



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

COMPARACIÓN POR SEXO DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y ANASTROZOL EN RATONES
CD₁ EXPUESTOS A LA INHALACIÓN DE VANADIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARCELA ROJAS LEMUS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, ZARAGOZA, UNAM.

MÉXICO D.F. MAYO, 2014



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**COMPARACIÓN POR SEXO DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA
ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y ANASTROZOL EN RATONES
CD1 EXPUESTOS A LA INHALACIÓN DE VANADIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
MARCELA ROJAS LEMUS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR
DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES, ZARAGOZA, UNAM.

MÉXICO D.F. MAYO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ROJAS LEMUS MARCELA** con número de cuenta **98201730** con la tesis titulada **"COMPARACIÓN POR SEXO DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO Y ANASTROZOL EN RATONES CD1 EXPUESTOS A LA INHALACIÓN DE VANADIO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Vocal: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Secretario: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Suplente: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de mayo de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (becario número 207165).
- Este proyecto fue apoyado por PAPIIT, IN209612.
- Al comité tutor:
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
 - Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
 - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

AGRADECIMIENTOS

- A mi tutora:
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
- Al Jurado revisor de esta tesis:
 - Dr. Juan José Rodríguez Mercado
 - Dra. Sara Frías Vázquez
 - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
 - Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo
- Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez y al Biól. Francisco Pasos Nájera, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su apoyo incondicional en la parte fotográfica.
- Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Salgado, personal del bioterio de la Facultad de Medicina por su gran apoyo en la obtención, cuidado y manejo de los animales experimentales.
- A la M. en C. Silvia Rosalía Sánchez Sandoval, del Instituto Nacional de Pediatría, por su experto apoyo durante la realización de la técnica de FISH.
- A la Dra. Sara Frías Vázquez por abrirme las puertas de su laboratorio.
- A la Dra. Laura Colín Barenque, a la M. en C. Patricia Bizarro Nevaes y a la Dra. Adriana González Villalva, por su gran apoyo en todos y cada uno de los aspectos de este trabajo de investigación.

Esta tesis está dedicada a:

...Dios

... los que amo y me aman

... los que en mí vida estuvieron

... los que en mí vida están

Desde el fondo de mi corazón, les digo:

Gracias

ÍNDICE

1. Resumen	1
1.1 Abstract.....	2
2. Introducción	3
2.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México.....	3
2.1.1. Partículas suspendidas.....	4
2.1.1.1. Metales.....	6
2.1.1.1.1. Vanadio.....	7
2.1.1.1.1.1. Generalidades.....	7
2.1.1.1.1.2. Emisión de vanadio a la atmósfera.....	7
2.1.1.1.1.3. Vanadio en el petróleo.....	8
2.1.1.1.1.4. Concentración ambiental de V en la ZMVM.....	8
2.1.1.1.1.5. Límites de Exposición.....	9
2.1.1.1.1.6. Vías de exposición.....	9
2.1.1.1.1.7. Toxicocinética.....	10
2.1.1.1.1.8. Toxicodinámica.....	11
2.1.1.1.1.9. Efectos en la salud.....	12
2.1.1.1.1.10. Efectos genotóxicos.....	12
2.2. Mecanismo de acción común a los metales: estrés oxidante.....	13
2.3. El sistema de defensa celular.....	14
2.3.1. Antioxidantes.....	14
2.3.1.1. Ácido ascórbico.....	14
2.3.2. Ácido ascórbico y metales.....	16
2.3.3. Ácido ascórbico y vanadio.....	17
2.4. El sexo y la madurez sexual: implicaciones en la respuesta a xenobióticos.....	18
2.4.1. Estudios experimentales sobre las diferencias por sexo.....	18
2.4.2 Terapia antiestrogénica: anastrozol.....	21
2.5. Técnicas para la detección de genotoxicidad.....	21
2.5.1. Ensayo cometa.....	22
2.5.2. Ensayo de micronúcleos.....	23
3. Antecedentes directos	26
4. Objetivos	28
4.1. Objetivo general.....	28
4.2. Objetivos específicos.....	28
5. Método	30
5.1. Selección de grupos experimentales.....	30
5.2. Esquema de inhalación.....	30

5.3. Estrategias experimentales.....	30
5.3.1. Administración oral de ácido ascórbico.....	30
5.3.2. Administración oral de anastrozol.....	30
5.3.3. Toma de muestras.....	31
5.4. Técnicas.....	31
5.4.1. Citología exfoliativa vaginal.....	31
5.4.2. Viabilidad celular por fluorocromos.....	32
5.4.3. Ensayo cometa pH13 y pH 12.3.....	33
5.4.4. Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina.....	33
5.4.5. Hibridación fluorescente <i>In Situ</i> (FISH).....	34
5.5. Análisis Estadístico.....	36
6. Resultados.....	37
6.1. Fase 1.....	37
6.1.1. Dosis de ácido ascórbico en machos.....	37
6.1.2. Eficacia del anastrozol.....	38
6.2. Fase 2. Comparación por sexo de los efectos genotóxicos de vanadio, ácido ascórbico y anastrozol en ratones pre-púberes.....	40
6.2.1. Machos.....	40
6.2.2. Hembras.....	43
6.2.3. Comparación por sexo.....	49
6.3. Fase 3. Identificación de centrómero en micronúcleos presentes en eritrocitos causados por la inhalación de vanadio.....	52
6.4. Resumen de resultados.....	53
7. Discusión.....	55
7.1. Irrigación de la médula ósea.....	56
7.2. Ausencia de efectos citotóxicos.....	56
7.3. Etiología de los micronúcleos.....	56
7.4. Fase 1.....	57
7.4.1. Genotoxicidad del ácido ascórbico.....	57
7.4.2. Eficacia del anastrozol.....	58
7.5. Fase 2. Comparación por sexo de los efectos genotóxicos del vanadio, ácido ascórbico y anastrozol en ratones pre-púberes.....	60
7.5.1. Efectos del vanadio.....	60
7.5.1.1. Ingreso al sistema y a las células.....	60
7.5.1.2. Estrés oxidante causado por vanadio.....	61
7.5.1.3. Efectos genotóxicos del vanadio.....	61
7.5.1.4. Vanadio y rompimientos de cadena sencilla del ADN.....	61
7.5.1.5. Vanadio y micronúcleos.....	64
7.5.1.6. Interacción con el aparato mitótico.....	64
7.5.1.7. ¿Los efectos genotóxicos del V dependen del sexo y de la edad?.....	66

