobre los sistemas naturales. La detección del potencial tóxico de los agentes físicos, químicos y biológicos sobre los ecosistemas y el hombre, es una tarea ardua en la que intervienen especialistas de áreas como: química, bioquímica, farmacología, fisiología, biología, epidemiología, genética, legislación, economía y sociología. Ellos conforman grupos multidisciplinarios que caracterizan las moléculas y determinan la manera en que entran al organismo, tanto la distribución como la retención y la excreción, también, determinan los efectos a nivel población, organismo, tejidos, células, componentes celulares y sobre el material genético, así como establecen los riesgos y proponer los límites permisibles (Zakrzewski, 1991; Plant, 2003; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

En el ambiente natural, en el lugar de trabajo y en el hogar, las personas están expuestas a una gran cantidad de substancias de manera permanente. En la Figura 1, se esquematizan las consecuencias derivadas del contacto de las substancias químicas con los organismos.

Para que un agente ambiental dañino, como muchos xenobióticos, interactúe con las moléculas intracelulares, debe pasar por una serie de barreras.

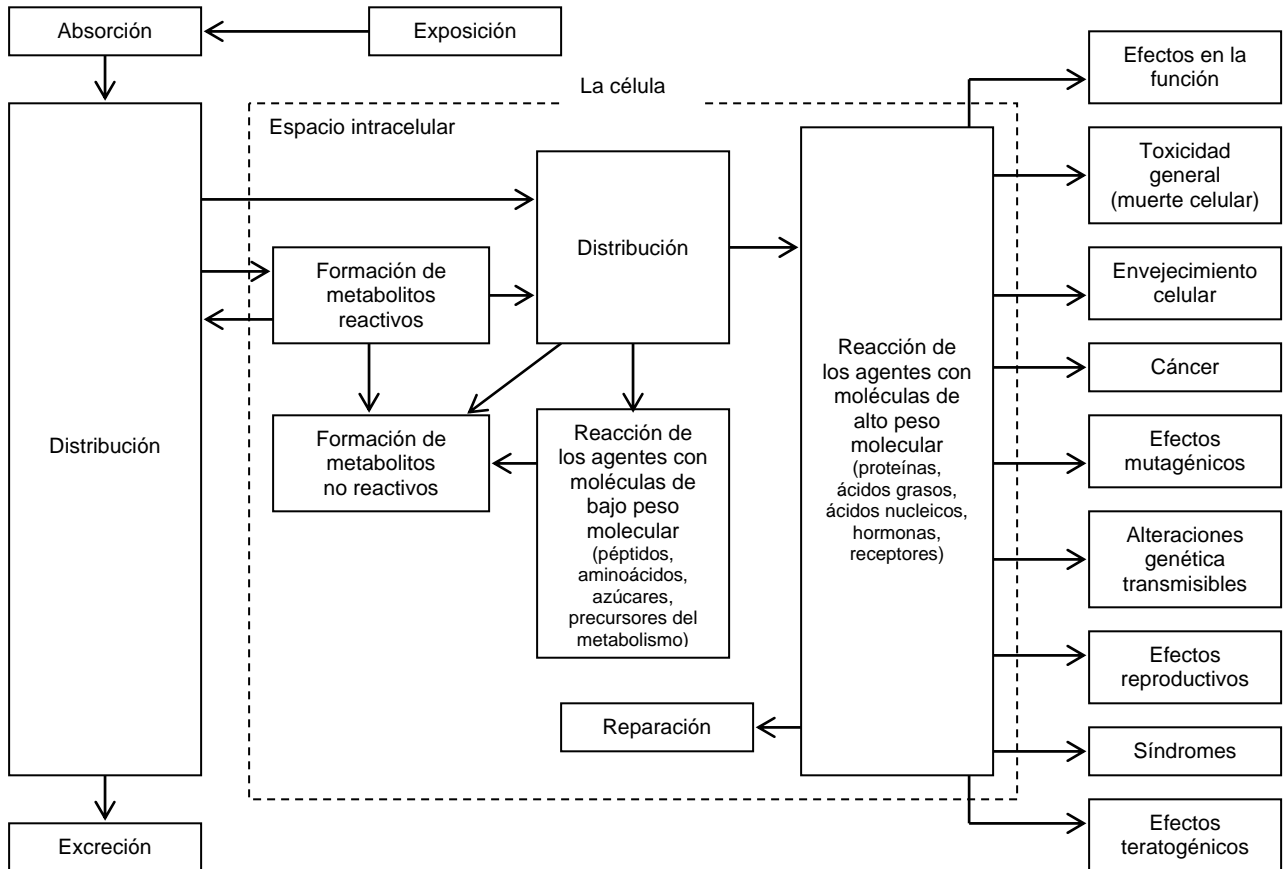


Figura 1. Interacción de los agentes tóxicos con los sistemas biológicos. En los organismos superiores el proceso toxicológico inicia con la exposición, la cual, está determinada por la ruta de acceso sea la respiración, a través de los alimentos o por la piel. La absorción es equivalente al paso de los agentes a la circulación sistémica a través de las membranas celulares, donde pueden ser biotransformados, distribuido a los diferentes órganos y excretado por los fluidos corporales o en las heces (tomado y modificado de Bus y Gibson, 1985).

La primera es la absorción, la cual, regula la distribución del agente a los órganos. Durante la absorción, la mayoría de los agentes químicos cruzan las membranas celulares por difusión simple o difusión facilitada, procesos que no requieren de energía. Por ejemplo, los compuestos no polares, entran rápidamente por difusión simple a favor de un gradiente de concentración, mientras los polares ingresan por canales iónicos (Bus y Gibson, 1985; Zakrzewski, 1991; Plant, 2003). Los canales iónicos están constituidos de proteínas transmembranales y generalmente se abren por un lapso corto en respuesta a estímulos

específicos como cambios en el potencial de membrana o la unión de un receptor a un ligando (Szachowicz-Petelska *et al.*, 2001).

La segunda barrera, es la transformación intracelular, aunque en algunos casos pueden ocurrir cambios en el torrente sanguíneo, en esta fase se generan productos que son más fáciles de excretar y frecuentemente más estables y menos tóxicos. En la tercera y última, el contacto con las biomoléculas puede afectar su función o producir daño, en casos extremos el daño es irreversible, pero cuando es reparable, por ejemplo lesiones en el material genético (ADN, ácido desoxiribonucleico)^[1], se minimiza la expresión de la respuesta tóxica (Bus y Gibson, 1985; Brusick, 1987; Plant, 2003).

3.2 GENÉTICA TOXICOLÓGICA

El campo de la genética toxicológica es amplio y se ha diversificado debido a que muchos xenobióticos producen una gran variedad de cambios que perjudican el material genético. La incidencia de *daño genético* puede traducirse en *mutación*; cuando ésta sucede en las células germinales, los ovocitos o los espermatozoides, puede conducir a defectos al nacimiento o enfermedades genéticas en la descendencia. En tanto, el daño genético en células somáticas está relacionado con la iniciación del cáncer (Hoffmann, 1982a; Waters *et al.*, 1999).

La sensibilidad y la especificidad son dos aspectos importantes en las pruebas de mutagénesis o carcinogénesis. La sensibilidad se refiere a la porcentaje de mutágenos o carcinógenos que son positivos en la prueba, y la especificidad se refiere a la proporción de no mutágenos o no carcinógenos que son negativos. Un falso negativo reduce la sensibilidad de la prueba, mientras que un falso positivo reduce su especificidad (Hoffmann, 1982a).

En genética toxicológica, se han desarrollado varias pruebas en las que se usan modelos biológicos *in vivo* e *in vitro* como bacterias, levaduras, plantas vasculares, insectos, peces, mamíferos, entre otros animales vertebrados e invertebrados. Las pruebas citogenéticas

¹ Los agentes que reaccionan con el ADN y producen daño, también, pueden provocar alteraciones en el ARN (ácido ribonucleico) causando fallas en el mensaje, en la síntesis de proteínas o modificación en la actividad enzimática. Efectos *no genotóxicos* que contribuyen a describir el comportamiento tóxico de los agentes en estudio.

son a las que más se recurre, su evaluación se realiza con un microscopio y da información de los efectos de toxicidad celular y sobre el genoma (Hoffmann, 1982b).

3.2.1 Pruebas de Toxicidad Celular

Dos marcadores citogenéticos que permiten determinar muerte celular y cambios en la progresión del ciclo celular son el índice mitótico (IM) y el índice de replicación (IR) (Ivett y Tice, 1982; Scott *et al.*, 1991; Kirkland y Müller, 2000). Un incremento en el valor de estos índices, generalmente está asociado con el estímulo de señales mitogénicas que modifican la homeóstasis celular y en muchos casos contribuyen a la transformación neoplásica. La disminución del IM es el reflejo de retrasos en la mitosis por arrestos en alguna de las fases del ciclo celular o por la pérdida permanente de la capacidad de proliferar que conduce a la muerte de la célula. La disminución del IR, también, resulta de retrasos mitóticos de las células que han pasado por más de un ciclo de división, permite conocer la actividad citostática de nuevas drogas, de agentes ambientales o de los metales. Otras pruebas como las de viabilidad prescriben discontinuidades en la membrana que conllevan a la muerte de la célula.

3.2.2 Aberraciones Cromosómicas e Intercambio de Cromátidas Hermanas

Los cambios genéticos que se pueden detectar mediante estas pruebas derivan principalmente de genes mutados, amplificación o pérdida de genes, alteraciones en los cromosomas y cambios en la transcripción, reparación o replicación del ADN (Hartwig, 1995; Müller *et al.*, 1999; Waters *et al.*, 1999).

Entre las alteraciones cromosómicas se encuentran las pruebas para evaluar aberraciones cromosómicas (AC) estructurales, intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y AC numéricas. Estas alteraciones se aprecian en los cromosomas de células en mitosis, en meiosis, en células en las que se induce la condensación prematura de la cromatina, en células en interfase por la formación de micronúcleos (MN) o en células en cualquier fase del ciclo celular (G_0 , G_1 , S, G_2 y M) por el pintado de los cromosomas con secuencias de ADN específicas mediante la Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH) (Tucker y Preston, 1996; Obe *et al.*, 2002; Natarajan y Boei, 2003).

Tanto los ICH como las AC y los MN, incluyendo las variantes que de éstas se desprenden, pueden medirse en cultivos de células de mamífero, y tienen la finalidad de detectar la inducción de rompimientos en los cromosomas (efecto clastógeno) o alteraciones en la maquinaria del huso que conducen a un inadecuado reparto de material genético durante la división celular (efecto aneugénico) (Anderson, 1993; Obe *et al.*, 2002; Natarajan y Boei, 2003).

Particularmente, para observar los ICH se requiere diferenciar las cromátidas hermanas por la incorporación de un análogo de base en el ADN cromosómico durante dos ciclos celulares continuos. Poco se conoce de los mecanismos moleculares que conducen a la formación de los intercambios, pero debido a que agentes que interfieren con la replicación e inducen enlaces cruzados o alquilación de bases en el ADN, incrementan la frecuencia de este ensayo (Tucker *et al.*, 1993), de hecho la prueba de ICH es considerada un buen marcador biológico de daño en el monitoreo de mutágenos que son carcinógenos para el humano (Albertini *et al.*, 2000).

Las AC estructurales se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a la fase del ciclo celular en la que se formaron. Las aberraciones *tipo cromosómico*, son producidas por errores en la reparación del ADN en la fase de G_0/G_1 o en fase de S en las regiones en las que el ADN aun no se ha replicado, involucran cambios estructurales en ambas cromátidas de un cromosoma. Las aberraciones *tipo cromatídico*, son producidas por errores en la reparación del ADN en la fase de G_2 o en fase S en regiones del ADN recién replicado, o cuando ocurre la replicación en una hebra progenitora que está dañada (Natarajan, 1993, 2002; Tucker y Presto, 1996; Obe *et al.*, 2002).

Las aberraciones que se forman son rompimientos que se observan como fragmentos sin centrómero, así como, uniones legítimas e ilegítimas entre los rompimientos que conducen a cambios completos o incompletos dentro de un mismo cromosoma o entre cromosomas. Los cambios que se originan son intra- e inter- cromátida o intra- e inter- cromosoma (Savage, 1976; Natarajan *et al.*, 1980).

Otro tipo de alteración cromosómica, considerada en una clasificación aparte son las brechas o lesiones acromáticas. Las brechas aparecen como regiones no teñidas en un cromosoma, sin una clara apariencia de ser un rompimiento. Hay varios datos

experimentales que respaldan la idea de que pueden ser regiones de ADN dañado, sin embargo su significado no es claro (Brogger, 1982; Preston, 1999; Paz-y-Miño *et al.*, 2002). Savage (2004) propone, que las lesiones acromáticas pueden ser excluidas del conteo de AC, pero no deben de ser ignoradas ya que algunas de ellas son verdaderas discontinuidades.

Los mutágenos que inducen aberraciones tipo cromatídico tienen un *efecto S-independiente*, es decir, las lesiones que ellos producen no requieren que las células pasen por síntesis. La radiación ionizante (rayos gama, partícula alfa, neutrones, protones) y agente químicos radio-miméticos (bleomicina, esteptonigrina u 8-etoxicafeína) que producen normalmente rupturas en la cadena de polinucleótidos del ADN^[2], incrementan la frecuencia de AC en células en metafase cuando los tratamientos se dan en S, G₂ o en profase.

Agentes alquilantes que forman enlaces covalentes con las bases o los inductores de enlaces cruzados ADN-ADN como la luz UV, tienen un *efecto S-dependiente*. Las AC que ellos producen son por errores durante la replicación que se transforman en rupturas (Natarajan, 1993, 2002). Esto no quiere decir que no puedan inducir AC por errores en la reparación sino que su probabilidad es muy baja, de hecho, muchos inductores de ICH que dan positivo con AC son agentes S-dependientes.

3.2.3 Electroforesis Unicelular en Gel

En las dos últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas en el campo de la toxicología. Una metodología sensible para detectar daño y reparación en el ADN es la electroforesis unicelular en gel (EUG), conocida como “ensayo Cometa”. Es ampliamente usada en sistemas *in vivo* e *in vitro* para evaluar efectos genotóxicos de agentes químicos industriales, biocidas, agroquímicos y productos farmacéuticos, así como en estudios de epidemiología, ecotoxicología y en el monitoreo biológico de carcinógenos ambientales (Singh *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1999; Olive, 1999; Albertini *et al.*, 2000; Singh, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004). Esta prueba combina técnicas bioquímicas y citogenéticas, y consiste en suspender las células en una matriz de agarosa

² La radiación ionizante y los demás agentes químicos arriba citados, inducen rupturas sobre el ADN de manera directa o de manera indirecta; ésta última tiene que ver con la modificación de la síntesis de desoxirribonucleótidos, las alteraciones en el metabolismo de los ácidos nucleicos o la generación de estrés oxidante, entre otros efectos (ver apartado 3.2.4).

y colocarlas sobre un portaobjetos para que mediante la lisis celular se obtenga el ADN nuclear, el cual, si se encuentra dañado, bajo condiciones de electroforesis (alcalinas o neutras) migra hacia el ánodo, dando la apariencia de un cometa con su corazón y su estela.

La cantidad de ADN en la estela (la cola del cometa) depende de la concentración del gel, las condiciones de la lisis, la alcalinidad, el pH, la temperatura y de las condiciones de electroforesis (pH, voltaje y amperaje). Su longitud es considerada como una medida del ADN fragmentado. El análisis de las imágenes mediante programas de cómputo, permiten definir múltiples longitudes así como cuantificar la cantidad de ADN en la estela con respecto a la cabeza (Olive, 1999; Singh, 2000).

La formación del cometa deriva de varios mecanismos. Los daños que se detectan son lesiones iniciales o primarias. En la EUG en condiciones neutras o cercanas a la neutralidad la migración del ADN aumenta por rupturas de hebra doble, cuando el pH es cercano a 12 la migración se incrementa por rupturas de hebra sencilla^[3] y doble, si el pH se eleva a 13 o más se presentan ambos tipos de eventos, además de rupturas simples producto de sitios sensibles al álcali. Con la EUG alcalina también se pueden detectar otro tipo de lesiones que reducen la migración como los enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteínas (Rojas *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000; Collins, 2004).

La EUG presenta ciertas ventajas que la hacen una prueba muy atractiva. Su evaluación se puede realizar en células eucariontes en proliferación o quiescencia, se requiere de un número reducido de células por muestra, los datos obtenidos son de células individuales por lo que se puede detectar respuestas diferenciales dentro de poblaciones celulares de un mismo tejido o clonas de un mismo tipo celular, se detectan bajos niveles de daño, se obtiene resultados en pocas horas, es de bajo costo, es relativamente sencilla, y por su flexibilidad puede modificarse para detectar lesiones como dímeros de timina, bases oxidadas o bases alquiladas, o bien, lesiones específicas en un cromosoma o gen (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2004).

³ Dentro de las rupturas de hebra sencilla se encuentran aquellos sitios escindidos durante la reparación e interrumpidos en el momento de la lisis.

3.2.4 Daño sobre el ADN y Ciclo Celular

Los agentes genotóxicos pueden producir daño inicial en el ADN interactuando de manera directa o indirecta (Figura 2) (Kirsch-Volders *et al.*, 2003). Los que actúan de manera directa, generalmente son moléculas fuertemente electrofílicas, deficientes en electrones y con una tendencia por grupos funcionales donantes; se conoce que en condiciones fisiológicas y en el entorno celular los cationes metálicos se comportan como electrófilos. Los que reaccionan de manera indirecta, tienen como blanco otras moléculas distintas al ADN; pueden cambiar la estructura, composición o función de la molécula que perturban y producir efectos como abatir en la célula el sistema de desintoxicación o el sistema de defensa antioxidante o producir estrés oxidante (Nelson y Cox, 2004)

En la célula el metabolismo genera especies reactivas de oxígeno, sin embargo, muchos agentes externos incrementan la formación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), del ion superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$) y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que causan desajustes en la homeostasis celular y producen una gran variedad de daño en los componentes celulares. En particular la estructura electrodensa del ADN es blanco especial de los radicales $\bullet\text{OH}$, que reaccionan como especies electrofílicas (Wang *et al.*, 1998).

Cuando las células son dañadas por agresiones externas, la proliferación celular se altera (Figura 3). Agentes que intervienen con la maquinaria de replicación, inhiben las síntesis de ADN arrojando a las células en S temprana, también, pueden producir daño cromosómico a través de mecanismos indirectos; no obstante, cualquier perjuicio sobre el genoma puede desencadenar retrasos, arrestos transitorios o paros definitivos en el ciclo celular (Scott *et al.*, 1991; Shackelford *et al.*, 2000; Hartwig *et al.*, 2002a; Kirsch-Volders *et al.*, 2003).

En una célula animal en cultivo, la fase de G_1 dura aproximadamente 12 horas, la fase S de 6 a 8 horas, G_2 de 3 a 6 horas y M es de 30 minutos. Este proceso es complejo, involucra una red de señales y es monitoreado por diferentes puntos de control “*checkpoints*” regulados por proteínas dependientes de cinasas y sus activadores las ciclinas. El ciclo celular puede detenerse temporalmente en G_1 , S y G_2 , para reparar o fijar el daño y re-entrar al ciclo. En caso de que el daño al ADN sea severo las células pueden quedarse en un estado estático de G_0 o morir por apoptosis, pero, si la agresión ocurre en la maquinaria encargada del reparto cromosómico la célula puede quedar detenida en metafase (Dasika

et al., 1999; Johnson y Walker, 1999; Shackelford *et al.*, 2000; Gorbsky, 2001; Sancar *et al.*, 2004).

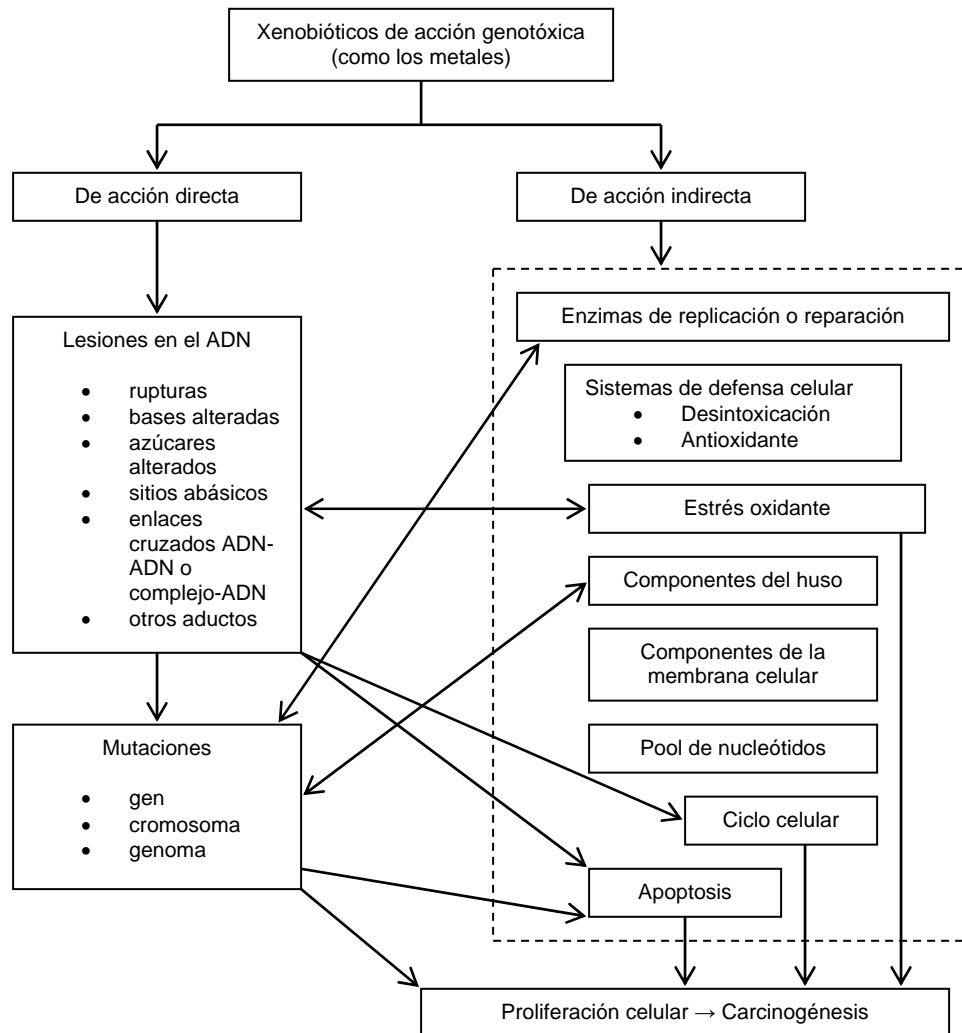


Figura 2. Mecanismos de acción que tienen en común algunos agentes genotóxicos. Los agentes que interaccionan de manera directa con el ADN producen diversas lesiones potencialmente mutágenas o clastógenas que pueden conducir a la muerte celular o contribuir al establecimiento de tumores. Los agentes que no interaccionan directamente con el ADN, afectan diferentes procesos celulares que en algún momento pueden ser causantes de incrementar de la tasa de mutaciones (tomado y modificado de Kirsch-Volder *et al.*, 2003).

La proliferación puede evaluarse con el microscopio mediante un conteo celular o con técnicas citogenéticas y citoquímicas (IM, IR o inhibiendo la citocinesis con citocalacina B, incorporación de [³H] timidina, entre otras pruebas), pero si se quiere conocer los efectos en una fase específica, es conveniente el uso de metodologías como la citometría de flujo.

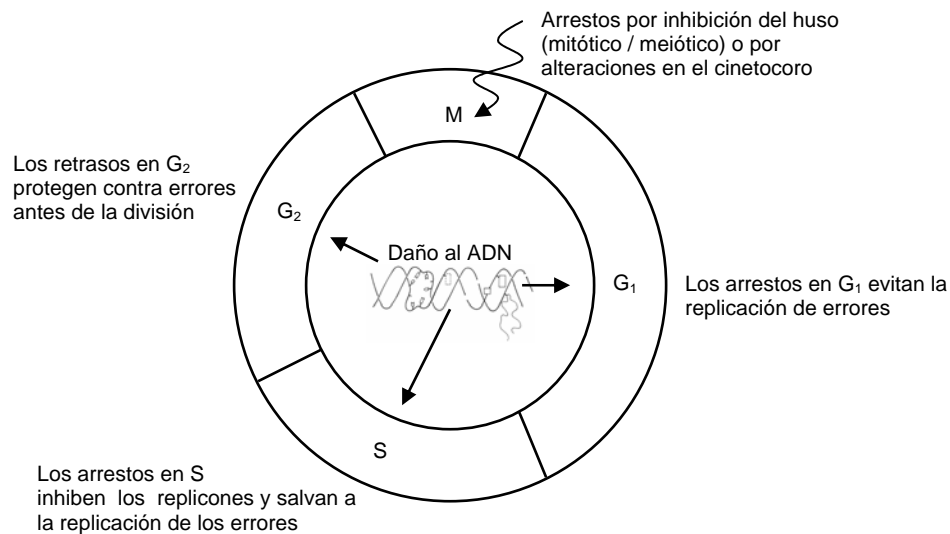


Figura 3. Cambios en la progresión del ciclo celular en respuesta al daño al ADN o por alteraciones en la maquinaria del huso.

3.2.5 Citometría de Flujo y Síntesis de ADN

Con ayuda de marcadores específicos la citometría de flujo permite conocer ciertas características externas e internas de la célula. Los citómetros, funcionan con base en el conocimiento teórico que rigen la física y la óptica, y transforman diversas señales de luz en unidades medibles^[4] (Longobardi, 1992).

Entre los métodos citométricos desarrollados para estudiar el ciclo celular, se encuentran los que utilizan colorantes fluorescentes que se unen al ADN. De esta manera, al pasar las células a través de un haz de luz, el colorante se excita y emite una señal fluorescente medible (fluorescencia relativa), la cual, permite diferenciar cada célula por su contenido relativo de ADN. Con estos datos los programas integrados en la computadora del citómetro, permiten la construcción de gráficas univariadas que ubican a las células con 1 contenido de ADN (2C) en fase de G₁-G₀, mayor a 1 y menor de 2 contenidos de ADN

⁴ La interminable lista de aspectos que se pueden medir en la célula ha colocado a la citometría de flujo como una de las tecnologías de alto impacto, con aplicaciones en diferentes áreas de la ciencia como: botánica, biología molecular, genética, inmunología, microbiología, embriología, oncología, entre otras.

(mayor a 2C pero menor a 4C) en fase de S, o en fase de G₂-M si hay 2 contenidos de ADN (4C)^[5] (Gray y Coffino, 1979; Darzynkiewicz y Juan 1998; Nunez, 2001).

