



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO GENOTÓXICO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO EN CÉLULAS DE
MÉDULA ÓSEA. COMPARACIÓN POR GÉNERO EN UN MODELO MURINO
DE EXPOSICIÓN POR INHALACIÓN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CARMEN LICET PÉREZ DE GANTE



TUTORA:
BIOL. MARCELA ROJAS LEMUS

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad Nacional Autónoma de México Carrera Número de cuenta	Pérez de Gante Carmen Licet 56459906 Universidad Nacional Autónoma de México Biología 302121957
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Bióloga Marcela Rojas Lemus
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dr. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	M. en C Gabriela Piñón Zarate
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	M. en C Adriana González Villalva
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

“Agradecimientos a mi familia del laboratorio”

- ♣ **Marce:** *iiiiMUCHAS GRACIAS!!!!!!!* por tu apoyo inmenso e incondicional que siempre me brindaste, por tu comprensión y por tú buen humor, que hace que todo salga bien. Gracias por iluminar este camino largo. Te deseo todo lo mejor en todos tus proyectos, sabes que vales mucho, aquí y en China, además de ser una gran persona y maestra. No cambies nunca.
- ♣ **Tere:** Muchas gracias por haberme recibido en tu laboratorio, por confiar en mí y por hacerme sentir parte del laboratorio.
- ♣ **Dr. Altamirano:** le agradezco inmensamente que haya aceptado ser parte de mi jurado.
- ♣ **Paty Bizarro, Lauris, Adriana, Michelito, Gabi:** Gracias a todas ustedes, son una parte muy importante del grupo de trabajo y del laboratorio, son ejemplos a seguir por los alumnos como yo, que vemos en cada una de ustedes la pasión por este proyecto, la destreza de su trabajo y la calidez de su trato. GRACIAS.
- ♣ **Rubén, Edgar, Gumaro, Jesús, Nelly, Carlos:** Gracias chicos por apoyarme y darme la mano cuando lo necesitaba.

Agradecimientos a mi familia

- ♥ **A mi familia** antes que nada, gracias por su apoyo incondicional, por la confianza, por la atención y comprensión que me tienen. Gracias por haber resistido conmigo, toda una carrera, con los altibajos frecuentes y las desveladas. Este es un trabajo que es para ustedes y por ustedes. Gracias "Macita", gracias "Pacito" y gracias "Lito", por todo su esfuerzo.
- ♥ **A las bichas:** Las quiero mucho bichas, a las tres: Male, Marisol y Natalia, por estar conmigo toda la carrera, por todas las cosas lindas, que hemos vivido juntas. Gracias por seguir siendo mis amigas y perdonen todos los disgustos que les cause. La vida nos ha deparado caminos diferentes y sorpresas que a veces nos mantienen distanciadas, pero aun así, saben que son una parte importante en mi vida y sé que siempre ahí van estar en las buenas y malas.
- ♥ **Betsi:** te mereces un agradecimiento muy especial ya que fuiste mi amiga desde el primer semestre y la que me ayudo al final a prepararme para mis exámenes, gracias por las lecciones.
- ♥ **Pit, Emanuel (Amor), Panchito, Poncho, Víctor:** ¡¡¡¡GRACIAS!!!! chicos por ayudarme cuando andaba depre, por darme ánimo cuando las cosas se veían difíciles, por ser tan caballerosos conmigo cuando salíamos todos juntos.
- ♥ **Cuchis-Chuchis:** ¡Gracias! por haber estado conmigo, por soportar mi mal humor, mis depre y mis cambiantes estados de ánimo. Te agradezco tu apoyo incondicional, como amigo en las buenas y en las malas. Sabes que eres una parte importante en mi vida y que eres mi motorcito para seguir adelante. ¡Gracias por tus visitas sorpresivas en el laboratorio que me hacían salir de mi rutina!

ÍNDICE

Tema	Pág.
1. Resumen	1
2. Contaminación ambiental	3
2.1.1. Contaminación de Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)	4
2.1.2. Partículas suspendidas	6
2.1.3. Metales	7
2.1.4. Vanadio	8
2.1.4.1. Generalidades	8
2.1.4.2. Usos	9
2.1.4.3. Fuentes de emisión	9
a) Fuentes Naturales	10
b) Fuentes Antropogénicas	10
2.1.4.4. Niveles de vanadio en el ambiente	10
2.1.4.5. Vías de exposición	10
a) Vía oral	10
b) Vía inhalada	11
2.1.4.6. Toxicocinética	11
2.1.4.7. Toxicodinámica	13
2.1.4.8. Efectos en la salud	14
2.1.4.9. Efectos genotóxicos	14
a) <i>In vitro</i>	15
b) <i>In vivo</i>	15
2.2. La médula ósea como un importante tejido	16
2.3. Efectos adversos de los metales sobre la médula ósea	17
2.3.1. El género implicado en la respuesta diferencial	18
2.4. Ensayo Cometa	19

3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivos generales	21
5.1. Objetivos Específicos	21
6. Material y Métodos	21
6.1. Método de Viabilidad Celular por Fluorocromos	22
6.2. Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)	23
6.3. Visualización de cometas y categorización de datos	24
6.4. Análisis Estadístico	25
7. Resultados	25
7.1. Viabilidad Celular	25
7.2. Ensayo Cometa	25
8. Discusión	29
8.1. Viabilidad celular por fluorocromos	29
8.2. Efectos genotóxicos del V ₂ O ₅	29
8.2.1. Mecanismos de genotoxicidad del V ₂ O ₅ en el ADN	29
8.2.2. Estrés oxidante	30
8.2.3. Actividad genotóxica de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres (RL)	31
8.2.4. Otros posibles mecanismos de genotoxicidad del vanadio	34
9. Diferencias entre géneros	35
9.1. Los estrógenos como citoprotectores	35
10. ¿Por qué es importante el daño genotóxico en las células de médula ósea?	39
11. Conclusiones	40
11.1. Perspectivas	41
12. Referencias	42

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1.- Ciudades más contaminadas del mundo.	5
Figura 2.- Proceso de reducción del vanadato en presencia de NADPH.	12
Figura 3.- Hematopoyesis.	17
Figura 4.- Representación esquemática del método experimental utilizado.	22
Figura 5.- Pasos realizados en la técnica Electroforesis Unicelular Alcalina.	24
Figura 6.- Medición de los cometas de medula ósea de ratones expuestos a V_2O_5 .	24
Figura 7.- Categorías de daño.	25
Figura 8.- Porcentaje de células que presentan daño en ratones machos expuestos a V_2O_5 durante cuatro semanas.	26
Figura 9.- Porcentaje de células agrupadas por categoría de daño: sin daño, daño bajo, daño medio, daño alto y daño total, en ratones macho expuestos a V_2O_5 durante cuatro semanas.	26
Figura 10.- Porcentaje de células que presentan daño en ratones hembra expuestos a V_2O_5 durante cuatro semanas.	27

Figura 11.- Porcentaje de células agrupadas por categoría de daño: sin daño, daño bajo, daño medio, daño alto y daño total, en ratones hembra expuestos a V ₂ O ₅ durante cuatro semanas.	27
Figura 12.- Comparación en el porcentaje de células que presentan daño en machos y hembras expuestas a V ₂ O ₅ durante cuatro semanas.	28
Figura 13.- Reacción de la guanina con un radical hidroxilo formando la 8-hidoxiguanina.	32
Figura 14.- Estructura molecular de los estrógenos 17β- estradiol, estrona y estriol.	36
Figura 15.- Posible acción del 17β- estradiol por su estructura química contra los radicales libres.	37

Efecto genotóxico del pentóxido de vanadio sobre células de médula ósea. Comparación por género en un modelo murino de exposición por inhalación.

1. Resumen

Actualmente se considera a la ZMVM como una megaciudad, ya que junto con su área metropolitana, excede los 10 millones de habitantes; en megaciudades como la ZMVM uno de los principales problemas es la contaminación ambiental. Las principales fuentes de contaminantes del aire son generadas por las diversas actividades antropogénicas, entre las que se encuentran: las industrias y principalmente la quema de combustibles fósiles por automóviles.

Uno de los contaminantes que en las últimas décadas se ha incrementado son las partículas suspendidas (PM), las cuales son núcleos de carbono a las que se les adosan diferentes productos de la combustión y diferentes metales de transición como el vanadio. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demuestran que la inhalación de pentóxido de vanadio genera: alteraciones ultraestructurales en células del timo, bazo y médula ósea; aumento de número y tamaño en megacariocitos de machos y hembras con mayor proliferación en estas últimas; rompimientos de cadena sencilla de ADN en leucocitos de sangre periférica. Debido a los resultados previos encontrados en nuestro laboratorio es importante evaluar el potencial genotóxico del pentóxido de vanadio V_2O_5 en células de médula ósea. Asimismo evaluar las diferencias en la respuesta entre géneros, ya que se han observado respuestas diferenciales entre machos y hembras sometidos a un mismo tratamiento. Se emplearon dos grupos experimentales y dos grupos testigo, cada uno con 30 ratones machos y 30 ratones hembra de la cepa CD-1. Los grupos experimentales inhalaron (0.02M), V_2O_5 una hora dos veces por semana, durante cuatro semanas. Mientras que el grupo testigo solo inhaló solución salina.

Se obtuvieron las células de médula ósea del fémur derecho de cada ratón y se procesaron para dos técnicas: viabilidad celular por fluorocromos y Electroforesis Unicelular Alcalina pH>13.

La viabilidad celular en todos los casos fue mayor al 85% lo cual indicó que el compuesto con este modelo de inhalación, no presenta actividad citotóxica en células de médula ósea. Por otro lado, éstos resultados permitieron, evaluar el daño genotóxico del V_2O_5 en células de médula ósea, con la técnica Electroforesis Unicelular Alcalina para la cual se requiere una viabilidad celular $\leq 80\%$.

El pentóxido de vanadio por vía inhalada mostró tener actividad genotóxica y generar rompimientos de cadena sencilla en el ADN, en células de médula ósea, esto puede ser debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y/o a los radicales libres que se producen durante el metabolismo de este compuesto, ó a la interacción intracelular del pentóxido de vanadio con enzimas, proteínas y factores de transcripción.

Además se encontraron diferencias significativas entre géneros, ya que los machos presentan un incremento en el porcentaje de células dañadas durante todo el tratamiento (4 semanas) y las

hembras presentan un incremento en el porcentaje de células dañadas hasta la segunda semana, después en la tercera y cuarta semana se observa un decremento significativo en el porcentaje de células dañadas con respecto al grupo de machos.

Esto puede ser gracias al papel que desempeñan los estrógenos como un agente antioxidante, debido a su estructura química característica, que no poseen moléculas como la testosterona y progesterona o a la interacción de los estrógenos en la transcripción de genes como: transcripción factores de crecimiento, proteínas antiapópticas, previniendo el aumento de calcio intracelular e interfiriendo con las caspasas, inhibiéndolas directamente o interaccionando con señales antiapópticas.

Por todo lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los rompimientos de cadena sencilla en células de médula ósea, revisten gran importancia; ya que de ser persistente el daño, este podría afectar la viabilidad y supervivencia de los distintos tipos celulares que se encuentran en la médula ósea, así como la producción y diferenciación del linaje linfóide y mielóide, además de generar daño permanente en este tejido vital, lo cual podría tener repercusiones desfavorables en la homeostasis del organismo.

2. Contaminación ambiental

Hoy en día son ampliamente conocidos los problemas de contaminación ambiental, en particular del aire, que influyen en la salud y el bienestar de la población. Gran parte de esos problemas son consecuencia del rápido y desordenado crecimiento urbano y de la industrialización (Lacasaña-Navarro *et al.* 1999).

El crecimiento urbano, está asociado al desarrollo de diversas actividades como: la industria petrolera, la agroindustria y el aumento en el número de automóviles, las cuales dan como resultado un consumo intenso de combustibles fósiles, generando elevados volúmenes de contaminantes que son nocivos para la salud y son dañinos para los ecosistemas (Romero *et al.* 2006).

Desde finales de la década de 1940, el creciente consumo de carbón y petróleo ha llevado a concentraciones cada vez mayores de dióxido de carbono y de otros gases que son emitidos a la atmósfera, el incremento de contaminantes, ocasiona serios problemas como el efecto invernadero (Romero *et al.* 2006, Riveros-Rosas *et al.* 1997, Molina y Molina 2004), la formación de niebla, la disminución de la radiación solar, las alteraciones en la temperatura y la distribución de los vientos (González 2000).

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades tales que pueden ser perjudiciales para la vida y que ocasionan cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Vallejo *et al.* 2003). Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (humo, polvo, gases y cenizas), que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales (Vallejo *et al.* 2003).

Por su origen, los contaminantes pueden clasificarse como primarios o secundarios (Romero-Salcedo 2005). Los contaminantes primarios, son aquellos que se emiten directamente a la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o por actividades antropogénicas (p.e. dióxido de carbono, óxidos de azufre, hidrocarburos, entre otros.) (Romero *et al.* 2006, González 2000). Los contaminantes secundarios (p.e. ozono, nitrato de peroxiacetilo) se forman en la atmósfera por reacciones fotoquímicas, hidrólisis o por la oxidación en las que intervienen contaminantes primarios (Romero *et al.* 2006, González 2000, Romero-Salcedo 2005).

Los efectos adversos en la salud por la contaminación del aire, se volvieron ampliamente conocidos después de la contaminación severa ocurrida en Europa y Norte América en la década de los 60s. Estos efectos fueron provocados por la acumulación de algunos contaminantes como: ozono (O₃), monóxido de carbono (CO), bióxido de azufre (SO₂), bióxido de nitrógeno (NO₂), plomo (Pb) y las partículas suspendidas totales (PST) (Vallejo *et al.* 2003, Katsouyanni 2003).

La evidencia indica que la población de mayor edad, los niños y las personas con enfermedades respiratorias, cardíacas o diabéticas son más susceptibles a tener problemas de salud por la

contaminación del aire, presentando efectos que persisten por un largo periodo de tiempo (<1.5meses) (Katsouyanni 2003).

2.1.1. Contaminación de Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), es una cuenca hidrológica, ubicada a 2,250 m.s.n.m con una población de ~ 20 millones de habitantes, que representan el 25% de la población total de México. En las últimas décadas, la población se ha incrementado rápidamente de 3 millones en 1950 a 18 millones en el año 2000 (Molina y Molina 2004).

La región urbanizada en la última mitad de siglo, se ha incrementado 13 veces, de 118 km² en 1940 a cerca 1500 km² en 1995, debido a esto, ha habido una expansión más allá de las 16 delegaciones del Distrito Federal, abarcando 18 municipios del estado de México y un municipio del estado de Hidalgo (Romero-Salcedo 2005, Zuk y Tzintzun-Cervantes 2007, Tzintzun-Cervantes *et al.* 2005, Molina y Molina 2004).

Se considera a la ZMVM como una megaciudad, este término se utiliza para las ciudades que junto con su área metropolitana, exceden los 10 millones de habitantes; en megaciudades como la ZMVM uno de los principales problemas es la contaminación ambiental (Molina y Molina 2004). En las décadas pasadas, el principal contaminante del aire era generado por la quema de carbón y actualmente es debido a las diversas actividades antropogénicas entre las que se encuentran: las actividades industriales y principalmente a la quema de combustibles fósiles por automóviles (Molina y Molina 2004).

La ZMVM cuenta con 46,000 industrias manufactureras, cerca de 28 000 se encuentran en el Distrito Federal y alrededor de 22 000 en los municipios conurbados del Estado de México; hay 3.5 millones de automóviles circulando al día, que consumen cerca de 40 millones de litros de gasolina diarios, produciendo miles de toneladas de contaminantes al año; aunado a esto, se estima que se incorporan veinte mil vehículos cada mes (Zuk y Tzintzun-Cervantes 2007).

A esto se le suman las características geográficas propias de la ZMVM, estar rodeada por montañas con una altura promedio de 1000 m y estar situada a 2250 m.s.n.m, lo cual provoca bajos niveles de oxígeno atmosférico (-23%), que no permiten una combustión completa de los motores, aumentando las emisiones de monóxido de carbono, hidrocarburos y componentes orgánicos volátiles. Esto favorece la exposición a radicales, capaces de transformar los contaminantes primarios en ozono y otros oxidantes; aunado a esto, la dirección de los vientos que predominan de noreste a suroeste, hace que la mayor concentración de contaminantes éste en la zona sur de la ciudad, en donde la sierra del Ajusco obstaculiza su disipación (Pacheco 1996, Molina y Molina 2004, Romero-Salcedo 2005).

En el 2002 la Secretaría de Ambiente y los Recursos Naturales (SEMARNAT, 2002), publicó que las fuentes de mayor emisión de contaminantes en la ZMVM eran los automóviles (84% de las

emisiones totales), seguidas por las fuentes de área (pequeñas industrias, maquinaria agrícola y de construcción) (12%) y las industrias y fuentes naturales (4%). De acuerdo con estos datos publicados, los vehículos automotores, fueron responsables de la emisión del 98% del monóxido de carbono (CO), 80% de los óxidos de nitrógeno (NOx), 40% de los hidrocarburos (HC) y 36% de las partículas suspendidas (PM10).

A partir de 1991 se crea un programa integral de mejora a la calidad de aire, donde se monitorea continuamente la cantidad de dióxido de sulfuro, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, ozono, plomo; además de monitorear cada semana las partículas suspendidas (PM10) (con un diámetro menor o igual a 10 µm) (Riveros-Rosas *et al.*1997).