7.5.1.8. Diferencias entre hembras y machos.....	66
7.5.1.9. Diferencias intrínsecas al sexo.....	66
7.5.1.10. Diferencias hormonales: estrógenos.....	66
7.5.1.11. Vanadio y anastrozol: ausencia de estrógenos.....	67
7.5.1.12. Vanadio y su interacción con los mecanismos antioxidantes.....	68
7.5.1.13. Vanadio y el efecto protector del ácido ascórbico.....	69
7.5.1.14. Peso en los animales expuestos.....	69
7.6. Fase 3.....	70
7.6.1. Vanadio: clastogénico y aneuploidogénico.....	70
7.6.2. Vanadio y región centromérica del ADN.....	71
8. Conclusiones y consideraciones finales.....	73
9. Referencias.....	75
10. Apéndice.....	81
Artículo: Rojas-Lemus M, Altamirano-Lozano MA, Fortoul-TI. Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. <i>Journal of Applied Toxicology</i> . 2014; 34: 258-64.	

1. Resumen

La inhalación de contaminantes, entre ellos metales como el vanadio, es un fenómeno cotidiano para los habitantes de las grandes ciudades, como es el caso de la Ciudad de México. Para determinar detalladamente los efectos que causa la inhalación de ciertos xenobióticos, hemos utilizado un modelo de exposición por inhalación de metales, con el que se han llevado a cabo varios estudios experimentales.

Nuestros resultados han mostrado que los ratones adultos, tanto hembras como machos expuestos a vanadio, presentan aumento en la frecuencia de micronúcleos y que el daño en el material genético, es mayor en machos. Debido a que las hembras son menos susceptibles al daño genotóxico causado por este elemento, se decidió determinar la participación de las hormonas sexuales femeninas, los estrógenos. Para evitar que estas hormonas estuvieran presentes en los ratones hembra y así tratar de comprender su función, se les administró un fármaco anti-estrogénico, el anastrozol. Este fármaco inhibe a la aromatasas, que es la enzima que cataliza la formación de estrógenos. Cuando el anastrozol se administra a los ratones hembra la producción total de estrógenos se abate en más del 95 %.

Por otro lado, tomando en consideración que uno de los mecanismos principales por el cual el vanadio ejerce su toxicidad, es la generación de estrés oxidante, consideramos que la administración de un potente antioxidante, como el ácido ascórbico, podría disminuir o evitar los efectos que causa este metal sobre el material genético.

Por lo anterior, los objetivos de este protocolo fueron: analizar los efectos en ratones pre-púberes (hembras y machos) que causa la inhalación del vanadio, la administración de anastrozol y de ácido ascórbico sobre la inducción de rompimientos del ADN y de micronúcleos, asimismo determinar la etiología de los éstos en los ratones macho, debido a que en ellos la frecuencia es mayor.

Los resultados muestran que en ratones a los que se les administra dosis bajas, el ácido ascórbico tiene efectos genotóxicos, porque genera incremento en la frecuencia de micronúcleos y de rompimientos de cadena sencilla. Por otra parte, el anastrozol demostró ser un fármaco eficaz para inhibir la formación de estrógenos en ratones hembra y por ende, puede ser utilizado con fines experimentales en esta especie animal. La administración de ácido ascórbico inhibe la formación de micronúcleos causados por vanadio y efectivamente, los micronúcleos en las hembras aumentan significativamente cuando la producción de estrógenos es inhibida por el anastrozol; sin embargo, hay otros mecanismos que confieren protección contra el daño al ADN en las hembras, además de los estrógenos. Por último, comprobamos que los micronúcleos causados por vanadio, son en su mayoría, centrómero-negativos, por lo que el mecanismo de acción predominante en estas condiciones experimentales, es la clastogénesis.

Estos resultados contribuyen al mejor entendimiento de la interacción entre el vanadio y los efectos sobre procesos importantes para el organismo, así como explicar parcialmente los mecanismos que podrían favorecer eventos adversos sobre la salud y, de manera importante, en los organismos jóvenes (pre-púberes). Así como establecer las diferencias intrínsecas al sexo, sin que en esa respuesta se encuentren comprometidas una de las principales hormonas sexuales femeninas, los estrógenos.

1.1 Abstract

Inhalation of contaminants, including metals such as vanadium, is an everyday phenomenon for residents of large cities, such as Mexico City. To determine in detail the effects caused by inhalation of certain xenobiotics, we used a model of inhalation exposure to metals, with which they have conducted several experimental studies.