Cuando se realizan investigaciones *in vivo* o con cultivos celulares y el ADN se sustituye con un análogo de base, como la 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), se puede estudiar con mayor precisión la progresión del ciclo celular. La cantidad de BrdU incorporada en la doble hélice puede revelarse por inmunohistoquímica, usando anticuerpos poli- o monoclonales unidos a un fluorocromo y contratiñendo el ADN total con otro fluorocromo. El resultado, una tinción de dos colores que finalmente puede quedar en gráficas bivariadas, los cuales detallan la proporción de células en cada fase del ciclo y además separa gráficamente la proporción de células con intensa incorporación de bromo correspondiente a las células que se encuentran en la fase de síntesis (Dobleare *et al.*, 1983; Darzynkiewicz y Juan 1998; Nunez, 2001).

Muchas células de nuestro cuerpo no se dividen, se encuentran en un estado quiescente y comienzan a proliferar en respuesta a estímulos externos e internos. Durante la fase de síntesis el material genético se duplica por completo. El avance de las horquillas de replicación se encuentra estrictamente regulado por diversos componentes que se bloquean cuando se incorporan nucleótidos dañados, se disminuye la cantidad de nucleótidos u otros precursores, hay uniones covalentes de proteínas con el ADN, se presentan rupturas en la doble hélice, y se inhiben cuando agentes externos interfieren con las polimerasas, topoisomerasas o helicasas del ADN, así como, con las ciclinas, las ciclinas dependientes de cinasas o los factores de crecimiento (Galloway *et al.*, 1998; Bartek y Lukas, 2001; Golias *et al.*, 2004; Sancar *et al.*, 2004; Masai *et al.*, 2005).

3.3 TOXICIDAD DE LOS METALES

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Muchos, como el calcio (Ca), cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), son micronutrientes y constituyen parte esencial en los sistemas biológicos. En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y en el transporte de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la traducción de señales

⁵ 2C se refiere a 1 contenido de ADN de una célula haploide (por ejemplo en el caso del humano corresponde a 46 cromosomas con una cromátida) y 4C se refiere a 2 contenidos de ADN (que equivalen a los 46 cromosomas con dos cromátidas).

(Lewin, 2000; Nelson y Cox, 2004). Sin embargo, en altas concentraciones algunos de ellos tienen propiedades genotóxicas y carcinógenas (Léonard, 1988; Hartwig, 1995).

iones de metaloides como el arsénico (As) y de metales como el berilio (Be), cadmio (Cd), cromo (Cr) y Ni, en bacterias muestran una débil actividad mutágena, pero en células de mamífero en cultivo producen diferentes tipos de daño celular y sobre el ADN, e inducen sobre-expresión de genes y transformación celular en modelos animales y en el humano, por lo que son considerados agentes potencialmente carcinógenos (Bal y Kasprzak, 2002; Hartwig *et al.*, 2002b; Andrew *et al.*, 2003). Otros metales como el Co, el Fe, el mercurio (Hg), el plomo (Pb) y el **vanadio (V)** tienen diversos efectos y son elementos que pueden incrementar la lista de compuestos carcinógenos con propiedades mutágenas y genotóxicas (Hartwin, 1995; Bal y Kasprzak, 2002; IARC, 2003).

3.4 VANADIO

3.4.1 Propiedades y Usos

En la corteza terrestre, el vanadio ocupa el número 22 entre los elementos más abundantes con una presencia de 0.014 a 0.02 %. Participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. Su necesidad para humanos no ha sido confirmada, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que en el caso de ser necesario la ingesta diaria sería de 15 µg por día aproximadamente (de un rango de 6 a 18 µg/día) (Lagerkvist *et al.*, 1986; EFSA, 2004).

El vanadio es un metal de color grisáceo con densidad de 6.11 g/cm³. En la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo VB, tiene como número atómico 23, configuración electrónica [Ar] 3d³ 4s², peso atómico 50.95, punto de fusión 1950 °C y punto de ebullición 3600 °C. Existe en diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, y generalmente pasa de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de oxidación-reducción. Sin embargo, únicamente los tres estados más altos, vanadio(III), vanadio(IV) y vanadio(V) (V^{III}, V^{IV} y V^V, respectivamente) tienen funciones biológicas importantes (IPCS, 1988; Rehder, 1991; Hirao, 2000; EFSA, 2004).

De manera similar al molibdeno (Mo), el vanadio tiene una posición excepcional dentro de los biometales, ya que participa en los procesos biológicos en forma de anión o catión. En condiciones fisiológicas el V^V predomina como anión vanadato (H₂VO₄⁻) y el V^{IV} como catión vanadilo (VO²⁺); aunque, pueden presentarse otras especies de cationes (VO³⁺, VO₂⁺) y aniones (HVO₄²⁻, V₄O₁₂⁴⁻ y V₁₀O₂₈⁶⁻) de V^V y de aniones ([VO₂(OH)₅]⁻) para el V^{IV}. A pH cercano a 7 el V^{III} se encuentra exclusivamente en forma de catión (V³⁺) y en el ambiente celular en forma de complejos. En condiciones ácidas de pH 3.5, el ion vanadilo es muy estable, en soluciones básicas predomina el ion ortovanadato (VO₄³⁻) que es muy similar en su geometría al fosfato (PO₄³⁻) (Baran, 2000; Rehder, 2003; Crans *et al.*, 2004). La química de coordinación del vanadio es extensa, comúnmente presenta una geometría octaédrica, de pirámide o bipirámide cuadrada, donde, un oxígeno siempre forma un doble enlace con el V^V o el V^{IV}, originando compuestos oxovanadatos u oxovanadilos (Crans *et al.*, 2004).

Se conocen una gran cantidad de compuestos inorgánicos de vanadio, en el cuadro I se muestran algunas de las propiedades físicas y químicas de los compuestos más comerciales, usados en la industria y que son de interés toxicológico. A continuación se mencionan sólo las propiedades de los compuestos que se evaluaron en esta investigación.

El pentóxido de vanadio (CAS No. 1314-62-1), es el compuesto más comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de 1750 °C y punto de ebullición de 690 °C, es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m³. El trióxido de vanadio (CAS. No. 1314-34-7) se funde a 1970 °C, es una sal de color negro que al contacto con el aire se cristaliza de manera gradual en índigo-azulado formando V₂O₄, se descompone al calentarla produciendo humos altamente tóxicos. El tetróxido de vanadio (CAS No. 1236-21-4) es un polvo azul-negro que se usa para catalizar varias reacciones a temperaturas elevadas, es muy irritante y se funde a 1976 °C. En general estos compuestos son moderadamente solubles en agua, muy solubles en ácido y pueden formar compuestos de V^V con bases. Las sales de V^{III} son reductores fuertes y en solución el metal es atacado lentamente por el agua para formar V^{IV}.

Para los procesos industriales, el vanadio se obtiene de los minerales cuprodescloicita, descloicita, patronita, roscolecita, vanadinita, carnotita, corvuosita, fernandinita y algunos menos abundantes que contienen sales de este metal en forma de V^V, V^{IV} y V^{III}. En 1990 se estimó que la producción mundial fue de 30,700 toneladas con cerca de 22 millones de

toneladas métricas de reserva, donde, Sudáfrica, la Ex-uni3n de Republicas Sovi3ticas Socialistas, China, Estados Unidos de Am3rica y Jap3n son los mayores consumidores. El vanadio tambi3n se encuentra en forma de complejos met3licos y organomet3licos en todos los petr3leos crudos y materiales de origen f3sil (Baroch, 1983; L3onard y Gerber, 1994; IPCS, 1988, 2001).

Cuadro I. Propiedades f3sicas y qu3micas de compuestos de vanadio de inter3s toxicol3gico

Nombre (f3rmula qu3mica)	Peso molecular	Estado de oxidaci3n	Densidad (g/cm ³)	Solubilidad
Pent3xido de vanadio (V ₂ O ₅)	181.88	V	3.357	Ligeramente soluble en agua fr3a o caliente, 8 g/L a 20 °C. Soluble en anh3drido ac3tico, acetato de etilo y acetona
Metavanadato de amonio (NH ₄ VO ₃)	116.98	V	2.326	Soluble en agua, 5.2 g/L a 15 °C, 69.5 g/L a 96 °C. Insoluble en alcohol, 3ter o NH ₄ Cl
Metavanadato de sodio (NaVO ₃)	121.93	V	Sin datos	Soluble en agua, 211 g/L a 25 °C, 388 g/L a 75 °C
Ortovanadato de sodio (Na ₃ VO ₄)	183.91	V	Sin datos	Soluble en agua
Oxitricloruro de vanadio (VOCl ₃)	173.30	V	1.829	Se descompone en soluci3n. Soluble en alcohol, 3ter y 3cido ac3tico
Tetr3xido de vanadio (V ₂ O ₄)	165.88	IV	4.339	Soluble en 3cidos o bases. Poco soluble en agua
Sulfato de vanadilo (VOSO ₄)	163.00	IV	Sin datos	Muy soluble en agua fr3a (20-25 °C)
Tetracloruro de vanadio (VCl ₄)	192.75	IV	Sin datos	Se descompone en soluci3n
Oxidicloruro de vanadio (VOCl ₂)	137.85	IV	2.88	Se descompone en agua fr3a. Soluble en 3cido n3trico diluido
Tri3xido de vanadio (V ₂ O ₃)	149.88	III	4.87	Ligeramente soluble en agua fr3a. Soluble en agua caliente, 3cido n3trico, 3cido hidroflluorh3drico y bases

M3s informaci3n de propiedades f3sicas y qu3micas de vanadio en: Baroch, 1983; Lagerkvist *et al.*, 1986; Carson *et al.*, 1987; Alessio *et al.*, 1988; Budavari *et al.*, 1996; IPCS, 1988, 2001.

En el gas natural se encuentra muy poco vanadio. La concentraci3n en los petr3leos del mundo var3a mucho, depende del lugar de origen. Los petr3leos de Am3rica son los que contienen m3s vanadio, en crudos provenientes de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1,180 µg/g, en la variedad atabasca de Canad3 y la maya de M3xico el contenido es

de 640 y 243 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. En cenizas, residuos sólidos u hollín se pueden encontrar de 600 a 700 $\mu\text{g/g}$ (IPCS, 1988; Crans *et al.*, 1998).

El vanadio es usado en la industria metalúrgica en manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con aluminio (Al), titanio (Ti), boro (B), Cr, Ni, Mn y tungsteno (W). Se utiliza en la preparación de vidrio, de pinturas de uso común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes. Se usa en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. Se utiliza en materiales de superconductividad, es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción de maquinaria aérea y tecnología espacial (Stokinger, 1981; Baroch, 1983; Carson *et al.*, 1987; Lagerkvist *et al.*, 1986; Alessio *et al.*, 1988; IPCS, 1988, 2001).

En farmacología ha adquirido una importancia especial. En los últimos 10 años complejos orgánicos y compuestos inorgánicos de vanadio (NH_4VO_3 , NaVO_3 , Na_3VO_4 , VOSO_4) son empleados en la terapia contra la diabetes y la obesidad. En atletas, para mejorar el rendimiento físico y en biología de la reproducción como anticonceptivo vaginal. Además, por sus propiedades antiproliferativas y moduladora de la expresión de diversos genes, es usado en modelos experimentales como agente anti-carcinogénico (Thompson y Orvig, 2004; Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004; D´Cruz y Uckun, 2005; Scior *et al.*, 2005).

3.4.2 Contaminación por Vanadio

En la naturaleza el vanadio no se encuentra en forma pura, por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos. El vanadio en el ambiente es un contaminante principalmente por la actividad humana. En zonas urbanas e industriales se encuentra en elevadas cantidades, por lo que, representa una fuente de exposición ocupacional y para la población en general.

La siderurgia del acero es uno de los procesos que libera grandes cantidades de vanadio a la atmósfera. Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de petróleo, carbón y aceites pesados, y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas e incendios forestales (IPCS, 2001).

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. En grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que en áreas rurales cantidades menores a 0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Lagerkvist *et al.*, 1986; IPCS, 1988). Para la Ciudad de México se han reportado valores de $0.027 \pm 0.012 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Riveros-Rosas *et al.*, 1997), sin embargo, estos datos no coinciden con las medidas encontradas en grande localidades cosmopolitas.

En el agua para beber se reportan valores por debajo de 10 $\mu\text{g}/\text{l}$, con un promedio de 4.3 $\mu\text{g}/\text{l}$. Cantidades altas, que van de 49.2 a 70 $\mu\text{g}/\text{l}$, se han encontrado en ríos cercanos a minas y mantos acuíferos ubicados cerca de zonas industriales (Lagerkvist *et al.*, 1986; IPCS, 1988). Las concentraciones en agua de mar se encuentran en un rango de 1 a 3 $\mu\text{g}/\text{l}$, con valores máximos de 7 $\mu\text{g}/\text{l}$ y de hasta 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco en sedimentos costeros (Miramand y Fowler, 1998).

El desgaste de las rocas oceánicas y de los minerales terrestres libera vanadio en el agua y en el aire. Se considera que la concentración promedio de este metal en el suelo se encuentra alrededor de 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso seco, pero en suelos cercanos a plantas metalúrgicas los valores superan los 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Lagerkvist *et al.*, 1986; IPCS, 1988, 2001).

3.4.3 Vanadio en los Alimentos

En una revisión reciente, se examinó la cantidad de vanadio en los alimentos que se ingieren en la dieta cotidiana y el riesgo toxicológico que representa (EFSA, 2004). En los alimentos se encuentra en estado de oxidación III y IV. Las concentraciones en peso fresco de grasas, aceites, frutas y vegetales van de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en granos, alimentos de mar y carnes de 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en eneldo o pimienta negra las cantidades detectadas se encuentran en 431 y 987 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente y en tabaco para fumar de 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Se ha estimado, que la ingesta de vanadio en la dieta en promedio es de 13 a 15 $\mu\text{g}/\text{día}$, pese a que algunos autores mencionan que alcanza valores de 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ (French y Jones, 1993; EFSA, 2004).

3.4.4 Biocinética y Metabolismo

Para la población general, los alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, seguida de la aérea.

La entrada de vanadio al organismo de los mamíferos, ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio. La absorción por la piel es mínima, varios reportes coinciden en que el 10 % o el 25 % de vanadio ingerido o inhalado, respectivamente es absorbido y transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (Elinder *et al.*, 1988; Mukherjee *et al.*, 2004).

Una vez que ha sido absorbido, puede encontrarse en estado de oxidación III, IV y V. El V^V es reducido a V^{IV} por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma (Rehder *et al.*, 2003). No se conoce bien la biocinética del V^{III} , pero debido a la presencia de oxígeno en la sangre es posible que pueda ser oxidado a V^{IV} ó V^V y parte permanece como V^{III} unido a diferentes ligandos.

Es transportado por la albúmina y selectivamente por la transferrina. Las condiciones de pH neutro propician el dominio de V^V en plasma. Se tiene bien establecido que el V^V entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato. En el interior de la célula el V^V puede ser nuevamente reducido a V^{IV} por el glutatión y otros sustratos (Cantley *et al.*, 1978; Yang *et al.*, 2003, 2004).

Algunos estudios de farmacocinética con eritrocitos, demuestran que la entrada de vanadio a la célula es regulada, se da en dos etapas y cada una implica un mecanismo en particular. En la etapa inicial, el V^V cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, entre tanto que en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, el V^{IV} , y un mecanismo de paso semejante al de los cationes divalentes (Heinz *et al.*, 1982). De hecho, se ha reportado que el vanadio ingerido es transformado en el estómago a su forma catiónica (VO^{2+}) antes de empezar a ser absorbido por el duodeno, además de que la absorción del VO^{2+} es cinco veces menor en comparación a la presencia de la forma aniónica (VO_4^{3-}) (Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004).

En los animales de experimentación, se ha determinado la toxicocinética del vanadio. La entrada del metal está en función de la ruta de administración, el tipo de tratamiento y de las propiedades del compuesto (Domingo, 1996). Independientemente de la forma en que se aplique se acumula exclusivamente como V^{IV} (VO^{2+}), en hígado, riñón, hueso y bazo, en órganos como los pulmones y los testículos se concentra en menor cantidad; aunque también se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso. Los órganos que no remueven con facilidad el metal son los huesos, los músculos y los pulmones, donde permanece por tiempo prolongado (Sharma *et al.*, 1987; Alessio *et al.*, 1988; Elinder *et al.*, 1988; French y Jones, 1993). Una vez, retenido en los órganos, es redistribuido en los componentes celulares, el vanadio se acumula en el núcleo, la mitocondria, los microsomas y en el citoplasma (Sakurai *et al.*, 1994), lo que demuestra la afinidad del vanadio por el material genético.

Pruebas bioquímicas demuestran que el vanadio en estado de oxidación IV y V, interactúa en concentraciones μM con muchas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (Crans *et al.*, 1989, Baran, 2000). En la célula el vanadio tiene preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas; se calcula que el 61 % del total de V^{IV} se une a los fosfatos, el 29 % a las proteínas, el 1 % queda libre y el resto a radicales sulfhidrilo o a vitaminas, entre otras moléculas (Nechay *et al.*, 1986).

En trabajadores expuestos a óxidos de vanadio y en modelos animales, el vanadio absorbido es rápidamente desechado por los riñones o la bilis y excretado en la orina o en las heces^[6]. La cinética de eliminación en la orina sigue un comportamiento bifásico, en las 20 primeras horas se excreta la mayor cantidad y entre los 40 a 50 días otra parte (Elinder *et al.*, 1988). Un dato importante, es que el vanadio en modelos animales puede cruzar las barreras hematotesticular y placentaria, e inducir alteraciones en las diferentes células del testículo y durante el desarrollo embrionario y fetal (Domingo, 1996; Aragón *et al.*, 2005)

3.4.5 Exposición y Toxicidad

La toxicidad del vanadio en trabajadores laboralmente expuestos está bien documentada (IPCS, 1988, 2001; WHO, 2000; Woodin *et al.*, 2000). Los óxidos de vanadio presentes en

⁶ Los posible sitio de monitoreo biológico lo constituye la sangre, las heces, la orina y el pelo.

las partículas de menos de 10 µm de diámetro de las cenizas y polvos, producto de la quema de combustible fósil, está asociado con efectos adversos en la salud. La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales, induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos cambios en el ritmo cardiaco y en trabajadores fumadores la aparición de un color verdoso en la lengua. También se han reportado alteraciones bioquímicas en sangre como la disminución de grupos sulfhídrico, cambios en la concentración de albúmina y colesterol.

La exposición aguda ligera (de 0.2 a 1 mg/m³) a polvos de vanadio en personas voluntarias, indujo síntomas como tos, irritación en la nariz y en la mucosa oral, mientras una exposición aguda fuerte causó irritación sensorial, fiebre, conjuntivitis, aumento del movimiento intestinal, dermatitis, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal.

En estudios de los efectos sobre la población de diversos metales dispersos en el aire de comunidades urbanas, se encontraron ligeras correlaciones entre los niveles de vanadio y la mortalidad producida por ciertos cánceres, neumonía y bronconeumonía, de la misma manera, se encontró correlación entre los niveles de vanadio en partículas aéreas y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (IPCS, 1988, 2001)

En un estudio más reciente, Fortoul y colaboradores (2002) encontraron que la cantidad de vanadio se incrementó significativamente en las autopsias de pulmón de residentes de la Ciudad de México que vivieron en la década de los 90's (1.36 ± 0.08) en comparación a los que vivieron en la década de los 60's (1.04 ± 0.05). Las concentraciones halladas no correlacionaron con el género, la edad, los hábitos al cigarro, la causa de muerte o su ocupación. Por otro lado, Lin y colaboradores (2004), encontraron 0.42 ± 0.24 ng/ml de vanadio en muestras de sangre de estudiantes de la Ciudad de Taiwan, cuando en la literatura se reportan valores de 0.10 ± 0.07 en residentes cercanos a zonas industriales y de 0.032 a 0.095 ng/ml para la población general. Lo anterior indica que los taiwaneses están expuestos ambientalmente a elevadas cantidades de vanadio y el aire representa un riesgo para la salud de los habitantes de ambas localidades.

Otra manera de exposición a vanadio para el humano la constituye las amalgamas, usadas en ortodoncia, ortopedia, en válvulas cardiovasculares y en distintos materiales biomédicos

(Daley *et al.*, 2004; Gioka *et al.*, 2004; Narayan, 2005). El metal soluble de la aleación Ti-6Al-4V, es liberado y redistribuido por el torrente sanguíneo. Algunos efectos que se han encontrado en estos pacientes son una respuesta inflamatoria local, toxicidad celular y daño cromosómico.

3.4.6 Genotoxicidad en Procariotas

El panorama de los efectos genotóxico y mutagénico por el vanadio y sus compuestos en bacterias es ambiguo (Cuadro II). En cepas de *B. subtilis* (Rec+ y Rec-), *S. typhimurium* y *E. coli* compuestos V^{IV} y V^V ($VOCl_2$ y NH_4VO_3 , V_2O_5), en concentraciones de 0.3 a 0.5 M, muestra en algunos casos una ligera actividad mutagénica y en otros ningún efecto (Kanematsu y Kada, 1978; Kanematsu *et al.*, 1980; Kada *et al.*, 1980; IPCS, 1988).

3.4.7 Genotoxicidad en Levaduras, Plantas e Insectos

Dentro del cuadro II, se muestran un resumen de los efectos genotóxicos y mutagénicos del vanadio y sus compuestos, en levaduras, plantas e insectos.

En la cepa diploide D7 de *S. cerevisiae*, el V^V (NH_4VO_3) en la concentración de 7.5 ó 110 mM induce conversión de genes mitóticos y de mutaciones puntuales reversas, mientras que, en cepas en fase estacionaria el V^{IV} ($VOSO_4$) de 160 a 420 mM no muestra efecto, con o sin la adición de la fracción hepática S9, pero cuando las células se encuentran en crecimiento exponencial aumentan las células con mutaciones e induce citotoxicidad. Por otro lado, en la cepa D61M ambos estados de oxidación incrementan la frecuencia de células aneuploides (Bronzetti *et al.*, 1990; Galli *et al.*, 1991).

En polen maduro de *Petunia hybrida* W166K, el bicloruro de vanadio induce poca fidelidad en la síntesis de ADN (Jackson y Linskens, 1982). En células de *Allium cepa* en dosis altas el pentóxido de vanadio produce picnosis, pérdida de material cromatídico y en dosis bajas actúan como veneno del huso mitótico, en tanto que el ortovanadato (Na_3VO_4) en concentraciones de 0.01 a 10 mM promueve la formación de células binucleadas y dosis mayores a 10 mM ocasiona citotoxicidad (Singh, 1979; Navas *et al.*, 1986).

En insectos, la prueba de mutación y recombinación somática (SMART), evaluada en las alas de *Drosophila melanogaster*, dio positiva al tratar larvas heterocigas $^{+}flr^{3}/mwh^{+}$ con sales de vanadio III, IV ó V. Además el V^{IV} como tetróxido de vanadio en concentraciones de 6.5 a 8.5 ppm fue capaz de inducir recombinación mitótica (Abundis 1994, 1996) y en forma de sulfato de vanadilo efectos adversos sobre la reproducción, al mismo tiempo evidenció diferencias en la respuesta mutagénica entre hembras y machos (Barrera y Villalobos 1998).

3.4.8 Genotoxicidad en Mamíferos Expuestos *in vivo*

En el cuadro III, se presentan los resultados de las investigaciones sobre los efectos genotóxicos por la exposición a vanadio en modelos *in vivo*.

En 49 trabajadores varones expuestos a pentóxido de vanadio no se encontraron cambios en la determinación de bases oxidadas (como la 8-hidroxilo-2´deoxiguanosina, 8-OHdG) en el ADN aislado de células de sangre, ni en el análisis citogenético de ICH o rupturas de cadena sencilla en el ADN con la prueba del Cometa; sólo se encontraron cantidades mayores de vanadio en suero (5.38 contra 2.54 $\mu\text{g/l}$) y orina (11.25 contra 0.74) con respecto al grupo no expuesto (Ivancsits *et al.*, 2002)

En células de médula ósea de ratas, la administración oral de pentóxido de vanadio en dosis de 4 mg/kg durante 21 días, no indujo alteraciones estructurales en los cromosomas pero sí disminuyó el IM (Giri *et al.*, 1979), mientras que cuando se administró pentóxido de vanadio por inyección intraperitoneal en ratones 615 y Kunming albino, en dosis de 0.17, 2.13 ó 6.4 mg/kg durante 5 días, se observó incremento en la frecuencia de MN. Resultados similares se encontraron al aplicarlo por la inyección subcutánea (0.25, 1 ó 54 mg/kg) o por la inhalación de polvos (0.5, 2 ó 8 mg/m^3), pero, no por la administración oral de 1.44, 2.83, 5.65 ó 11.3 mg/kg por 6 días en la cepa Kunming albino (Sun, 1987).

En ratones CD-1, la entubación intragástrica de una sola dosis de sulfato de vanadilo, ortovanadato de sodio y metavanadato de amonio en dosis de 100, 75 y 50 mg/kg, respectivamente (dosis de vanadio elemental 0.6, 0.4 y 0.42 mM para el VOSO_4 , Na_3VO_4 y NH_4VO_3) incrementó en eritrocitos policromáticos la frecuencia de MN y en médula ósea la frecuencia de células hipoploides e hiperploides. Además, el análisis citogenético de AC

reveló que sólo el V^{IV} fue capaz de afectar la estructura cromosómica y disminuir el promedio de la razón de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos (EPC/ENC) (Ciranni *et al.*, 1995). Por otro lado, en ratones machos y hembras de la cepa B6C3F1 la exposición de 1, 2, 3, 8 ó 16 mg/m³ a polvos de V^V (V_2O_5) durante 3 meses, no cambió la frecuencia de MN en ENC, ni tampoco mostró indicios de toxicidad celular medida por EPC/ENC (NTP, 2002).

En ratones macho, la inyección subcutánea de pentóxido de vanadio en dosis de 0.2, 1 ó 4 mg/kg dio resultados negativos con la prueba de letales dominantes (Sun, 1987), pero su administración intraperitoneal de 8.5 mg/kg/ cada tercer día durante 60 días disminuye el número de hembras preñadas e incrementa las mutaciones letales dominantes (LD, medidos por la frecuencia de vivos contra fetos muertos y reabsorbidos después de aparear machos tratados con hembras no tratadas) (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996).

En ratones macho CD-1 una dosis intraperitoneal durante 24 horas de 5.75, 11.5 ó 23 mg/kg, en células de médula ósea no modificó la cinética de ciclo celular, la frecuencia de ICH o de AC estructurales, sólo disminuyó el IM en dosis altas (Altamirano-Lozano *et al.*, 1993; Altamirano-Lozano y Álvarez-Barrera, 1996). Sin embargo, con la prueba del Cometa se observó incremento en la longitud de la migración del ADN de manera dependiente de la concentración en células de testículo, riñón, hígado, corazón, pulmón y bazo, mientras que en células de médula no se observaron cambios (Altamirano-Lozano *et al.* 1996, 1999).