Aún con el funcionamiento de este programa, se ha detectado, desde 1993 a la fecha valores superiores a 100 IMECAS (límite de la calidad del aire satisfactorio) durante más del 80% de los días, según el del Índice Metropolitano de Calidad del Aire IMECA (SEMARNAT, 2002).

Mundialmente se ha catalogado a la ZMVM como una de las megaciudades más contaminadas, que presenta una severa concentración de diversos contaminantes, como son SO₂, CO, O₃ y Partículas Suspendidas (PM) (Romero-Salcedo 2005) (Figura 2).

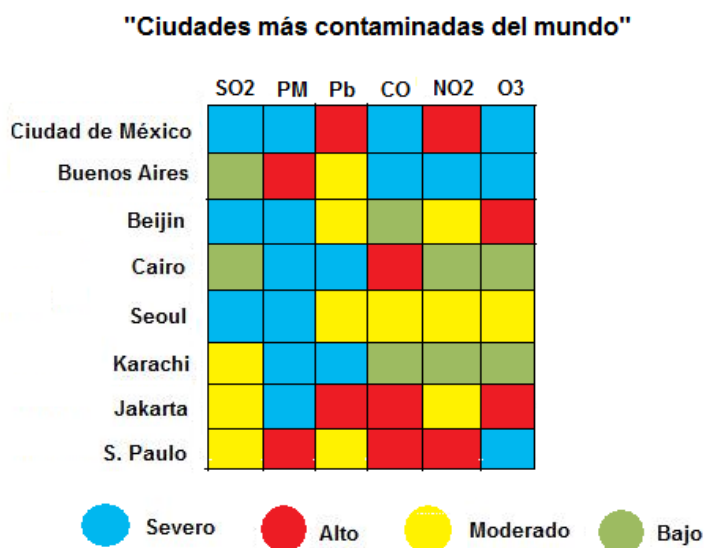


Figura 1. Ciudades más contaminadas del mundo. En la Ciudad de México los contaminantes que se encuentran en una mayor concentración son PM, SO₂, CO Y O₃, después le siguen Pb y NO₂. (Modificado de Yip y Madl, 2002).

El incremento de contaminantes en la atmósfera, es de suma importancia, ya que se ha observado que al haber un aumento de contaminantes atmosféricos, hay un mayor número de consultas por enfermedades respiratorias. Los estudios epidemiológicos demuestran, que la exposición a diferentes contaminantes ambientales (incluso a niveles por debajo de las normas internacionales),

se les asocia con un incremento en la incidencia de asma y enfermedades pulmonares (Romero *et al.* 2006, Brauer *et al.* 2001).

Otros estudios han concluido que la exposición diaria a partículas suspendidas en zonas urbanas, está asociado al incremento en la mortalidad, repercutiendo en principio, en el sistema respiratorio y cardiovascular (Alfaro-Moreno *et al.* 2002, Brauer *et al.* 2001, Ghio *et al.* 2002, Churg *et al.* 2003, González-Villalva *et al.* 2006). El estudio de Borja-Aburto y colaboradores (1998) reportan que el incremento de partículas suspendidas en la atmosfera de la ciudad de México, entre los años 1993-1995, estaba directamente relacionado con el 1.4% del total de muertes. Además de encontrar que el aumento en la mortalidad en este periodo de tiempo, era principalmente de personas de 65 años o más, a causa de enfermedades respiratorias y cardiovasculares.

Otros estudios han reportado que la exposición a concentraciones altas de partículas suspendidas, por breves periodos, en pacientes con enfermedades cardiorrespiratorias, adultos mayores y niños, presentan una mayor incidencia de enfermedades pulmonares crónicas, neumonía y cardiopatía isquémica (Rivero-Ponciano 1996, Molina y Molina 2004).

2.2.2. Partículas suspendidas

Las partículas suspendidas son contaminantes constituidos por materiales de naturaleza líquida o sólida de diversa composición y tamaño (Pope III 2000). Las partículas suspendidas constituyen una mezcla de muchas clases de contaminantes, que son productos de procesos naturales, como: erupciones volcánicas, el polvo proveniente de suelos erosionados y caminos sin asfaltar; y procesos antropogénicos como: quema de combustibles principalmente de aquellos que utilizan diesel, industrias de fundición, plantas productoras de energía y en la elaboración de pigmentos en la cerámica (Tzintzun-Cervantes *et al.* 2005, Katsouyanni 2003). El riesgo que constituyen para la salud, puede estar asociado con sus múltiples características físicas y químicas, como son: el número, el tamaño, la forma, la composición química y la concentración (Tzintzun- Cervantes *et al.* 2005, Fernández *et al.* 2003).

De acuerdo con su tamaño, las partículas suspendidas se clasifican en:

1.- Partículas burdas o gruesas, con un diámetro aerodinámico menor a 10 μm (PM10), y mayor de 2.5 μm . Están compuestas principalmente de sílice, titanio, aluminio, sodio hierro y cloruros (Vallejo *et al.* 2003).

2.- Partículas finas con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm (PM2.5), están compuestas por productos derivados de la combustión, particularmente de diesel e incluyen carbono, plomo, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno, además se le pueden adosar diferentes metales de transición como: vanadio, cromo, hierro, níquel, cobre y platino. Estas partículas se han demostrado, que se depositan con alto porcentaje en los alvéolos pulmonares (Costa y Dreher 1997, Vallejo *et al.* 2003, Sorensen *et al.* 2005).

3.- La partículas ultrafinas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor de $1\mu\text{m}$. Están compuestas por los productos de las quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel. Estas permanecen aisladas en la atmósfera durante períodos cortos, ya que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (González-Villalva *et al.* 2006).

La toxicidad de las partículas suspendidas se asocia principalmente a dos factores:

- a) Su tamaño: algunos estudios muestran que las partículas finas (PM_{2.5}), pueden ser más tóxicas que las partículas burdas (PM₁₀), y se ha encontrado que pueden tener efectos adversos en el sistema respiratorio (Choi *et al.* 2004, Churg *et al.* 2003, Englert 2004), se ha reportado que el incremento de $10\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas finas en la atmosfera, incrementa el número de muertes (entre 1.48% a 1.83%). Por consiguiente el tamaño de las partículas suspendidas es un importante indicador del riesgo potencial en la salud de la población de la ZMVM (Ghio *et al.* 2002, Englert 2004).
- b) Elementos que se les adosan: su toxicidad depende de los componentes que transportan, entre los que se encuentran, compuestos inorgánicos y metales de transición como: el cromo, el hierro, el níquel y el vanadio, a los cuales se le ha imputado la capacidad tóxica de las partículas suspendidas (Fernández *et al.* 2003, Sorensen *et al.* 2005).

2.2.3. Metales

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre y en algunos casos son parte esencial en los sistemas biológicos por ser micronutrientes necesarios como el calcio (Ca), cobre (Cu), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Sin embargo no todos los metales son esenciales, existen otros como el cobalto (Co), el mercurio (Hg), el plomo (Pb) y el vanadio (V), que tienen diversos efectos y son elementos considerados como posibles carcinógenos con propiedades mutágenas y genotóxicas (IARC, 2006). En las últimas décadas, metales como el plomo y el vanadio han sido ampliamente estudiados, ya que se encuentran entre los principales contaminantes atmosféricos de las grandes ciudades y se les ha relacionado como causantes de distintas enfermedades en la población.

Los metales como el hierro, el cobre, el cadmio, el cromo, el mercurio, el níquel y el vanadio, debido a su estructura química y a sus propiedades redox son capaces de desequilibrar en los organismos la homeostasis (Stohs y Bagchi 1994). Lo anterior se debe principalmente a que participan en reacciones de tipo Fenton, produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres (RL), (radical superóxido $[\text{O}_2^-]$ y radicales hidroxilo $[\cdot\text{OH}]$) (Stohs y Bagchi 1994, Valko *et al.* 2005, Sorensen *et al.* 2005).

Diversos estudios muestran que estos elementos son capaces de inducir carcinogénesis en animales y en humanos, debido a que provocan daño en el ADN y cambios conformacionales de

proteínas nucleares, sugiriendo que los RL y ERO's juegan un papel importante en respuestas celulares y carcinogénicas (Wang 2001).

Los RL provocan efectos adversos en los sistemas biológicos, se ha reportado hepatotoxicidad, neurotoxicidad y nefrotoxicidad, entre otros, debido a la interacción de los RL en la peroxidación de lípidos en la membrana plasmática - peroxidando lipoproteínas y progresivamente generando agregación de proteínas, lo cual lleva al endurecimiento de membranas- segundo por la activación de diversos procesos mutagénicos en ADN (p.e. aberraciones cromosómicas, oxidación de los residuos de guanina), degradación del ADN (ruptura y entrecruzamiento de cadenas) y apoptosis (Ghio *et al.* 2002, Goc 2006, Greggi *et al.* 2000, Chihuilaf *et al.* 2002). Además de activar la producción del factor de necrosis tumoral (TNF α), proteínas cinasas y la proteína activadora 1 (AP-1) (Stohs y Bagchi 1994).

Se ha reportado que las ERO's y los RL's como el radical hidroxilo, en altas concentraciones, pueden provocar estrés oxidante, teniendo repercusiones negativas en la supervivencia de la célula y desencadenando en algunos casos, necrosis celular (Morinville *et al.*1998).

El vanadio tiene una posición excepcional dentro de los metales, ya que participa en los procesos biológicos en forma de anión y catión (Etcheverry *et al.* 2002). Además posee la habilidad de producir radicales libres, provocando diversos tipos de daño en las células, debido a los resultados tan controversiales y poco concluyentes ha sido catalogado por la IARC (2006) dentro del grupo 2B como un posible carcinógeno para humanos.

2.2.4. Vanadio

2.1.4.1. Generalidades

El vanadio tiene una masa molecular de 50.9g (Ivancsists *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003a). Es un elemento metálico suave de color plateado-grisáceo, que puede existir con 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 óxido-reducción, sin embargo, sólo dos estados con valencia mayor V(IV) (vanadil) y V(V) (vanadato) tienen importancia biológica, el V(III) es muy reductor y no existe a pH fisiológico (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Guevara-García 1996, Zhang *et al.* 2001, Ding *et al.*1999).

El vanadio es un metal ampliamente distribuido en la corteza terrestre y es el vigésimo primer elemento más abundante, (0.014 a 0.02 %) (Kleinsasser *et al.* 2003, Leopardi *et al.* 2005, Cortizo *et al.* 2000). El vanadio no se encuentra como tal en la naturaleza, debido a que tiende a reaccionar con otros elementos, particularmente con el oxígeno, por lo tanto se encuentra unido a otros elementos como uranio, cobre, plomo y zinc (Barceloux 1999).

La forma más común es el pentóxido de vanadio (V₂O₅) con una masa molecular de 181.9g y un estado de oxidación +5. Es de color amarillo-rojizo o también se presenta en forma de un polvo

cristalino verde. Otros nombres que se le da a este compuesto son anhídrido de vanadio y pentóxido de divanadio (Mussali-Galante *et al.* 2005b, Costigan 2001).

Se extrae principalmente de las minas de Sudáfrica, Rusia y China; durante la fusión de la mena de hierro, se forma escoria de vanadio con pentóxido de vanadio; otra forma de producir el pentóxido de vanadio es por la extracción con disolventes, a partir de menas de uranio y de los residuos de las calderas o los residuos de las instalaciones de fosfato elemental mediante un proceso de calcinación de sales (Costigan 2001).

En algunos animales se considera que el vanadio es esencial, por ejemplo, en los sistemas enzimáticos de bacterias, que se encargan de fijar el nitrógeno atmosférico, así como en algunos organismos tunicados, anélidos, poliquetos y microalgas, sin embargo su función es incierta (Costigan 2001, Guevara-García 1996). Algunos de estos organismos llegan a tener altas concentraciones de vanadio como las ascidias que concentran más de 10 000 $\mu\text{g/g}$ y en anélidos alrededor de 786 $\mu\text{g/g}$ (Costigan 2001, Willsky 1990).

2.1.4.2. Usos

En la industria se utiliza como un constituyente del acero, ya que tiene una marcada resistencia a la corrosión y a la oxidación por ácidos y agua de mar, por lo cual se utiliza en la producción de aceros de alta resistencia mediante la formación de aleaciones con otros metales como cobre, cobalto, titanio, y carbono, utilizándose en la industria de la construcción y de la aeronáutica (Mercado 2006). Es importante como estabilizador de las aleaciones de titanio, las cuales contienen aproximadamente 4% de vanadio (Ivancsits *et al.* 2002).

El pentóxido de vanadio es utilizado en la catálisis de cambios de fase de algunos gases, particularmente en la conversión de dióxido de sulfuro a trióxido de sulfuro, esto durante la manufactura del ácido sulfúrico; en la industria agrícola en la elaboración de fungicidas e insecticidas; en algunos pigmentos y en tintas que son utilizadas en cerámica, dando un color de café a verde; en algunos lentes, se utiliza en los filtros ultravioleta, el cual le da propiedades características; y también se emplea en reveladores fotográficos (Opresko 1991, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

En la industria médica se utiliza en amalgamas, usadas en ortodoncia; en válvulas cardiovasculares y en la elaboración de prótesis ortopédicas (Nichols y Puleo 1997, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

2.1.4.3. Fuentes de emisión

El vanadio es emitido a la atmósfera por dos fuentes principales: las naturales y las antropogénicas.

a) Fuentes naturales

Las emisiones de pentóxido de vanadio a la atmósfera por fuentes naturales (vulcanismo, erosión, quema de bosques) son reducidas, se calcula que abarca alrededor del 9% del total emitido a la atmósfera (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

b) Fuentes Antropogénicas

Las fuentes antropogénicas son las más importantes formas de emisión del vanadio, éstas contribuyen con cerca del 91% (aproximadamente 64,000 toneladas) del vanadio que es emitido a la atmósfera cada año. Se libera principalmente por las actividades industriales, la combustión de aceites y de carbón (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

El vanadio es un elemento natural, que se encuentra en mayor cantidad en el petróleo mexicano y venezolano (Ivancsits *et al.* 2002, Mussali-Galante *et al.* 2005b, González-Villalva *et al.* 2006, Mercado 2006). El petróleo mexicano se caracteriza por su alta viscosidad y elevados contenidos de azufre 640 μ g/g y de vanadio 243 μ g/g, lo cual, debido a la geografía propia de la ZMVM y a los bajos niveles de oxígeno, no permite la combustión completa de gasolinas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Salinas *et al.* 2001). En la gasolina y en el carbón, el vanadio se encuentra presente en una conformación estable de porfirinas y éste es convertido en óxidos, cuando el combustible fósil se quema (Costigan 2001).

2.1.4.4. Niveles de vanadio en el ambiente

Actualmente utilizan las concentraciones atmosféricas de vanadio como indicador de la cantidad de partículas suspendidas totales, que se encuentran en la atmósfera (Ghio *et al.* 2002). En las zonas rurales el vanadio en el ambiente puede variar entre 25 y 75 ng/m³, mientras que las concentraciones de vanadio en las zonas urbanas varía en un rango de 0.25 hasta 300ng/m³, las grandes ciudades pueden tener un promedio anual de 20-100ng/m³, con un aumento en la concentración de hasta 6 veces durante el invierno. Es importante mencionar que según los últimos reportes la acumulación de vanadio aumenta cada año (Ghio *et al.* 2002).

2.1.4.5. Vías de exposición

Los organismos están expuestos principalmente a este metal por dos vías: la vía oral y la vía inhalada.

a) Vía Oral

La vía oral es la fuente más común de exposición para la mayor parte de la población. Los alimentos en general contienen bajas concentraciones de vanadio (<1 ng/g), sin embargo, hay algunos alimentos en los cuales las concentraciones de este elemento son mayores como: la pimienta negra, las semillas de eneldo, los hongos, el perejil, las espinacas y los mariscos (Leopardi *et al.* 2005, Barceloux 1999, Mukherjee *et al.* 2004), cabe resaltar que la mayoría de los

alimentos de origen marino tienen mayores concentraciones de vanadio, comparado con alimentos de origen terrestre (Guevara-García 1996).

Por esta vía la mayor parte del vanadio ingerido es excretado por las heces (Barceloux 1999, Nielsen y Uthus 1990). Estudios en animales sugieren que la cantidad de vanadio absorbido por el tracto gastrointestinal es <1-2%. (Costigan 2001, Nielsen y Uthus 1990).

b) Vía Inhalada

La vía inhalada es la ruta de exposición más frecuente, para la mayor parte de la población y por la cual se absorbe mayores cantidades de vanadio alrededor de un 90% (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Algunos estudios como los de Fortoul y colaboradores (2002) encontraron en muestras de autopsias (pulmón) realizadas a personas sanas, residentes de la Ciudad de México, en la década de los 90's, que la cantidad de vanadio aumentaba significativamente comparadas con la década de los 60's. Estas concentraciones halladas no se correlacionaron con el género, la edad, los hábitos al cigarro o su ocupación.

2.1.4.6. Toxicocinética

La toxicidad de los compuestos de vanadio, depende de una variedad de factores, que incluyen la ruta de exposición, el estado de valencia, la solubilidad y la toxicidad propia de cada compuesto; en general la toxicidad aumenta conforme aumenta la valencia del compuesto $V(III) < V(IV) < V(V)$ (Barceloux 1999). Se ha reportado que la forma pentavalente es cinco veces más tóxica que la forma trivalente (Leopardi *et al.* 2005). Esto se ha corroborado en pruebas realizadas *in vitro*, donde se encontró que el pentóxido de vanadio es más tóxico que el trióxido de vanadio y este a su vez es más tóxico que la forma divalente (Opresko 1991).