Our results have shown that adult mice, both females and males exposed to vanadium, have increased the frequency of micronuclei and that damage in the genetic material, is higher in males. Because females are less susceptible to genotoxic damage caused by this, it was decided to determine the involvement of female sex hormones, estrogens. To prevent these hormones were present in female mice and trying to understand their function, were given an anti-estrogen drug, anastrozole. This drug inhibits aromatase, which is the enzyme that catalyses the formation of estrogens. When anastrozole was administered to female mice total estrogen production swoops over 95%.

Furthermore, considering that one of the major mechanisms by which the vanadium exerts its toxicity, is the generation of oxidative stress, we believe that administration of a powerful antioxidant, such as ascorbic acid, may reduce or avoid the effects because this metal on the genetic material.

Therefore, the objectives of this protocol were to analyze the effects in prepubescent mice (males and females) that cause inhalation of vanadium administration of anastrozole and ascorbic acid on the induction of DNA breaks and micronuclei also determine the etiology of these in male mice, because in them the frequency is higher.

Results show that in mice that low doses are administered, ascorbic acid has genotoxic effects, because it generates increased frequency of micronuclei and single strand breaks . In addition, anastrozole was shown to be an effective drug to inhibit estrogen formation in female mice and therefore can be used for experimental purposes in this animal species. The administration of ascorbic acid inhibits the formation of micronuclei caused by vanadium and indeed micronuclei significantly increased in females when estrogen production is inhibited by anastrozole; however, there are other mechanisms that confer protection against DNA damage in females, in addition to estrogen. Finally, we found that the micronucleus caused by vanadium, are mostly centromere-negative, so that the predominant mechanism action under these experimental conditions, is the clastogenicity

These results contribute to a better understanding of the interaction between the vanadium and the effects on processes important for the body as well as partially explain the mechanisms that could promote adverse health events and, importantly, in young organisms (pre-pubertal). And to establish the intrinsic differences of sex, without that answer are committed one of the main female sex hormone, the estrogen.

2. Introducción

2.1. Contaminación atmosférica en la Ciudad de México

La Zona Metropolitana del Valle de México, (ZMVM) está situada en una elevada cuenca hidrológica a 2240 msnm (Riveros-Rosas *et al.* 1997, Vallejo *et al.* 2003). La meseta ocupa casi 5,000 km² y está confinada por tres lados (este, sur y oeste) por cordilleras montañosas, con un lado abierto hacia el norte y con un pequeño lado abierto hacia el suroeste. Las cordilleras montañosas a su alrededor varían en elevación (Rivero-Rosas *et al.* 1997) siendo la más alta la Sierra del Ajusco (Vallejo *et al.* 2003). El área metropolitana se encuentra del lado suroeste de la cuenca (Molina y Molina 2004) y abarca aproximadamente 2,000 km² (Riveros-Rosas *et al.* 1997).

La ZMVM es considerada una megaciudad (definida en términos generales como un área metropolitana con población que excede los 10 millones de habitantes) en la cual la contaminación ambiental ha sido, en décadas recientes, uno de los problemas más importantes. Las emisiones y las altas concentraciones de contaminantes atmosféricos pueden tener efectos adversos muy importantes sobre la salud, incluido el incremento significativo sobre la mortalidad de su población (Katsouyanni 2003).

Esta ciudad es una de las más grandes del mundo, con alrededor de 20 millones de habitantes (Molina y Molina 2004) que viven en un área de 2,000 km² (Rivero-Rosas *et al.* 1997), con una densidad poblacional de 12 200 habitantes/km² (una de las más altas a escala mundial), con 3.5 millones de vehículos que consumen más de 40 millones de litros de gasolina al día (Molina y Molina 2004) y 35 mil industrias (Riveros-Rosas *et al.* 1997, Molina y Molina 2004) situadas principalmente en la zona norte (Rivero-Rosas *et al.* 1997). Presenta características topográficas y meteorológicas complejas que la vuelven altamente susceptible a presentar altos niveles de contaminación (Vallejo *et al.* 2003) y entre ellas podemos contar: i) Las cadenas montañosas que junto con las frecuentes inversiones térmicas atrapan a los contaminantes dentro de la cuenca. ii) La altitud a la que se encuentra, determina que la concentración de oxígeno esté disminuida (-23%), y esto a su vez, reduce la eficiencia de los motores de combustión interna y aumenta la concentración de monóxido de carbono y de hidrocarburos (Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004). iii) La gran elevación de la ciudad y la intensa luz del sol también contribuyen en los procesos fotoquímicos para la formación de contaminantes secundarios (p.e. ozono) (Molina y Molina 2004). iv) La dirección de los vientos predominantes, de noreste

a sureste, hace que la mayor concentración de contaminantes se encuentre en la zona sur de la ciudad, en donde la Sierra del Ajusco obstaculiza su dispersión (Vallejo *et al.* 2003).

Por otro lado, a grandes altitudes (como es el caso de la Ciudad de México) las personas son más susceptibles a enfermedades respiratorias que las que viven al nivel del mar. A mayor altitud, más aire debe ser inhalado para obtener oxígeno suficiente, pero al mismo tiempo, se inhalan también mayores cantidades de contaminantes (Molina y Molina 2004). Los efectos en la salud comúnmente reportados por exposición a la contaminación del aire se presentan en las vías respiratorias (p.e. bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía), y en el sistema cardiovascular (p.e. arritmias e infartos) (Rosales-Castillo *et al.* 2001). En años recientes, se ha estudiado con mayor detalle a los grupos poblacionales que son más susceptibles a padecer los efectos de la contaminación: niños, ancianos, personas que sufren diabetes, enfermedades cardiovasculares, respiratorias o asma (Rosales-Castillo *et al.* 2001, Molina y Molina 2004).