El ortovanadato de sodio en dosis intraperitoneal de 5, 15 ó 25 mg/kg a ratones hembra ICR durante 18 horas (tratamientos aplicados dentro de la maduración de los ovocitos), induce diferentes anomalías citogenéticas en ovocitos en metafase II y en células de médula ósea. En las hembras tratadas, la cantidad de ovocitos colectados disminuyó, sin embargo, esta diferencia no fue significativa (18.6, 18.2 y 17.9 contra 26.8 % del grupo testigo). En los ovocitos se incrementó de manera dosis dependiente la formación prematura de anafases (5.4, 12.4 y 16 contra 0.6 % del testigo), mientras, en médula ósea la frecuencia de células tetraploides (7.3, 16.7 y 30.3 contra 1.3 % del testigo), hiperploides (0.7, 0, 3.3 contra 0 % del testigo) y la separación prematura del centrómero (16.2, 21.6 y 39.2 contra 12.8 del testigo) se elevó de manera importante ($P < 0.05$, excepto para 15 mg/kg en células hiperploides) (Maihles *et al.*, 2003).

En estudio reciente, Attia y colaboradores (2005), utilizando ratones macho F₁ de la cruce 102/E1 x C3H/E1 y el mismo tipo de tratamiento del párrafo anterior, hallaron que el ortovanadato, en una sola administración de 25 mg/kg, no produce retraso meiótico (efecto medido por la cantidad de espermatozoides que incorporaron BrdU en fase S durante la etapa de espermatocitos), mientras, las hiperploidías en espermatozoides se incrementaron significativamente en 15 y 25 mg/kg (0.092 ± 0.016 y 0.096 ± 0.015 contra 0.058 ± 0.016 del testigo) con la prueba de FISH para el cromosoma 8 y los sexuales (X, Y). Los mismos autores, no encontraron evidencias de toxicidad celular (en el porcentaje de EPC) ni tampoco genotoxicidad (MN en EPC) en células de médula ósea después de 24 horas de tratamiento.

Por su parte Leopardi y colaboradores (2005), al investigar los efectos genotóxicos del ortovanadato de sodio en ratones macho CD-1, suministrado en el agua para beber durante 5 semanas, en concentraciones de 0.75, 7.5, 75, 750 ó 1500 mg/l (0.06 , 0.57 , 5.49 , 20.8 ó 33 mg/kg, que representan las cantidades de vanadio elemental consumido al final, respectivamente), hallaron con el análisis de MN en reticulocitos de sangre periférica, un resultado significativo a partir de 75 mg/l en la tercera y quinta semana de tratamiento, del mismo modo, en la quinta semana encontraron que la frecuencia de MN en EPC de médula ósea se incrementó en 750 y 1500 mg/l, además, el daño al ADN evaluado con el ensayo Cometa en el bazo, la médula ósea y en los testículos mostró únicamente diferencia en la dosis más alta en células del bazo.

En resumen, los reportes relacionados con la actividad genotóxica y mutagénica en sistemas de mamíferos expuestos a vanadio *in vivo* son insuficientes. No queda claro si el vanadio induce AC estructurales y daño sobre el ADN. El V^{IV} muestra un débil efecto positivo en la formación de AC estructurales, mientras el V^V no. En cuanto a la inducción de rupturas de hebra sencilla, el V^V da un efecto positivo, el caso del V^{IV} no se conoce. Sin embargo, los resultados dan evidencia de que este metal en ambos estados de oxidación provoca un efecto aneuploidógeno con una toxicidad moderada.

3.4.9 Genotoxicidad en Células de Mamíferos Expuestas *in vitro*

En el cuadro IV, se describen los resultados de las investigaciones de la genotoxicidad inducida por el vanadio *in vitro*.

Uno de los primeros estudios de la exposición de células en cultivo a vanadio fue el que efectuaron Paton y Allison (1972) y Sun (1987). En leucocitos humanos tratados con vanadato u ortovanadato de sodio (concentraciones no especificadas), no encontraron diferencias en la inducción de AC estructurales, ni tampoco ICH en linfocitos cultivados con 0.047, 0.47 ó 4.7 moles de pentóxido de vanadio (no se especifica más acerca del tratamiento).

Roldán y Altamirano (1990), en un estudio más formal que los anteriores, ratificaron que el pentóxido de vanadio en concentraciones de 2, 4 ó 6 $\mu\text{g/ml}$ en el mismo sistema de linfocitos, no indujo AC estructurales o ICH, sin embargo encontraron que este compuesto incremento las células poliplóides y las asociaciones de satélites (AS) entre cromosomas acrocéntricos, además, causo disminución del IM y retraso en la duración del ciclo celular.

Compuestos halogenados como el tetraflúoruro (VF_4 , V^{IV}) o el tricloruro de vanadio (VCl_3 , V^{III}) en cultivo de linfocitos humanos tratados con 2, 4, 8 ó 16 $\mu\text{g/ml}$, reducen el IM de manera dosis dependiente y, solo el V^{IV} tiende a extender el tiempo de división celular e incrementar la frecuencia de ICH en concentraciones de 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$ (Rodríguez-Mercado, 1996).

En estudios realizados por Migliore y colaboradores (1993, 1995, 1999), se encontró que el V^{V} (NH_4VO_3 , NaVO_3 o Na_3VO_4) y V^{IV} (VOSO_4) aplicado a linfocitos humanos en 2.5, 5, 10, 20, 40 u 80 μM , fue capaz de inducir en concentraciones mayores a 5 μM hipoploidías, AS, MN, MN con centrómero positivo y MN positivos para el cromosoma X y la sonda β -satélite específica para cromosomas acrocéntricos, también, de incrementar la frecuencia de ICH y de disminuir la cinética de división en los tratamientos de 20, 40 y 80 μM , pero no de inducir AC estructurales.

Ramírez y colaboradores (1997), usando la prueba de ADN α -satélite para cromosoma 1 y 7, mediante la prueba de FISH en linfocitos humanos, reportaron que el pentóxido de vanadio en concentraciones de 0.001, 0.01 ó 0.1 μM incrementa la frecuencia de hiperploidías y en células tratadas con anticuerpos anti- β -tubulina este metal puede interrumpir la formación del huso mitótico.

Por otro lado, en leucocitos humanos, la prueba del Cometa reveló que el pentóxido de vanadio en 2 horas de exposición con 0.3, 30 ó 3000 μM (iguales a 0.54, 54 ó 540 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) induce rupturas de hebra sencilla y sitios sensibles al álcali en el ADN, y en linfocitos en proliferación tratados durante 24 horas el daño aumentó en concentraciones altas (Rojas *et al.*, 1996). En tanto, en tratamientos de 24 horas con ortovanadato de sodio en 0.5, 1, 5 ó 10 μM (iguales a 0.025, 0.05, 0.25 ó 0.5 $\mu\text{g/ml}$) sobre leucocitos de sangre completa, linfocitos no estimulados y fibroblastos de piel, este compuesto es capaz de elevar la migración del ADN con una repuesta diferencial entre las células de sangre y los fibroblastos, donde, los cultivos de piel muestran mayor sensibilidad para detectar daño en concentraciones bajas (0.025 y 0.05 $\mu\text{g/ml}$), en comparación con los leucocitos (0.25 $\mu\text{g/ml}$) (Ivancsits *et al.*, 2002).

Kleinsasser y colaboradores (2003), encontraron que los linfocitos humanos son más sensibles que las células de mucosa nasal a los efectos del vanadio. En sus experimentos observaron que el pentóxido en 60, 120, 240 ó 470 μM , causa daño al ADN de manera dosis dependiente, mientras, en las células de la mucosa nasal dicho efecto no se presentó.

El sulfato de vanadilo, también induce daño al ADN en linfocitos humanos y en células con alteraciones en su composición genética. Usando la prueba del Cometa, el VOSO_4 en tratamientos de 1 hora con 0.05 0.01, 0.5 ó 1 mM ^[7], produce rupturas de hebra sencilla y doble en linfocitos humanos en concentraciones altas (electroforesis a pH 12.1 o pH > 13), mientras, que en células HeLa únicamente rupturas de hebra sencilla en todas las concentraciones probadas. En el mismo estudio, la cinética de reparación reveló que en los linfocitos el daño se repara en 120 minutos en concentraciones menores a 0.5 mM . La aplicación de enzimas que reconocen bases oxidadas como la formamidopiridina-ADN glicosilasa o endonucleasa III (Fpg y EndoIII)^[8], revelaron que el daño al ADN incrementa de magnitud, el cual, disminuye considerablemente cuando las células son pre-incubadas con agentes antioxidantes (Woźniak y Błasiak, 2004).

En células de criceto chino y en la línea V79 de ovario, el sulfato de vanadilo (1, 2, 5 ó 7.5 mM) y el metavanadato de amonio (0.5, 1, 2 ó 5 mM) no inducen mutaciones puntuales en

⁷ Concentraciones relativamente altas en comparación con las cantidades del resto de los datos del cuadro IV.

⁸ La Fpg reconocen purinas y la Endo III pirimidinas oxidadas en el ADN. Ambas convierten este tipo de lesiones en rompimientos que son detectados por el Cometa (Collins *et al.*, 1995).

presencia o ausencia de la fracción hepática S9, pero ambos compuestos muestran una alta toxicidad, donde el V^V en comparación al V^{IV} reduce la sobrevivencia en mayor porcentaje, efecto que se aminora con la presencia de la fracción S9 (Galli *et al.*, 1991). En experimentos aparte, el metavanadato de amonio en concentraciones no citotóxicas de 5, 10, 20 ó 25 μM incrementó la frecuencia de mutaciones puntuales del locus *hprt* en las células V79 expuestas 24 horas en un medio sin suero y de mutaciones en el gen bacteriano *gpt* en células transgénicas G12 en concentraciones de 20 y 40 μM (Cohen *et al.*, 1992).

Algunos efectos genotóxicos inducidos por V^{III} , V^{IV} y V^V , se han encontrado en cultivos de células de ovario de criceto chino (línea celular $K_1\text{-BH}_4$). El trióxido de vanadio, sulfato de vanadilo y metavanadato de amonio en varias concentraciones (0.1, 0.5 ó 1 $\mu\text{g/ml}$; 0.5, 1 ó 6 $\mu\text{g/ml}$; y 0.5, 2 ó 4 $\mu\text{g/ml}$, correspondientemente) aumentan la frecuencia de ICH, efecto que disminuye en presencia de la fracción S9. En aplicaciones ligeramente mayores a las inductoras de ICH (12 y 18 $\mu\text{g/ml}$; 6, 12 y 24 $\mu\text{g/ml}$; 4, 8 y 16 $\mu\text{g/ml}$, correspondientemente) después de 2 horas de tratamiento, los tres compuestos incrementan significativamente las AC estructurales en presencia o ausencia de activación metabólica (Owusu Yaw *et al.*, 1990),

En otro estudio, con la línea V79, el pentóxido de vanadio en tratamientos de 1, 2, 3 ó 4 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas, no elevó la frecuencia de ICH ni de mutaciones puntuales, pero sí incrementó de manera dosis dependiente la frecuencia de células micronucleadas que contienen MN con señal positiva para cinetocoro, además de la presencia de endorreduplicaciones y la disminución de la viabilidad y de la cinética de división (Zhong *et al.*, 1994).

Otros efectos que se han observado en células de criceto y en la línea leucémica de linfocitos T humanos, MOLT4 ($\geq 200 \mu\text{M}$ y de 1 mM, correspondientemente), son los enlaces covalentes entre el ADN con las proteínas (Cohen *et al.*, 1992; Olin *et al.*, 1996).

En su conjunto, los estudios relacionados con la actividad genotóxica y mutagénica en células de mamífero tratadas con vanadio *in vitro*, suman una cantidad considerable pero aún insuficiente para entender los mecanismos por los cuales este metal y sus compuestos producen toxicidad en los sistemas biológicos (Cuadro IV).

Al igual que los reportes *in vivo*, en los resultados *in vitro* no es claro si el vanadio produce cambios en la morfología de los cromosomas. En leucocitos y células epiteliales de humano el V^V no induce AC estructurales, en tanto que el V^{IV} sí. Los datos relacionados con ICH muestran que en ambos estados de oxidación dan efecto positivo con una diferencia en la intensidad de la respuesta de acuerdo con el compuesto empleado, donde el pentóxido de vanadio no eleva la frecuencia de ICH. Los datos para el V^{III} son los más escasos y en linfocitos el VCl_3 no incrementa los ICH. No hay datos relacionados con el daño y reparación para el V^{III} o el V^{IV} en concentraciones bajas, pero, se ha reportado que las lesiones provocadas en el ADN por el pentóxido de vanadio son reparables y ayudan a explicar porqué en los análisis citogenéticos no se observa un efecto clastógeno contundente por parte del V^V .

Otros sistemas, como las células de ovario de criceto chino, son más sensibles para detectar los efectos genotóxicos del vanadio, los cuales, inducen daño citogenético y enlaces cruzados ADN-proteínas, sin embargo, este último en concentraciones de V^V relativamente altas.

Un resultado común tanto *in vivo* como *in vitro* es la presencia de un débil efecto mutágeno, la detección de un claro efecto aneuploidógeno y un frecuente efecto citotóxico y ciostático. Sin embargo, la información relacionada con sus efectos clastógenos es limitada y controvertida.

En la actualidad uno de los objetivos en el campo de la genética toxicológica es poder conocer los efectos del vanadio a nivel celular y sobre el ADN. Se sabe que varios factores están involucrados en la respuesta celular y que la toxicidad varía considerablemente no sólo entre compuestos de diferentes metales, sino también, entre distintas especies químicas de un mismo metal. Por lo anterior, en la presente investigación se decidió estudiar los efectos genotóxico y citotóxico de vanadio en estado de oxidación III, IV y V, como trióxido, teróxido y pentóxido de vanadio, respectivamente.

Cuadro II. Efectos genotóxicos y mutagénicos del vanadio en bacterias, levaduras, plantas e insectos

Sistema de prueba	Compuesto de vanadio				Tratamiento	Efecto	Referencia
	V ^V	V ^{IV}	V ^{III}	V ^{II}			
Bacterias:							
<i>Bacillus subtilis</i>	V ₂ O ₅	VOCl ₂			0.5 y 0.4 M	Mutagénico +	Kanematsu <i>et al.</i> , 1980
H17 (Rec+, arg-, tri-) M45 (Rec-, arg-, tri-) <i>Salmonella typhimuium</i>	NH ₄ VO ₃				0.3 M	+	Kanematsu y Kada, 1978; Kada <i>et al.</i> , 1980; IPCS, 1988
TA100, TA98, TA90, TA89 y TA1537	V ₂ O ₅ , NH ₄ VO ₃	VOCl ₂			0.3, 0.4 ó 0.5 M	-	
TA1535	V ₂ O ₅					-	Kada <i>et al.</i> , 1980; IPCS, 1988
TA1535	NH ₄ VO ₃					+	
<i>Escherichia coli</i>					0.3, 0.4 ó 0.5 M	-	
WP2 o WP2her	V ₂ O ₅ , NH ₄ VO ₃					-	
WP2, WP2uvrA o Cm981	V ₂ O ₅					+	
ND160 o MR102	V ₂ O ₅					-	
Levaduras:							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						Mutagénico +	Bronzetti <i>et al.</i> , 1990; Galli <i>et al.</i> , 1991
D7 (2n)	NH ₄ VO ₃				7.5 ó 110 mM	Aneuidógeno	
D7 (2n), fase estacionaria		VOSO ₄			420 mM a 1 M	-	
D7 (2n), fase logarítmica		VOSO ₄			160-420 mM	+	
D61M (2n)	NH ₄ VO ₃				4 ó 5 mM	+	
D61M (2n)		VOSO ₄			7.5 ó 10 mM	+	
Plantas:							
<i>Allium cepa</i>	Na ₃ VO ₄				0.01-10 mM	Inhibe la citocinésis	Navas <i>et al.</i> , 1986
	V ₂ O ₅				No descrito	Produce picnosis, pérdida de cromatina y alteraciones en el huso	Singh, 1979
<i>Petunia hybrida</i> W166K				VCl ₂	2 mM	Infidelidad en la síntesis de ADN	Jackson y Linskens, 1982
Insectos:							
<i>Drosophila melanogaster</i>						Prueba de SMART	
+flr ³ /mwh+	V ₂ O ₅	V ₂ O ₄	VCl ₃		2-125, 2-32 ó 2-250 ppm ^a respectivamente	+	Abundis, 1994, 1996
+flr ³ /mwh+	V ₂ O ₅				125-500 ppm ^b	+	Barrera y Villalobos, 1998
+flr ³ /mwh+	V ₂ O ₅	V ₂ O ₄	VCl ₃		4-32 ppm ^c	+	
TM3, Ser/mwh+		V ₂ O ₄			6.5 ó 8.5 ppm ^c	+	
		VOSO ₄			2.5, 2 ó 1 mM ^a	+	

^aexposición aguda; ^bexposición subcrónica; ^cexposición crónica

Cuadro III. Efectos genotóxicos y mutagénicos de mamíferos expuestos a vanadio *in vivo*

Sistema de prueba	Compuesto de vanadio		Tratamiento	Efecto							Referencia		
	V ^V	V ^{IV}		ACe	ACn	MN	ICH	RHS	LD	IM		CC	TC
Humano: Trabajadores expuestos			Cantidad de vanadio en suero 5.38 µg/l (de 2.18-46.35 µg/l)				-	-					Ivancsits <i>et al.</i> , 2002
Sistemas experimentales													
Rata: (médula ósea)	V ₂ O ₅		4 mg/kg vía oral, 21 días	-						+			Giri <i>et al.</i> , 1979
Ratón: Cepa 615 y Kunming albino MN en eritrocitos policromáticos	V ₂ O ₅		Intraperitoneal Subcutáneo Inhalación Oral (ver texto)			+							Sun, 1987
Cepa CD-1 AC y MN en médula ósea MN	NH ₄ VO ₃ Na ₃ VO ₄		50 mg/kg, intragástrica 75 mg/kg, intragástrica 100 mg/kg, intragástrica	-	+	+							Ciranni <i>et al.</i> , 1995
Cepa CD-1 AC, ICH, IM y CC en médula ósea RHS en 6 órganos	V ₂ O ₅	VOSO ₄	5.75, 11.5 ó 23 mg/kg, vía intra peritoneal	-			-	+	+	+	-		Altamirano-Lozano <i>et al.</i> , 1993, 1996, 1999; Altamirano-Lozano y Álvarez-Barrera, 1996
Cepa B6C3F1 MN en eritrocitos normocromáticos de sangre	V ₂ O ₅		1-16 mg/kg, inhalación por 3 meses			-							NTP, 2002
Cepa ICR (ovocitos y médula ósea)	Na ₃ VO ₄		5, 15 ó 25 mg/kg vía intraperitoneal		+								Mailhes <i>et al.</i> , 2003
Cepa F ₁ (102/E1 x C3H/E1) AC en espermatozoides MN en médula ósea CC espermatozoides	Na ₃ VO ₄		1, 5, 15 ó 25 mg/kg vía intraperitoneal		+	-					-	-	Attia <i>et al.</i> , 2005
Cepa CD-1 MN en sangre y médula ósea RHS en células de bazo	Na ₃ VO ₄		750 ó 1500 mg/l, vía oral			+		+					Leopardi <i>et al.</i> , 2005

ACe, aberraciones cromosómicas estructurales; ACn, aberraciones cromosómicas numéricas; MN, micronúcleos; ICH, intercambio de cromátidas hermanas; RHS, rupturas de hebra sencilla en el ADN; LD, letales dominantes; IM, reducción del índice mitótico; CC, retrasos en la cinética de división celular; TC, toxicidad celular

Cuadro IV. Efectos genotóxicos y mutagénicos en células de mamífero expuestas a vanadio *in vitro*

Sistema de prueba	Compuesto de vanadio			Tratamiento	Efecto										Referencia
	V ^V	V ^{IV}	V ^{III}		ACe	ACn	MN	ICH	AS	RHS	MP	EC	IM	CC	
Humanos:															
Linfocitos	NaVO ₃			No especificado	-									Paton y Allison, 1972	
	Na ₃ VO ₄			No especificado	-										
	V ₂ O ₅			0.047-4.7 moles				-						Sun, 1987	
Linfocitos	V ₂ O ₅			2, 4 ó 6 µg/ml	-	+		-	+			+	+	Roldán y Altamirano, 1990	
Linfocitos (5-80 µM)	NH ₄ VO ₃			0.29-9.36 µg/ml	-	+	+	+	+					+ Migliore <i>et al.</i> , 1993, 1995, 1999	
	Na ₃ VO ₄			0.41-13.12 µg/ml	-	+	+	+	+						
	NaVO ₃			0.28-8.96 µg/ml	-	+	+	+	+						
	VOSO ₄			0.41-13.04 µg/ml	-	+	+	+	+						
Linfocitos		VF ₄		2-16 µg/ml				+				+	+	Rodríguez-Mercado, 1996	
			VCl ₃	2-16 µg/ml				-				+	-		
Leucocitos y linfocitos	V ₂ O ₅			0.54, 54 ó 540 µg/ml						+				Rojas <i>et al.</i> , 1996	
Linfocitos	V ₂ O ₅			0.001, 0.01 ó 0.1 µM		+								Ramírez <i>et al.</i> , 1997	
Linfocitos o Fibroblastos	Na ₃ VO ₄			0.25-0.5 µg/ml						+				Ivancsits <i>et al.</i> , 2002	
				0.025 µg/ml						+					
Linfocitos y mucosa	V ₂ O ₅			0.06-0.47 mM						+				Kleinsasser <i>et al.</i> , 2003	
Linfocitos Células HeLa		VOSO ₄		0.5 ó 1 mM						+				Woźniak y Błasiak, 2004	
		VOSO ₄		0.05-1 mM						+					
Criceto chino:															
Células de ovario	NH ₄ VO ₃			0.5-16 µg/ml	+			+				+	+	Owusu-Yaw <i>et al.</i> , 1990	
		VOSO ₄		0.5-24 µg/ml	+			+				+	+		
			V ₂ O ₃	0.1-18 µg/ml	+			+				+	+		
Células V79	NH ₄ VO ₃			1-5 mM							-			Galli <i>et al.</i> , 1991	
		VOSO ₄		2-7.5 mM							-				
Células de ovario	NH ₄ VO ₃			5-50 µM							+	†		Cohen <i>et al.</i> , 1992	
Células V79	V ₂ O ₅			1-12 µg/ml		+	+	-			-	+	+	Zong <i>et al.</i> , 1994	
Células de ovario	NH ₄ VO ₃			0.2 ó 1 mM							+			Cohen <i>et al.</i> , 1992	
				0.25-2 mM							+				

ACe, aberraciones cromosómicas estructurales; ACn, aberraciones cromosómicas numéricas; MN, micronúcleos; ICH, intercambio de cromátidas hermanas; RHS, rupturas de hebra sencilla en el ADN; AS, asociaciones de satélites; MP, mutaciones puntuales; EC, enlaces cruzados ADN-proteínas; IM, reducción del índice mitótico o en la viabilidad (†); CC, retrasos en la cinética de división celular

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos genotóxicos, los cambios sobre la división y la progresión de ciclo celular producidos por el vanadio en estado de oxidación III, IV y V, utilizando distintos indicadores de daño y el modelo de células de sangre periférica de humano tratadas *in vitro*.

5.1.1 Primer Objetivo Particular

Cuantificar la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales, la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, el índice mitótico y el índice de replicación en leucocitos humanos expuestos a tetróxido de vanadio.

5.1.2 Segundo Objetivo Particular

Comparar la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales, el índice mitótico, así como, estimar en el ADN las rupturas de hebra sencilla, de hebra doble y la cinética de reparación en leucocitos humanos expuestos a trióxido, tetróxido o pentóxido de vanadio.

5.1.3 Tercer Objetivo Particular

Evaluar la progresión de las fases de ciclo celular (G_0 - G_1 , S y G_2 -M), con especial atención en la fase de síntesis del ADN por la incorporación de un análogo de base, en cultivos de linfocitos humanos expuestos a trióxido, tetróxido o pentóxido de vanadio.

5 HIPÓTESIS

El estado de oxidación del vanadio puede afectar no sólo la presencia de un efecto sino también la intensidad, por consiguiente, se espera que la inducción de la toxicidad celular y del daño al ADN difiera considerablemente al aplicar diferentes compuestos de este elemento (V^{III} , V^{IV} o V^V) en un sistema *in vitro*.

6 MATERIAL Y MÉTODO

6.1 PROTOCOLO I: ESTUDIO DEL EFECTO GENOTÓXICO INDUCIDO POR EL TETRÓXIDO DE VANADIO EN LEUCOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

6.1.1 Análisis Citogenético

Muestras de Sangre Periférica. Para este estudio, se obtuvieron las células sanguíneas por venopunción con una jeringa heparinizada. Se trabajó con las muestras de tres donadores hombres, no fumadores de 23, 25 y 29 años de edad.

Cultivos de Linfocitos Humanos y Tratamientos. Se sembraron 0.5 ml de sangre completa en 4.5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), el cual, fue previamente activado con 5 µg/ml fitohemaglutinina M (Sigma) para inducir la proliferación de linfocitos T. Para el análisis de AC o ICH, los cultivos se incubaron por 48 o 72 horas a 37°C, respectivamente. El tetróxido de vanadio (V_2O_4 , Aldrich Chem. Co., IN; CAS. No. 1236-21-4) se disolvió en agua destilada, se esterilizó por calor y en todos los casos el tratamiento se aplicó a las 24 horas después de iniciada la siembra. Las concentraciones empleadas fueron de 2, 4, 8 y 16 µg/ml de vanadio, seleccionadas con base en experimentos preliminares. Se hicieron cultivos por duplicado, por cada donador, contando con un lote testigo al que no se le adicionó ningún tratamiento.

Una hora antes de terminar el tiempo de incubación, se interrumpió la mitosis con 4 µg/ml de colchicina (Sigma) y después se procedió a la cosecha. Los cultivos se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm, los paquetes celulares se sometieron a un choque hipotónico durante 15 minutos con 5 ml de una solución de cloruro de potasio (KCl, 0.075 M, JT Baker de México) a 37°C. Después, la fracción celular se fijó 20 minutos con 5 ml de metanol y ácido acético frío (CH_3OH y CH_3COOH , JT Baker), preparado en el momento en parte proporcional 3:1; transcurrido este tiempo, se hicieron dos cambios más con el fijador. Las células se resuspendieron y se dejaron caer en los portaobjetos evitando que más de una gota quedara en el mismo sitio, los portaobjetos se pasaron por la flama y se dejaron secar a temperatura ambiente. Todas las preparaciones, fueron codificadas antes de analizarlas al microscopio.