Dentro del organismo el vanadio puede presentar cambios en el estado de oxidación, conversión de la forma de vanadilo (IV) en vanadato (V) y viceversa (Guevara- García 1996).

Las principales formas en que el vanadio entra al organismo son: 1) la vía oral: una vez que se han ingerido alimentos que contienen vanadio, pasan al estómago, el cual convierte a la mayoría de los compuestos de vanadio en vanadilo (IV) y los restos de esta forma pasan a la parte media del duodeno, donde generalmente son excretados por las heces (Barceloux 1999, Nielsen y Uthus 1990, Mukherjee *et al.* 2004, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

2) La vía inhalada en la cual, el vanadio entra por las fosas nasales, pasa a las vías respiratorias altas, posteriormente a las bajas, a continuación a los alvéolos pulmonares y por último al torrente sanguíneo por medio del cual se distribuirá a todo el organismo (González-Villalva *et al.* 2006).

La distribución del vanadio en el organismo es rápida ($t_{1/2}$ cerca de 1h aproximadamente) (Barceloux 1999); y los órganos principales donde se acumula son: el riñón, el hígado y el pulmón

y después de un período de tiempo en el hueso y en los músculos (Valko 2005, Mukherjee *et al.* 2004, Etcheverry *et al.* 2002, Villani *et al.* 2007, IARC 2006).

Una vez en el plasma un porcentaje de V(V) es reducido a V(IV) por los antioxidantes del plasma (no todo se reduce); posteriormente se transportara por proteínas como la transferrina (vanadato y vanadilo) y la albúmina (vanadilo), se calcula que alrededor de un 90% de vanadio es transportado por proteínas plasmáticas y el 10% viaja libre (Barceloux 1999, Nielsen y Uthus 1990, Mukherjee *et al.* 2004).

La entrada del vanadio a las células está regulada y se explica a continuación:

El V(IV) puede atravesar la membrana celular a través de un mecanismo semejante al de cationes divalentes (Mukherjee *et al.* 2004). Por otro lado el V(V) cruza la membrana celular a través de canales aniónicos inespecificos, una vez dentro de la célula puede nuevamente reducirse a vanadilo (IV) por el glutatión intracelular, cateolaminas, entre otros, esta reducción está regulada por los mecanismos celulares redox, que controlan el equilibrio de los estados de oxidación del vanadio (Valko *et al.* 2005, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Willsky 1990, Mukherjee *et al.* 2004). Por ejemplo, la reducción del vanadato (V) por el glutatión en presencia de NAD(P)H genera vanadilo (IV). Durante el proceso de reducción el oxígeno molecular es reducido a O_2^- y posteriormente por dismutación a H_2O_2 . La reacción de vanadilo (IV) con H_2O_2 genera el radical hidroxilo ($OH\cdot$) por reacciones tipo Fenton (Ding *et al.* 1999, Shi *et al.* 1996). Una vez reducido se une a las proteínas.

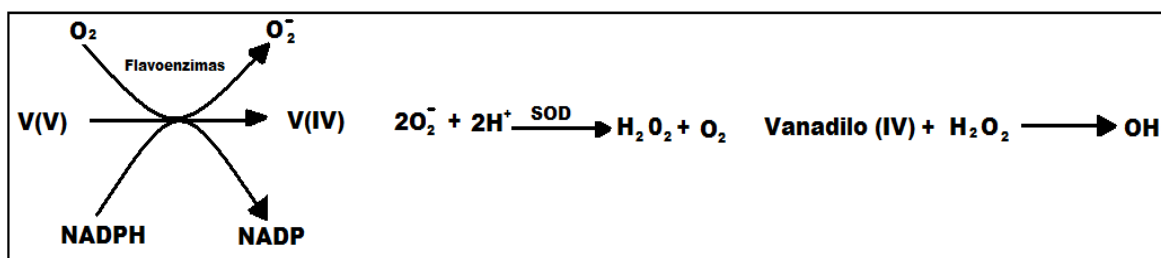


Fig.2 Proceso de reducción del vanadato en presencia de NADPH. El vanadato en presencia de NADPH genera al vanadilo y posteriormente el vanadilo al interactuar con peróxido de hidrogeno genera radicales hidroxilo. (Modificado de Ding *et al.* 1999).

Hay evidencia de que el vanadio tiene preferencia por grupos fosfato (debido a la gran similitud en estructura VO_4^{3-} , PO_4^{3-}), se calcula que el 61% total de V (IV) se une a fosfatos, 29% a proteínas, el 9% a radicales sulfhidrilo o vitaminas, entre otras moléculas y el 1% queda libre (Sabbioni *et al.* 1993, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006).

El V(V) se reduce a V(IV) para entrar al núcleo celular, esta reducción lleva a la formación de aniones superóxido O_2^- y peróxido de hidrogeno H_2O_2 , por otro lado, al interactuar estas

moléculas con el V(IV) se generan radicales hidroxilo OH• (Zhang *et al.* 2001, Leopardi *et al.* 2005).

Una parte del vanadio, que es absorbido por vía inhalada, posteriormente es excretado en la orina con una fase rápida de 10 a 20hrs, seguida de una fase lenta de 40 a 50 días, esto se considera que refleja la gradual liberación de vanadio de los tejidos (Barceloux 1999).

2.1.4.7. Toxicodinámica

Los compuestos de vanadio más estudiados son las formas tetra y pentavalente, ya que ambos reaccionan con grupos fosfato y con los azúcares de los nucleótidos, el vanadato interfiere con las fosfatasas ATP fosfohidrolasas, adenilato cinasa, gliceraldehido, 3-fosfato deshidrogenasa, ribonucleasas (Barceloux 1999, Altamirano *et al.* 1993). Induce la activación de diversos genes como: protooncogenes factores de transcripción como factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), proteína activadora-1 (AP-1), interleucina-8 (IL-8), ras, c-raf1, MAPK y la activación de proteína supresora de tumores p53 (Wang 2001, Noutsopoulos *et al.* 2007, Ghio *et al.* 2002, Mukherjee *et al.* 2004).

Estudios *in vitro* demostraron que el ión vanadato es un potente inhibidor de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa, el mecanismo por el cual se inhibe la bomba es a través de una proteína intermedia fosforilada, dentro del ciclo catalítico (Willsky 1990). En general, el vanadato es un inhibidor efectivo de las ATPasas en concentraciones >50 μ M, mientras que el vanadil es inhibidor a concentraciones bajas (10nM) (Mussali-Galante *et al.* 2005b, Barceloux 1999).

El vanadato en la membrana plasmática, activa la oxidación del NADH (en ausencia de cualquier proteína anexa) donde NADPH puede ser sustituido por NADH, produciendo radicales superóxido y la formación de H₂O₂ (Willsky 1990, Valko *et al.* 2005). Los compuestos de vanadio inhiben y estimulan la actividad de varias enzimas del ADN y del ARN induciendo diferentes efectos genotóxicos, como rompimientos de cadena sencilla en el ADN (Mukherjee *et al.* 2004).

Principalmente el vanadio puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres en los sistemas biológicos a través de reacciones de tipo Fenton o por la bio-reducción del vanadato mediada por el glutatión, flavoenzimas o NAD(P)H (Gándara *et al.* 2005, Sorensen *et al.* 2005, Aust *et al.* 2002).

Las concentraciones bajas de radicales libres son beneficiosas e incluso indispensables en los organismos, ya que cumplen una función importante en los procesos homeostáticos, como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida, sin embargo, en cantidades excesivas son tóxicas, y pueden llegar a oxidar biomoléculas, dañar el ADN, causar mutaciones y daño cromosómico, desencadenando trastornos en el metabolismo celular (Chihuailaf *et al.* 2002, Slamenova *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2001). Se ha propuesto que el principal mecanismo de genotoxicidad de los compuestos de vanadio es por medio de la generación de

radicales libres (Zhang *et al.* 2001, Leopardi *et al.* 2005, Cortizo *et al.* 2000, Wang *et al.* 2003a, Sorensen *et al.* 2005, Valko *et al.* 2006, Shi *et al.* 1996).

2.1.4.8. Efectos en la salud

Se sabe que los efectos que se presentan cuando hay una exposición por vía inhalada de V_2O_5 son principalmente en el sistema respiratorio y específicamente causando daño en el pulmón (Opresko 1991, Wang *et al.* 2003a). En humanos la retención pulmonar es de 35% y se estima que el 26% del vanadio soluble es absorbido a través de los pulmones (Opresko 1991, Sorensen *et al.* 2005, Englert 2004, González- Villalva *et al.* 2006).

Otros estudios realizados en estudiantes de Copenhagen, muestran que el vanadio y el cromo presentes en las PM 2.5 tienen un efecto de daño oxidativo en ADN de linfocitos, esto se determinó usando el biomarcador de daño al ADN 7-hidro-8-oxo-2-deoxiguanosina (8-oxodG), encontrándose que por una parte, el vanadio incrementa en un 1.9% la producción de 8-oxodG por $1\mu\text{g/l}$ y el cromo incrementa en un 2.2% la producción de 8-oxodG por $1\mu\text{g/l}$. Estos resultados son de suma importancia, ya que se ha correlacionado significativamente el efecto de las PM en la generación de tumores en modelos murinos (Sorensen *et al.* 2005) y de igual forma es asociado en la actualidad en la incidencia de enfermedades respiratorias y cáncer (Choi *et al.* 2004, Sorensen *et al.* 2005, Churg *et al.* 2003). Por otra parte, se sabe que a nivel celular, los metales de transición adsorbidos a las PM inducen la liberación de citocinas inflamatorias, generación de radicales hidroxilo y rompimientos de cadena sencilla en ADN. (Fernández *et al.* 2003, Choi *et al.* 2004).

Los primeros estudios realizados con V_2O_5 por vía oral (agudos) en animales, encontraron que provocaba diversos efectos como: vasoconstricción, enteritis, congestión y degeneración de los ácidos grasos en el hígado, además de congestión y hemorragias en el pulmón (Costigan 2001).

La toxicidad del vanadio está bien documentada, se sabe que la exposición crónica en Personas Ocupacionalmente Expuestos (POE) provoca irritación en el tracto respiratorio y garganta, tos, cojuntivitis, dermatitis, congestión pulmonar con destrucción del epitelio alveolar (Ghio *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2001, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006), bronquitis, rinitis, faringitis, coloración verde de la lengua, además de presentarse un incremento inflamatorio en las células de la mucosa nasal (Barceloux 1999).

2.1.4.9. Efectos genotóxicos

Se ha reportado, que los compuestos de vanadio provocan diferentes efectos genotóxicos y biológicos y esto depende de diferentes factores como la dosis, la duración de la exposición y del estado de oxidación del metal (Noutsopoulos *et al.* 2007).

El potencial genotóxico del V_2O_5 no ha sido establecido, sin embargo está enlistado por la IARC (2006) como miembro del grupo IIB (posible carcinógeno para los humanos) debido a que los resultados son contradictorios y no concluyentes.

a) *In Vitro*

Se ha reportado, que el pentóxido de vanadio induce: micronúcleos, rompimientos de cadena sencilla de ADN, intercambio de cromátidas hermanas (SCE) y aberraciones cromosómicas en diferentes sistemas (Villani *et al.* 2007). Se sabe que en fibroblastos humanos, genera rompimientos de ADN, segregación errónea en los cromosomas y la co-exposición de las células a otros agentes genotóxicos pueden resultar en un daño persistente en el DNA (Ivancsits *et al.* 2002, Leopardi *et al.* 2005). A continuación se describen algunos experimentos *in vitro* reportados.

Estudios realizados por Ivancsits y colaboradores (2002) en linfocitos y leucocitos, encontraron que a bajas concentraciones de vanadato ($1\mu\text{M}$), no causaba daños en el ADN, sin embargo a elevadas concentraciones ($>5\mu\text{M}$), observaron rompimientos de cadena sencilla en ADN. Por otra parte encontraron que en fibroblastos, al combinar la exposición de vanadato $0.5\mu\text{M}$ /UV $4.8\text{kJ}/\text{m}^2$ y vanadato $0.5\mu\text{M}$ /bleomicina $1\mu\text{g}/\text{ml}$ se presentaban rompimientos de cadena doble en ADN.

En estudios realizados por Kleinsasser y colaboradores (2003), observaron que la exposición con pentóxido de vanadio en linfocitos, genera rompimientos de cadena sencilla en ADN, mientras que en células epiteliales humanas y de la mucosa nasal no presentaron sensibilidad.

Estudios realizados por Altamirano y colaboradores (1993), con pentóxido de vanadio en cultivos celulares de linfocitos, observaron una disminución en el índice mitótico, poliploidia y asociaciones satelitales.

Las formas pentavalentes y tetravalentes del vanadio puede generar especies reactivas de oxígeno, debido a su potencial redox y provocar efectos aneugénicos en células somáticas, además de interferir con la mitosis y la distribución cromosómica. Hay evidencia que estas formas del vanadio, así como el vanadio trivalente puede producir daños en el ADN y en cromosomas, pero aún es controvertido, ya que se tienen tanto resultados positivos como negativos (Costigan 2001, Morinville *et al.* 1998).

b) *In vivo*

Estudios de Ciranni y colaboradores (1995), evaluaron los posibles efectos del sulfato de vanadilo vía intragástrica, en médula ósea, encontrando que después de 36 h y 26 h, había un incremento en el número de células aberrantes.

En 1999 Altamirano-Lozano y colaboradores, realizaron estudios para evaluar el potencial genotóxico del pentóxido de vanadio en seis diferentes órganos (hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón y médula ósea) usando la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa). Se administró por vía peritoneal, pentóxido de vanadio en diferentes dosis ($23\mu\text{g}/\text{g}$, $11.5\mu\text{g}/\text{g}$ y $5.75\mu\text{g}/\text{g}$) y posteriormente a las 24hrs los animales fueron sacrificados. En todos los tejidos y órganos evaluados (excepto en médula ósea) se encontró un incremento en el número de células

que presentan daño. El análisis de la migración ADN, muestra que hay diferencias en la sensibilidad entre los diferentes órganos y tejidos.

Además se ha encontrado que la inhalación de V_2O_5 por un largo periodo de tiempo (dos años), hay un incremento en tumores del tracto respiratorio en ratas y ratones, así como un incremento de fibrosis intersticial e hiperplasia en el epitelio alveolar y bronquiolar en ratones y en ratas (Ress *et al.* 2003).

Estudios de Leopardi y colaboradores (2005) con ortovanadato (Na_3VO_4), vía oral en ratones CD-1 tratados por cinco semanas a concentraciones de 750-1500 μ g/l Na_3VO_4 , se encontró un incremento de micronúcleos a concentraciones altas de ortovanadato (750 y 1500 μ g/l) en células de médula ósea.

Fortoul y colaboradores han encontrado en estudios realizados con un modelo murino de exposición por inhalación a V_2O_5 , alteraciones ultraestructurales en células del timo, bazo y médula ósea; aumento de número y tamaño en megacariocitos de machos y hembras (mayor proliferación en hembras); rompimientos de cadena sencilla de ADN en leucocitos de sangre periférica (Piñón-Zárate 2005; González-Villalva 2004; Rojas-Lemus 2006).

Por lo anterior, es necesario realizar más investigación al respecto del potencial genotóxico de este elemento, en los diferentes órganos, así como en las células de médula ósea, debido a que es un órgano importante en la producción de células hematopoyéticas.

2.2. La médula ósea como un importante tejido

La médula ósea es el órgano en el que tiene lugar la hematopoyesis. Para que se lleve a cabo ésta, la médula ósea cuenta con una red de células estromales (fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos) y células accesorias (monocitos y linfocitos), además de citocinas y proteínas de matriz extracelular producidas por dichos componentes celulares. En conjunto estos elementos conforman lo que se denomina como microambiente hematopoyético, en el cual las células hematopoyéticas son capaces de proliferar y diferenciarse hacia los distintos linajes sanguíneos, mediante el contacto directo con las células estromales o por influencia de las citocinas presentes en dicho microambiente (Montesinos y Mayani 2002). Las células que forman el sistema hematopoyético se pueden agrupar en cuatro compartimientos:

- a) El primer compartimiento corresponde a las células madre hematopoyéticas pluripotenciales (CSHP), capaces de autorrenovarse y originar las células de los distintos linajes sanguíneos; constituyen el 0.005% del total de células en la médula ósea.
- b) El segundo compartimiento corresponde a las células progenitoras (CPH), incapaces de autorrenovarse y con características de pluripotencialidad, bipotencialidad y monopotencialidad; en conjunto, las CPH constituyen el 0.15% de las células de la médula ósea.

c) El tercer compartimento comprende a las células precursoras reconocibles por su morfología y que corresponden a más del 95% de las células presentes en la médula ósea.

d) El cuarto compartimento corresponde a las células maduras circulantes, que representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos (Alvarado- Moreno y Mayani 2007).