En la ZMVM se estima que el 52% del total de la energía producida se emplea en el transporte, que es la mayor fuente de contaminación ambiental (Molina y Molina 2004), 27 % en las industrias y en plantas generadoras de energía y 15% en uso doméstico. Del total de contaminantes emitidos a la atmósfera el 95% corresponde a actividades antropogénicas y sólo el 5 % a fuentes naturales (Riveros-Rosas *et al.* 1997). El efecto combinado de las emisiones naturales y antropogénicas, y las características topográficas y meteorológicas de la Ciudad de México favorecen la persistencia de contaminantes (Vallejo *et al.* 2003) y el resultado es la degradación significativa del ambiente y de la salud humana (Molina y Molina 2004).

En las megaciudades a menudo se encuentran altas concentraciones de contaminantes característicos como dióxido de azufre (SO₂), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (COV's), hidrocarburos (HC), ozono (O₃) y partículas suspendidas totales (PST) (Molina y Molina 2004). El ozono y las partículas suspendidas son los dos contaminantes más importantes en la Ciudad de México (Rosales-Castillo *et al.* 2001).

2.1.1. Partículas suspendidas

En la ZMVM, como en otras grandes ciudades, existen problemas de contaminación ambiental. Las partículas suspendidas (PS) presentes en la atmósfera, son uno de los principales contaminantes ambientales de esta metrópoli, debido a que con frecuencia sus

concentraciones sobrepasan los límites establecidos por la NORMA oficial mexicana emitida por la Secretaría del Medio Ambiente (SMA 2008). Las PS, son una compleja mezcla de diferentes componentes químicos (Fernández *et al.* 2003) y físicos (Katsouyanni 2003) con variación local y regional (Englert 2004). Los principales orígenes de las partículas suspendidas son condensación de los productos de la combustión (Flores 2004), reacciones químicas o fotoquímicas que se producen en la atmósfera (Vallejo *et al.* 2003), fabricación de hierro, acero y cemento, extracción de rocas y minerales, almacenamiento y manejo de granos, caminos sin asfaltar o suelos erosionados (Vallejo *et al.* 2003, Flores 2004).

Para su cuantificación, las PS son caracterizadas por su tamaño (el *diámetro aerodinámico*) (Englert 2004). Las partículas inhalables son las que tienen un diámetro igual o menor a $10\ \mu\text{m}$ (Vallejo *et al.* 2003, Englert 2004) y se clasifican en:

- *Partículas burdas o gruesas*: con un diámetro aerodinámico menor a $10\ \mu\text{m}$ (PS_{10}) y mayor a $2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PS}_{2.5}$) (Vallejo *et al.* 2003, Englert 2004). Están compuestas principalmente por sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro y cloruros (Vallejo *et al.* 2003, Molina y Molina 2004).
- *Partículas finas*: con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PS}_{2.5}$) (Vallejo *et al.* 2003, Englert 2004). Están compuestas por productos derivados de la combustión (Fernández *et al.* 2003), particularmente del diesel, e incluyen carbono, plomo, vanadio, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno (Vallejo *et al.* 2003). Las partículas ultrafinas: con un diámetro aerodinámico menor a $0.1\ \mu\text{m}$ ($\text{PS}_{0.1}$) (Vallejo *et al.* 2003, Englert 2004). Están compuestas por los productos de las quemas agrícolas, forestales; y de la combustión de gasolina y diesel. Sin embargo, permanecen aisladas en la atmósfera durante cortos períodos de tiempo debido a que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo *et al.* 2003).

En la ZMVM se monitorean las concentraciones de partículas suspendidas $\text{PS}_{2.5}$ y PS_{10} y se estima que en total se emiten más de 24 mil toneladas anuales de PS_{10} de las cuales 5 499 son de $\text{PS}_{2.5}$. Las emisiones son generadas principalmente por la alta actividad vehicular, las vialidades sin pavimentar y la actividad industrial (SMA 2008).

Las partículas suspendidas son un contaminante atmosférico ubicuo, con gran influencia en el bienestar humano (Englert 2004). Estudios epidemiológicos realizados en diferentes países han reportado una asociación entre el incremento de las concentraciones de las PS y el aumento de mortalidad y morbilidad de sus poblaciones (Aust *et al.* 2002, Ghio *et al.* 2002, Marconi 2003).

Al estar presentes en la atmósfera, las PS ingresan al cuerpo a través de la inhalación y una vez dentro del árbol respiratorio son capaces de acumularse en diferentes sitios como: fosas nasales, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y sacos alveolares. Se ha observado que conforme disminuye el tamaño de la partícula aumenta su toxicidad (Ghio *et al.* 2002), esto se debe a que las partículas más pequeñas son capaces de penetrar más profundamente en las vías respiratorias (Choi *et al.* 2004). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud concluyó que hay suficiente evidencia para decir que las partículas suspendidas $<2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PS}_{2.5}$) son más dañinas que las PS_{10} en términos de mortalidad y de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Choi *et al.* 2004, Englert 2004, Molina y Molina 2004). Los estudios epidemiológicos indican que las PS en la ZMVM tienen gran relevancia, porque se produce el incremento del 1 % en la mortalidad por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento en la concentración de PS_{10} (Molina y Molina 2004).