Evaluación de Aberraciones Cromosómicas. Las preparaciones de los cultivos

cosechados y fijados después de 48 horas de incubación, fueron teñidas durante 10 minutos con una solución de Giemsa (Sigma) al 5 %. El análisis de AC, se realizó en 200 células en metafase por cada tratamiento, se evaluaron las alteraciones estructurales en los cromosomas, tanto de tipo cromosómico como de tipo cromatídico siguiendo los lineamientos de la OECD (1997) y EPA (1998). El IM, se determinó en 8000 células para cada tratamiento, distinguiendo las células en mitosis de las células en interfase. Para calcular el porcentaje de células que entran en división se empleó la siguiente fórmula (Dean y Danford, 1984):

$$IM = \left(\frac{\text{Número de células en división}}{\text{Total de células analizadas}} \right) \times 100$$

Evaluación de Intercambio de Cromátidas Hermanas. Para obtener la tinción diferencial de cromátidas hermanas, a los cultivos de 72 horas se les adicionó 5 µg/ml de BrdU (Sigma) 24 horas después de haber iniciado la siembra. Las preparaciones destinadas para evaluar los ICH, se radiaron en medio acuoso por 20 minutos con una lámpara de luz UV situada a una distancia de 15 cm de altura. Inmediatamente se pasaron a un baño caliente de solución salina citrato (2xSSC a 60°C), en donde reposaron 20 minutos, se enjuagaron con agua y se tiñeron con Giemsa. Por cada tratamiento, en los cromosomas de 60 células en segunda división mitótica fueron contados los ICH de acuerdo al criterio propuesto por Carrano y Natarajan (1988) y los lineamientos de la OECD (1986). El IM se determinó en 8000 células, y a partir del conteo de 400 metafases se identificaron células que pasaron por primero (I), segundo (II) o tercer (III) ciclo de división y mediante la siguiente fórmula se calculó el IR (Ivet y Tice, 1982):

$$IR = \frac{(I)1 + (II)2 + (III)3}{\text{Total de células analizadas}}$$

El análisis de los parámetros citogenéticos, se realizó en un microscopio óptico Nikon (Optiphot-2, Japón), para las frecuencias de AC, ICH e IR se utilizó el ocular de 1000 aumentos y para el IM el de 200 aumentos.

Análisis Estadístico. Los datos obtenidos, en cada ensayo, fueron analizados por la

comparación del grupo testigo contra el grupo tratado. Para el IM, las diferencias significativas fueron detectadas con la prueba estadística de *Z* para *proporciones*. En el caso de alteraciones en IR y en la frecuencia de AC estructurales inducidas por el tratamiento químico, se empleó una prueba de *ji cuadrada*, mientras que, la diferencia estadística en la frecuencia de ICH fue determinada con un análisis de varianza de un factor seguido de una prueba de rangos múltiples de Tukey, *ANDEVA-Tukey*. Los datos se muestran en frecuencias, porcentajes y medias con su desviación estándar, y en la figura 4(A) la media de ICH con su error estándar. Para establecer la posibilidad de un comportamiento dosis-efecto en los distintos parámetros se empleó una regresión lineal (Marques de Cantú, 1990; Cooke *et al.*, 1998; Samuels y Witmer, 1999).

6.1.2 Resultados

Índice Mitótico e Índice de Replicación. Los distintos parámetros citogenéticos se analizaron en tres donadores (A, B y C de 29, 23 y 25 años). En los cuadros V y VI se presentan los datos del IM de los linfocitos humanos en cultivo tratados y no tratados con tetróxido de vanadio. En estos, se puede observar que la frecuencia de células en mitosis disminuye significativamente^[9]. El promedio de los tres donadores muestra un decremento de las células en mitosis y por tanto, un decline gradual en porcentaje de inhibición del IM, efecto que sigue un comportamiento dependiente de la concentración (Figura 4).

El efecto en el IR determinado por la tinción diferencial de cromátidas hermanas, se muestran en el cuadro V. La diferencia estadística del IR, se debe a que en el grupo tratado durante el análisis se observó que la proporción de células en primera división fue considerablemente mayor que las que se encontraban en segunda, tercera o subsecuentes divisiones.

Intercambio de Cromátidas Hermanas. El análisis de la frecuencia de ICH, muestra algunos incrementos entre el grupo tratado comparado con el grupo testigo (Cuadro V), con variaciones interindividuales en respuesta al vanadio. En cuanto al promedio de los tres donadores, las diferencias estadísticas se dan en el tratamiento de 4, 8 y 16 µg/ml.

Aberraciones Cromosómicas. La frecuencia de AC de tipo cromosómico y cromatídico,

⁹ La diferencia entre los datos del grupo testigo se deben a la variación interindividual en respuesta al estímulo con el

se muestran en el cuadro VI. Las aberraciones en las que se consideraron rompimientos (en los que están incluidos los fragmentos acéntricos y las pérdidas), aberraciones tipo cambio (figuras radiales, cromosomas dicéntricos y en anillos) y en una clase aparte las lesiones acromáticas o brechas, no muestran diferencias estadísticas entre el grupo testigo de los tres donadores, pero si, entre los diferentes tratamientos con el compuesto metálico. En el cuadro, se puede observar que tanto los diversos tipos de aberraciones como el porcentaje de células con aberraciones, no incluyendo brechas, se incrementan de manera similar en todos los tratamientos de vanadio(IV), de 2 a 16 µg/ml. Efecto que se define estadísticamente al promediar la frecuencia de AC, así como el porcentaje de células con aberraciones (Cuadro VI y Figura 4).

mitógeno, mientras, las encontradas en los cultivos tratados corresponden a la respuesta individual producida por el metal.

Cuadro V. Índice mitótico (IM), índice de replicación (IR) y frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos cultivados y tratados durante 48 horas con tetróxido de vanadio

Tratamientos en µg/ml	IM ± DEM (% de inhibición)	ICH /célula ± DEM	IR ± DEM
<i>Donador A</i>			
Testigo	1.64 ± 0.21	5.88 ± 2.91	2.40 ± 0.01
2	1.14 ± 0.12 ^b	6.53 ± 3.41	2.48 ± 0.13
4	0.91 ± 0.08 ^b	6.93 ± 3.13	2.40 ± 0.21
8	1.35 ± 0.29	6.17 ± 3.13	2.44 ± 0.08
16	1.26 ± 0.13 ^a	8.52 ± 3.93 ^b	2.24 ± 0.01
<i>Donador B</i>			
Testigo	2.40 ± 0.13	5.66 ± 2.62	2.15 ± 0.04
2	2.70 ± 0.21	5.62 ± 2.68	2.29 ± 0.01
4	2.10 ± 0.24	5.32 ± 2.45	1.98 ± 0.25
8	1.05 ± 0.16 ^b	5.57 ± 2.47	1.99 ± 0.12
16	1.28 ± 0.12 ^b	6.48 ± 3.28	1.88 ± 0.07 ^a
<i>Donador C</i>			
Testigo	2.36 ± 0.12	5.60 ± 2.60	2.51 ± 0.03
2	2.33 ± 0.16	5.90 ± 2.55	2.17 ± 0.05 ^a
4	1.80 ± 0.08 ^a	9.25 ± 4.29 ^b	2.28 ± 0.02
8	2.19 ± 0.19	8.02 ± 2.54 ^b	2.24 ± 0.05 ^a
16	1.80 ± 0.14 ^a	8.00 ± 2.93 ^b	1.86 ± 0.13 ^b
<i>Promedio de los tres donadores *</i>			
Testigo	2.24 ± 0.14	5.71 ± 2.70	2.35 ± 0.16
2	2.17 ± 0.20 (3)	6.02 ± 2.92	2.29 ± 0.13
4	1.60 ± 0.14 (19) ^c	7.17 ± 3.73 ^a	2.23 ± 0.25 ^a
8	1.71 ± 0.21 (14) ^c	6.68 ± 2.92 ^a	2.22 ± 0.20 ^a
16	1.46 ± 0.12 (35) ^c	7.73 ± 3.49 ^b	1.99 ± 0.20 ^b

DEM, desviación estándar de la media

* Regresión lineal: IM $y = 2.442 - 0.202x$, $r = 0.8366$; ICH $y = 5.252 - 0.47x$, $r = 0.8129$; IR $y = 2.505 - 0.105x$, $r = 0.75$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ y ^c $P < 0.002$, comparado con su testigo

Cuadro VI. Índice mitótico (IM) y frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos humanos cultivados y tratados durante 24 horas con tetróxido de vanadio

Tratamientos en µg/ml	IM ± DEM (% de inhibición)	Inducción de AC estructurales						Total		% de células con AC
		Cromatídica			Cromosómica					
		s	r	c	b	s	r	c	b	
<i>Donador A</i>										
Testigo	1.72 ± 0.20	4	0	4	1	0	0	5	9	2.0
2	2.04 ± 0.19	12	0	8	2	0	1	14	23	5.5 ^a
4	1.67 ± 0.13	10	0	5	5	1	1	16	22	5.0
8	1.48 ± 0.18	12	1	9	2	1	0	16	25	5.0
16	1.00 ± 0.22 ^d	15	0	6	4	0	1	19	26	4.5
<i>Donador B</i>										
Testigo	1.73 ± 0.09	2	1	8	0	0	1	3	12	1.5
2	1.76 ± 0.16	6	1	11	3	0	2	10	23	5.0 ^a
4	1.83 ± 0.23	5	0	7	2	0	2	7	16	3.0
8	1.36 ± 0.12 ^a	9	0	5	4	0	3	13	21	6.0 ^a
16	1.19 ± 0.20 ^c	5	0	5	3	0	0	8	13	4.0
<i>Donador C</i>										
Testigo	3.27 ± 0.24	4	0	5	0	0	0	4	9	2.0
2	2.75 ± 0.32 ^a	6	1	1	2	0	0	9	10	4.5
4	2.45 ± 0.22 ^d	6	0	3	2	0	0	8	11	4.0
8	2.01 ± 0.15 ^d	10	0	5	4	1	1	15	21	7.0 ^a
16 *	1.12 ± 0.09 ^d	10	1	7	2	0	0	13	20	7.5 ^b
<i>Promedio de los tres donadores **</i>										
Testigo	2.27 ± 0.19									1.8 ± 0.2
2	2.18 ± 0.15 (4)									5.0 ± 0.4 ^c
4	2.00 ± 0.13 (12) ^a									4.0 ± 0.8 ^a
8	1.63 ± 0.10 (28) ^d									6.0 ± 0.8 ^c
16	1.20 ± 0.10 (47) ^d									5.3 ± 0.5 ^c

DEM, desviación estándar de la media; r, rompimientos; c, cambios; b, brechas

* 200 células analizadas para AC, excepto en 16 µg del donador C donde se evaluaron 170 células

** Regresión lineal: IM $y = 2.663 - 0.269x$, $r = 0.9295$; células con AC $y = 2.02 - 0.8x$, $r = 0.6011$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$ y ^d $P < 0.002$, comparado con su testigo

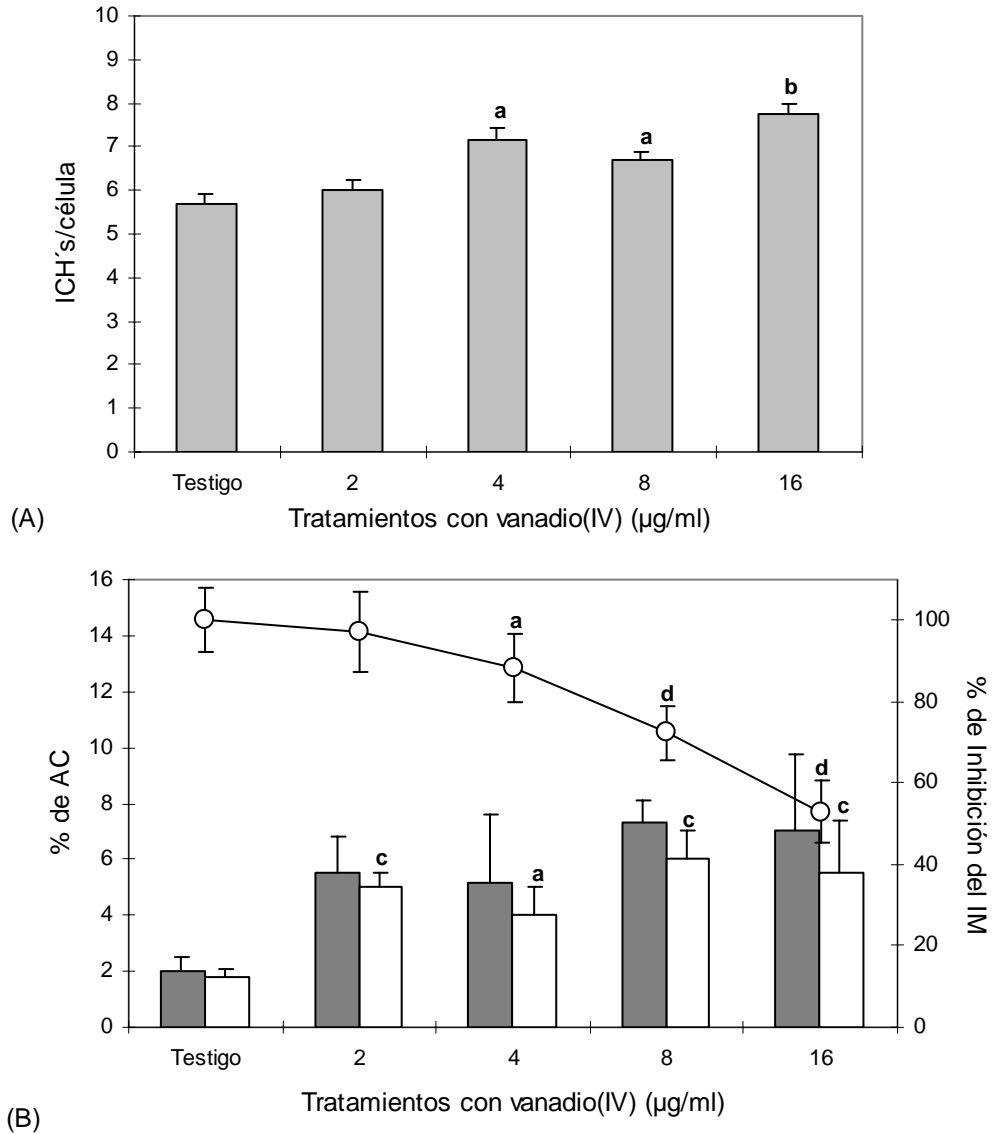


Figura 4. Efectos del tetróxido de vanadio(IV) en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro*. En (A) se describe el comportamiento de la frecuencia de ICH ± EEM y en (B) la línea continua indica el % de inhibición del IM; las barras oscuras el % de AC estructurales ± DEM, y las barras claras el % de células con AC ± DEM. Los resultados son el promedio de tres donadores (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$ y ^d $P < 0.002$, diferencias estadísticas con respecto al grupo testigo).

6.2 PROTOCOLO II: COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS GENOTÓXICO Y CITOTÓXICO INDUCIDO POR TRES ÓXIDOS DE VANADIO EN LEUCOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

6.2.1 Análisis Citogenético

Muestras de Sangre Periférica. Para el análisis citogenético y la prueba de electroforesis unicelular en gel, se trabajó con muestras de sangre periférica heparinizada de tres donadores sanos, varones no fumadores de entre 25 a 36 años de edad.

Cultivos de Linfocitos Humanos y Tratamientos. A partir de la muestra de sangre completa de un donador (hombre de 35 años de edad), se hicieron los cultivos como se describió en el protocolo I. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37 °C y los tratamientos con los compuestos de vanadio se aplicaron a las 44 horas después de iniciada la siembra. Los cultivos se hicieron por duplicado, contando con un testigo negativo y un testigo tratado con 0.4 µg/ml de mitomicina C (C₁₅H₁₈N₄O₅, CAS. No. 50-07-7, Sigma), un reconocido agente alquilante inductor de aberraciones estructurales.

El vanadio comercializado por la Compañía de Productos Químicos Aldrich (Chem. Co., IN), fue disuelto en agua destilada y preparado como se describió en el protocolo I. El trióxido de vanadio (V₂O₃, CAS. No. 1314-34-7), tetróxido de vanadio (V₂O₄, CAS. No. 1236-21-4) y pentóxido de vanadio (V₂O₅, CAS. No. 1312-62-1), se adicionaron a los cultivos de manera independiente en concentraciones de 1, 2, 4 y 8 µg/ml.

Evaluación de Aberraciones Cromosómicas. Los cultivos fueron cosechados, fijados y el análisis de AC e IM se realizó en 200 metafases y 4000 células, respectivamente; excepto para la mitomicina C ya que por su elevada toxicidad se consideró suficiente el análisis de 100 metafases.

6.2.2 Análisis con la Electroforesis Unicelular en Gel

Tratamiento de Leucocitos Humanos y Viabilidad. Para exponer los leucocitos humanos a los óxidos de vanadio, para cada tratamiento, se tomaron 40 µl (de 5 a 10 mil leucocitos por cada 10 µl) de la muestra de sangre de un donador (hombre de 25 años de edad) y se

adicionaron en tubos eppendorf, los cuales, contenían el compuesto de vanadio en 1 ml de medio RPMI-1640. Las concentraciones empleadas fueron 1, 2, 4 y 8 µg/ml para cada óxido. Los tratamientos se realizaron de manera independiente y se hizo un experimento con su duplicado por concentración por cada agente químico probado. Las células se incubaron a 37 °C por 2, 4 ó 6 horas y al terminar cada tiempo el paquete celular se dividió en dos partes, una se destinó para evaluar la viabilidad y la otra para el daño al ADN.

Para determinar la viabilidad se utilizó el método propuesto por Strauss en 1991. Se resuspendieron 20 µl de células con 10 µl de una solución de fluorocromos, esta última se preparó al momento de usarse a partir de una mezcla en volumen 1:1 con una solución de 0.025 µg/µl de bromuro de etidio (Sigma) y otra de 0.125 µg/µl de diacetato 5-6 de carboxifluoresceína (Sigma). Después de 5 minutos a 37 °C, las células fueron lavadas tres veces a temperatura de incubación con 1 ml de medio RPMI-1640.

La viabilidad se analizó en un microscopio Nikon (Optiphot-2, Japón) a 400 aumentos, equipado con fluorescencia y filtros para detectar excitación de luz de 515-560 nm. Se contaron 200 células por tratamiento distinguiendo las vivas, que metabolizan el diacetato-5-6-carboxifluoreceína a un compuesto que fluoresce y tiñe el citoplasma en verde, de las no viables, en donde, el bromuro de etidio tiñe de rojo el núcleo cuando hay daño en la membrana celular.

Procedimiento y Evaluación del Daño al ADN. La fracción de células destinadas para evaluar daño al ADN, se resuspendieron en 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % a 37 °C y se colocaron en dos portaobjetos esmerilados, que previamente tenían una capa sólida de 200 µl de agarosa regular al 1 %, se mantuvieron sobre hielo y se colocó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión. En cada paso fue puesto un cubreobjetos para obtener una película homogénea, los cuales, se removieron al solidificar el gel.

La metodología de electroforesis unicelular en gel (EUG) ha sido motivo de varias revisiones en los últimos años (Singh, 2000; Tice *et al.*, 2000; Olive, 2002; Hartmann *et al.*, 2003; Collins, 2002, 2004). La EUG que se siguió en este protocolo fue la versión alcalina descrita por Singh y colaboradores (1988) con algunas modificaciones. De manera breve, una vez embebidas las células en gel de agarosa y adheridas en los portaobjetos

esmerilados, las preparaciones se sumergieron dentro de una caja Koplín que contenía una solución de lisis con detergentes y rica en sales (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10 con DMSO al 10 % y tritón X-100 al 1 %, Sigma) por no menos de 1 hora a 4 °C. Las laminillas se colocaron de manera ordenada en una caja horizontal de electroforesis y se cubrieron con solución amortiguadora de sales a pH>13 (NaOH 300 mM y Na₂-EDTA 1 mM, Sigma), donde el ADN nuclear se dejó desenrollar por 20 minutos, transcurrido este tiempo, la electroforesis fue conducida 20 minutos a 25 volts y 300 mA (0.73 V/cm), a temperatura ambiente. Todos los pasos de la técnica efectuados hasta este momento se realizaron en la oscuridad o con luz amarilla, para evitar producir daño en el ADN. Después, para neutralizar las condiciones alcalinas, las laminillas fueron colocadas en solución de Tris (0.4 M a pH 7.5, Sigma), realizando tres lavados de 5 minutos cada uno. Por último, las preparaciones se deshidrataron en etanol al 70 % durante 5 minutos y se dejaron secar al aire.

Todas las preparaciones se codificaron. En el momento del análisis a cada una se le adicionaron 75 µl de bromuro de etidio a una concentración de 20 µg/ml, se colocó sobre el gel un cubreobjetos y con ayuda de un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro para excitación de luz entre 450-490 nm (filtro G-2A) fueron evaluadas las células de manera individual. Se tomaron en cuenta los núcleos de las células dañadas o con estela que toman la apariencia de un cometa, los núcleos intactos derivados de células sin daño y el ADN difuso resultado de células con daño severo. Con una escala ocular, se midió la estela del cometa como la longitud de la migración del ADN, de la parte proximal al núcleo a la más distal. La migración se observó a 400 aumentos y se midieron 100 núcleos por tratamiento; los datos fueron transformados a µm.

Al mismo tiempo, los cometas se clasificaron en cinco categorías tomando en cuenta el valor promedio de la longitud de los núcleos, donde la razón $r = a$ la longitud de la estela/medida de la cabeza del cometa (Altamirano-Lozano *et al.*, 1999; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003). De esta manera, los núcleos intactos ($r = 0$) fueron considerados en la categoría **sin daño** al ADN (**a**); cuando r fue ≤ 1 los núcleos entraron a la categoría de **daño bajo (b)**; si r fue ≤ 2 en **daño medio (c)**; en el caso de $r > 2$ en **daño alto (d)** y, los núcleos en donde el ADN migró completamente fuera de la región de la cabeza se consideraron en **daño severo (e)**. Con los datos de las categorías se determinó el índice de migración (IMg), el cual, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IMg} = \frac{(a)1 + (b)2 + (c)3 + (d)4 + (e)5}{100 \% \text{ de células analizadas}}$$

en donde (a), (b), (c), (d) y (e) son el porcentaje de núcleos en cada categoría y los números son valores arbitrarios que representan cada categoría.

Evaluación de la Cinética de Reparación. Los óxidos de vanadio empleados en este estudio son capaces de inducir daño al ADN en concentraciones que van de 1 a 8 µg/ml, en tiempos de exposición de 2, 4 o 6 horas. Para observar la capacidad de las células de reparar las lesiones inductoras del daño al ADN detectadas por la EUG, se emplearon 8 µg/ml de los compuestos y 4 horas de exposición, tratamientos que ejercen un efecto positivo.

El análisis de la reparación del ADN, se realizó en leucocitos humanos de sangre completa, de un donador varón 29 años de edad. Los tratamientos se dieron de manera independiente y se hizo un experimento con su duplicado por cada compuesto. Al terminar las 4 horas de exposición las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 a 37 °C sin vanadio, se lavaron tres veces y una parte de la fracción celular se embebió en el gel de agarosa; este momento se tomó como tiempo 0. La otra parte de células se dejaron en medio a temperatura de incubación, después de 30, 60, 90 ó 120 minutos de recuperación, se colocaron las células en láminas esmeriladas para llevar a cabo la electroforesis alcalina (pH>13). En todos los casos, al término de cada período de recuperación, las muestras se manejaron en un baño de hielo para evitar la reparación. La viabilidad fue evaluada al finalizar el experimento (de acuerdo con resultados previos), en el tiempo de 120 minutos.

Evaluación de las Rupturas de Hebra Doble en el ADN. Se utilizaron muestras de sangre completa de dos donadores (A y B, varones de 36 y de 29 años de edad). Las células fueron tratadas durante 4 horas con 8 µg/ml de los óxidos de vanadio, al término de este tiempo las células fueron colectadas, resuspendidas en gel y colocadas en portaobjetos esmerilados. Después de 1 hora de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10 con DMSO al 10 % y tritón X-100 al 1 %), las preparaciones se lavaron dos veces con medio RPMI-1640, se incubaron a 37 °C por 1 hora más en una nueva solución de lisis sin detergentes (NaCl 2.5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, a pH 10) con 10 µg/ml

de ARNasa (Sigma). Posteriormente, las láminas se transfirieron a otra solución de lisis a 37 °C sin detergentes complementada con 4 µg/ml de proteinasa K (Sigma; concentración seleccionada con base en experimentos preliminares), donde, permanecieron 1 hora. Las preparaciones se colocaron en la unidad de electroforesis que fue llenada con un amortiguador de Tris (100 mM, Sigma) y acetato de sodio (300 mM, Sigma) a pH 9, ajustado con ácido acético glacial. Después de 20 minutos de equilibrio, se conectó la corriente durante 1 hora a 12 V y 100 mA (0.35 V/cm). Al terminar la electroforesis las preparaciones se cambiaron a una solución de hidróxido de sodio (300 mM) en la que reposaron 15 minutos para eliminar posibles restos de RNA, enseguida se neutralizaron y deshidrataron. La propuesta de esta prueba se basó en los estudios de Singh y Stephens (1997) y las recomendaciones de Singh (2000).

Análisis Estadístico. Los resultados de la prueba citogenética IM y frecuencia de AC estructurales se analizaron con la prueba estadística de *Z* para *proporciones* y *ji cuadrada*. Los datos del IMg, el cual fue calculado a partir de las categorías de daño, se analizaron tomando en cuenta la cantidad de células dañadas con respecto a las no dañadas utilizando una prueba de *ji cuadrada*. Para determinar diferencias en la longitud de la migración del ADN se empleó una prueba de rangos para muestras independientes *U* de *Mann-Whitney*. Los datos se muestran en frecuencias o porcentajes, el IM está representado por la media con su desviación estándar y la migración del ADN por la media con el error estándar. La posible relación dosis-efecto se determinó usando la regresión lineal (Marques de Cantú, 1990; Cooke *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1998; Samuels y Witmer, 1999).

6.2.3 Resultados

Aberraciones Cromosómicas e Índice Mitótico. La frecuencia de AC estructurales, de tipo cromosómico como de tipo cromatídico, y el IM en los cultivos de linfocitos humanos tratados 28 horas con los óxidos de vanadio revelan contrastes importantes entre los tratamientos (Cuadro VII). En el grupo expuesto a tetróxido de vanadio la frecuencia de aberraciones, sin considerar las brechas, fue mayor con respecto al grupo testigo, la diferencia estadística se dio desde la concentración de 2 y hasta 8 µg/ml. Del mismo modo, el incremento en porcentaje de células con aberraciones mostró diferencias significativas cuando se comparó contra el testigo, de 1.5 contra 5 ó 5.5 en los tratados con tetróxido de

vanadio; efecto que no se observó en las células de los cultivos tratados con trióxido de vanadio o con pentóxido de vanadio.

Los datos del IM indican que la proporción de células en metafase disminuye al aplicar cualquiera de los tres óxidos, además, la regresión lineal muestra que la disminución sigue un comportamiento dependiente de la concentración.

Por otro lado, como era de esperarse, en tratamientos con mitomicina C el IM se reduce drásticamente, y el número de aberraciones o de células con aberraciones se incrementa significativamente.