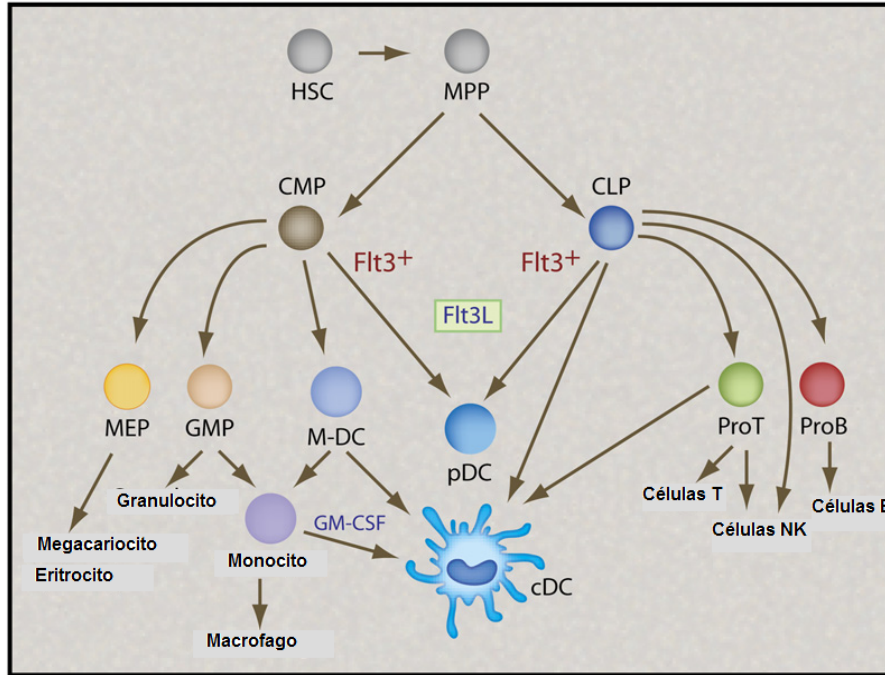


Fig. 3 Hematopoyesis. Las células madre (HSC) dan origen a progenitores multipotenciales (MPP) que son capaces de originar a los precursores mieloides (CMP) que formaran eritrocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas y a los precursores linfoides (CLP) que darán origen a los linfocitos B y T. Abreviaturas: GMP, precursor de granulocitos y macrófagos; MEP, precursor de megacariocitos y eritrocitos; M-DC, precursor de macrófagos; ProT, precursor de linfocitos T y NK; ProB, precursor de linfocitos B. (Modificado de Wu y Liu 2007).

2.2.1 Efectos adversos de los metales sobre la médula ósea

En algunos estudios realizados de contaminación ambiental, se ha encontrado que la médula ósea es un órgano sensible al daño que producen los contaminantes, que se encuentran por un largo período de tiempo en la atmósfera. Como los estudios realizados con ratones silvestres colectados en tres áreas conurbadas de Roma (expuestas a diferentes concentraciones de contaminantes), se encontró un incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica y médula ósea, además de encontrar que el daño genético estaba correlacionado con los niveles de

contaminantes en la atmósfera, debido principalmente al tráfico vehicular de la zona (Ieradi *et al.* 1996).

Los metales que se encuentran en la atmósfera tales como el cloruro de cadmio por inhalación, induce daño en ADN en diferentes órganos como: testículo, células nasales epiteliales, cerebro, pulmón, hígado, riñón y médula ósea. La médula ósea presenta un alto porcentaje de daño en el ADN desde el inicio hasta el final del experimento, así como una mayor susceptibilidad comparada con los otros órganos (Valverde *et al.* 2000, Nehéz *et al.* 2000).

La exposición por inhalación de cobalto en personas ocupacionalmente expuestas (refinerías), se ha observado que el órgano blanco es el tracto respiratorio, sin embargo se le ha asociado con efectos adversos en órganos como: piel, pulmón, glándula de tiroides, miocardio y médula ósea (Swennen *et al.* 1993).

En las últimas décadas se ha encontrado efectos nocivos por la corrosión de diferentes metales como níquel, cobalto, cromo y vanadio que son principalmente utilizados en prótesis medicas así como dentales (Coen *et al.* 2001). En investigaciones realizadas con pacientes que utilizan prótesis hechas de titanio-aluminio-vanadio (Ti-6Al-4V) se ha reportado que afectan seriamente ciertos tejidos como: sangre y médula ósea, debido a la liberación de iones en los tejidos que rodean a los injertos, esto puede causar inflamación, daño cromosómico y citotoxicidad local, afectando la morfología y estructura del tejido y esto paulatinamente puede llevar a la carcinogénesis o reacciones alérgicas (Coen *et al.* 2001, McKay *et al.* 1996; Case *et al.* 1994). Por ejemplo los iones del níquel provocan disturbios en las etapas iniciales de proliferación de la médula ósea, provocando efectos nocivos en la viabilidad/ proliferación; el hierro y el cromo interfiere con el crecimiento normal del cultivo de células de médula ósea (Morais *et al.* 1999).

2.3. El género implicado en la respuesta diferencial.

Algunos autores han reportado diferencias significativas entre géneros expuestos a un mismo tratamiento, como los estudios realizados por Fortoul y cols. (2004) quienes encontraron diferencias, al estudiar una población de estudiantes residentes de una zona altamente contaminada. En este estudio se evaluó el daño genotóxico en leucocitos de sangre periférica, así como los cambios histológicos en el epitelio nasal. Se encontró un alto porcentaje de daño en el ADN, así como cambios en el epitelio nasal en el grupo de hombres expuestos y controles, comparados con las mujeres.

Otros estudios de Fortoul y cols. (2005) en ratones expuestos por vía inhalada a plomo, se midió la concentración de plomo en pulmón y la respuesta bronquiolar después de la inhalación. Encontrando que en las hembras había una alta concentración de plomo en el pulmón y por otro lado, en los machos había un mayor daño celular, así como la pérdida de células ciliadas bronquiales y aumento de necrosis.

En estudios de enfermedades como el Alzheimer, se sabe que el estrés oxidante juega un papel importante en la patología de la enfermedad, se ha visto que hay una mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres postmenopáusicas que en hombres. Se han realizado estudios por Schuessel y cols. (2004) para ver la posible relación entre el género y el metabolismo antioxidante en el cerebro de mujeres y hombres con la enfermedad de Alzheimer. Encontrando que en personas enfermas con Alzheimer hay un aumento de la actividad de superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc (SOD), de la glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión disulfuro reductasa (GR) comparado con los grupos controles. Los resultados indican que el metabolismo de antioxidantes es funcional y que está incrementado en personas con Alzheimer lo que implica que el daño oxidante es causado por la sobreproducción y la insuficiente desintoxicación de ERO's. Además de encontrar que la actividad de la SOD y GPx estaba incrementada en mujeres y los niveles de 4- hidroxinonenal (marcador de daño a ADN) era alto en los pacientes hombres.

Otros autores como Celsi *et al.* 2004 han encontrado un efecto protector del estrógeno (17β -estradiol) contra estrés oxidante formado por el péptido β -Amiloide ($A\beta$) en la enfermedad del Alzheimer. Se ha visto que la línea celular SH-SY5Y y SH-SY5Y+SOD son menos susceptibles a $A\beta$, además se observó que el estrógeno 17β -estradiol protege ambas líneas celulares, sin afectar la actividad de la SOD.

En todos estos trabajos se sugiere la implicación de las hormonas sexuales, como un factor importante a considerar, en la respuesta diferencial entre machos y hembras sometidos a un mismo tratamiento.

2.4. Ensayo Cometa

En la actualidad hay una amplia gama de técnicas para evaluar la actividad genotóxica de los compuestos, entre ellas podemos mencionar la técnica de Micronúcleos (en linfocitos o eritrocitos), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Aberraciones Cromosómicas y la Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa). El ensayo cometa es una técnica genotóxica ampliamente utilizada en las últimas décadas, ya que es considerada como un biomarcador sensible al daño temprano en el ADN, inducido por una amplia variedad de agentes físicos y químicos, en células individuales expuestas *in vivo* o *in vitro* (Mussali- Galante *et al.* 2005a, Slamenova *et al.* 1997, Hellman *et al.* 1995, McNamee *et al.* 2000).

En 1984 Ostling y Johanson, desarrollaron la técnica de Electroforesis Unicelular en condiciones neutras, pero esta prueba resultó ser muy limitada, ya que sólo podía detectar rompimientos de cadena doble (DSB) (Tice *et al.* 2000; Kasamatsu *et al.* 1996). Poco tiempo después Singh y colaboradores en 1988 desarrollaron la Electroforesis Unicelular Alcalina $pH > 13$, a ellos se les reconoce por haber mejorado y optimizado esta técnica, ya que al utilizar un pH alcalino, ésta se vuelve más eficiente al detectar distintos tipos de daño en ADN como: rompimientos de cadena sencilla en ADN (SSB), sitios alcalilabiles (ALS) y entrecruzamientos ADN-ADN/ADN-proteínas; por

eso en la actualidad es una técnica ampliamente utilizada en la detección de agentes con actividad genotóxica (Tice *et al.* 2000, Kasamatsu *et al.* 1996, Slamenova *et al.* 1997).

Varias son las ventajas que presenta esta técnica, entre las que destacan: sensibilidad a bajos niveles de daño en DNA (50-15,000 rompimientos/célula) superando en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas, requiere de un pequeño número de células, la información es obtenida a nivel de células individuales, aplicable a cualquier tipo celular eucarionte (proliferantes y no proliferantes), los resultados se pueden obtener en un período corto de tiempo (Tice *et al.* 2000, Prieto-González 1999). Por todas estas ventajas es una técnica genotóxica actualmente muy utilizada en los laboratorios.

3. Justificación

La ZMVM actualmente es catalogada mundialmente como una megaciudad por ser una zona densamente poblada con alrededor de 20 millones de habitantes. En una metrópoli tan grande diariamente se desarrollan diferentes actividades industriales y antropogénicas, que en su mayoría, favorecen la emisión de grandes cantidades de contaminantes a la atmósfera, aunado a esto, las condiciones físicas del paisaje (rodeado por montañas y estar a una altura promedio de 2500 m.s.n.m), tener vientos predominantes de norte a sur, por un lado, no favorece la combustión completa de los motores y por el otro lado, no favorece la disipación de los contaminantes, provocando que estos se mantengan en la atmósfera por un largo período de tiempo, sobrepasando los límites permisibles de contaminantes en la atmósfera y ocasionando diferentes problemas de salud pública.

Dado los resultados previos encontrados en nuestro laboratorio en un modelo murino de exposición por inhalación a V_2O_5 , es importante el estudio de la médula ósea por ser uno de los principales órganos de producción de los diferentes linajes celulares como: eritrocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas; y debido a que no hay nada concluyente sobre la genotoxicidad del V_2O_5 , es importante la evaluación genotóxica en este importante tejido. Así como realizar una evaluación entre géneros, ya que se ha reportado respuestas diferenciales entre machos y hembras sometidos a un mismo tratamiento.

4. Hipótesis

- El V_2O_5 en ratones expuestos por vía inhalada durante cuatro semanas, producirá rompimientos de cadena sencilla en el ADN en células de médula ósea.
- Se observaran respuestas diferenciales entre el grupo tratado de machos y el grupo tratado de hembras, expuestos al V_2O_5 durante cuatro semanas.

5. Objetivos Generales

- Comparar por género los efectos genotóxicos del pentóxido de vanadio (0.02 M) a diferentes tiempos de exposición mediante la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina en ratones expuestos por vía inhalada durante cuatro semanas.

5.1. Objetivos Específicos

- Identificar la citotoxicidad del V_2O_5 en células de médula ósea, mediante la técnica de viabilidad celular por fluorocromos.
- Identificar la presencia de rompimientos de cadena sencilla en el ADN, mediante la técnica Electroforesis Unicelular Alcalina, en células de médula ósea de ratones hembras y machos expuestos a la inhalación de V_2O_5 .
- Comparar por género la presencia de rompimientos de ADN en las células de médula ósea de los ratones expuestos a V_2O_5 .

6. Material y Método

Se utilizaron 30 ratones hembras y 30 machos de la cepa CD-1 de 30 ± 5 g, se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad (12:12hrs), con agua y alimento *ad libitum*.

Se dividieron en cuatro grupos, dos de hembras y dos de machos. El primer grupo de hembras ($n=20$), fue el grupo experimental y el segundo grupo de hembras ($n=10$), fue el grupo testigo; por otra parte, el grupo de machos, se dividió de igual manera que el grupo de las hembras.

En una caja de acrílico transparente (45 x 21 x 35cm), conectada a un ultranebulizador UltraNeb® 99 con flujo 10 L/min, se sometió a los grupos testigo a la inhalación de solución salina y posteriormente a los grupos tratados a la inhalación de V_2O_5 (0.02M), una hora dos veces por semana, durante cuatro semanas.

Posteriormente los ratones se sacrificaron por dislocación cervical a las 24hrs de la primera exposición y cada siete días. Se extrajo el fémur y se tomaron muestras de médula ósea, para dos técnicas: Viabilidad Celular por fluorocromos y Electroforesis Unicelular Alcalina (Fig.4).

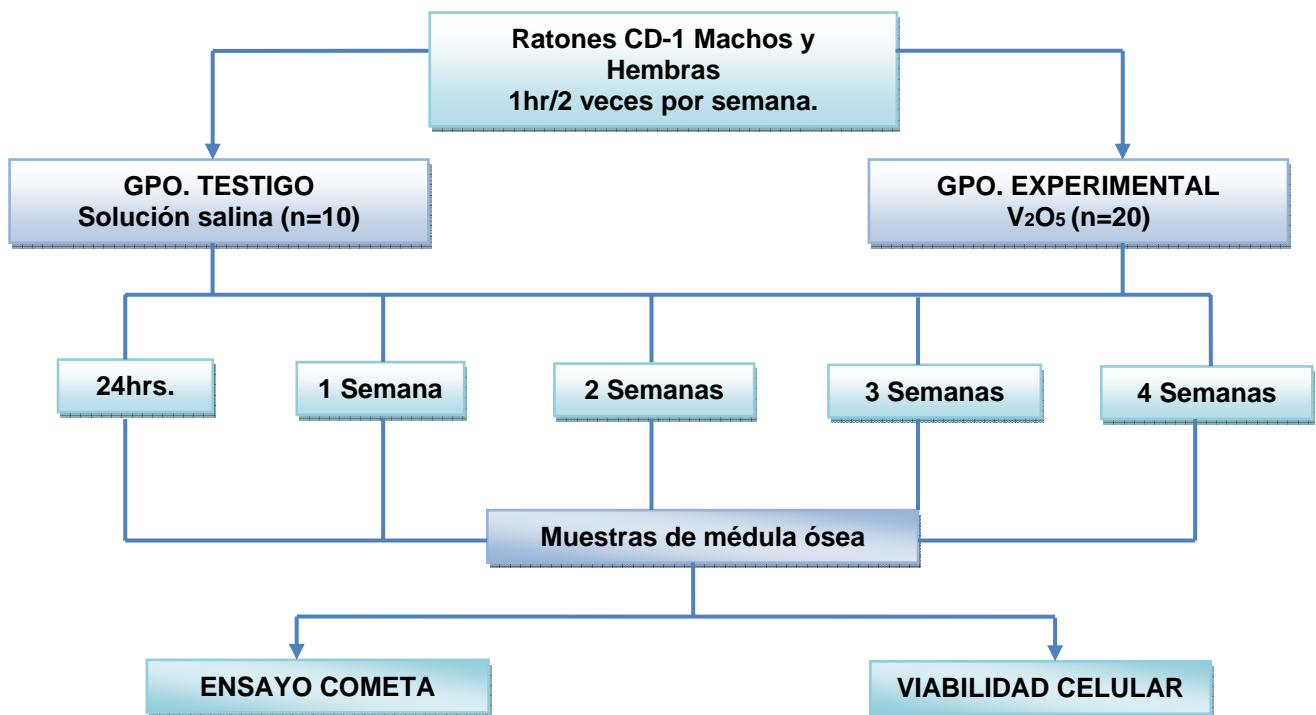


Fig. 4 Representación esquemática del método experimental utilizado.

Para la obtención de muestras de médula ósea, se extrajo el fémur derecho de los ratones (tanto expuestos como testigos), a los cuales se les retiro los residuos de tejido circundante, para

posteriormente cortar ambas epífisis. Se hicieron pasar 5ml de medio RMPI, (disuelto en buffer de fosfatos [pH 7.4] a 37°C), a través de la porción de hueso esponjoso del fémur. Una vez realizado lo anterior, las muestras se centrifugaron (1000rpm) durante cinco minutos y se retiró el sobrenadante. El botón resultante se resuspendió con 500 μ l de medio RPMI y se tomaron 10 μ l para cada muestra.

6.1. Método de Viabilidad Celular por Fluorocromos

Para el método de viabilidad celular se siguió el método descrito por Strauss y cols. (1991) con algunas modificaciones:

Se utilizaron dos soluciones: a) Diacetato de fluoresceína (FDA) (0.01g) disuelto en 2ml acetona y b) Bromuro de etidio (BrEt) (0.01g) disuelto en 5ml de buffer de fosfatos (PBS). Ambos se guardaron por separado en frascos ámbar a 4°C.

En fresco, se realiza una solución FDA (15 μ l), PBS (2.4ml) y BrEt (100 μ l).

5 μ l de médula ósea se mezcla con 5 μ l de BrEt-FDA-PBS (1:1) y se observó en un microscopio de fluorescencia a 200x. Se cuantificaron las células vivas, que se observan de color verde-fluorescente y las células muertas de color rojo, en campos al azar hasta completar un total de 100 células, obteniéndose la proporción de células vivas con respecto a las células muertas.

6.2. Electroforesis Unicelular Alcalina (Ensayo Cometa)

Para realizar la Electroforesis Unicelular Alcalina se empleó el método descrito por Tice y cols. (2000) con algunas modificaciones. Se tomaron 10 μ l de la muestra de médula ósea y se mezclaron con 75 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%). Se colocó en un portaobjetos, al que previamente se le había colocado una capa de agarosa regular (0.5%) [75 μ l]. Se cubrió con un cubreobjetos libre de impurezas y se colocó en hielo hasta que la agarosa de bajo punto de fusión se solidificó. Cada muestra se realizó por duplicado.