Las PS son buenos receptores, contenedores y vehículos de componentes toxicológicamente relevantes (Fernández *et al.* 2003, Vallejo *et al.* 2003). Un ejemplo de ello son las partículas generadas por la combustión del petróleo y sus derivados, éstas usualmente consisten en un núcleo de carbón en el cual hay complejas mezclas de compuestos adheridos a ellas, como hidrocarburos poliaromáticos, toxinas, sulfatos, nitratos y especialmente metales de transición, como el vanadio, el manganeso, el cromo, entre otros (Katsouyanni 2003, Sorensen *et al.* 2005). Se considera que los metales juegan un papel muy importante en la inducción de efectos tóxicos en los sistemas biológicos (Ghio *et al.* 2002, Marconi 2003).

2.1.1.1. Metales

Los metales son la categoría mayor de contaminantes globalmente distribuidos. Es notable su tendencia a acumularse en algunos tejidos del cuerpo humano y su potencial tóxico a concentraciones relativamente bajas (Hu 2002). La exposición constante a ciertos metales se ha relacionado con inflamación de los tejidos, daño celular y cáncer, particularmente de pulmón y piel (Leonard *et al.* 2004a). Cada metal tiene sus propios mecanismos de acción (Leonard *et al.* 2004b), algunos pueden producir efectos adversos por sí mismos, mientras que otros interactúan con diversos factores (Leonard *et al.* 2004a). Se sabe que los metales, entre ellos el vanadio, pueden ser genotóxicos y carcinogénicos por medio de diferentes vías y que una de las más comunes es la inducción de estrés oxidante (Leonard *et al.* 2004 b).

2.1.1.1.1. Vanadio

2.1.1.1.1.1. Generalidades

El vanadio (V), es un metal de transición miembro del grupo VB de la tabla periódica (Mukherjee *et al.* 2004) que está ampliamente distribuido en la corteza terrestre, en la que se encuentra presente en cantidades comparables al cobre, níquel y zinc (Kleinsasser *et al.* 2003); constituye el elemento número 21 en abundancia (Thompson 1999). Existe en estados de oxidación que van desde el -1 hasta el +5, los más comunes son +3, +4 y +5 (Barceloux 1999). No se le encuentra como vanadio puro (forma parte de aproximadamente 70 minerales), debido a que es muy propenso a reaccionar con otros elementos, especialmente con el oxígeno formando, de esta manera, óxidos de vanadio (Barceloux 1999).

Debido a su dureza, a su capacidad para formar aleaciones y a su alta resistencia a la corrosión, el vanadio es frecuentemente utilizado como constituyente del acero que se emplea para fabricar herramientas, implantes ortopédicos (Ivancsits *et al.* 2002) y maquinaria (Barceloux 1999). También es común su uso en la manufactura de semiconductores, reveladores fotográficos y agentes colorantes; para la producción de pigmentos amarillos y cerámicas. Las sales, incluidos los óxidos de vanadio, se emplean como catalizadores para la producción de ácido sulfúrico, en la purificación de gases y en la oxidación de etanol (Barceloux 1999).

El pentóxido de vanadio es un compuesto comercial muy empleado (Ivancsits *et al.* 2002) y es la materia prima principal para la producción de otros compuestos de vanadio (Dill *et al.* 2004). Por otro lado, es el compuesto más común en situaciones de exposición industrial (Dill *et al.* 2004).

2.1.1.1.1.2. Emisión de vanadio a la atmósfera

La emisión mundial total de vanadio se calcula entre 71 000 a 210 000 toneladas por año (Ress *et al.* 2003). Las fuentes antropogénicas contribuyen con dos terceras partes del vanadio que es emitido a la atmósfera específicamente en forma de óxidos. Las fuentes naturales como polvos continentales, aerosoles marinos y en menor medida, emisiones volcánicas, contribuyen con el resto del vanadio en el ambiente (Barceloux 1999).

2.1.1.1.1.3. Vanadio en el petróleo

Altas concentraciones de vanadio (hasta 50 % de los elementos traza) aparecen en los depósitos de petróleo especialmente en aquellos que provienen de Iraq, Irán, Kuwait,

Venezuela y del Golfo de México (Barceloux 1999). Se estima que entre el 12 y el 15 % del vanadio está presente en los derivados del petróleo, incluso después de ser procesados (Léonard y Gerber 1994).

Debido a que éste es el elemento traza más abundante en los combustibles fósiles, la quema de éstos y de sus derivados provee una fuente importante de vanadio en el ambiente (De la Torre *et al.* 1999). Se estima que el 90 % del vanadio que es emitido cada año a la atmósfera proviene principalmente de la combustión del petróleo (Dill *et al.* 2004) y de sus derivados como la gasolina (Ávila-Costa *et al.* 2004). En la ZMVM el consumo promedio diario de los combustibles se estimó en 314 mil barriles equivalentes de gasolina; es decir 50 millones de litros equivalentes por día (SMA 2008).

En México, la Norma Oficial Mexicana sobre las *especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental* (NORMA 2005), indica que deben conocerse los límites en la concentración de metales como vanadio, níquel, hierro y cromo; sin embargo, dichos valores todavía no han sido determinados.