Viabilidad Celular. La evaluación con la combinación de colorantes fluorescentes, no mostró diferencias. En los leucocitos incubados 2, 4 ó 6 horas en medio de cultivo con o sin vanadio, siempre dio un valor de células viables mayor al 92 % en el grupo testigo y en el tratado con los óxidos de vanadio no fue menor al 88 %. En los experimentos de cinética de reparación y en los experimentos destinados para detectar rupturas de hebra doble, no se observaron diferencias estadísticas; la viabilidad en grupo testigo en ambas pruebas fue mayor o igual al 95 %, mientras que en los tratados con vanadio se encontraron valores entre el 85 y el 97 %.

Daño al ADN. Los datos de las evaluaciones de la EUG alcalina de los leucocitos expuestos durante 2, 4 ó 6 horas a los óxidos de vanadio se describen en los cuadros VIII, IX y X. En ellos se muestra la distribución de las células con daño agrupadas en las cinco categorías, los resultados del IMg y la longitud de la migración del ADN en μm ^[10].

Los tratamientos con trióxido de vanadio y pentóxido de vanadio, producen aumento significativo en el porcentaje de células dañadas que se refleja en los valores del IMg, del mismo modo se observa que la longitud de la migración del ADN incrementa en todos los tiempos de exposición (Cuadros VIII y X). En los tratamientos de 2 horas con el tetróxido de vanadio no se detectó inducción de daño al ADN, sin embargo, en 4 y 6 horas se presentan diferencias significativas, tanto en el porcentaje de células con daño (IMg)^[11] como en la

¹⁰ Las diferencias observadas en los valores basales del grupo testigo, en todos los experimentos, pueden ser atribuidas a las variaciones durante el procedimiento de la electroforesis.

¹¹ La distribución de las categorías de daño, obtenidas a partir la longitud de la migración del ADN, permiten distinguir la cantidad de células con diferentes niveles de daño. Con estos datos, se puede determinar mediante cálculos el IMg que

media de la longitud de la migración del ADN en todas las concentraciones (Cuadro IX). La capacidad para producir rupturas en el ADN por el trióxido y el pentóxido de vanadio se mantiene con el tiempo y en 4 horas exposición el incremento muestra una tendencia dependiente de la concentración, mientras que para el tetróxido de vanadio en este lapso el efecto alcanza los valores más altos.

Cinética de Reparación. Los resultados de la EUG de los leucocitos humanos incubados durante 4 horas con 8 µg/ml de los tres óxidos de vanadio, se muestran en el cuadro XI y en la figura 5. Las células fueron cosechadas inmediatamente después del tratamiento químico (tiempo 0) y a diferentes tiempos después de dejarlos en medio sin tratamiento, durante, 30, 60 90 y 120 minutos.

El análisis de los experimentos, en general, muestra que el valor promedio de la migración disminuye hasta no mostrar diferencias estadísticas con relación al grupo testigo. Las células sin daño, con respecto a las células con estela, descienden de manera gradual desde el tiempo 0 hasta los 120 minutos de recuperación, efecto que se observa en los valores del IMg, los cuales, siguen un comportamiento dependiente del tiempo. Sin embargo, las células tratadas con trióxido y pentóxido de vanadio necesitan 90 minutos para que el número de células con estela y la longitud de la migración se asemeje al testigo, en tanto, las células expuestas al tetróxido de vanadio requiere mayor tiempo para reparar el daño al ADN, entre 90 y 120 minutos. Es importante resaltar que a los 60 minutos de recuperación, en los tratamientos con vanadio(III), se dio un ligero incremento con respecto al tiempo anterior.

Rupturas de Hebra Doble en el ADN. La estimación de rupturas de hebra doble en el ADN, analizadas por la versión neutra de la EUG, se resume en el cuadro XII y la Figura 6. Este parámetro que se determinó en leucocitos de dos donadores A y B, los resultados con ambas tiene la misma tendencia. En los tratamientos con vanadio(III) o vanadio(V) los datos de las evaluaciones de IMg y de la migración del ADN no se modifican con respecto al valor del grupo testigo, mientras que la exposición a 8 µg/ml de tetróxido de vanadio es suficiente para incrementar el daño al ADN ($P < 0.01$).

adquiere valores cercanos a 1 cuando la proporción de células sin daño es mayor, o valores cercanos a 2, 3, 4 y 5 cuando se

Cuadro VII. Índice mitótico (IM) y frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en linfocitos humanos cultivados y tratados durante 28 horas con diferentes óxidos de vanadio

Tratamientos en µg/ml	IM ± DEM **	Inducción de AC estructurales (200 células analizadas)								% de células con AC
		Cromatídicas			Cromosómicas			Total		
		r	c	b	r	c	b	sin b	con b	
Testigo	2.64 ± 0.35	3	0	5	0	0	0	3	8	1.5
Trióxido de vanadio										
1	1.85 ± 0.15 ^b	6	1	9	1	0	0	8	17	4
2	1.65 ± 0.15 ^c	3	0	8	1	0	0	4	12	2
4	1.65 ± 0.31 ^c	3	0	8	0	0	0	3	11	1.5
8	1.35 ± 0.15 ^d	5	0	3	1	1	1	7	11	2.5
Tetróxido de vanadio										
1	2.59 ± 0.26	2	0	2	1	0	0	3	5	1.5
2	1.80 ± 0.24 ^c	7	0	2	3	2	0	12 ^a	14	5.5 ^a
4	1.48 ± 0.39 ^d	7	0	5	5	0	0	12 ^a	17	5.5 ^a
8	1.41 ± 0.27 ^d	10	0	12	3	0	0	13 ^a	25	5 ^a
Pentóxido de vanadio										
1	2.00 ± 0.27	6	0	7	0	0	0	6	13	3
2	1.90 ± 0.19 ^a	6	0	6	0	0	1	6	13	3
4	1.57 ± 0.30 ^d	3	0	5	0	0	1	3	9	1.5
8	1.66 ± 0.34 ^c	6	0	6	0	0	0	6	12	3
Mitomicina C *										
0.4	0.75 ± 0.15 ^d	68	15	12	0	0	0	83 ^e	95	48 ^e

DEM, desviación estándar de la media; r, rompimientos; c, cambios; b, brechas

* Análisis de 100 células

** Regresión lineal del IM: Trióxido de vanadio $y = 2.662 - 0.276x$, $r = 0.8121$; Tetróxido de vanadio $y = 3.055 - 0.357x$, $r = 0.9008$; Pentóxido de vanadio $y = 2.671 - 0.239x$, $r = 0.8009$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$, ^d $P < 0.002$ y ^e $P < 0.0005$, comparado con el testigo

incrementa la proporción de células en las diferentes categorías con daño bajo, medio, alto y severo, respectivamente.

Cuadro VIII. Daño al ADN en leucocitos humanos tratados durante 2, 4 ó 6 horas con trióxido de vanadio

Tratamientos en µg/ml	Categorías de daño (100 células analizadas)					Índice de migración (IMg) *	Migración del ADN en µm ± EEM
	Sin	Bajo	Medio	Alto	Severo		
Trióxido de vanadio							
<i>2 horas</i>							
Testigo	75	21	1	3	0	1.32	4.46 ± 1.15
1	55	23	12	9	1	1.78 ^c	13.51 ± 2.37 ^d
2	70	15	6	8	1	1.55	10.14 ± 2.29
4	52	22	15	10	1	1.86 ^e	15.13 ± 2.47 ^d
8	53	16	17	14	0	1.92 ^e	19.16 ± 3.18 ^d
<i>4 horas</i>							
Testigo	69	12	13	5	1	1.57	8.10 ± 1.47
1	54	16	14	16	0	1.92 ^a	16.10 ± 2.24 ^b
2	58	11	19	12	0	1.85	13.94 ± 2.06 ^a
4	48	9	21	20	2	2.19 ^c	22.69 ± 3.14 ^d
8	36	3	23	35	3	2.66 ^e	32.16 ± 3.28 ^d
<i>6 horas</i>							
Testigo	66	7	18	9	0	1.7	11.42 ± 1.67
1	54	5	21	20	0	2.07	20.32 ± 3.16 ^b
2	38	7	15	38	2	2.59 ^e	29.79 ± 3.24 ^d
4	26	10	26	37	1	2.77 ^e	33.61 ± 2.91 ^d
8	38	2	23	34	3	2.62 ^e	35.79 ± 3.91 ^d

EEM, error estándar de la media

* Regresión lineal de IMg: 2 horas $y = 1.302 + 0.128x$, $r = 0.6652$; 4 horas $y = 1.303 + 0.245x$, $r = 0.885$; 6 horas $y = 1.588 + 0.254x$, $r = 0.7987$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$, ^d $P < 0.001$ y ^e $P < 0.0005$, comparado con su testigo

Cuadro IX. Daño al ADN en leucocitos humanos tratados durante 2, 4 ó 6 horas con tetróxido de vanadio

Tratamientos en $\mu\text{g/ml}$	Categorías de daño (100 células analizadas)					Índice de migración (IMg) *	Migración del ADN en $\mu\text{m} \pm \text{EEM}$
	Sin	Bajo	Medio	Alto	Severo		
Tetróxido de vanadio							
<i>2 horas</i>							
Testigo	72	8	17	3	0	1.51	7.56 ± 1.32
1	74	8	11	6	1	1.52	9.13 ± 2.05
2	64	12	11	13	0	1.73	12.80 ± 2.49
4	63	9	16	11	1	1.78	13.03 ± 2.15
8	64	13	14	7	2	1.70	11.51 ± 2.18
<i>4 horas</i>							
Testigo	76	8	7	9	0	1.49	9.46 ± 2.05
1	39	6	14	39	2	2.59 ^d	34.12 ± 3.77^c
2	45	3	18	33	1	2.42 ^d	31.73 ± 3.81^c
4	39	5	14	40	2	2.61 ^d	35.53 ± 3.82^c
8	45	3	20	30	2	2.41 ^d	27.42 ± 2.48^c
<i>6 horas</i>							
Testigo	75	15	8	2	0	1.37	5.26 ± 1.06
1	54	8	21	16	1	2.02 ^b	16.56 ± 2.16^c
2	49	5	23	23	0	2.20 ^d	20.84 ± 2.49^c
4	53	3	17	24	3	2.21 ^d	20.00 ± 2.61^c
8	45	3	26	26	0	2.33 ^d	24.70 ± 2.77^c

EEM, error estándar de la media

* Regresión lineal de IMg: 2 horas $y = 1.498 + 0.064x$, $r = 0.3103$; 4 horas $y = 1.746 + 0.186x$, $r = 0.401$; 6 horas $y = 1.393 + 0.211x$, $r = 0.7586$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.005$, ^c $P < 0.001$ y ^d $P < 0.0005$, comparado con su testigo

Cuadro X. Daño al ADN en leucocitos humanos tratados durante 2, 4 ó 6 horas con pentóxido de vanadio

Tratamientos en µg/ml	Categorías de daño (100 células analizadas)					Índice de migración (IMg) *	Migración del ADN en µm ± EEM
	Sin	Bajo	Medio	Alto	Severo		
Pentóxido de vanadio							
<i>2 horas</i>							
Testigo	73	18	5	4	0	1.40	5.88 ± 1.37
1	59	17	13	10	1	1.77 ^a	13.63 ± 2.72 ^b
2	57	7	16	18	2	2.01 ^b	16.34 ± 2.43 ^c
4	54	10	22	12	2	1.98 ^b	14.67 ± 1.93 ^d
8	54	5	23	14	4	2.09 ^b	18.37 ± 2.77 ^d
<i>4 horas</i>							
Testigo	74	15	6	5	0	1.42	6.44 ± 1.28
1	64	9	13	14	0	1.77	16.66 ± 3.08 ^a
2	56	3	14	27	0	2.12 ^b	24.20 ± 3.28 ^d
4	48	12	17	23	0	2.15 ^e	28.24 ± 3.49 ^d
8	42	5	19	33	1	2.46 ^e	28.08 ± 3.38 ^d
<i>6 horas</i>							
Testigo	76	6	10	8	0	1.50	8.04 ± 1.66
1	58	4	11	27	0	2.07 ^b	24.82 ± 3.84 ^d
2	45	7	22	25	1	2.30 ^e	26.30 ± 3.75 ^d
4	37	13	22	26	2	2.43 ^e	26.53 ± 3.08 ^d
8	46	3	22	29	0	2.34 ^e	26.54 ± 3.10 ^d

EEM, error estándar de la media

* Regresión lineal de IMg: 2 horas $y = 1.373 + 0.159x$, $r = 0.8016$; 4 horas $y = 1.246 + 0.246x$, $r = 0.9507$; 6 horas $y = 1.151 + 0.204x$, $r = 0.7386$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$, ^d $P < 0.001$ y ^e $P < 0.0005$, comparado con su testigo

Cuadro XI. Reparación del daño en el ADN de leucocitos humanos tratados 4 horas con 8 µg/ml de vanadio en diferentes estados de oxidación

Minutos de recuperación después del tratamiento	Categorías de daño (100 células analizadas)					Índice de migración (IMg) *	Migración del ADN en µm ± EEM
	Sin	Bajo	Medio	Alto	Severo		
Trióxido de vanadio							
0	47	9	21	23	0	2.20 ^e	24.28 ± 2.99 ^d
30	61	12	11	14	2	1.84 ^b	15.89 ± 2.76 ^b
60	57	11	12	17	3	1.98 ^c	18.32 ± 2.92 ^d
90	68	10	8	12	2	1.70	12.77 ± 2.49
120	72	6	6	14	2	1.68	13.38 ± 2.73
Testigo	78	11	7	4	0	1.37	6.42 ± 1.61
Tetróxido de vanadio							
0	45	5	20	30	0	2.35 ^e	28.06 ± 3.22 ^d
30	53	10	8	27	2	2.15 ^c	26.40 ± 3.93 ^d
60	54	9	12	23	2	2.10 ^b	23.48 ± 3.38 ^d
90	61	9	5	25	0	1.98 ^a	19.66 ± 3.20 ^b
120	68	12	7	12	1	1.66	12.42 ± 2.51
Testigo	73	11	14	2	0	1.45	6.96 ± 1.28
Pentóxido de vanadio							
0	47	8	22	22	1	2.22 ^e	20.84 ± 2.52 ^d
30	51	13	9	26	1	2.13 ^e	22.74 ± 3.04 ^d
60	56	6	14	22	2	2.08 ^c	21.73 ± 3.26 ^d
90	70	7	8	12	3	1.71	11.58 ± 2.44
120	73	8	10	8	1	1.56	10.22 ± 2.17
Testigo	78	11	7	4	0	1.37	6.42 ± 1.61

EEM, error estándar de la media

* Regresión lineal de IMg: Trióxido de vanadio $y = 2.286 - 0.140x$, $r = 0.8543$; Tetróxido de vanadio $y = 2.554 - 0.175x$, $r = 0.965$; Pentóxido de vanadio $y = 2.478 - 0.181x$, $r = 0.9506$

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$, ^d $P < 0.001$ y ^e $P < 0.0005$, comparado con su testigo

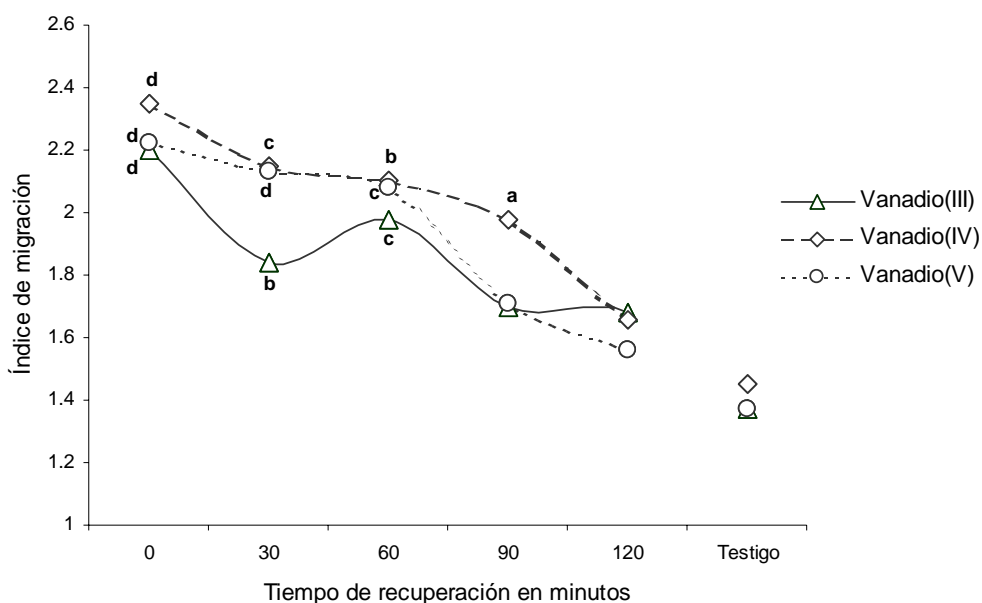


Figura 5. Cinética de reparación del daño al ADN inducidos en leucocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con tres óxidos de vanadio. Las células fueron incubadas durante 4 horas con 8 $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de vanadio(III), tetróxido de vanadio(IV) o pentóxido de vanadio(V), y colocadas en medio de cultivo fresco por 0, 30, 60, 90 y 120 minutos (^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.005$ y ^d $P < 0.0005$, diferencias estadísticas con respecto a su testigo).

Cuadro XII. Detección de rupturas de hebra doble en leucocitos humanos tratados 4 horas con tres óxidos de vanadio

Tratamiento con 8 $\mu\text{g/ml}$	Categorías de daño (100 células analizadas)					Índice de migración	Migración del ADN en $\mu\text{m} \pm \text{EEM}$
	Sin	Bajo	Medio	Alto	Severo		
<i>Donador A</i>							
Testigo	85	13	2	0	0	1.17	2.58 ± 0.64
Trióxido de vanadio	86	11	3	0	0	1.17	2.12 ± 0.57
Tetróxido de vanadio	61	21	15	3	0	1.60 ^b	8.50 ± 1.27^a
Pentóxido de vanadio	81	14	5	0	0	1.24	3.30 ± 0.74
<i>Donador B</i>							
Testigo	80	14	6	0	0	1.26	3.86 ± 0.84
Trióxido de vanadio	81	14	5	0	0	1.24	3.04 ± 0.72
Tetróxido de vanadio	60	25	15	0	0	1.55 ^b	8.04 ± 1.07^a
Pentóxido de vanadio	81	15	4	0	0	1.23	2.86 ± 0.67

EEM, error estándar de la media

^a $P < 0.01$ y ^b $P < 0.005$, comparado con el testigo

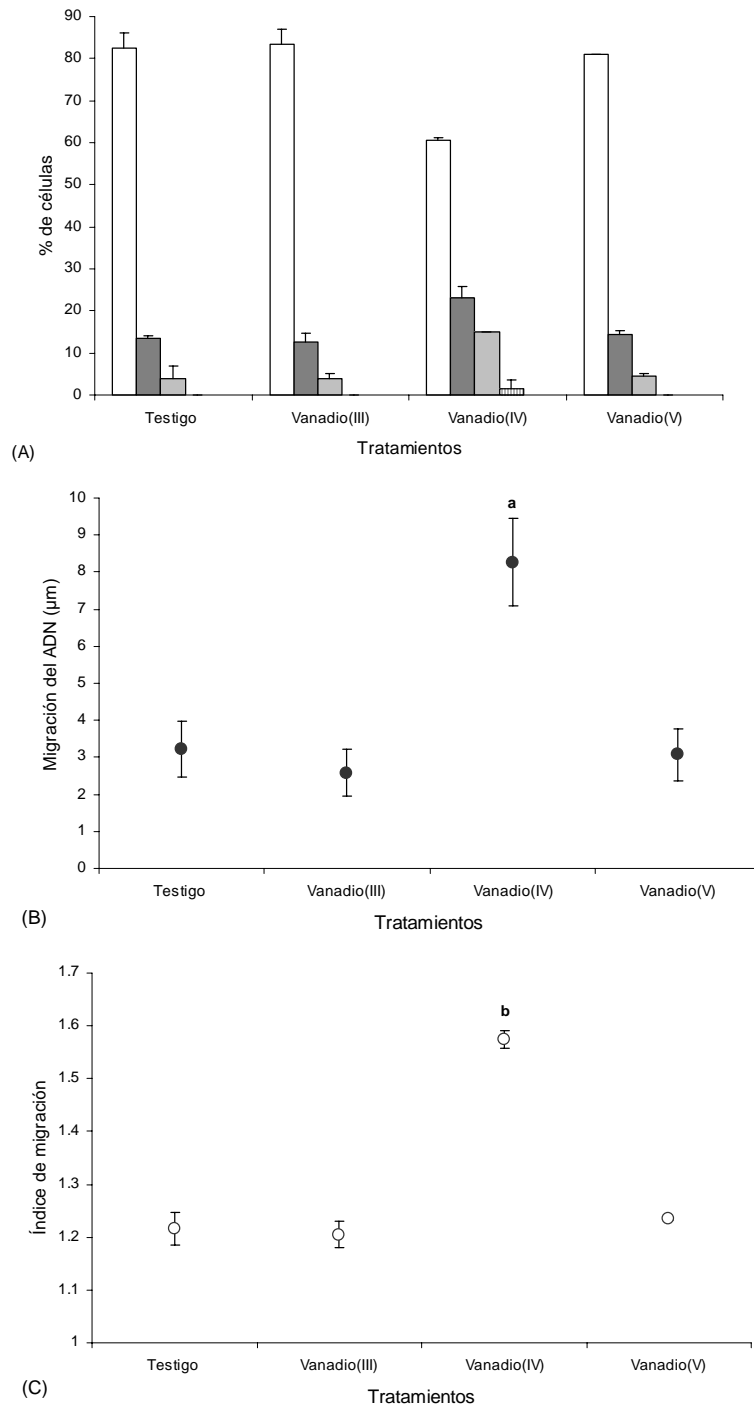


Figura 6. Detección de rupturas de hebra doble inducidos en leucocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro* con tres óxidos de vanadio. Las células fueron incubadas durante 4 horas con 8 µg/ml de trióxido de vanadio(III), tetróxido de vanadio(IV) o pentóxido de vanadio(V) y analizadas por electroforesis unicelular en gel a pH 9. En (A) se muestra la distribución de las categorías de daño ± DEM, donde, las barras claras representan los núcleos sin daño, las oscuras daño bajo, las gris daño medio y las rayadas daño alto. En (B) la longitud de la migración del ADN ± EEM y en (C) la expresión del IMg ± EEM. Los resultados son el promedio de 200 células contadas en cada tratamiento (^a $P < 0.01$ y ^b $P < 0.005$, diferencias estadísticas con respecto al grupo testigo).

6.3 PROTOCOLO III: ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR PRODUCIDO POR TRES ÓXIDOS DE VANADIO EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

6.3.1 Análisis del Ciclo Celular por Citometría de Flujo

El protocolo que se siguió para estandarizar la técnica, en el modelo de linfocitos humanos de sangre completa, fue el propuesto por Dolbeare y colaboradores (1983), siguiendo las recomendaciones de la compañía de Becton Dickinson (BD Pharmigen, BrdU Flow Kits, 2003; San José, CA) para usar el ensayo de tinción del anticuerpo contra BrdU, el cual, se encuentra conjugado con isotiocinato de fluoresceína (anti-BrdU-FICT).

Cultivos de Linfocitos Humanos y Tratamientos. Las muestras de sangre periférica, fueron tomadas con una jeringa heparinizada a tres donadores sanos no fumadores, dos hombres de 25 y 36 años y una mujer de 34 años de edad. Se realizaron tres determinaciones experimentales, una por cada donador, para lo cual se hicieron cultivos de linfocitos humanos por el método habitual usado en el análisis citogenético. A las 44 horas después de iniciada la siembra los cultivos fueron incubados 4 horas con el agente químico. Los tratamientos se dieron de manera independiente, se aplicaron 8 µg/ml de los óxidos de vanadio, 0.4 µg/ml de mitomicina C ó 0.846 µg/ml de afidicolina (C₂₀H₃₄O₄, CAS. No. 38966-21-1, Sigma) este último un excelente inhibidor de las ADN polimerasa. De acuerdo con experimentos preliminares, 45 minutos antes de terminar el tratamiento a los cultivos se les adicionaron 3.1 µg/ml de 5-bromodesoxiuridina (BrdU, BD) y a las 48 horas las células fueron lavadas en tres ocasiones con medio RPMI-1640 precalentado a 37 °C. Después de remover la BrdU y el tratamiento químico, una alícuota de cada cultivo se cosechó (hora 0) y el resto se incubaron en medio RPMI-1640 suplementado con fitohemaglutinina M y con 20 µM de timidina (Sigma). Las células re-incubadas se cosecharon a las 52, 56 y 72 horas de cultivo, es decir, a las 4, 8 ó 24 horas, después del retirar el tratamiento químico.

Procedimiento de Tinción para Detectar BrdU. Las células obtenidas a los diferentes tiempo de cosecha (0, 4, 8 y 24 horas) se colocaron en tubos eppendorf, donde, reposaron 4 minutos con 1 ml de en una solución de lisis (NH₄Cl 154 mM, KHCO₃ 10 mM; ambos JT Baker México, y Na₂-EDTA 100 µM, Sigma a pH 7.4) a 4 °C; para eliminar los eritrocitos. La

fracción de células nucleadas, se lavaron con 1 ml de una solución de fosfatos con suero fetal de bovino (Amortiguador de tinción FBS, BD) a 4 °C. Después, se fijaron durante 20 minutos en 100 µl de PBS con paraformaldehído al 1 % (de solución de trabajo Citofix, BD), se lavaron con una solución de fosfatos y detergentes (Perm/Wash, DB), se colocaron en 50 µl de un agente que incrementa la permeabilidad en las membranas (Citoperm Plus, BD), enseguida se lavaron y se dejaron en fijador.

Para exhibir los epítopes de BrdU, aproximadamente 500 mil células, se expusieron a 30 µg de ADNasa (BD) durante 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron (Perm/Wash, DB) y se mantuvieron a 4 °C por no más de 24 horas. Posteriormente, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente con 50 µl del anti-BrdU-FICT, para detectar las células que incorporaron BrdU. Por último, el ADN nuclear fue teñido con 7-amino-actinomicina D (7-AAD, DB) y analizados en el clitómetro de flujo. Los pasos anteriores se realizaron en condiciones de oscuridad, para evitar la fotólisis de la BrdU y pérdida de fluorescencia.

El análisis de tinción de los dos colorantes, se efectuó por el flujo de no más de 400 eventos por segundo, en 10 mil núcleos por cada muestra. La exploración citométrica se realizó en un citómetro de flujo FACS-Calibur de Becton Dickinson, equipado con un láser de argón a 488 nm. Este láser permite la excitación de los colorantes fluorescentes, donde, el FICT es detectado en FL1 y la 7-AAD en FL3. Se obtuvieron gráficas de puntos para la tinción dual, utilizando una escala lineal en el eje X para mostrar el contenido de ADN, donde, se integra la fluorescencia roja del 7-AAD y una escala logarítmica en el eje Y para mostrar la incorporación de BrdU, que integra la fluorescencia verde del FICT.