Una vez que la agarosa solidificó, se retiró suavemente el cubreobjetos y se adicionó una tercera capa de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) [75 μ l], nuevamente se cubrió y se dejó solidificar.

Para lisar las células, las muestras se colocan en un vaso coplin con una solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 Mm Na₂EDTA, 10 mM Tris- Base [pH 10]; al que se le adiciono en fresco Tritón X-100 [1%] y DMSO [10%]). Las muestras en solución de lisis se mantuvieron a 4°C en condiciones de oscuridad al menos durante 1h.

El desenrollamiento y corrida de las muestras se realizó en una cámara de electroforesis horizontal con buffer de desenrollamiento (NaOH 300Mm, EDTANa₂ 1mM pH>13) durante 20 minutos cada proceso a 25V y 300mA.

Una vez realizado lo anterior, las muestras se colocan en una solución de neutralización (400mM TRIS pH 7.5) por 15 minutos y posteriormente las muestras son deshidratadas con etanol absoluto (5 minutos). Para la observación de las muestras se fluorocromizan con Bromuro de Etidio 50µl (0.02mg/ml) disuelto en agua destilada (Fig. 3). Posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus BH2-RFCA) a 200x con una regilla integrada en el ocular y equipado con filtro de excitación 480-550nm y uno de absorción 570nm.

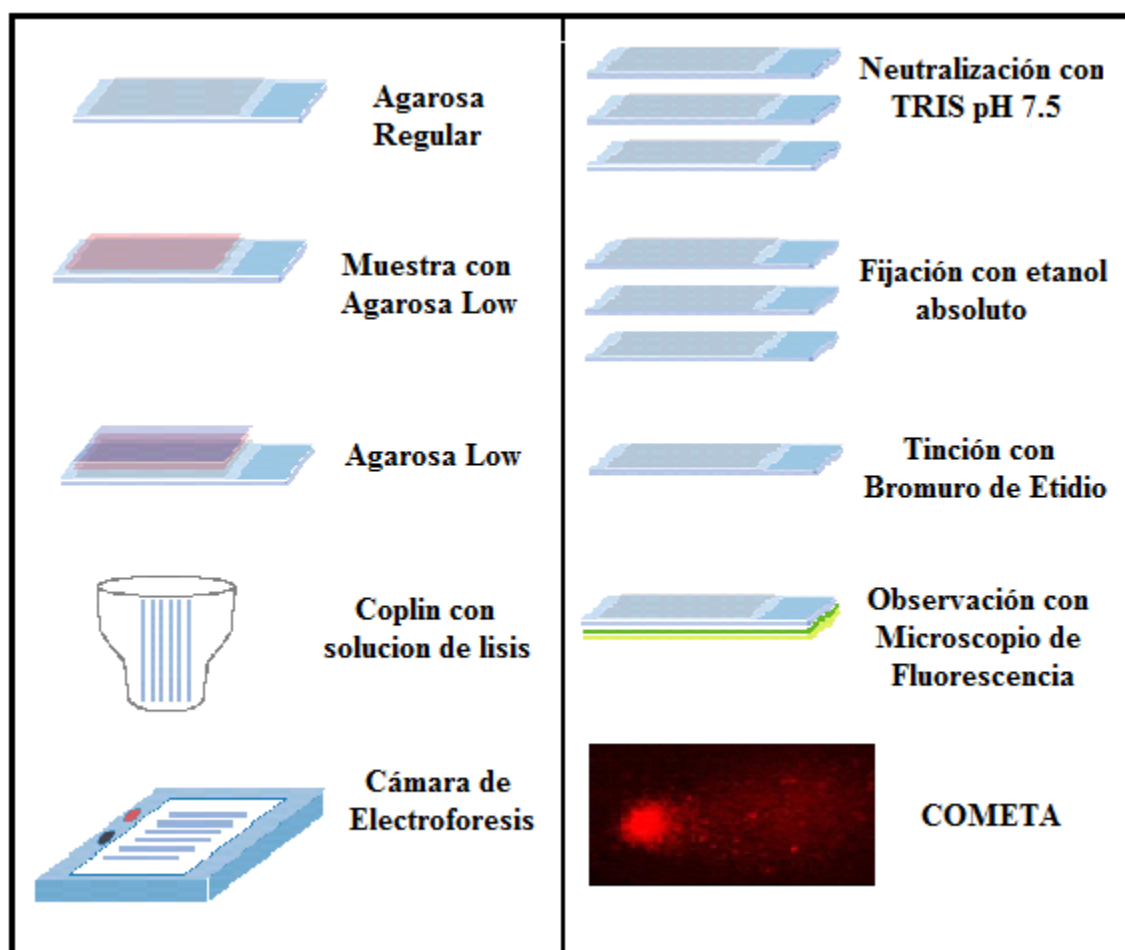


Fig. 5 Pasos realizados en la técnica Electroforesis Unicelular Alcalina.

(Modificado de Rojas-Lemus 2006).

6.3. Visualización de cometas y categorización de datos

Se consideran al azar 200 nucleoides por individuo. A las células con daño (que presentan una estela o cola) se les midió la longitud de la cola y la longitud de la cabeza (Fig. 6), posteriormente fueron clasificadas según Altamirano-Lozano y colaboradores (1999) mediante la fórmula: longitud de la cola /la longitud de la cabeza, en tres categorías de daño: bajo (<1), medio (<2) y alto (>2).

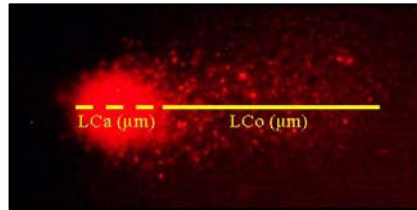


Fig.6 Medición de los cometas de medula ósea de ratones expuestos a V_2O_5 ; LCa (longitud de la cabeza), LCo (longitud de la cola).

En cada muestra se cuantificaron células sin daño, con daño bajo, con daño medio y con daño total y se obtuvieron los porcentajes respectivos.

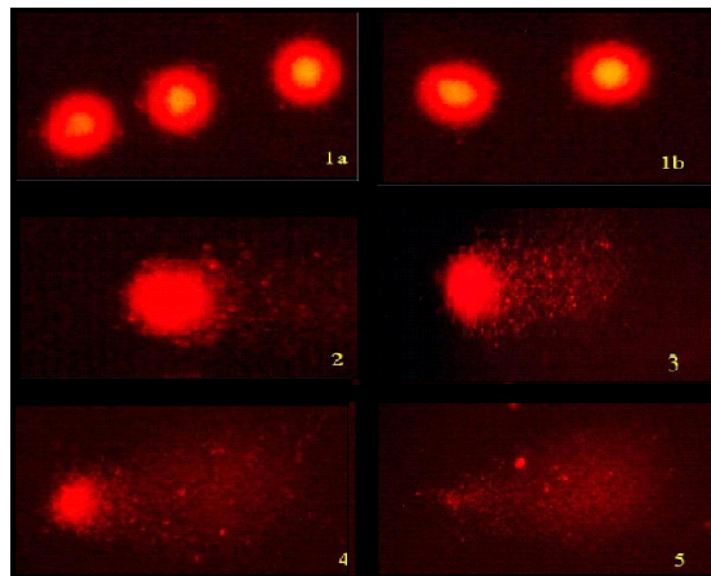


Fig. 7 Categorías de daño.
1a y 1b: Células sin daño. 2: Células con daño bajo. 3: Células con daño medio.
4: Células con daño alto. 5: Células con daño total.

6.4. Análisis Estadístico

Con el paquete estadístico Sigma Stat versión 2.0 se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba post-hoc Kruskal-Wallis, para determinar las diferencias entre los grupos tratados con respecto a los grupos control, con respecto al tiempo de inhalación; y posteriormente se realizó una prueba t- student para determinar las diferencias entre el grupo tratado de hembras y el grupo tratado de machos. Para las pruebas antes descritas se consideraron valores de $P < 0.05$.

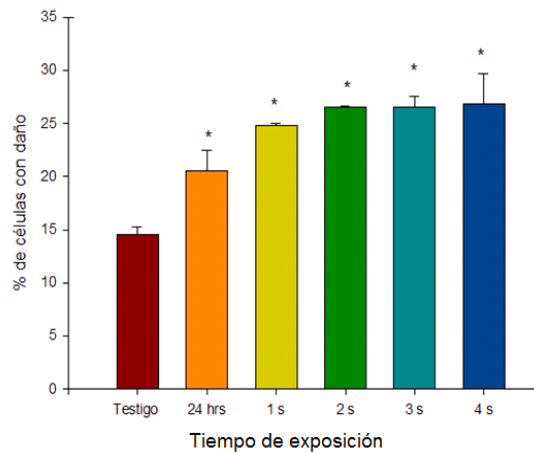
7. Resultados

7.1. Viabilidad celular: En todos los grupos tratados expuestos a V_2O_5 y en los grupos controles la viabilidad celular fue mayor al 85%.

7.2. Ensayo cometa: Los resultados obtenidos empleando el ensayo cometa de cada grupo experimental comparado con su grupo control, se muestra a continuación:

a) Machos

En el grupo de los machos se observa aumento significativo y progresivo del porcentaje de células con daño desde las 24 h hasta las cuatro semanas de tratamiento con respecto al grupo testigo.

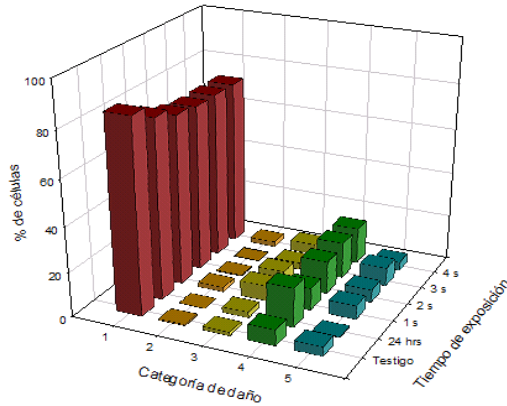


ANOVA (Kruskal-Wallis) * $p < 0.05$

Fig. 8 Porcentaje de células que presentan daño en ratones machos expuestos a V_2O_5 durante cuatro semanas.

i) Categorías de daño

En el grupo de los machos se observa mayor porcentaje de células con daño alto, en comparación con el resto de categorías de daño.



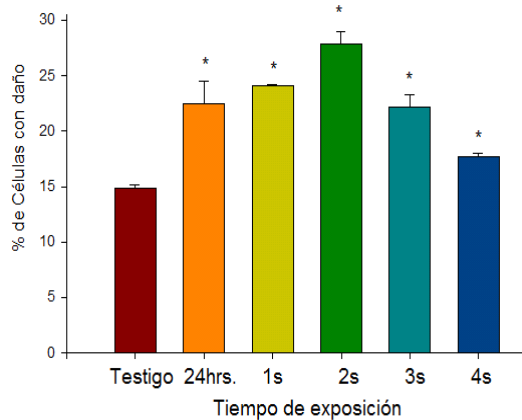
Categorías de daño:
1) Sin daño
2) Daño bajo
3) Daño medio
4) Daño alto
5) Daño total

ANOVA (Kruskal-Wallis) *p<0.05

Fig. 9 Porcentaje de células agrupadas por categoría de daño: sin daño, daño bajo, daño medio, daño alto y daño total, en ratones macho expuestos a V₂O₅ durante cuatro semanas.

b) Hembras.

En el grupo de las hembras se observa aumento significativo y progresivo del porcentaje de células con daño desde las 24 h hasta la segunda semana de tratamiento con respecto al grupo testigo y posteriormente en la tercera y cuarta semana se observa decremento del porcentaje de células con daño. .

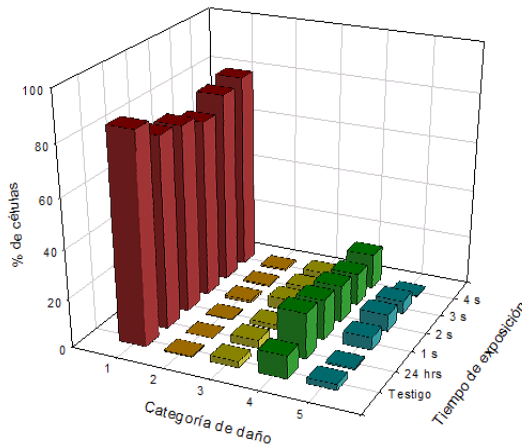


ANOVA (Kruskal-Wallis) *p<0.05

Fig.10 Porcentaje de células que presentan daño en ratones hembra expuestos a V₂O₅ durante cuatro semanas.

ii) Categorías de daño

En el grupo de las hembras se observa mayor porcentaje de células con daño alto, en comparación con el resto de categorías de daño.



Categorías de daño:
 1) Sin daño
 2) Daño bajo
 3) Daño medio
 4) Daño alto
 5) Daño total

ANOVA (Kruskal-Wallis) *p<0.05

Fig.11 Porcentaje de células agrupadas por categoría de daño: sin daño, daño bajo, daño medio, daño alto y daño total, en ratones hembra expuestos a V₂O₅ durante cuatro semanas.

c) Comparación por género

Se observa que a) los grupos testigo presentan menor porcentaje de células con daño con respecto a los grupos tratados (hembras y machos), b) se observa en los grupos tratados similitud en el porcentaje de células con daño desde las 24 h hasta la segunda semana, c) en la tercera y cuarta semana se observa decremento significativo del porcentaje de células con daño en el grupo de hembras con respecto al grupo de los machos.

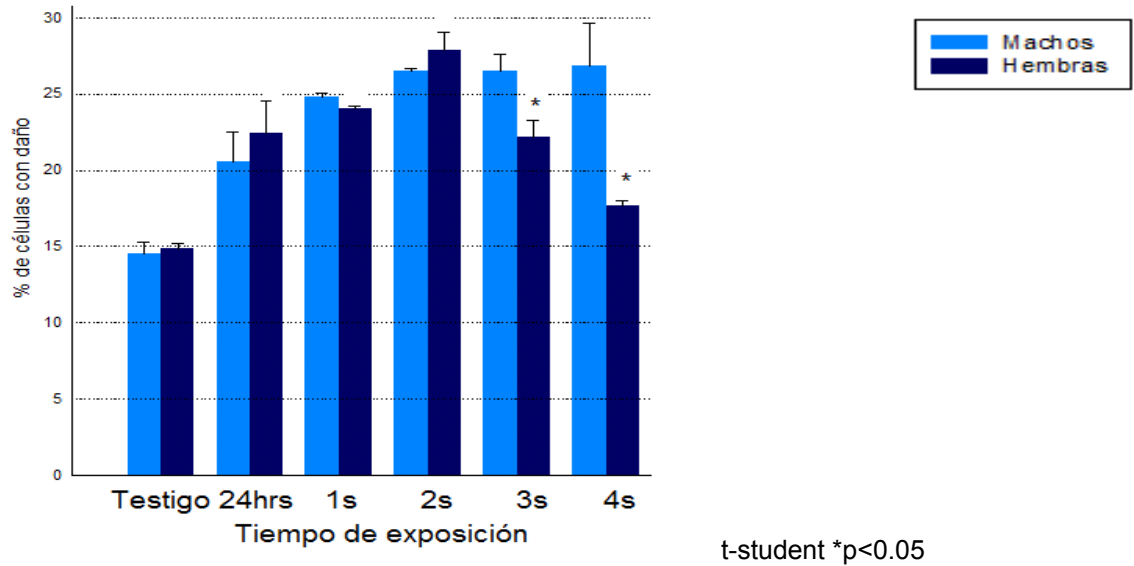


Fig.12 Comparación en el porcentaje de células que presentan daño en machos y hembras expuestas a V₂O₅ durante cuatro semanas.

8. Discusión

8.1. Viabilidad celular por fluorocromos

La viabilidad celular por fluorocromos fue mayor al 85% en todos los casos, lo cual indicó que el compuesto en este modelo de inhalación, no presentó actividad citotóxica en células de médula ósea. Por otro lado, estos resultados permitieron, evaluar el daño genotóxico del V_2O_5 con la técnica Electroforesis Unicelular Alcalina para la cual se requiere una viabilidad celular $\leq 80\%$ (Tice *et al.* 2000).

8.2. Efectos genotóxicos del V_2O_5

Los resultados genotóxicos obtenidos por medio de la técnica de Electroforesis Unicelular Alcalina, nos permite interpretar que el V_2O_5 genera rompimientos de cadena sencilla en ADN a $pH > 13$ en células de médula ósea tanto en el grupo de hembras como el de los machos.

El pentóxido de vanadio cuando es inhalado pasa a las vías respiratorias altas y posteriormente a las vías respiratorias bajas, de ahí pasa a los sacos alveolares y posteriormente al torrente sanguíneo (González-Villalva *et al.* 2006).

En el torrente sanguíneo el vanadio es transportado por la albúmina y por la transferrina, y una parte es reducido de vanadato V(V) a vanadil V(IV) por el glutatión, el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma (Nielsen y Uthus 1990, Mukherjee *et al.* 2004, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Del torrente sanguíneo es transportado a varios órganos blanco como: hígado, testículo, riñón, hueso y bazo (Valko 2005, Mukherjee *et al.* 2004, Etcheverry *et al.* 2002).