El vanadio está ampliamente distribuido como contaminante ambiental (unido a las partículas suspendidas) en forma de óxidos resultado de la quema de combustibles fósiles (Ávila-Costa *et al.* 2004), aunado a que muchos procesos metalúrgicos generan polvos que contienen óxidos de este metal (Dill *et al.* 2004).

2.1.1.1.1.4. Concentración ambiental de vanadio en la ZMVM

Debido a las actividades antropogénicas, en años recientes, los niveles de vanadio en el ambiente se han incrementado (De la Torre *et al.* 1999). Aunque las concentraciones de este metal en México no se monitorean, existen grupos de investigación que actualmente trabajan para identificar los daños a la salud que causa la exposición a vanadio. En 2002, con muestras de necropsias pulmonares en las cuales se determinaron las concentraciones de varios metales por medio de la absorción atómica de masas, Fortoul y colaboradores (Fortoul *et al.* 2002) reportaron el aumento significativo (del 20 % aproximadamente) en las concentraciones de vanadio de los pulmones de ciudadanos que vivieron en la década de los 90's comparados con pobladores de la década de los 60's.

Gutiérrez-Castillo y colaboradores (Gutiérrez-Castillo *et al.* 2006) mostraron la presencia de vanadio, cadmio, cromo, cobre, fierro, zinc, manganeso y níquel en muestras de partículas

suspendidas recolectadas en cuatro estaciones de monitoreo (zonas centro, sureste, noreste y noroeste) de la ZMVM.

Lo anterior significa, que por medios indirectos (como la determinación de metales en el tejido pulmonar) y directos (determinación de la composición química de las PS), se ha demostrado de manera contundente el aumento de vanadio en la atmósfera de esta ciudad.

2.1.1.1.1.5. Límites de exposición

Instituciones internacionales como la Administración para la Seguridad Ocupacional y la Salud (OSHA 2011), el Instituto Nacional para la Seguridad y la Salud Ocupacional (NIOSH 2011) y la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (OSHA 2011) han determinado que el límite de exposición ocupacional a gases y polvos de vanadio es de 0.05 mg/m³, por jornada de 8 horas.

Sin embargo, en México ningún metal es considerado por la legislación como un *contaminante criterio*. Los contaminantes criterio son aquellos cuyas emisiones están reguladas por la Secretaría de Salud la cual emite Normas Oficiales Mexicanas de Salud Ambiental, en dónde se determinan las concentraciones en el aire recomendables para la protección de la salud humana; en este país no se considera importante o necesario implementar normas para evitar el riesgo a la salud por metales, ni especialmente por vanadio.

2.1.1.1.1.6. Vías de exposición

Vía oral. Para la población en general, los alimentos son la mayor fuente de exposición a vanadio (Barceloux 1999, Ivancsits *et al.* 2002, Mukherjee *et al.* 2004). Entre los alimentos ricos en vanadio se incluyen pimienta negra, hongos, perejil (Mukherjee *et al.* 2004) y espinacas (Barceloux 1999). En general, los alimentos de origen marino contienen mayores cantidades de vanadio comparados con los de origen terrestre (Barceloux 1999, Ivancsits *et al.* 2002). Sin embargo, la absorción de compuestos de vanadio por el tracto gastrointestinal es pobre (Mukherjee *et al.* 2004), sólo se absorbe <1-2 % del metal que es ingerido (Barceloux 1999).

Vía inhalada. El vanadio se absorbe y distribuye mejor en el organismo cuando se inhala (WHO 2001). Se considera que por esta vía se absorbe hasta el 90 % de este metal (Léonard y Gerber 1994). La inhalación es la ruta principal de entrada al cuerpo (Cooper 2007). El vanadio se adsorbe a la superficie de la partícula, especialmente a las PS <2.5 µm, que son capaces de entrar fácilmente hasta los sacos alveolares de los pulmones. Una vez ahí, la mayor parte del

vanadio que es inhalado, es incorporado al torrente sanguíneo del organismo, esto hace de la vía inhalada la mejor ruta de absorción.

2.1.1.1.1.7. Toxicocinética

Los estados biológicamente relevantes del vanadio son vanadato V(V), el estado pentavalente usualmente como oxianión (p.e. HVO_4^{2-} o $\text{H}_2\text{VO}_4^{4-}$), esta forma predomina en el espacio extracelular; y el vanadilo V(IV), el estado tetravalente usualmente como oxición (p.e. VO^{2+}), que es más estable y que predomina en el espacio intracelular (Stern *et al.* 1993, SFC 2004).

El vanadio unido a las PS que entra al árbol respiratorio, es capaz de penetrar profundamente en las vías respiratorias (Choi *et al.* 2004), atravesar la barrera hematogaseosa y alcanzar el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo 2001).

En el plasma, el vanadio(V) es rápidamente reducido a vanadio(IV) generalmente por antioxidantes del plasma y se transporta unido a proteínas (Evangelou 2002). Sin embargo, ambos estados de oxidación existen en el plasma debido a que el vanadilo sufre una oxidación espontánea a vanadato *in vivo* (Mukherjee *et al.* 2004).

El vanadilo es transportado principalmente por albúmina y transferrina, el vanadato sólo por transferrina; de esta manera el vanadio es transportado a los órganos y tejidos (Mukherjee *et al.* 2004, Gándara *et al.* 2005). Aproximadamente el 90% del vanadio en el plasma se encuentra primordialmente como vanadilo unido a transferrina y albúmina (Barceloux 1999).