El registro de la proporción de células en cada fase del ciclo celular se llevó a cabo distinguiendo la población de células que incorporaron BrdU (núcleos en fase S) de la población de células sin señal para BrdU (núcleos en fase G₀, G₁, G₂ y M). Las gráficas de tinción dual, anti-BrdU-FICT con 7-AAD, fueron divididas en compartimentos de acuerdo a la figura 7.

La incorporación de BrdU en el ADN de las células que pasan por la fase de S, fue calculada cuantitativamente, para lo cual, se construyeron gráficas de área bajo la curva, en escala lineal, de número de células contra fluorescencia verde (FL1).

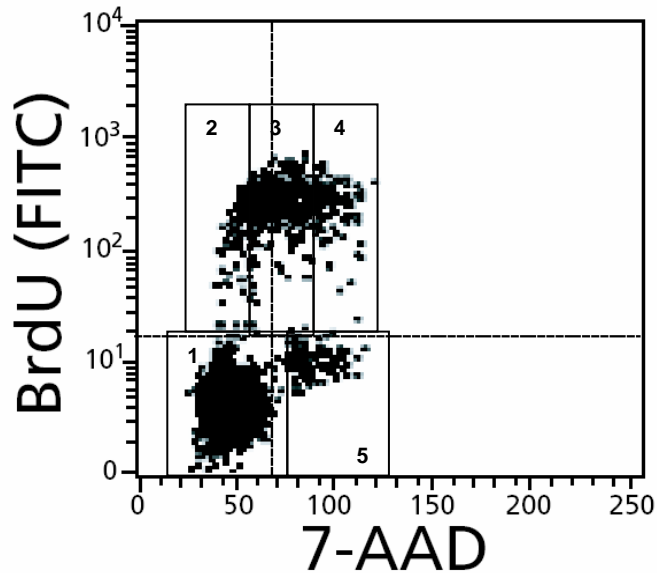


Figura 7. Gráfica de flujo de células de mamífero en cultivo. En el eje vertical (escala logarítmica) corresponde a la fluorescencia verde que revela la incorporación de BrdU dentro del ADN y en eje horizontal (escala aritmética) corresponde a la fluorescencia roja que revela el contenido total de ADN, el contenido 2C se encuentra en la posición 50. Los compartimentos muestran la fase del ciclo celular en que se encuentran las células; 1 = G₀-G₁, 2 = S temprana, 3 = S intermedia, 4 = S tardía y 5 = G₂-M. El análisis es de 10 mil células de una muestra testigo.

Análisis Estadístico. La posibilidad de producir cambios en la proporción de células en fase de G₀-G₁, S y G₂-M del ciclo celular, de los datos analizados por donador, fue determinada con una prueba de *ji cuadrada*. Para encontrar posibles diferencias en los valores promedio de los tres experimentos, se empleó la prueba *t-Student's* para muestra independientes. (Marques de Cantú, 1990; Samuels y Witmer, 1999).

6.3.2 Resultados

Ciclo celular. La progresión del ciclo celular, fue determinada a las 0, 4, 8 y 24 horas después de finalizar 4 horas de tratamiento con 8 µg/ml de vanadio, con la muestra de tres donadores (A y C hombres de 25 y 36 años, B mujer de 34 años). Las células fueron marcadas con BrdU 45 minutos antes de terminar el tiempo de exposición con los agentes químicos, los resultados muestran ligeras variaciones con algunos valores estadísticamente significativos (Cuadros XIII, XIV y XV).

Para el Donador A, a las 0 horas de recuperación después del tratamiento con tetróxido de

vanadio, se presenta una disminución ($P < 0.025$) en el porcentaje de núcleos que entran a fase de S que va acompañada por un ligero incremento en el número de células en fase de G_2 -M y G_0 - G_1 . Efecto que se desvanece después de retirar el compuesto (Cuadro XIII). En tanto que en los tratamientos con trióxido de vanadio o pentóxido de vanadio, no muestran cambios significativos.

En el donador B, después de 8 horas de recuperación, los tratamientos con trióxido o pentóxido de vanadio provocan la disminución de las células en G_0 - G_1 ($P < 0.025$) y un incremento en las fases subsecuentes, principalmente en los compartimentos de fase S. Este comportamiento también se puede apreciar para el tetróxido de vanadio, a pesar de no aportar valores significativos (Cuadro XIV). Sin embargo, el ciclo celular recupera su marcha 24 horas después de retirar el vanadio.

El análisis del paso de una fase a otra del ciclo celular, en los linfocitos del Donador C expuestos y no expuestos a los diferentes óxidos de vanadio no mostró diferencia estadística (Cuadro XV).

Con respecto a la mitomicina C, el porcentaje de núcleos en fase de G_0 - G_1 , fase de S (S-temprana, -intermedia o -tardía) y fase G_2 -M en los tiempos post-tratamiento, sufre ligeras variaciones con una tendencia a desaparecer después de eliminar el compuesto del medio de cultivo (Cuadros XIII, XIV y XV). Al promediar los experimentos de los tres donadores, el análisis de la distribución del ciclo celular no mostró datos significativos (Figura 8).

Incorporación de BrdU e Inhibición de la Síntesis de ADN. Las células en fase S incorporan cantidades elevadas de BrdU, la cual, es el reflejo de la intensidad de síntesis del ADN. Para determinar los posibles efectos del vanadio en el ciclo celular, todos los experimentos se corrieron con un lote tratado con 0.846 $\mu\text{g/ml}$ de afidicolina (25 μM), que es un excelente inhibidor de la síntesis de la fase S. Cabe aclarar, que este último compuesto se utilizó con el fin de obtener un efecto positivo, por lo tanto, a continuación se dan los promedios de los datos de los tres donadores.

La progresión del ciclo celular para la afidicolina se determinó al finalizar las 4 horas de tratamiento. Los resultados en los tres donadores mostraron un comportamiento similar, incremento de células en G_0 - G_1 (53.02 ± 1.39 contra 39.73 ± 1.87 del grupo testigo; $P <$

0.05), acompañado de la acumulación de células en fase de S, principalmente en el compartimiento de fase S-temprana (30.24 ± 0.81 contra 17.21 ± 2.27 del testigo; $P < 0.05$) y una disminución en G₂-M (2.28 ± 0.96 contra 10.64 ± 4.70 del testigo; $P < 0.01$). Con relación a los datos de las células con señal intensa a BrdU, detectada con el anticuerpo anti-BrdU-FICT, la afidicolina inhibe eficazmente la incorporación del análogo de base, donde, el porcentaje de núcleos en S que incorporaron BrdU fue de 54.51 ± 1.50 en comparación al 100 % del testigo ($P < 0.05$), es decir, cerca del 45 % de los núcleos en S tienen su síntesis interrumpida.

En contraste, en los cultivos expuestos a los óxidos de vanadio el porcentaje de núcleos en fase S que incorporaron BrdU no difieren del grupo control. Con respecto a la mitomicina C el promedio de los tres experimentos presentan una ligera inhibición durante el tratamiento (Cuadro XVI).

Cuadro XIII. Primera determinación de la progresión del ciclo celular por incorporación de BrdU en linfocitos humanos de sangre periférica tratados, de las 44 a las 48 horas de cultivo, con vanadio y cosechados a diferentes tiempos después de la exposición.

Tiempo de cosecha (horas de recuperación)	Fases del ciclo celular (% de 10,000 núcleos analizados)					
	G ₀ -G ₁	S temprana	S media	S tardía	Fase de S	G ₂ -M
<i>Donador A</i>						
<i>48 horas (0)</i>						
Testigo	36.06	16.93	22.72	18.94	58.58	5.36
Trióxido de vanadio	39.40	12.18	15.24	25.80	53.22	7.38
Tetróxido de vanadio	47.20	12.33	16.97	13.20	42.50 ^a	10.30
Pentóxido de vanadio	43.86	17.66	17.25	12.74	47.65	8.49
Mitomicina C (0.4 µg/ml)	21.51 ^a	25.58	20.94	16.25	62.77	15.72
<i>52 horas (4)</i>						
Testigo	43.29	16.26	20.01	16.48	52.75	3.96
Trióxido de vanadio	39.45	12.13	14.21	26.83	53.17	7.38
Tetróxido de vanadio	43.81	13.46	17.16	18.89	49.52	6.68
Pentóxido de vanadio	44.20	14.74	16.09	18.84	49.67	6.13
Mitomicina C	40.06	9.27	17.45	25.57	52.29	7.65
<i>56 horas (8)</i>						
Testigo	31.93	22.30	12.99	18.70	53.99	14.08
Trióxido de vanadio	28.00	23.42	12.45	17.56	53.43	18.57
Tetróxido de vanadio	33.02	22.20	10.55	17.30	50.04	16.94
Pentóxido de vanadio	35.44	24.43	11.27	13.79	49.49	15.07
Mitomicina C	26.74	13.26	12.34	29.10	54.71	18.55
<i>72 horas (24)</i>						
Testigo	33.80	20.41	13.00	12.67	46.07	20.13
Trióxido de vanadio	37.50	18.97	11.84	13.12	43.94	18.56
Tetróxido de vanadio	42.34	19.59	12.20	9.59	41.38	16.28
Pentóxido de vanadio	43.03	18.66	12.73	9.36	40.76	16.21
Mitomicina C	28.22	19.02	14.95	18.37	52.34	19.44

^a $P < 0.025$, comparado con su testigo

Cuadro XIV. Segunda determinación de la progresión del ciclo celular por incorporación de BrdU en linfocitos humanos de sangre periférica tratados, de las 44 a las 48 horas de cultivo, con vanadio y cosechados a diferentes tiempos después de la exposición.

Tiempo de cosecha (horas de recuperación)	Fases del ciclo celular (% de 10,000 núcleos analizados)					
	G ₀ -G ₁	S temprana	S media	S tardía	Fase de S	G ₂ -M
<i>Donador B</i>						
<i>48 horas (0)</i>						
Testigo	42.22	13.43	15.57	8.74	37.74	20.04
Trióxido de vanadio	44.09	12.34	13.65	12.86	38.85	17.06
Tetróxido de vanadio	43.95	21.88	11.13	5.47	38.48	17.58
Pentóxido de vanadio	41.03	17.52	14.53	6.84	38.89	20.09
Mitomicina C (0.4 µg/ml)	52.86	15.82	6.06	4.04	25.93	21.21
<i>52 horas (4)</i>						
Testigo	42.22	13.43	15.57	8.74	37.74	20.04
Trióxido de vanadio	43.36	15.90	16.99	7.19	40.09	16.56
Tetróxido de vanadio	46.98	21.44	15.01	4.48	40.94	12.09
Pentóxido de vanadio	45.37	15.12	16.82	5.67	37.62	17.01
Mitomicina C	56.76 ^a	18.58	6.42	3.38	28.38	14.86
<i>56 horas (8)</i>						
Testigo	52.54	14.47	7.36	4.06	25.89	21.57
Trióxido de vanadio	36.48 ^b	21.76	10.55	6.15	38.46	25.05
Tetróxido de vanadio	43.20	17.93	12.96	4.97	35.85	20.95
Pentóxido de vanadio	36.17 ^b	16.84	13.51	7.90	38.25	25.57
Mitomicina C	41.13	7.45	7.09	7.45	21.99	36.88 ^b
<i>72 horas (24)</i>						
Testigo	39.68	19.35	5.81	3.87	29.03	31.29
Trióxido de vanadio	41.52	16.95	4.95	4.00	25.90	32.57
Tetróxido de vanadio	42.73	20.57	8.16	3.37	32.09	25.18
Pentóxido de vanadio	40.47	17.71	6.91	4.38	29.01	30.52
Mitomicina C	43.94	16.26	7.27	3.11	26.64	29.41

^a $P < 0.05$ y ^b $P < 0.025$, comparado con su testigo

Cuadro XV. Tercera determinación de la progresión del ciclo celular por incorporación de BrdU en linfocitos humanos de sangre periférica tratados, de las 44 a las 48 horas de cultivo, con vanadio y cosechados a diferentes tiempos después de la exposición.

Tiempo de cosecha (horas de recuperación)	Fases del ciclo celular (% de 10,000 núcleos analizados)					
	G ₀ -G ₁	S temprana	S media	S tardía	Fase de S	G ₂ -M
<i>Donador C</i>						
<i>48 horas (0)</i>						
Testigo	40.92	21.28	16.85	14.42	52.54	6.54
Trióxido de vanadio	39.77	15.34	17.53	18.97	51.84	8.39
Tetróxido de vanadio	38.38	20.71	19.31	15.27	55.29	6.32
Pentóxido de vanadio	39.99	19.38	19.57	14.42	53.37	6.65
Mitomicina C (0.4 µg/ml)	44.06	19.63	13.63	12.81	46.07	9.87
<i>52 horas (4)</i>						
Testigo	43.47	19.17	21.28	10.75	51.20	5.33
Trióxido de vanadio	37.58	16.66	18.01	19.21	53.88	8.54
Tetróxido de vanadio	39.01	18.75	19.96	15.07	53.77	7.22
Pentóxido de vanadio	41.41	15.40	18.15	16.37	49.92	8.68
Mitomicina C	43.60	17.34	16.55	14.37	48.26	8.14
<i>56 horas (8)</i>						
Testigo	32.28	30.77	13.68	9.60	54.04	13.68
Trióxido de vanadio	25.58	31.60	11.92	11.56	55.07	19.34
Tetróxido de vanadio	27.85	33.49	12.22	8.72	54.44	17.71
Pentóxido de vanadio	24.06	31.31	12.54	12.10	55.95	19.99
Mitomicina C	35.45	18.71	14.17	14.37	47.25	17.30
<i>72 horas (24)</i>						
Testigo	33.72	14.92	8.52	13.94	37.38	28.91
Trióxido de vanadio	32.89	15.90	9.00	14.24	39.13	27.98
Tetróxido de vanadio	26.32	16.60	10.89	17.34	44.83	28.85
Pentóxido de vanadio	27.77	15.20	8.25	15.51	38.96	33.28
Mitomicina C	31.95	16.53	7.56	14.60	38.69	29.36

Cuadro XVI. Porcentaje de núcleos de linfocitos humanos en fase de S que incorporaron BrdU después de 4 horas de tratamiento, de las 44 a las 48 horas de cultivo, con vanadio (8 µg/ml) *

Tratamiento	% de núcleos que incorporaron BrdU (10 mil núcleos analizados por tratamiento)			Media ± EE
	<i>Donador A</i>	<i>Donador B</i>	<i>Donador C</i>	
Testigo	100	100	100	
Trióxido de vanadio	92.91	113.59	103.7	103.41 ± 5.17
Tetróxido de vanadio	83.18	114.66	110.08	102.65 ± 8.15
Pentóxido de vanadio	84.41	101.51	99.63	95.19 ± 4.69
Mitomicina C (0.4 µg/ml)	99.55	86.84	81.46	89.29 ± 4.64

EE, error estándar

* Las células fueron incubadas con BrdU 45 minutos antes de terminar el tratamiento, cosechadas y analizadas por citometría de flujo

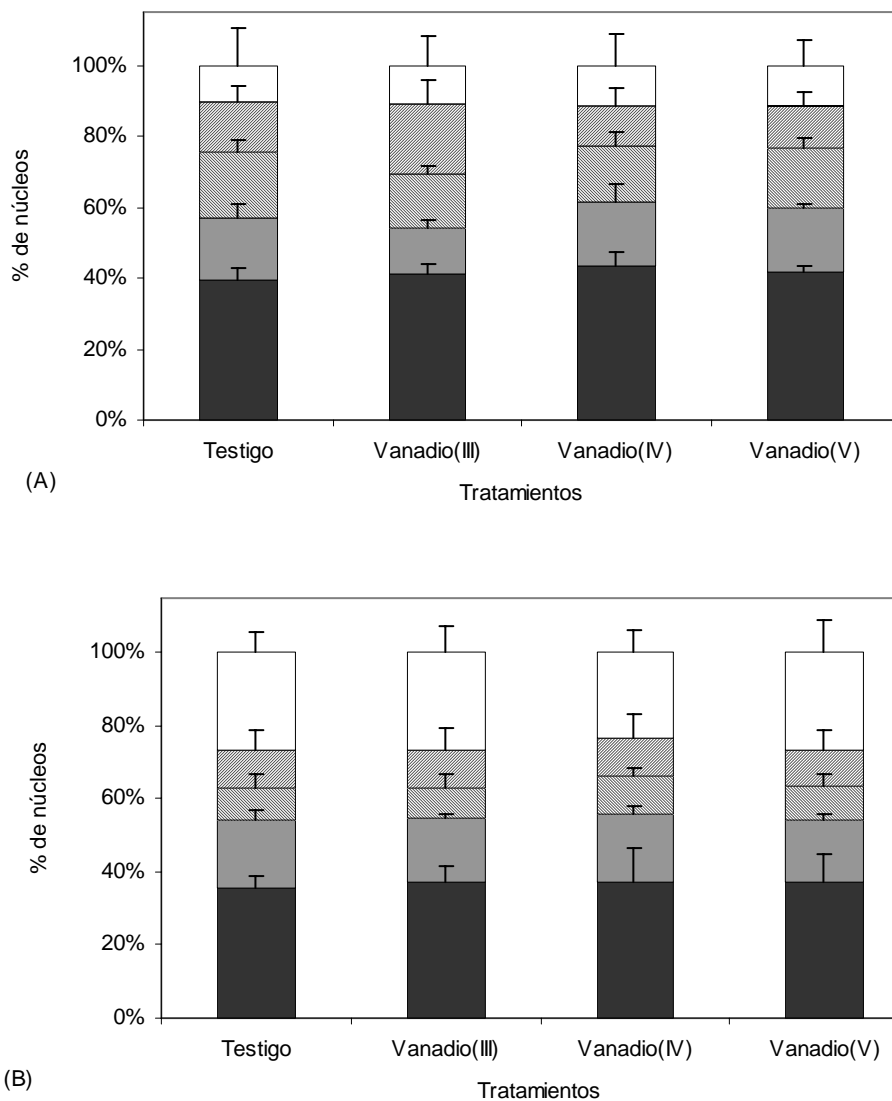


Figura 8. Porcentaje de núcleos en cada fase del ciclo celular después de ser tratados con tres óxidos de vanadio. Las células fueron cosechadas a las 0 horas (A) y 24 horas (B) después de ser tratados durante 4 horas con 8 $\mu\text{g/ml}$ de trióxido de vanadio(III), tetróxido de vanadio(IV) o pentóxido de vanadio(V). Las células fueron incubadas con BrdU los últimos 45 minutos antes de terminar el tratamiento químico y analizadas por citometría de flujo. En las barras la fase de G₀-G₁ se simboliza en color oscuro, S temprana en tono gris, S intermedia en líneas verticales hacia la izquierda, S tardía en líneas verticales hacia la derecha y G₂-M en color claro. Cada valor representa la media \pm EE de 30 mil núcleos en cada tratamiento, de tres experimentos independientes.

7 DISCUSIÓN

7.1 ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO

7.1.1 Índice Mitótico e Índice de Replicación

El vanadio en sus diferentes estados de oxidación, es capaz de interactuar con numerosas biomoléculas que forman parte fundamental de los componentes celulares. Cuando se aplica *in vitro* o se administra *in vivo* produce gran variedad de respuestas y efectos biológicos.

A pH fisiológico el vanadio puede existir en forma de anión y catión (Rehder, 2003; Crans *et al.*, 2004). Cuando se adiciona a los cultivos celulares, es muy probable que predomine la especie química y el estado de oxidación del metal en el que se dio el tratamiento, no obstante, también pueden existir diferentes especies químicas de vanadio en el interior de la célula, independientemente de la forma química en que se haya adicionado.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el vanadio, en los estados de oxidación III, IV y V, reduce el IM. Además, el tetróxido de vanadio es capaz de producir disminución en el valor del IR, que es el reflejo de la acumulación de células que se han dividido una vez y consecuentemente la disminución de células que han pasado por dos o más divisiones mitóticas, lo que indica un retraso en la progresión del ciclo celular. Este tipo de efecto, se ha observado en células de mamífero que han sido tratadas con vanadio y otros metales de transición, los cuales, afectan las rutas de señalización intracelular, inhiben el crecimiento, y producen arrestos, que conllevan consecuentemente al descenso de células que entran en mitosis así como a una disminución en la viabilidad (Altamirano-Lozano *et al.*, 1998; Campella *et al.*, 2002; Chen y Shi, 2002).

La toxicidad celular es un fenómeno complejo que depende de varios aspectos. Compuestos como los vanadatos de sodio, el pentóxido de vanadio y el sulfato de vanadilo en concentraciones μM activan factores de transcripción incluyendo p53, AP-1, STAT y NF- κB , pueden inhibir algunas señales de proliferación y el crecimiento celular que son dirigidas por proteínas MAPKs, además, de producir apoptosis (Altamirano-Lozano *et al.*, 1998; Campella *et al.*, 2002; Chen y Shi, 2002; Ye *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Zhang *et*

al., 2002, 2003).

En la célula, el vanadio interfiere con la actividad de varias enzimas, se conoce que los iones de V^V y V^{IV} pueden inhibir a las ATPasas de Na^+ , K^+ , H^+ o Ca^{2+} . Se considera a los iones $H_2VO_4^-$ y HVO_4^{2-} potentes reguladores de las fosfatasas de fosfotirosina y de las proteínas de tirosina con actividad cinasa, donde, los cationes VO^{2+} tienen las mismas propiedades pero son menos eficientes (Nechay *et al.*, 1986; Hulley y Davisos, 2003; Crans *et al.*, 2004). Algunos de estos eventos se encuentran asociados con procesos que controlan la proliferación, así como, la homeostasis celular, y permiten explicar los efectos citotóxico y citostático que producen los óxidos de vanadio.

7.1.2 Aberraciones Cromosómicas e Intercambio de Cromátidas Hermanas

Normalmente los agentes que dañan a las células y a sus componentes, lo hacen en un rango amplio de concentraciones. Para evaluar genotoxicidad en sistemas *in vitro*, es indispensable contar con un parámetro de toxicidad celular. Es recomendable, por ejemplo, que el valor del IM en el grupo tratado no disminuya más de un 50 %, para evitar falsos positivos y no tener contratiempos durante el análisis, ya que hay agentes químicos que inducen AC estructurales en dosis elevadas, aberraciones que pueden estar asociadas a la citotoxicidad o ser una consecuencia secundaria de la misma (Scott *et al.*, 1991; Galloway, 2000) y no producto de la capacidad del agente para dañar el cromosoma.

En el presente estudio, la reducción en el IM no rebasó el 50 % en ninguno de los tratamientos con los óxidos de vanadio. El incremento en la frecuencia de aberraciones estructurales y en el porcentaje de células con aberraciones para el tetróxido de vanadio se dio a partir de los 2 $\mu\text{g/ml}$. La capacidad de esta forma química para producir rompimientos no se compara con la de compuestos alquilantes S-dependientes como lo es la mitomicina C, no obstante, las diferencias estadísticas encontradas permiten colocarlo como un agente de efecto clastógeno y la presencia de cromosomas dicéntricos o en anillo abre la posibilidad de que este compuesto actúe de manera S-independiente. Posibilidad que sería importante profundizar en futuras investigaciones.

En poblaciones celulares que proliferan de manera asincrónica, el incremento de AC que producen varios clastógenos va en ascenso con el tiempo, debido a que el daño

cromosómico puede producir retrasos mitóticos. Por esta razón, en el Protocolo II se realizaron tratamientos de 28 horas, para determinar la posibilidad de que el V^{III} o el V^V indujeran este tipo de efecto, además, de visualizar posibles diferencias en el tipo de aberraciones que produjo el tetróxido de vanadio; sin embargo, en ambos tratamientos (24 ó 28 horas) la frecuencia de alteraciones estructurales es similar para el estado de oxidación IV.

En cuanto a los ICH, el tetróxido de vanadio fue capaz de incrementar, de manera débil pero estadísticamente significativa este parámetro. Los ICH son una manifestación citológica de intercambio entre los productos de la replicación del ADN en *loci* aparentemente homólogos de un cromosoma, donde, se involucran procesos de rompimiento y reunión de las cuatro hebras. Los ICH son considerados indicadores altamente sensibles para detectar agentes genotóxicos. Un incremento significativo ($P < 0.05$) en algún tratamiento, indica la capacidad de los agentes de producir algún tipo de interacción con el ADN (Tucker *et al.*, 1993; Tucker y Preston, 1996; Albertini *et al.*, 2000), por lo que la discusión de un trabajo sin mencionar al menos esta prueba puede quedar incompleta.

En la literatura, la acción clastógena del vanadio no es concluyente. Es considerado un agente aneuploidogénico y de inducir poliploidías en células que pasan por mitosis o meiosis, e incapaz de producir mutaciones génicas (Roldán y Altamirano, 1990; Zong *et al.*, 1994; Migliore *et al.*, 1993, 1999; Attia *et al.*, 2005). Sin embargo, en esta investigación en la que se realizó un análisis para comparar los efectos citogenético de los tres compuestos de vanadio, de estructura química similar pero estado de oxidación diferente, se encontró que el tetróxido de vanadio induce AC y el vanadio(V) o vanadio(III) no. Comportamiento que también ha sido observado en cultivos celulares y en ratón (ver cuadros III y IV)

En células de criceto chino, cultivadas en presencia o ausencia de activación metabólica, Owusu-Yan y colaboradores (1990) encontraron que el sulfato de vanadilo aumentó significativamente la frecuencia de AC (rompimientos y aberraciones tipo cambio) en concentraciones de 6, 12 ó 24 $\mu\text{g/ml}$ y de ICH en concentraciones de 0.5 a 6 $\mu\text{g/ml}$, cuando las células son tratadas durante 2 horas y cosechadas 22 horas después. Por su parte, Ciranni y colaboradores (1995) encontraron que la administración intragástrica de 100 mg/kg de este compuesto, incrementó las AC y los MN en células de médula ósea de ratón

CD-1, efecto que no se observó cuando se administraron compuestos de V^V.

A pesar de que los reportes anteriores contribuyen a confirmar el potencial clastógeno del tetróxido de vanadio, algunos resultados *in vitro* muestran contradicción con los resultados del vanadio en estado de oxidación III y V de la presente investigación. Al respecto, en el estudio de Owusu-Yan y colaboradores (1990) el metavanadato de amonio o trióxido de vanadio, en concentraciones de 4 a 16 µg/ml y de 12 a 18 µg/ml, dieron positivos para AC e ICH; efecto que no se observó en el sistema de linfocitos humanos expuestos a diferentes sales inorgánicas trivalentes y pentavalentes (VCl₃, NaVO₄, NH₄VO₃, NaVO₃ y V₂O₅) (Roldán y Altamirano, 1990; Migliore *et al.*, 1993; Rodríguez-Mercado, 1996)

Roldán y Altamirano (1990), fueron de los primeros en demostrar que el pentóxido de vanadio en linfocitos humanos no produce daño en la estructura cromosómica ni induce ICH; situación que también se manifiesta *in vivo* en células de médula ósea de rata y ratón, por la administración oral o intraperitoneal de 4 mg/kg durante 21 días o en una sola dosis de 5.75, 11.5 y 23 mg/kg, respectivamente (Giri *et al.*, 1979; Altamirano-Lozano *et al.*, 1993). El pentóxido es considerado un mutágeno de acción débil, debido a que en células de mamífero no provoca mutaciones en el locus *hprt* y solo incrementa la frecuencia de ICH cuando las células son tratadas con inhibidores de la reparación (Zhong *et al.*, 1994; Roldán *et al.*, 1997).