El mecanismo por el cual entra a las células se describe brevemente: El V(IV) puede atravesar la membrana celular a través de un mecanismo semejante al de cationes divalentes (Mukherjee *et al.* 2004). Por otro lado el V(V) cruza la membrana celular por un mecanismo de transporte aniónico, una vez dentro de la célula puede nuevamente reducirse a vanadil (IV) por el glutatión intracelular, cateolaminas, entre otros; esta reducción está regulada por los mecanismos celulares redox, que controlan el equilibrio de los estados de oxidación del vanadio; subsecuentemente se une a las proteínas (Valko *et al.* 2005, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006, Willsky 1990, Mukherjee *et al.* 2004).

8.2.1. Mecanismos de genotoxicidad del V_2O_5 en el ADN.

Actualmente se sabe que el ADN puede ser alterado por acción de diversos agentes físicos-químicos de origen extracelular como: las radiaciones ultravioletas, los plaguicidas y la exposición a otras sustancias del ambiente; o ser de origen intracelular como: desórdenes metabólicos o las especies reactivas de oxígeno (Roche y Romero-Alvira 1996, Alberts 2002). Varios estudios sugieren que el principal mecanismo de genotoxicidad de los compuestos de vanadio es la

producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y de radicales libres (RL) que actúan como segundos mensajeros en las cascadas de señalización, dañan al ADN y a otros blancos celulares (Leopardi *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2001, Cortizo *et al.* 2000, Wang *et al.* 2003a, Sorensen *et al.* 2005, Valko *et al.* 2006). Además de la formación de ERO's y de RL, se sabe que el vanadio, tiene gran parecido con el fosfato y debido a ello, puede inhibir o activar a varias proteínas, así como detener el ciclo celular (Mukherjee *et al.* 2004).

8.2.2. Estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son especies químicas que son generadoras, o resultan de la reducción o metabolismo de los radicales libres (RL) y que se comportan como oxidantes como: el peróxido de hidrógeno, el singlete de oxígeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito, los hidroperóxidos y los metabolitos epóxido (Venereo-Gutiérrez 2002, Chihuailaf *et al.* 2002, Sen y Packer 1996, Hazra *et al.* 2002).

Un radical libre (RL) es definido como cualquier especie química que posee uno o más electrones desapareados (un número impar de electrones) girando en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración es electroquímicamente inestable, lo cual le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva de corta vida y capaz de modificar y atacar todos los principales constituyentes celulares (Halliwell y Gutteridge 1984, Chihuailaf *et al.* 2002, Prokai-Tatrai *et al.* 2008, Galaris y Evangelou 2002). Entre los radicales libres encontramos al anión superóxido, el radical hidroxilo, óxido nítrico, así como derivados de compuestos orgánicos (peroxilo y alcoxilo).

En los organismos las ERO's y RL tienen origen endógeno y su producción se localiza en tres fuentes claramente definidas:

- a) En la respiración celular: la cual es la principal fuente de RL y ERO's. Las mitocondrias consumen oxígeno molecular y lo reducen secuencialmente hasta producir agua, una pequeña fracción del oxígeno se metaboliza vía reducción univalente y los inevitables productos intermedios de esta reacción son el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido y el radical hidroxilo; se calcula que aproximadamente la mitocondria genera 2–3 nmol de superóxido/minuto por mg de proteína (Chihuailaf *et al.* 2002, Alberts 2002).
- b) Los peroxisomas que contienen acil coA oxidasa, dopamina β-hidroxilasa y urato oxidasa generan peróxido de hidrógeno como producto intermedio (Chihuailaf *et al.* 2002, Roche y Romero-Alvira 1996).
- c) Los fagocitos (monocitos, neutrófilos y macrófagos) destruyen células infectadas con bacterias o virus, con una descarga oxidante compuesta básicamente por el peróxido de hidrógeno, hipoclorito, óxido nítrico y anión superóxido (Chihuailaf *et al.* 2002, Roche y Romero-Alvira 1996, Hüttemann *et al.* 2007, Valko *et al.* 2006).

Sin embargo cuando hay un exceso de ERO's, en los sistemas biológicos, puede haber un desequilibrio entre los factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes, encargados de eliminar dichas especies químicas, a lo cual se le conoce como "estrés oxidante" (Venereo-Gutiérrez 2002, Mendoza-Núñez *et al.* 1999). Esto provoca diversos efectos nocivos en la supervivencia celular y tisular como son: la peroxidación de lípidos, interacción con macromoléculas como el ADN, y la inducción de apoptosis (Ghio *et al.* 2002, Goc 2006, Gregg *et al.* 2000, Chihuailaf *et al.* 2002, Slamenova *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2001, Mendoza-Núñez *et al.* 1999).

Aunado a la formación normal de los organismos de ERO's y de RL, se sabe que el vanadato V(V) para entrar al núcleo celular, se reduce a vanadil V(IV), esta reducción lleva a la formación de aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), al interaccionar estas moléculas con el V(IV) generan radicales hidroxilo ($OH\cdot$) (Zhang *et al.* 2001, Leopardi *et al.* 2005), esto a través de reacciones de tipo Fenton ($Metal^{n-1+} + H_2O_2 \rightarrow Metal + \cdot OH + OH$) (Halliwell y Gutteridge 1984) o por la bio-reducción del vanadato mediada por el glutatión, flavoenzimas o NAD(P)H (Gándara *et al.* 2005, Sorensen *et al.* 2005, Aust *et al.* 2002). Los primeros daños que generan las ERO's y RL en el núcleo son la oxidación de bases de ADN y rompimientos de cadena sencilla del ADN (Leopardi *et al.* 2005, Stemmler y Burrows 2001).

8.2.3. Actividad genotóxica de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y radicales libres (RL).

Se sabe que las ERO's pueden alterar la transducción de señales en las cascadas de señalización intracelulares, así como alterar la homeostasis del calcio, aunado a lo anterior, se sabe que el aumento de ERO's en los sistemas biológicos provoca un constante estrés oxidante en las células, lo cual ha sido relacionado con la prevalencia de varios tipos de cáncer (Valko *et al.* 2006, Roche y Romero-Alvira 1996).

Por otro lado las alteraciones más frecuentes observadas en el ADN por los RL son: la hidrólisis de la cadena de ADN que involucra la hendidura en el fosfodiéster generando fragmentos de ADN que subsecuentemente pueden ser relegados, oxidaciones de la desoxiribosa por la eliminación de hidrógenos o oxidación de las nucleobases (Noutsopoulos *et al.* 2007, Nakamura *et al.* 2003).

Se ha reportado que los radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y los radicales superóxido (O_2^-) provocan reducción de los azúcares por la eliminación de hidrógenos, lo cual lleva a la escisión del ADN; las alteraciones por radicales peróxido son: el incremento de los niveles de fragmentación y modificaciones oxidantes de las bases púricas y pirimidínicas (Rao *et al.* 2008, Borrás-Blasco 2003). Las oxidaciones no sólo tienen repercusión por sus efectos mutagénicos (apareamientos de bases incorrectos o presencia de bases no codificadoras), sino también por sus efectos en la estructura tridimensional del ADN (imposibilidad de emparejamientos entre las bases y de

interacción con las histonas) así como transcripción y replicación defectuosas (Roche y Romero-Alvira 1996).

Entre los productos formados a consecuencia del ataque de radicales libres a las bases púricas y pirimidícas del ADN son: 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxicitosina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina, 5-hidroxiuracil, timina glicol y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (Nzengue *et al.* 2008, Borrás-Blasco 2003, Sorensen *et al.* 2005).

Dentro de las alteraciones oxidantes de las bases púricas conviene señalar que la guanina es la más susceptible a la oxidación, formando como producto la 8-hidroxiguanina (8-oxoG), que es la alteración con mayor frecuencia observada y su importancia reside en su alto efecto mutagénico y carcinogénico, ya que la 8-oxoG durante la replicación del ADN, se aparea con adenina en vez de hacerlo con citosina. Actualmente, se utiliza como un efectivo biomarcador de daño oxidante al ADN (Nzengue *et al.* 2008, Rao *et al.* 2008, Sorensen *et al.* 2005, Noutsopoulos *et al.* 2007, Valko *et al.* 2006). Estudios *in vitro* muestran que la incubación con vanadil y 2-deoxiguanosina o el ADN en presencia de H₂O₂, generan aumento en la formación de 8-oxoG, así como rompimientos de cadena de ADN (Valko *et al.* 2005).

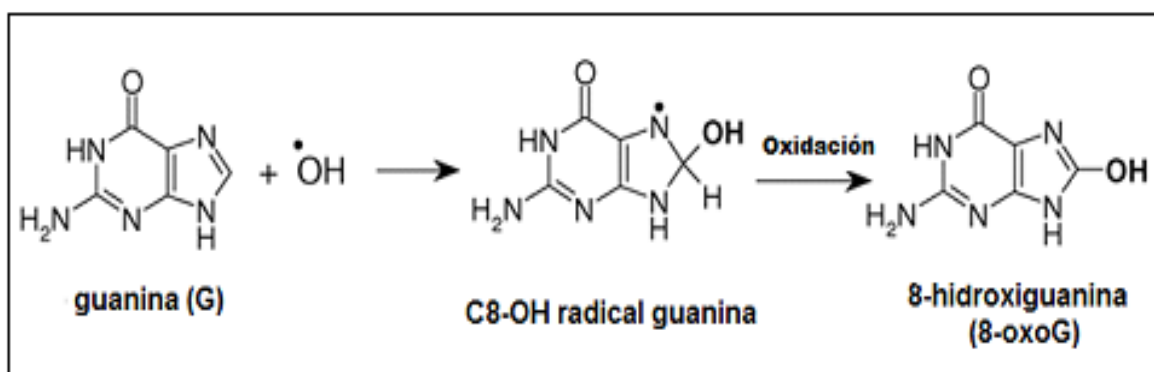


Fig.13 Reacción de la guanina con un radical hidroxilo formando la 8-hidroxiguanina.

(Modificado de Valko *et al.* 2006)

Las formamidopirimidinas se forman por la ruptura del anillo de imidazol de la purina dando lugar a la presencia de sitios apurínicos dentro de la molécula de ADN. Estos sitios apurínicos bloquean la actividad de la ADN polimerasa, impidiendo la replicación del ADN. Finalmente, los desoxirribonucleósidos de 8,5' ciclopurina producen distorsiones en la hélice de ADN por la presencia de dímeros de purina intracatenarios dificultando, por consiguiente, el empaquetamiento correcto y la replicación del ADN (Roche y Romero-Alvira 1996, Borrás-Blasco 2003, Hazra *et al.* 2002).

Dentro de las alteraciones de las pirimidinas, cabe señalar, la saturación de los anillos de pirimidina que incluyen a los glicoles de timina y citosina y los hidratos de pirimidina. Estas alteraciones se

caracterizan por la pérdida de la estructura planar del anillo, por lo que las bases afectadas son incapaces de aparearse correctamente con sus complementarias en la hebra opuesta, facilitando finalmente la fragmentación del ADN (Roche y Romero-Alvira 1996). Entre las lesiones a las pirimidinas (citocinas) se encuentran 5,6 dihidrouracil (DHU) y 5-hidroxiuracil (5-OHU).

La genotoxicidad de los RL radica en la interacción con el ADN, lo que provoca lesiones en las bases y rompimientos de cadena. En la células estos tipos de lesiones se reparan principalmente por la escisión de bases (BER), con una batería de enzimas de reparación del ADN como las ADN glicosilasas/ AP endonucleasas (Hazra *et al.* 2002, Mitra *et al.* 2002). Algunos estudios reportan que el estrés oxidante puede dañar a las enzimas de reparación. Respecto a este punto, se sabe que bajo condiciones normales de daño oxidante al ADN, este es rápidamente reparado, en unas pocas horas o unos minutos. En primer lugar las glicosilasas son las encargadas de reconocer y escindir las bases modificadas del ADN, formando sitios apurínicos y apirimidínicos (AP), lo cual lleva a la ruptura del ADN, posteriormente la AP-endonucleasa incorpora una nueva base en los sitios AP. La reparación es completada por la acción de la ADN polimerasa β y una ligasa (Galaris y Evangelou 2002, Alberts *et al.* 2002, Dally y Hartwing 1997, Nakamura *et al.* 2003, Mitra *et al.* 2002).

Se sabe que las enzimas de reparación del ADN pueden ser inhibidas por una diversidad de metales como: cromo, cadmio, níquel, cobalto y arsénico. La interacción de los iones de los metales, con las enzimas de reparación, puede ser debido a diversos mecanismos como a) estar directamente ligado con la formación de radicales libres, b) por la sustitución de otros metales en la conformación original de las enzimas reparadoras o c) estar directamente relacionado con un bajo nivel de GSH, esta molécula es de suma importancia ya que puede revertir la inhibición de las enzimas de reparación en muchos casos (Galaris y Evangelou 2002, Dally y Hartwing 1997).

Por otro lado se ha reportado que diferentes metales como cobre, níquel, cobalto, cadmio y hierro son capaces de sustituir al zinc, que forma parte de la estructura de las enzimas reparadoras y provocar, un decremento de las actividades de reparación del ADN, incrementando los niveles de modificaciones en el ADN y consecuentemente a la progresión de procesos como la carcinogénesis. Esto se ha observado en p53 y en el receptor de estrógenos, en ambas proteínas la sustitución del zinc por otros metales, lleva a modificaciones estructurales y a un mal funcionamiento de las proteínas (Galaris y Evangelou 2002).

Por otra parte metales como el Níquel (II) y el Cadmio (II) inhiben la escisión de nucleótidos (NER), por medio de la interacción de estos metales con DNA y las proteínas reparación, además se ha observado que el Arsénico (III) inhibe la escisión y la unión de nucleótidos y el cobalto (II) inhibe la escisión así como la polimerización de nucleótidos (Hartwig 1998).

Por todo lo anterior, es posible que el vanadio actué formando ERO's y RL que pueden llevar a un constante estrés oxidante, e influir en los sistemas biológicos afectando directamente al ADN o

inhibiendo las enzimas de reparación del ADN y provocar que en nuestros resultados observemos rompimientos de cadena sencilla en el ADN.

8.2.4. Otros posibles mecanismos de genotoxicidad del vanadio

Nuestros resultados muestran rompimientos de cadena sencilla en el ADN en células de médula ósea y esto puede ser debido a la interacción de las ERO's y los RL con el ADN ó debido a otros mecanismos reportados de acción del vanadio como: inhibición y activación de diversas enzimas, proteínas y genes del metabolismo celular, debido a la preferencia por los grupos fosfato (por la similitud en estructura VO_4^{3-} , PO_4^{3-}) (Sabbioni *et al.* 1993, Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006). Estos múltiples mecanismos de acción del vanadio, son tomados en cuenta, para una mejor comprensión de las diversas formas en las que el vanadio puede provocar daño al ADN.

Se sabe que el vanadio inhibe a los grupos tioles de la enzima calcio ATPasa encargada de mantener el gradiente de iones Ca^{2+} . Esto es de suma importancia, ya que el contenido intracelular de este ión es habitualmente diez mil veces menor en comparación con su concentración extracelular, y cualquier perturbación que afecte su transporte altera significativamente la función celular y cuando ello ocurre, se pierde la actividad catalítica de la enzima y se modifica de esta manera la homeostasis del Ca^{2+} ; el incremento en la concentración intracelular de calcio estimula la activación de proteasas, que atacan el citoesqueleto, y de nucleasas que fragmentan el ADN (Chihuailaf *et al.* 2002, Touyz 2005, Roche y Romero-Alvira 1996, Galaris y Evangelou 2002).

Se ha reportado que las formas pentavalentes de vanadio induce la inhibición de las proteínas tirosinas fosfatasas (PTP) oxidando sus sitios activos (cisteínas), produciendo intermediarios del ácido sulfónico que reaccionan con los grupos tioles de forma catalítica inactivando PTP disulfuros, dirigiendo a la célula a la ruta Bcl-2 de muerte celular, en la cual hay una reducción del potencial transmembranal de la mitocondria, así como una liberación de citocromo c y la activación de las caspasas 3, 8 y 9 que llevan a cabo la fragmentación del ADN cromosómico (Hegner *et al.* 1999, Valko *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2002).

Dada la importancia de mantener el ADN intacto y sin daños de una generación a la siguiente, las células disponen de mecanismos que les ayuda a responder a las alteraciones del ADN: retrasan la progresión del ciclo celular hasta completar la reparación del ADN (Alberts *et al.* 2002). Se ha observado que el vanadato puede provocar arresto al ciclo celular, estudios de Zhang y cols. (2002), muestran que el vanadato es capaz de producir arresto celular en la fase S en células C141 epidermales de ratón y estar involucrado p53. La activación de p53 lleva al incremento de la expresión de p21, lo cual resulta en una pausa en el ciclo celular.

El mecanismo por el cual el vanadato genera arresto celular tiene que ser investigado, pero aún así, se sabe que las ERO's generan reacciones que causan daño al ADN, lo que podría activar

cascadas de señalización como la activación MAP cinasas incrementando la fosforilación de p53 (Zhang *et al.* 2001, Valko *et al.* 2005).

Las diferencias en las fases de arresto celular inducido por el vanadato posiblemente dependen de la línea celular que se emplee. Ya que otros estudios realizados en cultivos celulares epiteliales de pulmón, el arresto celular se presenta en la fase G₂/M (Zhang *et al.* 2001).

La pausa en el ciclo celular es de gran importancia, para llevar a cabo la reparación del ADN por medio de una batería de enzimas que escinden la cadena, retiran los fragmentos dañados, los sustituyen y unen nuevamente la cadena. La reparación del ADN requiere tiempo y esto podría ser, una posible explicación del porque observamos rompimientos de cadena sencilla en ADN.