Siguiendo el transporte en el plasma, la distribución del vanadio en el organismo es rápida ($t_{1/2}$ 1 hora), se acumula principalmente en hueso, riñón, hígado y bazo; en pulmones y testículo, en menor grado (Evangelou 2002).

El vanadilo como catión libre tiene habilidad limitada para atravesar las membranas celulares, pero el vanadato (que usualmente predomina en el espacio extracelular, a pH neutro se absorbe 5 veces más que el vanadilo) (Mukherjee *et al.* 2004) entra a las células por medio de canales iónicos inespecíficos e intracelularmente es biorreducido a vanadilo (Barceloux 1999, Mukherjee *et al.* 2004). Esta biorreducción puede ser llevada a cabo por glutatión celular, catecolaminas, cisteína, NADH, NADHP y L-ácido ascórbico (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003); subsecuentemente se une a proteínas (Evangelou 2002). Su reducción es regulada por los mecanismos redox de la célula que controlan el equilibrio de los estados de oxidación del vanadio (Evangelou 2002).

Dentro de la célula, el vanadio se une a las fracciones citosólicas y nucleares. Una pequeña porción (~1 %) se puede encontrar en forma libre (Evangelou 2002), además de pequeñas cantidades de vanadio presentes en la célula pueden permanecer unidas a las moléculas de grasa y por lo tanto no estar disponibles para producir toxicidad inmediata (Mukherjee *et al.* 2004).

La eliminación del vanadio del organismo es bifásica, con una fase rápida (10-20 h) y otra fase terminal larga (40-50 días) (Barceloux 1999, Ivancsits *et al.* 2002). El vanadio que no es absorbido es excretado por vía urinaria, que es la ruta de eliminación principal y sólo una pequeña cantidad (<10%) es excretado en las heces (Barceloux 1999).

2.1.1.1.1.8. Toxicodinámica

El vanadio puede ser altamente tóxico para los humanos y algunos animales debido a que puede afectar importantes funciones celulares (Altamirano-Lozano *et al.* 1993) entre las que se encuentran el ciclo celular, las vías de señalización y la sobrevivencia celular (SCF 2004). Este elemento puede interferir con una gran batería de sistemas enzimáticos que contienen fosfatos como ATPasas, fosfatasas, cinasas (Zhong *et al.* 1994, Mukherjee *et al.* 2004), ribonucleasas (Mukherjee *et al.* 2004), ADN-polimerasas, peroxidasa (Zhong *et al.* 1994), ATP fosfohidrolasas, adenilato ciclasa, fosfatasa alcalina y proteínas propias de la síntesis de ADN (Altamirano-Lozano *et al.* 1999). Por otro lado, la expresión de varios genes se ve afectada por el vanadio, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), proteína activadora 1 (AP-1), ras, c-raf, proteína activadora de genes mitógenos (MAPK), p53, factores nucleares- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y otros más (Mukherjee *et al.* 2004).

El vanadato está ampliamente reconocido como un análogo estructural y electrónico del fosfato (VO_4^{3-} y PO_4^{3-}), porque presenta reacciones similares de protonación (Morinville *et al.* 1998, Crans *et al.* 2004). Esta similitud química del vanadio al fosfato ayuda a explicar el efecto de este metal sobre las reacciones de fosforilación en los sistemas biológicos (Fortoul *et al.* 2002).

El vanadio y sus compuestos, son capaces de interactuar con los sistemas biológicos e interferir con la homeostasis del organismo, causando de esta manera, efectos adversos a la salud.

2.1.1.1.9. Efectos en la salud

Los efectos tóxicos del vanadio y sus compuestos están relacionados con el organismo expuesto, la dosis, la ruta, la duración de la exposición y la naturaleza del compuesto. Los óxidos de vanadio pueden ser más los más tóxicos de las sales, aunado a que la toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta conforme a su valencia, siendo de esta manera, el estado pentavalente el más tóxico (Evangelou 2002).

Entre los signos y síntomas que se presentan como consecuencia de la exposición a vanadio están la irritación de ojos y garganta, coloración verde de la lengua, sabor metálico en la boca, tos, dificultad para respirar, bronquitis, epistaxis, disnea, eczema, conjuntivitis, dolor de cabeza, boca seca, mareo, nerviosismo, insomnio y temblor; en tanto que los efectos sobre la salud que se reportan son irritación de mucosas (conjuntiva y respiratoria) y de la piel, así como daño bronquial agudo y crónico (OSHA 2011).

2.1.1.1.10. Efectos genotóxicos

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, enlista al pentóxido de vanadio como “un posible carcinógeno para humanos” dentro del grupo 2B (ATSDR 2012). Lo anterior se basó en la evidencia de la generación de cáncer pulmonar en ratones que fue publicado por el Programa Nacional de Toxicología (NTP 2002). Sin embargo, la evidencia sobre la carcinogenicidad del vanadio ha sido ampliamente cuestionada por Duffus (2007) y Starr *et al.* (2012). La información relacionada con el potencial carcinogénico y genotóxico del pentóxido de vanadio es limitada y no concluyente (Rodríguez-Mercado *et al.* 2011; Boobis *et al.* 2009); ya que pocos estudios se han realizado para evaluar la genotoxicidad del vanadio *in vivo* (Ivancsits *et al.* 2002). Por otro lado, la información actual sobre la genotoxicidad y la diferencia por sexo es casi inexistente (Rojas-Lemus *et al.* 2014).