Las AC y los ICH son inducidos por distintos mecanismos, no obstante, ambos eventos están relacionados con más de un efecto genotóxico específico, tal como, las enzimas implicadas en el metabolismo del ADN. Al respecto Sabbioni y colaboradores (1983) demostraron que los compuestos de vanadio IV y V inhiben ADN polimerasas (α y las formas tipo I), ribonucleasas y la desoxinucleotidil transferasa, enzimas importantes en el proceso de síntesis y reparación.

Otro mecanismo que podría sumarse para explicar el incremento de la aberraciones estructurales, es la característica de los iones de vanadio(IV) de reaccionar con el peróxido de hidrógeno para generar radicales •OH (Liochev y Fridovich, 1987, 1990; Sakurai, 1994). Varios metales de transición, entre los que se encuentran el Fe^{II}, Cu^I, Cr^V y Cr^{IV} o Co^I y Co^{II}, por reacciones de tipo Fenton generan radicales •OH ($\text{Metal}^{n-1} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Metal}^n + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$) (Valko *et al.*, 2005), los cuales, son reactivos muy inestables capaces de alterar

diversas biomoléculas produciendo lesiones en el esqueleto de fosfatos, en los azúcares o las bases del ADN. Este tipo de comportamiento también se ha observado en células de mamífero con metales como el Ni^{II}, Ti^{IV} y Hg^{II} (Kawanishi *et al.*, 1989; Lu *et al.*, 1998; Woźniak y Błasiak, 2002) que generan estrés oxidante, daño primario al DNA y finalmente daño cromosómico.

Con relación al V^{III}, los estudios de sus efectos genotóxicos son escasos. Desde el punto de vista químico en solución forma el ion vanádico (V³⁺), considerado un fuerte agente reductor, que al igual que el V^{VI} (VO²⁺) se comporta como un ion de transición capaz de competir con otros cationes metálicos y unirse a diferentes biomoléculas (Baran, 2000; Crans *et al.*, 1998, 2004). Experimentalmente, se ha demostrado que por óxido/reducción el V^{III} puede generar radicales hidroxilo (Du y Espenson, 2005) y producir lesiones de cadena sencilla o doble en el ADN aislado de plásmido pBluescript Kt y de esperma de salmón (Lloyd *et al.*, 1997, 1998), lo cual, lo coloca como un posible clastógeno. Sin embargo, el análisis citogenético no mostró evidencias de este efecto. Las pruebas citogenéticas no pueden detectar lesiones primarias, pero contribuyen a conocer el alcance de los efectos del V^{III} en los distintos niveles de organización del material genético.

7.2 ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL

7.2.1 Viabilidad Celular

La prueba de diacetato 5-6 de carboxifluoresceína más el bromuro de etidio, al igual que otras pruebas de viabilidad, son un indicador de muerte celular por roturas en la membrana plasmática. En estudios previos, se ha reportado que el pentóxido de vanadio, no produce toxicidad celular en 2 horas de tratamiento (Rojas *et al.*, 1996; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003), efecto que tampoco se aprecia si se exponen las células durante 4 ó 6 horas al trióxido, tetróxido o pentóxido de vanadio.

Metales como el Cd^{II}, en forma de CdCl₂, en cultivos de células de mamífero disminuyen la viabilidad en 3 horas de exposición en concentraciones mayores a 40 µM, y conforme se incrementa el tiempo de exposición, de 5 a 8 horas, la toxicidad celular empieza a incrementarse de manera gradual en concentraciones bajas, menores a 10 µM (Fotakis y Timbrell, 2006). El comportamiento anterior no es el caso del vanadio, el efecto citotóxico

se observa cuando se dan tratamientos de 24 horas o más (Cuadros V, VI y VII), situación que ha sido reportada previamente con otras sales de vanadio (Sabbioni *et al.*, 1993).

7.2.2 Daño y Reparación en el ADN

Las células blancas de la sangre se encuentran en fase de G₀, condición que le da ciertas ventajas a la metodología de EUG con respecto a otras pruebas, puesto que, se evitan las interferencias relacionadas con los efectos dependientes del ciclo celular. Este ensayo en condiciones alcalinas ha mostrado una sensibilidad similar y en muchos casos mayor en comparación con las técnicas citogenéticas convencionales (Betti *et al.*, 1994; Cebulska-Wasilewska *et al.*, 1998; Somorovská *et al.*, 1999; Hartmman *et al.*, 2003), pero, algunos reportes encuentran más atractivo las prueba de ICH, MN o AC que la EUG (Harmman y Speit 1995; Giannotti *et al.*, 2002; Martino-Roth *et al.*, 2003).

Los resultados de los tratamientos con vanadio III y V muestran que la EUG es sensible para detectar daño al ADN en leucocitos humanos expuestos 2 horas en concentraciones de 1 a 8 µg/ml, mientras que el mismo tipo de tratamiento con tetróxido de vanadio no fue suficiente para inducir daño, lo que indica que esta forma química necesita más tiempo para entrar a la célula.

Un factor crítico para que los metales pesados ejerzan su acción tóxica, es el transporte al interior de la célula^[12]. Cuando se trabaja con cultivos celulares, como el de sangre completa, y se adicionan los metales en forma de sales, es poco probable que sus iones atraviesen pasivamente la membrana plasmática, sin antes tener contacto e interactuar con sus constituyentes. Metales como el Cd, Pb, Zn y Cu, cruzan la membrana de los eritrocitos a través de los canales aniónicos unidos al carbonato, bicarbonato, hidroxilo o iones cloro (Garty *et al.*, 1986; Foulkes, 2000).

Se tiene bien documentado que el V^V aplicado a cultivos en forma aniónica como sal inorgánica, cruza la membrana de distintos tipos celulares por los canales de fosfato (p.e. HPO₄²⁻) y en cuestión de 2 a 5 minutos es posible que se detecte en el citoplasma (Cantley *et al.*, 1978; Yang *et al.*, 2003, 2004). No se conoce con certeza la manera en que los iones

¹² Los iones metálicos son químicamente reactivos, muchos poseen afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas y pueden reaccionar con una gran variedad de moléculas. Debido a esta afinidad, es poco probable que en los sistemas *in vivo* estos iones se encuentren de manera libre, por lo que, el paso a través de las membranas involucra la transferencia de un

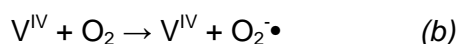
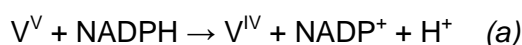
de vanadio IV y III entran a la célula. En células rojas se propone que los iones VO^{2+} atraviesa la membrana plasmática del mismo modo que lo hacen los cationes divalentes, cuyo transporte y acumulación es mucho más lenta en comparación con los iones vanadato (Heinz *et al.*, 1982).

Los cationes VO^{2+} y V^{3+} de los compuestos de vanadio IV y III, respectivamente, forman complejos con diferentes ligandos. La unión principalmente del VO^{2+} a ligandos específicos puede facilitar su entrada. Un grupo químico importante es el sulfato (SO_4^{2-}), su presencia en el medio de cultivo puede contribuir al paso del V^{IV} al interior de la célula, esto es posible debido a que en un estudio con linfocitos humanos, encontraron daño al DNA inducido por el sulfato de vanadilo con 1 hora de exposición en concentraciones \geq a 81.5 $\mu\text{g/ml}$ (Woźniak y Błasiak, 2004). Datos que además, disienten de los encontrados con tetróxido de vanadio. Estas diferencias se pueden atribuir a las concentraciones empleadas y a la posibilidad de una mayor disponibilidad del V^{IV} cuando se encuentra acompañado de iones indispensables para la célula como los sulfatos.

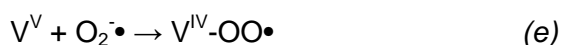
No se sabe si el vanadio se une directamente a los componentes de la molécula de ADN, se conoce que sales en estados de oxidación III, IV y V coordinan con los grupos fosfato y el hidroxilo de los nucleósidos y los nucleótidos (Rehder, 1991; Baran, 2000), eventos que pueden disminuir la cantidad de precursores de los ácidos nucleicos y contribuir a incrementar las rupturas de las uniones fosfodiéster si nucleótidos anormales son insertados en el ADN.

Varios cationes de transición como el Mg^{II} , Cu^{II} , Ni^{II} , Pd^{II} y Cr^{II} , interaccionan con el nitrógeno 1 y 7 de las purinas, el nitrógeno 3 de las pirimidinas y con el fosfato de los ácidos nucleicos (Duguid *et al.*, 1993, 1995), produciendo una amplia gama de interacciones de hebra sencilla que, por un lado, pueden conducir a la ruptura durante la remoción de los sitios afectados y, por el otro, provocar cambios en la conformación de la doble hélice originando una forma estereoquímica que es reconocida como sustrato de las ADNasas, las cuales introducen rupturas de doble cadena (Campbell y Jackson, 1980; Rojas *et al.*, 1996).

Un mecanismo común de daño es el estrés oxidante. Se ha descrito ampliamente que los metales de transición tienen la capacidad de influir en la formación de radicales reactivos por la reacción de Fenton (Bal y Kasprzak, 2002; Kawanishi *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2005). El V^V puede ser reducido a V^{IV} por antioxidantes enzimáticos como el NADPH^[13] y no enzimáticos como el ácido ascórbico, ya que las reacciones que ocurren en el interior de la célula propician que parte del producto reducido (a) se auto-oxide y genere el anión radical superóxido (b), los cuales, a su vez pueden reducir más V^V (c) para formar un complejo reactivo, el peroxovanadilo (V^{IV} -OO•) y el hidroperoxovanadilo (V^{IV} -OOH•).

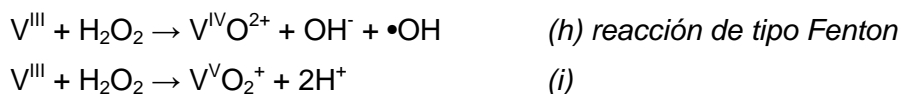


El V^{IV} puede auto-oxidarse en presencia de oxígeno molecular y producir el radical $O_2^{\bullet-}$ más V^V (d), el producto de esta reacción puede terminar en complejos de peroxovanadilo (e). A su vez, el ion $O_2^{\bullet-}$ puede convertirse por la acción de la superóxido dismutasa en H_2O_2 , el cual, bajo condiciones fisiológicas y en presencia de V^{IV} consigue reaccionar para producir radicales •OH y V^V por la ruta Fenton (f). Además, desde el punto de vista teórico el radical $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el H_2O_2 por la reacción de Haber-Weiss elevando la abundancia del radical •OH (g).



El V^{III} también tiene la peculiaridad de reaccionar con el H_2O_2 y oxidarse vía la transferencia de un electrón para generar •OH (h) u oxidarse hasta V^V por el traslado de un grupo completo de oxígeno (i) (revisado en: Helen y Sicilio, 1971; Rush y Bielski, 1985; Liochev y Fridovich, 1987, 1990; Byczkowski y Kulkarni, 1998; Du y Espenson, 2005; Valko *et al.*, 2005).

¹³ NADPH, nicotina adenina dinucleótido fosfato hidruro. Molécula que actúa como un bioreductor



Cuando los radicales hidroxilo son generados cerca de la cromatina, las purinas y pirimidinas son oxidadas. Experimentalmente, se ha demostrado que el V^{IV} en presencia de H_2O_2 incrementa las lesiones 8-OHdG, que terminan en rupturas de hebra sencilla y de hebra doble en el DNA (Sakurai, 1994; Shi *et al.*, 1996). De manera similar, como se había mencionado en la sección de AC, el V^{III} puede causar lesiones oxidantes que conducen a rupturas en el DNA (Lloyd *et al.*, 1997, 1998). En este estudio, no se evaluaron los radicales libres, no obstante, si estas especies químicas están presentes en los cultivos de leucocitos tratados con tetróxido de vanadio o el trióxido de vanadio, entonces, se podría pensar que el daño oxidante es un mecanismo por el cual actúa el vanadio en estado de oxidación III y IV, que finalmente inducen daño al ADN que puede detectarse con la EUG en condiciones alcalinas.

Al respecto, en un estudio con EUG publicado por Woźniak y Błasiak en el 2004, se encontró que el sulfato de vanadilo en concentraciones de 0.5 a 1 mM (equivalencias de 20.37 a 81.5 $\mu\text{g/ml}$) produce rompimientos de cadena sencilla y doble en linfocitos humanos con 1 hora de exposición, efecto relacionado con la formación de radicales libres y que posiblemente se están induciendo con el tetróxido de vanadio, del presente estudio, en concentraciones menores.

En otros estudios utilizando el cultivo de leucocitos y fibroblastos humanos tratados con pentóxido de vanadio en concentraciones 0.3, 30 ó 3000 μM y ortovanadato de sodio de 0.5 a 10 μM , encontraron que daño al ADN es producido por rompimientos de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali (Rojas *et al.*, 1996; Ivancsits *et al.*, 2002), más no por lesiones de bases oxidadas o rupturas de hebra doble (Ivancsits *et al.*, 2002), situación que también ha sido observada *in vivo* (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996, 1999). Por lo anterior y con base en los resultados obtenidos en este estudio con el pentóxido de vanadio, tanto del análisis citogenético como los de la EUG, posiblemente la fragmentación del ADN no es ocasionada por formación de especies reactivas de oxígeno, como primer mecanismo, sino, que su toxicidad sobre el genoma probablemente está relacionada con la interferencia de los procesos del metabolismo de los ácidos nucleicos o sus precursores.

Otra evidencia que respalda la idea anterior, es que el vanadio es considerado un posible carcinógeno cuando se administra en forma aniónica, como pentóxido de vanadio (IARC, 2003), y no como V^{IV} ó V^{III} , debido a que la célula transporta eficientemente los aniones de V^V a su interior por canales de sulfato o fosfato y que difícilmente pueden interactuar de manera directa con el ADN, debido a la mutua electro-repulsión que existe entre ambas moléculas.

Las lesiones ocasionadas por los procesos endógenos o inducidos por mutágenos ambientales son eficientemente reparadas en las células. Una ventaja de la EUG es que se puede cuantificar tanto la inducción como la reparación de las rupturas de hebra, sencilla y doble. En teoría, las primeras se reparan por mecanismos libres de errores, en los que la hebra no dañada participa como molde, mientras, las rupturas de doble cadena se reparan por recombinación homóloga o rutas propensas a errores, como la unión de extremos no homólogos (Moustachi, 2000; Pfeiffer *et al.*, 2004). Las células en fase de G_0 , entre las que se encuentran los leucocitos humanos, utilizan sistemas de reparación por escisión de bases y nucleótidos y sistemas propensos a errores. Los leucocitos son capaces de reparar en gran medida el daño inducido después de 4 horas de exposición con $8 \mu\text{g/ml}$ de los compuestos de vanadio (Cuadro XI).

Los resultados de la cinética de reparación, muestran incremento del daño al ADN en los 60 minutos después de la exposición a tetróxido de vanadio, el cual, es el resultado de la escisión de las lesiones que están siendo removidas, puesto que a los 90 minutos tanto la cantidad de células con daño como la longitud de la migración del ADN disminuye (Figura 5).

Cuando las células fueron tratadas con el vanadio IV ó V, no se observó incremento alguno en los tiempos de recuperación. En ambos tratamientos, la reparación expresada como IMg (Figura 5) muestra una relación dependiente del tiempo y a los 90 minutos el valor del grupo tratado con pentóxido de vanadio dejan de ser diferente del testigo, mientras, el tetróxido de vanadio requiere más tiempo para reparar el daño. Las disimilitudes encontradas, indican que cada forma química está produciendo alguna lesión específica.

Es importante resaltar que en cualquiera de los tres tratamientos, después de 120 minutos

de incubación sin el metal, no se llega al valor basal del grupo testigo, es decir, del 6 al 8 % de las células no se recuperan y se mantienen en la categoría de daño alto. Este tipo de comportamiento ha sido observado con anterioridad (Singh *et al.*, 1990; Olive *et al.*, 1991) y puede explicarse por la presencia de una subpoblación de células con una capacidad de reparación limitada, debida al agotamiento de los desoxiribonucleótidos, los cuales se encuentran en bajas cantidades en las células no estimuladas comparadas con las células en continua división (Tyrsted *et al.*, 1973).

Las rupturas de hebra sencilla, corresponden al daño primario más abundante y al igual que los enlaces cruzados ADN-ADN intra hebra, las bases modificadas y los sitios sin purinas o sin pirimidinas, son lesiones que se reparan rápidamente, requieren de 4 a 15 minutos y se completa de 2 a 3 horas (Singh *et al.*, 1988). Las rupturas de cadena doble, enlaces cruzados ADN-ADN inter-hebra o ADN-proteínas y otro tipo de lesiones gruesas requieren rutas enzimáticas complejas y por lo tanto mayor tiempo (Hoeijmakers, 2001; Pfeiffer *et al.*, 2004).

7.2.3 Rupturas de Hebra Doble en el ADN

La electroforesis EUG en condiciones neutras, puede detectar rupturas de hebra doble que son inducidas *in vitro* por la radiación y por agentes químicos con actividad radiomimética (Singh y Stephens, 1997). Dependiendo del tipo celular, se presume que el 5 % del daño total al ADN inducido por 5 Gy de radiación son rupturas de hebra doble, que equivalen a cerca de 200 rupturas por célula (Olive *et al.*, 1990; Olive, 1999). Incluso, se ha comprobado que esta modificación a la metodología de electroforesis es tan sensible como la versión alcalina, ya que puede detectar daño en dosis de radiación tan bajas como 1 Gy (Calini *et al.*, 2002).

En la cinética de reparación, se detectó que el daño producido por el tetróxido de vanadio requiere más tiempo para repararse, entre 90 y 120 minutos, y al parecer, este comportamiento está directamente involucrado con la inducción de lesiones de hebra doble.

En el caso de vanadio, el tetróxido es el único capaz de inducir rupturas de hebra doble. Cuando las células tratadas fueron analizadas, se notó incremento en el número de

núcleos en las categorías de daño (Figuras 6A y 6C), acompañado de un incremento en la longitud de la migración del ADN (Figura 6B). Al respecto, se considera que la reparación de bases oxidadas (Cooke *et al.*, 2003) y de las rupturas en la doble cadena es más lenta en comparación a las lesiones de hebra sencilla; se ha estimado que para reunir los rompimientos dobles se requieren de 1 hora o más (Olive *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1995), razón que apoya las diferencias estadísticas encontradas en 90 minutos de reparación.

Anteriormente se ha comentado que uno de los mecanismos por los cuales el V^{IV} puede estar provocando su toxicidad es por su capacidad pro-oxidante y por su carácter catiónico. Condición suficiente que puede incrementar el daño en el ADN y, por lo tanto, intensificar la escisión simultánea de bases dañadas (u otro tipo de lesiones) que están situadas en hebras opuestas, a una distancia no mayor a 10 pares de bases, y conducir consecuentemente a rupturas dobles (Pfeiffer *et al.*, 2004).

Las rupturas de hebra doble, son consideradas lesiones críticas que ocasionan las AC estructurales visibles en metafase (Natarajan *et al.*, 1980; Natarajan, 1993). Cuando, lesiones de esta naturaleza se inducen por el tratamiento químico en las células en G_0 , se incrementa el daño cromosómico, razón que permite explicar porqué el tetróxido de vanadio produce clastogénesis en los cultivos estimulados con fitohemaglutinina y el trióxido o el pentóxido de vanadio no.

El daño en los cromosomas, como los rompimientos cromatídicos observados en el análisis de AC, se puede deber al incremento de las rupturas de hebra doble que no fueron reparadas o a que su reparación fue incompleta. De la misma manera, los fragmentos dobles (cromosómicos) pueden ser resultado de la reparación ilegítima de las rupturas de hebra doble, que generalmente van acompañadas de cromosomas dicéntricos o cromosomas en anillo.

7.3 CICLO CELULAR E INCORPORACIÓN DE BrdU

El análisis de tinción dual por medio de citometría de flujo, permite estudiar el ciclo celular y al mismo tiempo el compartimiento de la fase de síntesis del ADN. Se tiene bien establecido que el daño al ADN inducido por diversos agentes, como los metales, pueden conducir a paros en el ciclo de células que se encuentran en proliferación, así como impedir

la entrada al ciclo de células que se encuentran en G_0 (Chiu *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004).

En este estudio, el análisis de los cultivos de linfocitos humanos marcados con BrdU y tratados con 8 $\mu\text{g/ml}$ durante 4 horas con los óxidos de vanadio, muestran aisladas diferencias estadísticas y una respuesta que varía entre los donadores, ya sea al terminar el tratamiento o tiempo después de haberlo retirado (Cuadros XIII, XIV y XV). Estas diferencias implican perturbaciones en la progresión del ciclo celular que son producidas por el tratamiento, puesto que el comportamiento se restablece cuando las células son incubadas 24 horas en medio fresco.

A pesar de que los tres compuestos de vanadio pueden disminuir el IM (Cuadros V, VI y VIII) y tanto el tetróxido de vanadio como el pentóxido de vanadio retrasan la cinética de división celular (Cuadro VI, y referencia Roldán y Altamirano, 1990), este efecto no fue reproducible con la citometría de flujo, debido a que el tiempo de exposición puede ser un factor determinante. Costa y colaboradores (1982), proponen que la reactividad química y la cantidad acumulada de los metales en el interior de las células, que a su vez dependen del tiempo de exposición y la concentración usada, son los causantes de los arrestos en alguna de las fase del ciclo celular.

Al respecto, estudios publicados en los últimos años muestran que el metavanadato de sodio en diferentes líneas celulares de especies de murinos y en humano, en concentraciones de 10 a 100 μM , puede afectar el ciclo celular de manera dosis y tiempo dependiente, donde, los efectos significativos se presentan de 6 a 12 horas de exposición. Las perturbaciones que induce son retrasos en la fase de S, así como los bloqueos en G_2 -M en tratamientos de 50 y 100 μM (Zhang *et al.*, 2002, 2003).

Los resultados obtenidos con mitomicina C coinciden con los reportados en la literatura (Galloway *et al.*, 1998). Este compuesto químico, es un clastógeno alquilante que incrementa drásticamente las AC estructurales (Cuadro VII), sin producir cambios fuertes en la síntesis de ADN y en el ciclo celular (Cuadros XIII, XIV, XV y XVI). Agentes como la afidicolina que inducen AC de manera indirecta (van Zeeland *et al.*, 1982) suprimen la síntesis de ADN y producen bloqueos en fase de S (Cuadro XVI).

Los puntos de control o “checkpoints” en el ciclo celular tienen como finalidad aminorar los

efectos adversos que pueden comprometer a la célula. Los compuestos de vanadio inducen daño en el ADN, y una respuesta diferente en la reparación, además el tetróxido de vanadio produce rupturas de hebra doble y AC estructurales, efectos que en su conjunto pueden afectar el ciclo celular. En estos experimentos se decidió dar tratamientos de 4 horas a células en proliferación y medir la síntesis de ADN por varias razones. Primero, porque durante la replicación el empaquetamiento de la cromatina es menos compacto y el ADN se hace más susceptible al ataque de los agentes genotóxicos. Segundo, porque con 4 horas de exposición se asegura que el ADN sufre daño y, uno de los mecanismos por los cuales se producen bloqueos en el ciclo celular es la inducción de rupturas de hebra doble, las cuales están relacionadas directamente con la formación de AC. Tercero y último, porque uno de los mecanismos para inducir daño cromosómico es a través de inhibir las síntesis de ADN, y en teoría el vanadio puede interferir con los componentes del metabolismo del ADN o sus precursores. Por lo anterior, es conveniente examinar, en futuros experimentos, los efectos del vanadio en la fase de síntesis y en el ciclo completo con tiempos de exposición mayores de 4 horas (de 6, 12 y 24 horas), al mismo tiempo que los niveles de expresión de las proteínas que regulan la transición de la fase G_1/S , S y G_2/M .

Cabe aclarar que el error estándar de los resultados promedio (Cuadro XVI y Figura 8) es el reflejo de la variación individual, ocasionada por la respuesta que muestran las células de cada donador al estímulo con el mitógeno. Se conoce que la mayoría de los linfocitos humanos en cultivo entran en fase de S entre 24 a 48 horas después de ser estimulados con fitohemaglutinina, distinguiéndose, donadores con poblaciones celulares que responden rápido, entre 24 a 30 horas, de individuos que responden lento, entre 30 a 48 horas (Sörén, 1973; Crossen y Morgan, 1979).

8 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, así como en el análisis y la discusión de los mismos, las conclusiones del presente trabajo son:

- a) El trióxido, tetróxido y pentóxido de vanadio pueden afectar el proceso normal de división celular, efecto evidenciado por la disminución en el IM, y al igual que otras sales de este metal, el tetróxido vanadio puede reducir el IR.
- b) El análisis citogenético, mostró que el tetróxido de vanadio es capaz de incrementar significativamente la frecuencia de AC estructurales en concentraciones en las que el IM no se ve afectado drásticamente, además, es capaz de incrementar la frecuencia de ICH en más de una dosis, situación que lo coloca como un agente clastogénico.
- c) Los tres óxidos de vanadio inducen daño primario sobre el ADN, evaluado con la prueba de EUG. Sin embargo, el tetróxido vanadio requiere mayor tiempo para producir este efecto.
- d) La cinética de reparación reveló que el daño primario producido por el pentóxido y el tetróxido de vanadio se repara rápidamente, en 90 minutos, mientras que el ocasionado por el tetróxido requiere más tiempo para repararse, entre 90 y 120 minutos.
- e) La prueba de EUG neutra, mostró que únicamente el tetróxido de vanadio es capaz de inducir rupturas de hebra doble.
- f) En este estudio, las sales empleadas no muestran una respuesta contundente en las evaluaciones del seguimiento del ciclo celular.

9 COMENTARIOS FINALES

Los efectos adversos que puede producir el vanadio sobre la célula y el genoma, pueden involucrar a más de un mecanismo. Este metal, por sus en estado de oxidación III y IV, es considerado un fuerte pro-oxidante, capaz incrementar los radicales hidroxilo y producir estrés oxidante en células humanas (Fickl *et al.*, 2006). Se tiene bien documentado, que cuando las especies reactivas de oxígeno formadas intracelularmente exceden la capacidad de la célula para defenderse, los componentes celulares se alteran, modificando proteínas y dañando el ADN entre otras consecuencias (Bjelland y Seeberg, 2003; Cooke *et al.* 2003). Posiblemente el V^V está induciendo de manera indirecta daño sobre el genoma a través de distintos mecanismos como son, uniéndose a los precursores de los ácidos nucleicos, inhibiendo el metabolismo del ADN e interfiriendo con la maquinaria encargada de la segregación cromosómica durante la división de la célula y no por la producción de radicales hidroxilo como primer mecanismo.