9. Diferencias entre géneros.

Se realizó una evaluación entre géneros expuestos a V_2O_5 , ya que varios autores señalan una respuesta diferencial entre machos y hembras (Vahter *et al.* 2007, Mussali *et al.* 2005a, Fortoul *et al.* 2005) y los resultados obtenidos fueron positivos, encontrando diferencias significativas entre géneros, ya que los machos presentan un incremento en el porcentaje de células dañadas durante todo el tratamiento (4 semanas) y las hembras presentan un incremento en el porcentaje de células dañadas hasta la segunda semana, después en la tercera y cuarta semana se observa un decremento significativo en el porcentaje de células dañadas con respecto al grupo de machos.

Algunos estudios indican una diferencia significativa entre machos y hembras al ser expuestos a diferentes metales tóxicos así como en el modo de acción de los metales, cinética y la susceptibilidad que presenta cada género (Vahter *et al.* 2007).

Se sugiere que las hormonas sexuales (estrógenos y testosterona) juegan un papel importante en la respuesta de cada género, se ha propuesto que además de las funciones fisiológicas ya conocidas de los estrógenos, como: el desarrollo de características sexuales secundarias, regulación de la síntesis de lipoproteínas, estimulación de proteínas antiapoptóticas, prevención de la atrofia urogenital y el mantenimiento de las funciones cognitivas, los estrógenos estimulan rutas de señalización de protección contra agentes nocivos, teniendo propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes, lo cual le confiere a las hembras una ventaja sobre los machos (Mussali *et al.* 2005a, Fortoul *et al.* 2005, Sur *et al.* 2003, Wang *et al.* 2003b).

9.1. Los estrógenos como citoprotectores

Los estrógenos son sintetizados a partir del colesterol mediante una serie de reacciones que ocurren principalmente en la zona parafolicular de los ovarios y está controlado mediante una retroalimentación negativa del eje hipotálamo- hipófisis- gónada (Abraham y Staffurth 2007).

El estrógeno natural más potente en los humanos es el 17β - estradiol, seguido por la estrona y el estriol, cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo A fenólico (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D; el anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos. Los estrógenos esteroideos se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos, la reacción comprende aromatización del anillo A, y ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de enzima monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos (Borras-Blasco 2003).

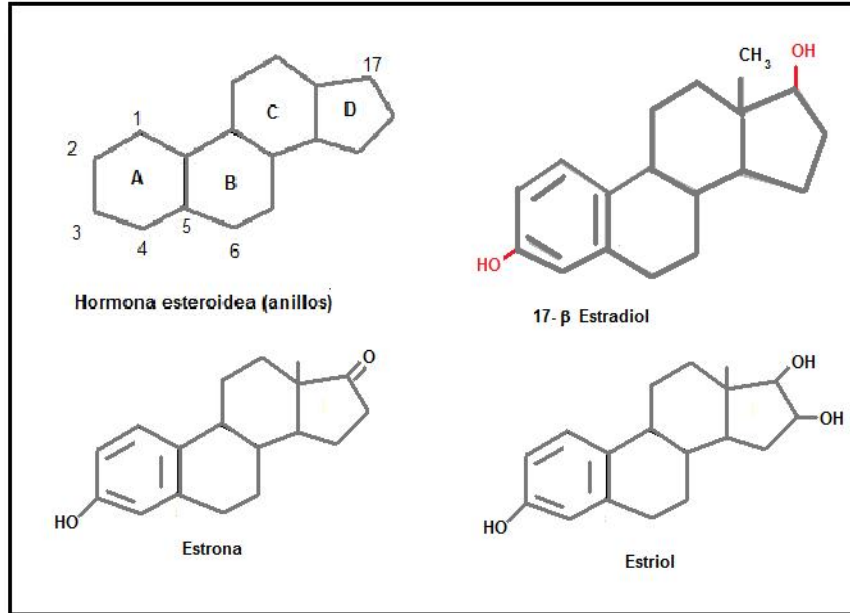


Fig.14 Estructura molecular de los estrógenos 17 β - estradiol, estrona y estriol. El grupo 3-OH en el anillo A grupo necesario con actividad protectora contra RL. (Modificado de Behl *et al.* 1997).

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos, el principal producto secretado es el estradiol sintetizado por células de la granulosa a partir de precursores androgénicos, proporcionados por células de la teca, el estradiol secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol (Laplante *et al.* 2008).

Se han propuesto varias formas de acción de los estrógenos contra los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno como:

a) Se cree que el efecto antioxidante de los estrógenos es debido al 17- β -estradiol y algunos derivados del estradiol que pueden prevenir la acumulación intracelular del peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, esto debido a su anillo fenólico A y al grupo hidroxilo en el carbono 3, confiriendo efectos antioxidantes propios, que hormonas como la progesterona y la testosterona no tienen; sin embargo no se sabe el modo exacto de acción. Se sugiere que los estrógenos actúan fragmentando el H₂O₂ previniendo la formación de RL, elevando la supervivencia celular (Sur *et al.* 2003, Behl *et al.* 1997, Prokai-Tatrai *et al.* 2008, Ruiz-Sanz *et al.* 2007, Mann *et al.* 2007, Badeau *et al.* 2005). Algunos autores como Prokai-Tatrai y cols. 2008, así como Badeau y cols. 2005 sugieren que el radical oxi del fenol causa interrupción de las reacciones en cadena de los RL, donando un átomo de hidrógeno del fenol a los radicales \cdot OH en soluciones acuosas y así el reciclamiento de fenol reducido se lleva a cabo por moléculas intracelulares como el ascorbato y tioles.

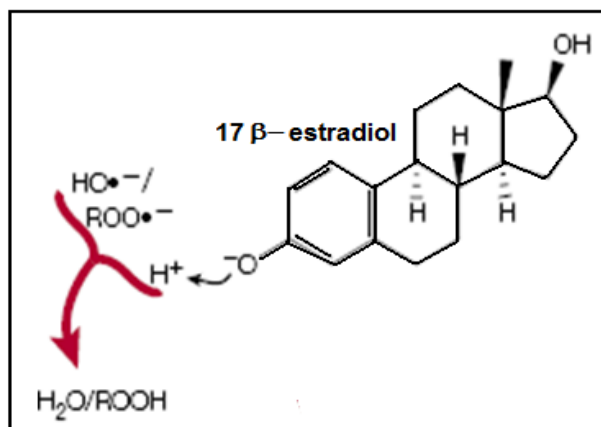


Fig. 15 Posible acción del 17 β - estradiol por su estructura química contra los radicales libres. El anillo A fenólico con su grupo hidroxilo en el carbono tres, dona su átomo de hidrógeno al radical hidroxilo. (Modificado de Behl 2002).

Algunos estudios como los realizados por Wang y cols. (2003b) indican que el estradiol a concentraciones fisiológicas, puede funcionar como antioxidante ya que el tratamiento con estrógenos, reduce la peroxidación de lípidos y atenúa la producción de peróxido de hidrogeno, producido en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria.

Además Mann y cols. (2007) han reportado 17 β -estradiol y moléculas similares (17 α -estradiol, 17 α -etinilestradiol; 10 nM) que contienen C3-OH en la mitad el anillo A (estructura que se presume que tiene los efectos contra los radicales libres) comparado con moléculas sin C3-OH (Mestranol and Quinestrol; 10 nM) encontraron que los primeros tenían actividad antiapóptótica en osteocitos *in vitro*. Además de encontrarse que el 17 β - estradiol y las moléculas similares eran capaces de bloquear las especies reactivas de oxigeno (ERO's que generaba las células a través de H₂O₂) mientras que el Mestranol y Quinestrol no mostraron ese efecto.

b) Otra posible forma de acción de los estrógenos es: según los resultados de Borrás-Blasco (2003) se sugiere que el estradiol tiene un efecto antioxidante, no relacionado con su estructura química sino por su actividad hormonal, posiblemente inductora de la expresión de enzimas, activando la expresión de genes de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa.

Actualmente se sabe que los estrógenos inducen la transcripción de varios genes como: transcripción factores de crecimiento, proteínas antiapópticas, previene el aumento de calcio intracelular e interfiere con las caspasas (inhibiéndolas directamente o interaccionando con señales antiapópticas). Esto a través de dos mecanismo a) la unión con sus receptores lo que provoca cambios conformacionales del receptor y por último transcribiendo diferentes tipos de genes, o b) interaccionando con su receptor en el citosol y posteriormente desencadenando cascadas de señalización que lleva a la activación de diversos genes (Behl 2002).

Por lo tanto, es posible que las hembras adultas presenten una menor proporción de células dañadas con respecto a los machos, debido a la presencia de estrógenos, a los cuales se les atribuye un efecto antioxidante.

10. ¿Por qué es importante el daño genotóxico en las células de médula ósea?

Como se menciona anteriormente la médula ósea es un tejido de suma importancia. En este tejido se lleva a cabo la hematopoyesis. En este proceso, una población de células madre hematopoyéticas pluripotenciales da origen a células progenitoras que proliferan y maduran hacia los diferentes linajes sanguíneos (Montesinos y Mayani 2002). Este tejido se encuentra continuamente generando nuevas células, un ejemplo de ello es la producción de eritrocitos y leucocitos neutrófilos: se sabe que genera 2.5×10^{11} de los primeros y 10^3 de los segundos. Por otro lado, en la médula ósea se lleva a cabo gran parte del proceso de maduración de los precursores de los linfocitos B y T.

Existen diferentes tipos celulares que se encuentran en la médula ósea, entre ellos: a) Células madre hematopoyéticas pluripotenciales (CSHP), capaces de autorrenovarse y originar las células de los distintos linajes sanguíneos, b) Células progenitoras (CPH), incapaces de autorrenovarse. Éstas pueden ser pluri, bi o monopotentes, c) Células precursoras de los diferentes linajes linfóide y mielóide, d) Células maduras que serán posteriormente liberadas al torrente sanguíneo y que representan el último estadio de diferenciación de los elementos hematopoyéticos (Alvarado-Moreno y Mayani 2007).

Por todo lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo indican que los rompimientos de cadena sencilla en células de médula ósea, revisten gran importancia; ya que de ser persistente el daño, este podría afectar la viabilidad y supervivencia de los distintos tipos celulares que se encuentran en la médula ósea, así como la producción y diferenciación del linaje linfóide y mielóide, además de generar daño permanente en este tejido vital, lo cual podría tener repercusiones desfavorables en la homeostasis del organismo.

11. Conclusiones

- ❖ El pentóxido de vanadio por vía inhalada mostró tener actividad genotóxica y generar rompimientos de cadena sencilla en el ADN, en células de médula ósea, esto puede ser debido a la formación de especies reactivas de oxígeno y/o a los radicales libres que se producen durante el metabolismo de este compuesto. O a la interacción intracelular del pentóxido de vanadio con enzimas, proteínas y factores de transcripción.

- ❖ Hay diferencias significativas entre el grupo de hembras y machos expuestos al mismo tratamiento, encontrándose que en el grupo de hembras en la tercera y cuarta semana, se observa un decremento significativo del porcentaje de células que presentan daño. Y en el grupo de los machos se encontró un aumento gradual del porcentaje de células con daño durante todo el tratamiento. Esto puede ser debido al papel que desempeñan los estrógenos como un agente antioxidante, debido a su estructura química característica, que no poseen moléculas como la testosterona y progesterona.

- ❖ Los grupos controles muestran durante todo el tratamiento un porcentaje de células con daño relativamente alto, pero menor que los grupos tratados. Esto se puede deber a que la médula ósea es un órgano que constantemente se encuentra generando nuevas células, por lo que frecuentemente se encuentra replicando su ADN y generando fragmentos de ADN (fragmentos de okazaki).

- ❖ La importancia de este trabajo radica en que los resultados encontrados se observa un daño temprano en el ADN y esto puede tener implicaciones graves de continuar con un daño constante en el ADN, debido a que la médula ósea es el principal órgano de producción del linaje linfocítico y mielocítico y esto puede tener implicaciones biológicas adversas en el organismo.

- ❖ Además debido a que la ZMVM es una zona densamente poblada con altos niveles de contaminación, a los que estamos expuestos diariamente todos los habitantes de la ciudad, es importante la evaluación del potencial genotóxico del pentóxido de vanadio en las células de médula ósea, como una evidencia más de los efectos sobre la salud de los contaminantes atmosféricos.

11.1 Perspectivas

- Identificar si hay subpoblaciones en la médula ósea que presentan mayor susceptibilidad al daño por la inhalación del V₂O₅.
- Determinar la generación de ERO's y RL así como identificar los diferentes tipos de daño que el V₂O₅ causa en el ADN. Así como identificar si hay daño en las enzimas de reparación del ADN.
- Determinar si los estrógenos están implicados en la respuesta diferencial entre hembras y machos.

12. Referencias

- Abraham J, Staffurth J. **Hormonal therapy for cáncer.** 2007; *Systemic Therapy*. 36(1): 29-32.
- Alberts B. **Biología molecular de la célula.** Barcelona. 2002. 1350pp.
- Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Bonner C. J, Clifford Murray J, Rosas I, Ponce de León Rosales S, Osornio-Vargas R. **Biologic Effects Induced *in Vitro* by PM10 from Three Different Zones of México City.** 2002; *Environ Health Perspec*. 110: 715–720.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Álvarez-Barrera L, Molina B, Rojas E. **Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues.** 1999; *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 19:243-255.
- Altamirano-Lozano M, Álvarez-Barrera L, Roldán-Reyes E. **Cytogenic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice.** 1993; *Medical science research*. 21(19): 711-713.
- Alvarado-Moreno J, Mayani H. **El ciclo celular y su papel en la biología de las células progenitoras hematopoyéticas. Artículo de revisión.** 2007; *Gaceta Médica Mexicana* 143(2): 149-161.
- Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty J.S, Smith K.R, Straccia A. M, Veranth JM. **Particle characteristics responsables for effects on human lung epithelial cell.** 2002; *Research Repeport Health Effects Institute*. (110)1-65.
- Barceloux D. **Vanadium.** 1999; *Clinical Toxicology*.37(2): 265–278.

- Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen J. M. **Estrogen A-ring structure and antioxidative effect on lipoproteins.** 2005; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 96:271–278.
- Behl C. **Oestrogen as a neuroprotective hormone.** 2002; *Nature Reviews*. 3:433-442.
- Behl C, Skutella F, Lezoualc'h P.A, Widmann M, Newton J. C, Holsboer F. **Neuroprotection against Oxidative Stress by Estrogens: Structure-Activity Relationship.** 1997; *Molecular Pharmacology*. 51:535–541.
- Borja-Aburto V, Castillejos MR, Gold D, Bierzwinski S, Loomis D. **Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico city, 1993-1995.** 1998; *Environ Health Perspectives*. 106:849-855.
- Borrás-Blasco C. 2003. **Importancia del estrés oxidativo en la diferencia de longevidad entre machos y hembras.** Tesis de doctorado. Departamento de fisiología-Departamento de inorgánica. Universidad de Valencia. 1-343pp.
- Brauer M, Ávila-Casado C, Fortoul T, Vedal S, Stevens B, Churg A. **Air Pollution and Retained Particles in the Lung.** 2001; *Environ Health Perspectives*. 109:1039-1043.
- Case P.C, Langkamer G.V, James C, Palmer R.M, Kemp J.A, Heap F.P, Solomon L. **Widespread dissemination of metal debris from implants.** 1994; *Journal Bone Joint Surg*. 76-B: 701-712.
- Celsi F, Ferri A, Casciati A, D'Ambrosi N, Rotilio G, Costa A, Volonté C, Carrí T. M. **Overexpression of superoxide dismutase 1 protects against β -amyloid peptide toxicity: effect of estrogen and copper chelators.** 2004; *Neurochemistry International*. 44: 25–33.

- Chihuailaf H.R, Contreras A.P, Wittwer G.F. **Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. Artículo de revisión.** 2002; *Veterinaria México*. 33(3): 266-281.
- Choi Jiin-Hyuk, Kim Jun-Sung, Young-Chui K, Yoon-Shin K, Nam-Hyun C, Myung- Haing C. **Comparative study of PM2.5- and PM10- induced oxidative stress in rat lung epithelial cells.** 2004; *Journal of veterinary Science*. 5(1):11-18.
- Churg A, Brauer M, Avila-Casado M.C, Fortoul I.T, Wright L.J. **Chronic Exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling.** 2003; *Environmental Health Perspectives*. 111(5):714-718.
- Coen N, Mothersill C, Kadhim M, Wright E.G. **Heavy metals of relevance to human health induce genomic instability.** 2001; *Journal Pathology*.195: 293–299.
- Costa D, L. Dreher K. **Bioavailable Transition Metals in Particulate Matter Mediate Cardiopulmonary Injury in Healthy and Compromised Animal Models.** 1997;*Environmental Health Perspectives*. 105 (5):1053-1060.
- Costigan M, Cary R. **Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds.** 2001;*World Health Organization Geneva*.
- Cortizo A, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry S. **A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** 2000;*Toxicology*. 89-99.
- Dally H, Hartwig A. **Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells.** 1997; *Carcinogenesis*.18(5):1021–1026.
- Ding M, Li JJ, Leonard S, Ye JP, Shi X, Colburn H.N, Castranova V, Vallyathan V. **Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species.** 1999; *Carcinogenesis*. 20(4):663–668.