10 REFERENCIAS

- Abundis MHM.** (1994). Valoración de la genotoxicidad del pentóxido de vanadio en células de las alas de *Drosophila melanogaster*. Comparación de tres protocolos. Tesis de Licenciatura. UNAM, México.
- Abundis MHM.** (1996). Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagman L, Hemminki K, Melo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD y Aitio A.** (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* 463 111-172.
- Alessio L, Marinoni M y Dell'Orto A.** (1988). Biological monitoring of vanadium. En: Biological monitoring of toxic metals. (Eds) Clarkson WT, Friberg L, Nordberg F y Sanger R. Plenum Press, NY. pp. 427-436.
- Altamirano LM, Álvarez BL y Roldán ER.** (1993). Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res.* 21:711-713.
- Altamirano-Lozano M, M Valverde, L Álvarez-Barrera, B Molina y Rojas E.** (1999). Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V_2O_5) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogen. Mutagen. Carcinogen.* 19:243-255.
- Altamirano-Lozano MA y Álvarez-Barrera L** (1996). Genotoxic and reprotoxic effects of vanadium and lithium. En: Metal Ions in Biology and Medicine. (Eds) Collery J, Corbella Ph, Domingo JL, Etienne JC y Llobert JM. John Libbey Eurotex, Paris. Vol. 4, pp. 423-425.
- Altamirano-Lozano MA, Álvarez-Barrera L, Basurto-Alcantara F, Valverde M y Rojas E.** (1996). Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 16:7-17.
- Altamirano-Lozano MA, Roldán-Reyes E y E Rojas.** (1998). Genetic toxicology of vanadium compounds. En: Vanadium in the Environment. Parte I y II. (Eds) Jerome O Nriagu. John Wiley y Sons, Inc.
- Anderson D.** (1993). Cytogenetics. En: General & Applied Toxicology. (Ed) Ballantyne B, Marrs T y Turner P, Vol 2. The Macmillan Press Ltd, UK.
- Andrew AS, Warren AJ, Barchowsky A, Temple KA, Klei L, Soucy NV, O'Hara KA y Hamilton JW.** (2003). Genomic and proteomic profiling of responses to toxic metals in

human lung cells. *Environ. Health Perspect.* 111:825-35.

- Aragón MA, Ayala ME, Fortoul TI, Bizarro P y Altamirano-Lozano M.** (2005). Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod. Toxicol.* 20:127-134.
- Attia SM, Badary OA, Hamada FM, Hrabé de Angelis M y Adler ID.** (2005). Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes at the same dose level. *Mutat. Res.* 583:158-167.
- Bal W y Kasprzak KS.** (2002). Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol. Lett.* 127:55-62.
- Baran EJ.** (2000). Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *J. Inorg. Biochem.* 80:1-10.
- Baroch EF.** (1983). Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopaedia of chemical technology. John Wiley y Sons, NY. pp. 673-710.
- Barrera FSM y Villalobos CHD.** (1998). Genotoxic effects of vanadyl sulfate in *Drosophila melanogaster*. *Invest Clin.* 39, Suppl 1:123-137.
- Bartek J y Lukas J.** (2001). Mammalian G₁- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:738-747.
- BD** (2003). Becton Dickinson. Pharmigen, BrdU flow kits. Instruction manual FICT BrdU flow kit and APC BrdU flow kit. Becton Dickinson and Company.
- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N y Barale R.** (1994). Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* 307:323-333.
- Bjelland S y Seeberg E.** (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 531:37-80.
- Brogger A.** (1982). The chromatid gap-a useful parameter in genotoxicology?. *Cytogenet. Cell Genet.* 33:14-19.
- Bronzetti G, Morchetti E, Della Croce E, Del Carratore R, Giromini L y Galli A.** (1990). Vanadium; genetical and biochemical investigations. *Mutagenesis* 5:293-295.
- Brusick D.** (1987). Principles of genetic toxicology. Plenum Press, NY.
- Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE y Kinneary JF.** (1996). The merck index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Edición 12. Whiehouse Station, Merck y Co., Inc., NJ.
- Bus JS y Gibson JE.** (1985). Body defense mechanism to toxicant exposure. En: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Volumen IIIB, 2^a edición. A Wiley-Interscience

Publication, NY.

- Byczkowski JZ y Kulkarni AP.** (1998). Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. En: Vanadium in the environmental. Parte 2: Health Effects. (Ed) Jerome O Nriagu, John Wiley y Sons, Inc.
- Calini V, Urani C y Camatini M.** (2002). Comet assay evaluation of DNA single- and double strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 18:369-379.
- Campbell VW y Jackson DA.** (1980). The effect of divalent cations on the mode of action of DNase I. *J. Biol. Chem.* 255:3726-3735.
- Cantley LC, Cantley LG y Josephson L.** (1978). Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 272:552-554.
- Capella LS, Gefé MR, Silva EF, Affonso-Mitidieri O, Lopes AG, Rumjanek VM y Capella AM.** (2002). Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch. Biochem. Biophys.* 406:65-72.
- Carrano AV y Natarajan AT.** (1988). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC). Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 204:379-406.
- Carson BL, Ellis HV y McCann JL.** (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, Inc. Pags. 276-289.
- Cebulska-Wasilewska A, Nowak D, Niedzwiedz W y Anderson D.** (1998). Correlations between DNA and cytogenetic damage induced after chemical treatment and radiation. *Mutat. Res.* 421:83-91.
- Ciranni R, Antonetti M y Migliore L.** (1995). Vanadium salts induce cytogenetic effects *in vivo* treated mice. *Mutat. Res.* 343:53-60.
- Cohen MD, Klein CB y Costa M.** (1992). Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* 269:141-148.
- Collins AR, Ai-Guo M y Duthie SJ.** (1995). The kinetics of repair oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 336:69-77.
- Collins AR.** (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. En: Methods in Molecular Biology. (Ed) Didenko VV, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 203:163-77.
- Collins AR.** (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. En: Molecular Biology. Humana Press Inc., Vol. 26.
- Cooke D, Allen A, Clare MG, Doré CJ y Henderson L.** (1998). Statistical methods for sister chromatid exchange experiments. En: Statistical evaluation of mutagenicity test data.

(Ed) Kirkland DJ. Cambridge University Press, UK.

- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M y Lunec J.** (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17:1195-1214.
- Costa M, Cantón O, de Mars M y Swartzendruber DE.** (1982). Toxic metals produce an S-phase-specific cell cycle block. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 38:405-419.
- Crans DC, Robin I y Theisen LA.** (1989). Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 7597-7607.
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E y Yang L.** (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104: 849-902.
- Crans DC, Amin SS y Keramidas AD.** (1998). Chemistry of relevance to vanadium in the environment. Vanadium in the Environment, Parte I y II. (Ed) Jerome O Nriagu, John Wiley y Sons, Inc.
- Crossen PE y Morgan WF.** (1979). Proliferation of PHA-stimulated lymphocytes measured by combined autoradiography and sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 118:423-427.
- Chen F y Shi X.** (2002). Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 42:105-121.
- Chiu S-J, Lee M-Y, Chen H-W, Chou W-G y Lin L-Y.** (2002). Germanium oxide inhibits the transition from G₂ to M phase of CHO cells. *Chem. Biol. Interact.* 141:211-228.
- Daley B, Doherty AT, Fairman B y Case CP.** (2004). Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 86: 598-606.
- Darzynkiewicz Z y Juan G.** (1998). Analysis of DNA content and BrdUrd incorporation. En: Current Protocols in Cytometry. Section 7. 7. (Eds) Robinson P, Darzynkiewicz Z, Dean P, Orfao A, Rabinovitch P, Stewart C, Tanke H y Wheelless L. Current Protocols/Wiley-Liss, NY.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A y Lee EY.** (1999). DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18:7883-7899.
- D'Cruz OJ y FM Uckun.** (2005). Vaginal contraceptive activity of a chelated vanadocene. *Contraception* 72:146-156.
- Dean BJ y Danford N.** (1984). Assay for the detection of chemically induced chromosome damage in cultured mammalian cell. En: Mutagenicity Testing. (Eds) Venitt S y Parry

JM. IRL Press, Oxford.

- Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG y Gray JW.** (1983). Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:5573-5577.
- Domingo JL.** (1996). Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.* 10:175-182.
- Du G y Espenson JH.** (2005). Oxidation of vanadium(III) by hydrogen peroxide and the oxomonoperoxo vanadium(V) ion in acidic solutions: a kinetics and simulation study. *Inorg. Chem.* 44:5514-5522.
- Duguid JG, Bloomfield VA, Benevides JM y Thomas GJ.** (1993). Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophys J.* 65:1916-1928.
- Duguid JG, Bloomfield VA, Benevides JM y Thomas GJ.** (1995). Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. II. The thermal denaturation of DNA in the presence of Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} . *Biophys J.* 69:2623-2641.
- EFSA.** (2004). European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA J.* 33:1-22.
- Elinder CG, Gerhardsson L y Oberdoerster G.** (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. En: Biological monitoring of toxic metals. (Eds) Clarkson WT, Friberg L, Nordberg F y Sanger R. Plenum Press, NY.
- EPA.** (1998). Environmental Protection Agency. Health effects test guidelines, *In vitro* mammalian chromosome aberrations test. EUA.
- Evangelou AM.** (2002). Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42:249-65.
- Fickl H, Theron AJ, Grimmer H, Oommen J, Ramafi GJ, Steel HC, Visser SS y Anderson R.** (2006). Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* 40:146-155.
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sanchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Osorio LS, Espejel-Maya G, Avila-Casado M del C, Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Villanueva DN y Olaiz-Fernandez G.** (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health* 57:446-449.
- Fotakis G y Timbrell JA.** (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride.

Toxicol. Lett. 160:171-177.

Foulkes EC. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *PSEBM.* 223:234-240.

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

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 cells. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 11:175-183.

Galloway SM. (2000). Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ. Mol. Mutag.* 35:191-201.

Galloway SM, Miller JE, Armstrong MJ, Bean CL, Skopek TR, Nichols WW. (1998). DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: comparison of DNA- reactive and non-DNA-reactive clastogens. *Mutat. Res.* 400:169-186.

Garty M, Bracken WM y Klaassen CD. (1986). Cadmium uptake by rat red blood cells. *Toxicology* 42:111-119.

Giannotti E, Vandin L, Repeto P y Commelli R. (2002). A comparison of the *in vitro* Comet assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals. *Mutagenesis* 17:163-170.

Gioka C, Bourauel C, Zinelis S, Eliades T, Silikas N y Eliades G. (2004). Titanium orthodontic brackets: structure, composition, hardness and ionic release. *Dent. Mater.* 20:693-700.

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

Golias CH, Charalabopoulos A y Charalabopoulos K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. J. Clin. Pract.* 58:1134-1141.

Gorbsky GJ. (2001). The mitotic spindle checkpoint. *Curr. Biol.* 11:R1001-4.

Gray JW y Coffino P. (1979). Cell cycle analysis by flow cytometry. *Methods Enzymol.* 58:233-248.

Harmann A y Speit G. (1995). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). *Mutat. Res.* 346:49-56.

- Hartmann A, Plappert U, Poetter F y Suter W.** (2003). Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res.* 536:27-38.
- Hartwig A.** (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8:3-11.
- Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T y Burkle A.** (2002a). Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. *Environ. Health Perspect.* 110, Suppl 5:797-799.
- Hartwig A, Asmuss M, Blessing H, Hoffmann S, Jahnke G, Khandelwal S, Pelzer A y Burkle A.** (2002b). Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem. Toxicol.* 40:1179-1184.
- Heinz A, Rubinson KA y Grantham JJ.** (1982). The transport and accumulation of oxovanadium compounds in human erythrocytes *in vitro*. *J. Lab. Clin. Med.* 100:593-612.
- Helen BB y Sicilio F.** (1971). Electron spin resonance kinetic studies of the oxidation of vanadium(IV) by hydrogen peroxide. *Inorg. Chem.* 10:2530-2534.
- Hirao T.** (2000). Redox reactions via vanadium-induced electron transfer. *J. Inorg. Biochem.* 80:27-33.
- Hoeijmakers JHJ.** (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
- Hoffmann GR. (1982a).** Mutagenicity testing in environmental toxicology. *Environ. Science Technol.* 16:560-573.
- Hoffmann GR. (1982b).** Overview of genetic toxicology. *Basic Life Sci.* 21:5-27.
- Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, She H, Butterworth L, Lu Y, Costa M, Rojasasakul Y, Castranova V y Shi X.** (2000). Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol. Chem.* 275:32516-32522.
- Hulley Ph y Davison A.** (2003). Regulation of tyrosine phosphorylation cascades by phosphatases: What the actions of vanadium teach us. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 16:281-290.
- IARC.** (2003). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulphate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Vol. 86, Lyon.
- IPCS.** (1988). International Programme on Chemical Safety. Vanadium. Environmental Health Criteria, No. 81. World Health Organisation, Ginebra.
- IPCS.** (2001). International Programme on Chemical Safety. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, No 29. World Health Organisation, Ginebra.

- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A y Rüdiger HW.** (2002). Vanadate induces DNA strand breaks in cultured fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat. Res.* 519:25-35.
- Ivett, JL y Tice RR.** (1982). Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:358.
- Jackson JF y Linskens HF.** (1982). Metal ion induced unscheduled DNA synthesis in *Petunia* pollen. *Mol. Gen. Genet.* 187:112-115.
- Johnson DG y Walker CL.** (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39:295-312.
- Kada T, Hirano K y Shirasu Y.** (1980). Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. En: Chemical mutagens: Principles and methods for their detection. (Eds) de Serres FJ y Hollaender A. Plenum Press, NY. 5:149-173.
- Kanematsu N y Kada I.** (1978). Mutagenicity of metal compounds. *Mutat. Res.* 53:207-208.
- Kanematsu N, Hare M y Kada I.** (1980). Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. *Mutat. Res.* 77:109-116.
- Kawanishi S, Inoue S y Yamamoto K.** (1989). Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 10:2231-2235.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M y Oikawa S.** (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with references to carcinogenesis. *Free Radic. Boil. Med.* 32:822-832.
- Kirkland DJ y Muller L.** (2000). Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat. Res.* 464:137-147.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U y Decordier I.** (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* 140-141:63-74.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Zwickenpflug W y Richter E.** (2003). Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicol.* 5:171-177.
- Lagerkvist G, Nordberg GF y Vouk V.** (1986). Vanadium. En: Handbook the toxicology and metals. Vol. II. Elsevier Science Publishing Co. Inc. Holanda. Cap. 27.
- Léonard A.** (1988). Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of *in vitro* approaches. *Mutat. Res.* 198:321-326.
- Léonard A y Gerber GB.** (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317:81-88.
- Leopardi P, Villani P, Cordelli E, Siniscalchi E, Veschetti E y Crebelli R.** (2005). Assessment of the *in vivo* genotoxicity of vanadate: analysis of micronuclei and DNA

damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol. Lett.* 158:39-49

Lewin B. (2000). Genes VII. Oxford University Press. NY.

Lin TS, Chang CL y Shen FM. (2004). Whole blood vanadium in Taiwanese college students. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:781-786.

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

Liochev SI y Fridovich Y. (1990). Vanadate stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O_2^- . *Arch. Biochem. Biophys.* 279:1-7.

Longobardi GA. (1992). Flow cytometry. First principles. Wiley-Liss, Inc., NY.

Lu P-J, Ho I-Ch y Lee T-Ch. (1998). Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Mutat. Res.* 414:15-20.

Lloyd DR, Phillips DH y Carmichael PL. (1997). Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem. Res. Toxicol.* 10:393-400.

Lloyd DR, Carmichael PL y Phillips DH. (1998). Comparison of formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* 11:420-427.

Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW y London SN. (2003). Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 538:101-107.

Marques De Cantú MJ. (1990). Probabilidad y estadística: para ciencias químico-biológicas. McGraw-Hill, México.

Martino-Roth MG, Viégas J y Roth DM. (2003). Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Gen. Mol. Res.* 2:410-417.

Masai H, You Z y Arai K. (2005). Control of DNA replication: regulation and activation of eukaryotic replicative helicase, MCM. *IUBMB Life* 57:323-335.

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

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

Migliore L, Zotti-Martelli L y Scarpato R. (1999). Detection of chromosome loss and gain induced by griseofulvin, estramustine an vanadate in binucleated lymphocytes using

FISH analysis. *Environ. Mol. Mutagen.* 34:64-68.

Miramand P y Fowler S. (1998). Bioaccumulation and transfer of vanadium in marine organism. En: Vanadium in the environmental. Parte I y II. (Ed) Jerome O Nriagu. John Wiley y Sons, Inc., NY.

Moustacchi E. (2000). DNA damage and repair: consequences on doses-responses. *Mutat. Res.* 464:35-40.

Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A y Chatterjee M. (2004). Vanadium--an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 21:135-143.

Muller L, Kikuchi Y, Probst G, Schechtman L, Shimada H, Sofuni T y Tweats D. (1999). ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutat. Res.* 436:195-225.

Narayan RJ. (2005). Nanostructured diamondlike carbon thin films medical applications. *Materials Sci. Engin. C* 25:405-416.

Natarajan, AT. (1993). Mechanism for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ. Health Perspect.* 101:225-229.

Natarajan AT. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.* 504:3-16.

Natarajan AT y Boei JJ. (2003). Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. *Mutat. Res.* 544:299-304.

Natarajan AT, Obe G, Van-Zeeland AA, Palitti F, Meijers M y Verdegaal-Immerzeel EAM. (1980). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations, II. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-ray in G₁ and G₂ stage on the cell cycle. *Mutat. Res.* 69:293-305.

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

Nechay NR, Nanninga LB y Nechay SE. (1986). Vanadyl(VI) and vanadate(V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligand; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 251:128-138.

Nelson D L y Cox MM. (2004). Lehninger principles of biochemistry. Edición 4. Freeman, NY.

NTP. (2002). National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* 507:1-343.

Nunez R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* 3:67-70.

- Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natajara AT, Martínez-López W, Folle GA y Drets ME.** (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.* 504:17-36.
- OECD.** (1986). Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals. Genetic toxicology: *In vitro* sister chromatid exchange assay in mammalian cells. Guía 479.
- OECD.** (1997). Organization for Economic Cooperation and Development. Guideline for the testing of chemicals. *In vitro* mammalian chromosome aberration test. Guía 473.
- Olin KL, Cherr GN, Rifkin E y Keen CL.** (1996). The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links *in vitro*. *Toxicology* 110:1-8.
- Olive PL.** (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology, *Int. J. Radiat. Biol.* 75:395-405.
- Olive PL.** (2002). The comet assay. An Overview of Techniques. En: *Methods in Molecular Biology*. (Ed) Didenko VV. Humana Press Inc., Totowa, NJ. Vol. 203, pp. 179-194.
- Olive PL, Banáth JP y Duran PE.** (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122:86-94.
- Olive PL, Wlodek D y Banáth JP.** (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* 52:4671-4676.
- Owusu-Yaw J., Choen MD, Fernando SY y Wei CI.** (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicol. Lett.* 50:327-336.
- Paton GR y Allison AC.** (1972). Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat. Res.* 16:332-336.
- Paz-y-Miño C, Davalos MV, Sanchez ME, Arevalo M y Leone PE.** (2002). Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutat. Res.* 516:57-61.
- Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S y Obe G.** (2004). Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* 104:7-13.
- Plant N.** (2003). *Molecular toxicology*. BIOS Scientific Publishers. TJ International LTD., Padstow, UK.
- Preston RJ.** (1999). Chromosomal changes. En: *The uses of short- and medium-term test for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluations*. (Eds) McGregor DB, Rice JM y Venitt S. IARC, Scientific Publications, No.146, Lyon.

- Ramírez P, Easstmond DA, Laclette JP y Ostrosky-Wegman P.** (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386:291-298.
- Rehder D.** (1991). The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30:148-167.
- Rehder D.** (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium, *Inorg. Chem. Commun.* 6:604-617.
- Richardson C, Williams DA, Amphlett G, Phillips B, Allen JA y Chanter DO.** (1998). Analysis of data from *in vitro* cytogenetic assays. En: Statistical evaluation of mutagenicity test data. (Ed) Kirkland DJ. Cambridge University Press, UK.
- Riveros-Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Julian-Sanchez A, Canales O y Garfias J.** (1997). Personal exposure to elements in México City air. *Sci. Total Environ.* 198:79-96.
- Rodríguez-Mercado JJ.** (1996). Genotoxicidad inducida *in vitro* por sales de vanadio en cromosomas de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura UNAM, México.
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldan-Reyes E, Altamirano-Lozano M.** (2003). Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol. Lett.* 144:359-369.
- Rojas E, López MC y Valverde M.** (1999). Single cell electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatography B* 722:225-254.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano MA 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 E y Altamirano M.** (1990). Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 245:61-65.
- Roldán-Reyes E, Aguilar-Morales C, Frías-Vázquez S y Altamirano-Lozano MA.** (1997). Induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes by vanadium pentoxide in combination with caffeine. *Med. Sci. Res.* 25:501-504.
- Rush JD y Bielski BHJ.** (1985). Pulse radiolitic studies of the reactions of $\text{HO}_2/\text{O}^{2-}$ with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of $\text{HO}_2/\text{O}^{2-}$ with ferric ions and implication on the occurrence of the Haber-Weiss-reaction. 89:5062-5066.
- Sabbioni E, Brazzelli A, Clerici L.** (1983). Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes, *J. Toxicol. Environ. Health* 12:737-748.
- Sabbioni E, Pozzi G, Devos S, Pintar A, Casella L y Fischbach M.** (1993). The intensity of

vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cell is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis* 14:2565-2568.

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

Samuels ML y Witmer JA. (1999). Statistics for the life sciences. 2^{da} Edición. Prentice-Hall, Inc., NJ.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K y S Linn. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73:39-85.

Savage JR. (2004). On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenet. Genome Res.* 104:46-55.

Savage JRK. (1976). Annotation: classification and relationship of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 13:103-122.

Scior T, Guevara-Garcia A, Bernard P, Do QT, Domeyer D y Laufer S. (2005). Are vanadium compounds drugable? Structures and effects of antidiabetic vanadium compounds: a critical review. *Mini Rev. Med. Chem.* 5:995-1008.

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

Shackelford RE, Kaufmann WK y Paules RS. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1387-1404.

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

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

Shi X, Jiang H, Mao Y, Ye J y Saffiotti U. (1996). Vanadium(IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicol.* 106:27-38.

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

Singh NP. (2000). Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455:111-127.

Singh NP y Stephens RE. (1997). Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA

electrostreching. *Mutat. Res.* 383:167-175.

- Singh NP, M McCoy, RR Tice y Schneider EL.** (1988). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-191.
- Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L y Schneider EL.** (1990). DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat. Res.* 237:123-130.
- Somorovska M, Szabova E, Vodicka P, Tulinska J, Barancokova M, Fabry R, Liskova A, Riegerova Z, Petrovska H, Kubova J, Rausova K, Dusinska M y Collins A.** (1999). Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat. Res.* 445:181-192.
- Sörén L.** (1973). Variability of time at which PHA-stimulated lymphocytes initiate DNA synthesis. *Exp. Cell Res.* 78:201-208.
- Stokinger HE.** (1981). The metals. En : Patty's industrial hygiene and toxicology, 3^a Ed. Vol. II-A. (Eds) Clayton GD y Clayton FE. John Wiley and Sons, NY. Cap. 29.
- Strauss GHS.** (1991). Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT). *Mutat. Res.* 252:1-15.
- Sun P.** (1987). Toxicity of vanadium and its environmental health standard. Changdu West China University of Medical Sciences, Report. China.
- Szachowicz-Petelska B, Figaszewski Z y Lewandowski W.** (2001). Mechanisms of transport across cell membranes of complexes contained in antitumour drugs. *Int. J. Pharm.* 222:169-182.
- Thompson KH y Orvig C.** (2004). Vanadium compounds in the treatment of diabetes. *Met. Ions Biol. Syst.* 41:221-252.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Rojas E, Ryu JC y Sasaki YF.** (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35:206-221.
- Tucker JD y Preston RJ.** (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.* 365:147-159.
- Tucker JD, Auletta A, Cimmino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR y Carrano AV.** (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. *Mutat. Res.* 297:101-180.
- Tyrsted G, Munch-Petersen B y Cloos L.** (1973). DNA polymerase activity in phytohemagglutinin-stimulated and non-stimulated human lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 77:415-427.
- Valko M, Morris H y Cronin MTD.** (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med.*

Chem. 12:1161-1208.

- van Zeeland AA, Bussmann CJ, Degrassi F, Filon AR, van Kesteren-van Leeuwen AC, Palitti F y Natarajan AT.** (1982). Effects of aphidicolin on repair replication and induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Mutat. Res.* 92:379-392.
- Wang D, Kreutzer DA y Essigmann JM.** (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.* 400:99-115.
- Waters MD, Stack HF y Jackson MA.** (1999). Short-term test for defining mutagenic carcinogens. (Ed) McGregor DB, Rice JM y Venitt S. IARC, Scientific Publications, No.146, Lyon.
- WHO.** (2000). World Health Organization. Air quality guidelines. Regional office for Europe, No. 91. Copenage.
- Woodin MA, Liu Y, Neuberg D, Hauser R, Smith TJ y Christiani DC.** (2000). Acute respiratory symptoms in workers exposed to vanadium-rich fuel-oil ash. *Am. J. Ind. Med.* 37:353-363.
- Woźniak K y Błasiak J.** (2004). Vanadyl sulfate can differentially damage DNA in human lymphocytes and HeLa cells. *Arch. Toxicol.* 78:7-15.
- Woźniak K, Błasiak J.** (2002). Free radicals-mediated inductions of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride. *Mutat. Res.* 514:233-243.
- Yang P-M, Chiu S-J, Lin K-A y Lin L-Y.** (2004). Effect of cadmium on cell cycle progression in chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact.* 149:125-136.
- Yang X-G, Wang K, Lu J y Crans DC.** (2003). Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chem. Res.* 237:103-111.
- Yang X-G, yang X-D, Yuan L, Wang K y Crans DC.** (2004). The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium compounds. *Pharmaceutical Res.* 21:1026-1033.
- Ye j, Ding M, Leonard S, Robinson VA, Millecchia L, Zhang X, Castranova V y Shi X.** (1999). Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol. Cell Biochem.* 202:9-17.
- Zhang Z, He H, Chen F, Huang Ch y Shi X.** (2002). MAPKs mediate S phase arrest by vanadate trough a 53-dependent pathway in mouse epidermal C141 cells. *Chem. Res. Toxicol.* 15:950-956.
- Zhang Z, Leonard SS, Huang Ch, Vallyathan V, Castranova V y Shi X.** (2003). Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G₂/M phase arrest. *Free Rad. Biol. Med.* 34:1333-1342.

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

11 ANEXOS

11.1 ARTÍCULOS PUBLICADOS

Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells
Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E y Altamirano-Lozano M.
Toxicology Letters, 144 (2003) 359-369

Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad
(Vanadium: pollution, metabolism and genotoxicity)
Rodríguez-Mercado JJ y Altamirano-Lozano MA.
Artículo enviado para su publicación en la Rev. Int. Contam. Ambient. (México)