- Englert N. **Fine particles and human health-a review of epidemiological studies.** 2004; *Toxicology Letters*. 149: 235-242.
- Etcheverry B.S, Williams P, Salice C.V, Barrio A.D, Ferrer G.E, Cortizo M.A. **Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl (IV)-aspirin complex on bone cell lines culture.** 2002; *BioMetals*. 15: 37-49.
- Fernandez Art, Wendt J, Wolski N, Hein R.G.K, Wang S, Witten M. **Inhalation health effects on fine particles from the co- combustion of coal and refuse derived fuel.** 2003; *Chemosphere*. 51(10):1129-1137.
- Fortoul T.I, Moncada-Hernández S, Saldivar-Osorio L, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Ávila-Casado MC, Colín-Barenque L, Hernández-Serrato I.M, Ávila-Costa R.M. **Sex differences in bronchiolar epithelium response after the inhalation of lead acetate (Pb).** 2005; *Toxicology*. 207(2): 323-330.
- Fortoul T.I, Valverde M, López M. C, Avila-Costa M.R, Avila-Casado M.C, Mussali-Galante P, Gonzalez-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Shejet P. **Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area.** 2004; *Environmental Research*. 94(3): 243-248.
- Fortoul T.I, Quan-Torres A, Sanchez I, Irma L.E, Bizarro P. **Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1980s.** 2002; *Archives of Environmental Health*. 57(5):1-4.
- Galaris D, Evangelou A. **The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogénesis.** 2002; *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 42:93–103.
- Gándara R.M.C, Soares S.S, Martins H, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M. **Vanadate oligomers: in vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers.** 2005; *Journal of Inorganic Biochemistry*. 99(5):1238-1244.

- Guevara-García J. **Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio.** 1996; *Profesores al día.* 185-189.
- Ghio Andrew, Silbajoris R, Carson L.J, Samet M.J. **Biological Effects of Oil Fly Ash. Reviews.** 2002; *Environmental Health Perspectives.* 110:89-94.
- Goc A. **Biological activity of vanadium compounds.** 2006; Review in *Central European Journal of Biology.* 1(3) 314-332.
- González G. **Calidad del aire en las principales ciudades de México.** *Instituto Nacional de Ecología.* México, 2000; Subdirectora de Modelos y Calidad del Aire. Dirección General de Gestión e Información Ambiental.
- González-Villalva A, Fortoul T.I, Ávila- Costa M, Piñon-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Bizarro P, Mussali- Galante P. **Trombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V₂O₅ Inhalation.** 2006; *Toxicology and Industrial Health.* 22: 110-116.
- González-Villalva A. 2004. **Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcronica y crónica de vanadio en médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón.** Tesis de maestría. UNAM. 44pp.
- Gregg A.L.M, Araújo M.C.P, D'Arc C, Darin J, Bianchi M.L.P. **Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells.** 2000; *Mutation Research.* 465:131–137.
- Halliwell B, Gutteridge J. **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Review.** 1984; *Biochemical Journal* 219: 1-14.

- Hartwig A. **Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition.** 1998; *Toxicology Letters*. 235-239.
- Hazra T, Izumi T, Boldogh I, Imhoff B, Kow Y, Jaruga P, Dizdaroglu M, Mitra S. **Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA.** 2002; *Journal PNAS*. 99(6): 3523-3528.
- Hellman B, Vaghef H, Boström B. **The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay.** 1995; *Mutation Research*. 336:123-131.
- Hehner S.P, Hofmann T.G, DroÈge W, Lienhard S.M. **Inhibition of tyrosine phosphatases induces apoptosis independent from the CD95 system.** 1999; *Cell Death and Differentiation*. 6:833- 841.
- Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan J.W. **Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling.** 2007; *Biochimica et Biophysica Acta*. 1773: 1701–1720.
- Ieradi L.A, Cristaldi M, Mascanzoni D, Cardarelli E, Grossi R, Campanella L, **Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution.** 1996; *Environmental Pollution*. 92(3):323-328.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) 2006. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Cobalt in hard-metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide.** Lyon. Vol.86.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger H. **Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure.** 2002; *Mutation research*. 519:25-35.
- Katsouyanni K. **Ambient air pollution and health.** 2003; *British Medical Bulletin*. 68,1;143-156.

- Kasamatsu T, Kohda K, Kawazoe Y. **Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay.** 1996; *Mutation Research*. 369: 1-6.
- Kleinsasser H, Dirschedl P, Staudenmaier R, Harreus U, Wallner B. **Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract.** 2003; *International Journal of Environmental Health Research*. 373-379.
- Lacasaña-Navarro M, Aguilar-Garduño C, Romieu I. **Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres mega-ciudades de América Latina.** 1999; *Salud Pública México*. 41:203-215.
- Laplante Y, Cadot C, Fournier A.M, Poirier D. **Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1, 17b-hydroxysteroid dehydrogenase: Blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone.** 2008; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 3-12.
- Leopardi P, Villani P, Codelli E, Siniscalchi E, Veschetti E, Crebelli R. **Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure.** 2005; *Toxicology Letters*. 158:39–49.
- Mann V, Huber C, Kogianni G, Collins F, Noble B. **The antioxidant effect of estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the inhibition of osteocyte apoptosis in vitro.** 2007; *Bone*. 40: 674–684.
- McKay GC, Macnair R, MacDonald C, Grant MH. **Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line.** 1996; *Biomaterials*. 17:1339-1344.
- McNamee J.P, McLean J.R.N, Ferrarotto C.L, Bellier P.V. **Comet assay: rapid processing of multiple samples.** 2000; *Mutation Research*. 466:63–69.

- Mercado J. 2006. **Estudios de los efectos inducidos In Vitro por tres óxidos de vanadio a nivel celular y sobre el ADN.** Tesis de doctorado en ciencias biológicas. UNAM. Facultad de estudios superiores Zaragoza.
- Mendoza-Núñez M. V, Retana-Ugalde R, Sánchez-Rodríguez A.M, Altamirano-Lozano A.M. **DNA damage in lymphocytes of elderly patients in relation with total antioxidant levels.** 1999; *Mechanisms of Ageing and Development.* 108: 9–23.
- Mitra S, Izumi T, Boldogh I, Bhakat K. K, Hill W. J, Hazra K. T. **Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. Serial Review: Oxidative DNA Damage and Repair.** 2002; *Free Radical Biology & Medicine.* 33(1):15–28.
- Molina MJ, Molina LT. **Megacities and atmospheric pollution.** 2004; *Air and Waste Manage Association.* 54: 644-680.
- Montesinos J, Mayani H. **Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. Artículo de revisión.** 2002; *Gaceta Médica Mexicana.* 138(1): 67-77.
- Morais S, Dias N, Sousa JP, Fernández MH, Carvalho GS. **In vitro osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metal ions.** 1999; *Journal Biomedical Materials Research.* 44:176-190.
- Morinville A, Maysinger D, Shaver A. **Vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling Review.** 1998; *Trends in pharmacological Sciences.* 19(11):452-460.
- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerje P, Tiwari A, Chatterjee M. **Vanadium- an element of atypical biological significance.** 2004; *Toxicology Letters.* 150:135-143.

- A) Mussali-Galante P, Ávila-Acosta, Piñon-Zarate G, Martínez-Levy G, Rodríguez-Lara V, Rojas-Lemus M, Ávila-Casado MC, Fortoul I. **DNA damage as an early biomarker of effect in human health.** 2005; *Toxicology and Industrial Health*. 155-166.
- B) Mussali-Galante P, Rodríguez-Lara V, Hernández-Tellez B, Ávila-Costa MR, Colin-Berenque L, Bizarro P, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Piñón-Zarate G, Saldivar-Osorio L, Diaz-Beck P, Herrera-Enriquez M, Tovar-Sanchez E, Fortoul T. **Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of Mouse testes at different exposure times.** 2005; *Toxicology and Industrial Health*. 21: 215-222.
- Nakamura J, Purvis R.E, Swenberg A.J. **Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells.** 2003; *Nucleic Acids Research*. 31(6):1790-1795.
- Nehéz M, Lorencz R, Dési I. **Simultaneous Action of Cypermethrin and Two Environmental Pollutant Metals, Cadmium and Lead, on Bone Marrow Cell Chromosomes of Rats in Subchronic Administration.** 2000; *Environmental Research*. 45B: 55-60.
- Nichols K. G, Puleo D.A. **Effect of metal ions on the formation and function of osteoclastic cells *in vitro*.** 1997; *Journal of Biomedical Materials Research*. 35:265–271.
- Nielsen F.H, y Uthus E.O. **The Essentiality of Metabolism of Vanadium.** En *Vanadium in Biological Systems*, N. Dennis Chasteen, Ed. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.1990. 5:1-225.
- Noutsopoulos D, Markopoulos G, Koliou M, Dova L, Vartholomatos G, Kolettas E, Tzavaras T. **Vanadium Induces VL30 Retrotransposition at an Unusually High Level: A Possible Carcinogenesis Mechanism.** 2007; *Journal Molecular Biology*. 374(1): 80–90.

- Nzengue Y, Steiman R, Garrel C, Lefévre E, Guiraud P. **Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium.** 2008; *Toxicology*. 243: 193–206.
- Opresko DM. **Toxicity summary for vanadium and vanadium compounds.** Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. 1991.
- Pacheco O.C. **La contaminación del aire de la Ciudad de México.** 1996; *Revista de Cultura Ecológica "ArcoRedes"*. 3(15).
- Piñon-Zarate G. 2005. **Alteraciones morfológicas de bazo secundarias a la inhalación aguda, subaguda, y crónica de pentóxido de vanadio. Modelo en ratón.** Tesis de licenciatura (Biologo)- UNAM. Facultad de Ciencias.
- Prieto-González A. **Normalización de la electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa).** 1999; *Revista Cubana Investigacion Biomedica*. 18(1):34-6.
- Prokai-Tatrai K, Perjesi P, Rivera-Portalatinc M.N, Simpkinsa W.J, Prokaic L. **Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative.** 2008; *Steroids* 73: 280–288.
- Pope III C. A. **Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk?.** 2000; *Environmental Health Perspectives*. 108(4): 713-723.
- Rao R, Patra K.A, Chetana P.R. **Synthesis, structure, DNA binding and oxidative cleavage activity of ternary (L-leucine/isoleucine) copper(II) complexes of heterocyclic bases.** 2008; *Polyhedron*. 27: 1343–1352.
- Ress N.B, Chou B.J, Renne R.A, Dill J.A, Miller R.A, Roycroft J.R, Hailey J.R, Haseman J.K, Bucher J.R. **Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice.** 2003; *Toxicology Science*. 74, 287–296.

- Rivero SO, Ponciano RG. **Riesgos ambientales para la salud en la Cd. México.** 1996; Puma (*Programa universitario de medio ambiente*) Ed. 46-56.
- Riveros-Rosas H, Pfeifer D.G, Lynam R.D, Pedroza J.L, Julián-Sánchez A, Canales O, Garfias J. **Personal exposure to elements in Mexico City Air.** 1997; *The science of the total environment.* 198(1):79-96.
- Roche E, Romero-Alvira D. **Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. Artículo de revisión.** 1996; *Medicina Clínica.* 106: 144-153.
- Rodríguez-Mercado J, Altamirano-Lozano M. **Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad.** 2006; *Revista Internacional Contaminación Ambiental.* 22(4):173-189.
- Romero P. M, Diego O.F, Álvarez T.M. **La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud.** 2006; *Revista Cubana Higiene y Epidemiología.* 44(2).
- Romero-Salcedo A. **The contribution of the Mexican environmental policies to the efficient solution of the problem of air pollution.** 2005; *LUMES: Lund University Master's Programme in Environmental Science.* 1-42.
- Rojas-Lemus M. 2006. **Pentóxido de vanadio y cloruro de manganeso: comparación de sus efectos genotóxicos en leucocitos: modelo murino de exposición por inhalación.** Tesis de licenciatura (Biólogo)-UNAM, Facultad de Ciencias. 44pp.
- Ruiz-Sanz J.I, Navarro R, Martínez R, Hernández M. L, Matorras R, Ruiz-Larrea B.M. **No effect of menstrual cycle on LDL oxidizability and particle size.** 2007; *Maturitas (the european menopause journal).* 57:253–260.

- Sabbioni E. Marafante E. **Relations between iron and vanadium metabolism. The exchange of vanadium between transferrin and ferritin.** 1981; *Journal Toxicol Environ Health.* 419-29.
- Sabbioni E. Pozzi G. **The intensity of vanadium (V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3T3 cells is dependent on glutathione mediates bio-reduction to vanadium.** 1993; *Carcinogenesis.* 2565-2568.
- Salinas V, Diego M.A, Porcado C.J. **Uso de crudo Maya despuntado como combustible alternativo al combustóleo.** 2001; *Tendencias Tecnológicas, Boletín IIE.* 126-130.
- Schuessel K, Leutner S, Cairns N.J, Müller W.E. Eckert A. **Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain.** 2004; *Journal of Neural Transmission.* 11(9):1167-1182.
- SEMARNAT, **Informe de la situación del medio ambiente en México: Inventario de emisiones en la ZMVM, México DF:** SEMARNAT, 2002.
- Sen C, Packer L. **Antioxidant and redox regulation of gene transcription.** 1996; *The FASEB Journal.* 10:709–720.
- Shi X, Jiang H, Maoa Y, Ye J, Saffiotti U. **Vanadium(IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage.** 1996; *Toxicology.* 106:27-38.
- Slamenova D, Gébelová A, Ruzeková L, Chalupa I, Horváthová E, Farkasová T, Bozsakyová E, Stetina R. **Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations.** 1997; *Mutation Research.* 383: 243-252.

- Sorensen M, Schins P.F.R, Hertel O, Loft S. **Transition Metals in Personal Samples of PM 2.5 and Oxidative Stress in Human Volunteers.** 2005; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 14(5):1340-1343.
- Stemmler J.A, Burrows C. **Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes.** 2001; *Journal biology inorganic chemistry.* 6:100-106.
- Stohs S.J, Bagchi D. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** 1994; *Free Radical Biology & Medicine.* 18(2): 321-336.
- Strauss GHS. **Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes test (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects.** 1991; *Mutation Research.* 252:1-15.
- Sur P, Anthony E.S, Wingrave JM, Walter M.N, Kumar R. S, Lal B.N. **Estrogen attenuates oxidative stress-induced apoptosis in C6 glial cells.** 2003; *Brain Research.* 971:178–188.
- Swennen B, Buchet J.P, Stanescu D, Lison D, Lauwerys R. **Epidemiological survey of workers exposed to cobalt oxides, cobalt salts, and cobalt metal.** 1993; *British Journal of Industrial Medicine.* 50:835-842.
- Tice R.R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J.C, Sasaki Y.F. **Single cell gel /comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing.** 2000; *Environmental and molecular mutagenesis.* 35: 206-221.
- Touyz M.R. **Reactive Oxygen Species as Mediators of Calcium Signaling by Angiotensin II: Implications in Vascular Physiology and Pathophysiology.** 2005; *Antioxidants & Redox Signaling.* 7(9):1302-1310.

- Tzintzun-Cervantes M, Rojas B.L, Fernández-Bremauntz A. **Las partículas suspendidas en tres grandes ciudades mexicanas.** 2005; Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT.
- Vahter M, Akesson A, Lidén C, Ceccatellia S, Berglunda M. **Gender differences in the disposition and toxicity of metals.** 2007; *Environmental Research*. 104:85–95.
- Valko M, Rhodes C.J, Moncola J, Izakovic M, Mazur M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cáncer. Mini-review.** 2006; *Chemico-Biological Interactions*. 160:1–40.
- Valko M, Morris H. Cronin M.T.D. **Metals, toxicity and oxidative stress.** 2005; *Current Medicinal Chemistry*. 12:1161-1208.
- Valverde M, Fortoul I, Diaz-Barriga F, Mejia J, Rojas C. E. **Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalación in several organs of CD-1 mice.** 2000; *Mutagenesis*. 15(2):109-114.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K.G, Hermosillo A.F, Márquez M, Cárdenas M. **Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Cd. México.** 2003; *Gaceta Médica de México*, Review 139(1):57-63.
- Venereo-Gutiérrez J.R. **Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.** 2002; *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2):126-33.
- Villani P, Cordelli E, Leopardi P, Siniscalchi E, Veschetti E, Fresegna A, Crebelli R. **Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium *in vivo*.** 2007; *Toxicology Letters*. 170: 11–18.
- Yip M, Madl P. **Air Pollution in Mexico City: Project-Study paper.** 2002; University of Salzburg, Austria, Academic Information Systems, Lund University Library.

- A) Wang L, Medan D, Mercer R, Overmiller D, Leonard S, Castranova V, Shi X, Ding M, Huang C, Rojanasakul Y. **Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: role of reactive oxygen species.** 2003; *Journal of cellular physiology*.195: 99-107.
- B) Wang X, Simpkins W. J, Dykens A.J, Cammarata R. P. **Oxidative Damage to Human Lens Epithelial Cells in Culture: Estrogen Protection of Mitochondrial Potential, ATP, and Cell Viability.** 2003; *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS)*. 44(5):2067-2075.
- Wang S, Shi X. **Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis.** 2001;*Molecular and Cellular Biochemistry*. 222:3-9.
- Willsky RG. **Vanadium in the Biosphere.** En: *Vanadium in biological systems*, N. Dennis Chasteen Ed. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.1990. 5:1-225.
- Wu L, Liu YJ. **Development of Dendritic-Cell Lineages.** 2007; *Immunity Reviews* 26:741-750.
- Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard S.S, Lanciotti R, Butterworth L, Shi X. **Vanadate- Induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species.** 2001; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 392: 311–320.
- Zhang Z, Huang C, Li J, Shi X. **Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells.** 2002; *Journal of Inorganic Biochemistry*. 89: 142–148.
- Zuk M, Tzintzun-Cervantes M. **Tercer almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en nueve ciudades mexicanas.** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología 2007.