En la Tabla 1 se citan algunos de los trabajos realizados *in vivo* sobre la genotoxicidad del vanadio y sus compuestos.

Tabla 1. Algunos efectos genotóxicos *in vivo* del vanadio y sus compuestos.

Organismo/tejido	Resultado	Referencia
Ratón macho CD1 Médula ósea	+ Micronúcleos + Aberraciones cromosómicas estructurales + Hiperploidía	Ciranni et al. 1995
Ratón macho CD1 Diferentes órganos	+ Rompimientos de cadena sencilla de ADN	Altamirano-Lozano et al. 1999
Ratón macho CD1 Testículo	+ Rompimientos de cadena sencilla de ADN	Altamirano- Lozano et al. 1996
Ratón macho y hembra CD1 Sangre Periférica	+ Micronúcleos + Rompimientos de cadena sencilla de ADN	Rojas-Lemus et al. 2014

+ Efectos positivos

2.2. Mecanismo de acción común a los metales: estrés oxidante

El estrés oxidante es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante de un organismo (Chihuailaf *et al.* 2002). Puede resultar del incremento en la exposición a oxidantes, por el decremento en la protección contra los oxidantes, o bien porque ambos eventos ocurran simultáneamente (Davies 2000).

En sentido estricto, un radical libre (RL), representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración, electroquímica es inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida (Valko *et al.* 2006). La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos y tienen un período de vida muy corto (fracciones de microsegundo). Cuando un radical reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, generándose así reacciones en cadena que provocan efectos biológicos alejados del lugar que originó el primer radical (Martínez-Cayuela 1998), aunado a que cuando colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón (oxidándola), ésta pierde su función específica dentro de la célula. Los radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de radicales generados en los sistemas biológicos (Valko *et al.* 2006).

Un amplio rango de xenobióticos puede generar estrés oxidante (Martínez-Cayuela 1998). Independientemente del origen, los radicales libres pueden interactuar con las biomoléculas que se encuentran en la célula como es el caso de los ácidos nucleicos (Cooke *et al.* 2003), las proteínas, los lípidos insaturados y los carbohidratos (Martínez-Cayuela 1998), provocando con ello modificaciones y consecuencias potencialmente serias para el equilibrio celular (Cooke *et al.* 2003).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), juegan un papel dual en la bioquímica de los organismos: pueden ser perjudiciales o benéficas. Los efectos de las ERO involucran respuesta celular a la noxia, defensa contra agentes infecciosos, señalización celular, y en bajas concentraciones, inducen la respuesta mitogénica. En contraste, altas concentraciones de EROS pueden ser mediadores importantes de daño a las estructuras celulares y a las biomoléculas (Valko *et al.* 2006).

2.3. El sistema de defensa celular

Las células no están indefensas contra los radicales libres a los que continuamente están expuestas. Todos los organismos aeróbicos, utilizan una serie de mecanismos en el intento de protegerse contra el daño oxidante, entre ellos están las moléculas antioxidantes, que representan a la primera línea de defensa. Si la acción de las moléculas antioxidantes falla o es rebasada, entonces puede emplear otros como el arresto celular transitorio, sistemas de reparación de biomoléculas o desencadenar procesos de muerte por apoptosis (Davies 2000).

2.3.1. Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con el sustrato oxidable, disminuye o previene la oxidación de ese sustrato. Los sustratos oxidables comprenden todo (excepto H₂O₂) lo que se encuentra en los tejidos vivos e incluyen proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Halliwell 2002).

Las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes que reaccionan directamente con los agentes oxidantes, funcionando como “barredores” o escudos químicos (Davies 2000); estas moléculas pueden tener acción enzimática o no enzimática. Los antioxidantes no enzimáticos llevan a cabo la reducción de radicales libres por medio de la donación de electrones, evitando así las reacciones de oxidación. El glutatión (GSH), el alfa-tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), la bilirrubina y el ácido úrico, son las moléculas principales que llevan a cabo esta función.

2.3.1.1. Ácido ascórbico

Esta lactona de 6-carbonos, es un micronutriente esencial requerido para el funcionamiento metabólico normal del cuerpo; pero los humanos y otros primates han perdido su habilidad para sintetizarla, y por ende, deben obtenerla de la dieta. En mamíferos, el ácido ascórbico es

co-factor de 8 diferentes enzimas como las hidroxilasas y las oxigenasas involucradas en la síntesis de colágena, carnitina, catecolaminas y hormonas peptídicas; la acción del ácido ascórbico en estas enzimas es mantener al ión metálico en su estado reducido. Se considera, que el potencial redox del ácido ascórbico está directamente relacionado con su capacidad de reducir a los metales (Padayatty *et al.* 2002).

Entre sus funciones no enzimáticas, el ácido ascórbico es un eficaz donador de electrones en el medio intra y extracelular; es una molécula antioxidante o un agente reductor capaz de donar 2 electrones de manera secuencial sin formar metabolitos peligrosos. Además puede ser reducido a su forma inicial, por lo tanto una sola molécula de ácido ascórbico, puede funcionar varias veces. Dentro de la célula, actúa como un antioxidante que regula la expresión génica, la traducción del mRNA y evita el daño por oxidación en las proteínas; mientras que fuera de ella, actúa contra el daño oxidante (Padayatty *et al.* 2002).

El ácido ascórbico es un importante antioxidante hidrosoluble en los fluidos biológicos, porque puede eliminar especies reactivas de oxígeno y radicales como radicales alcoxilo (RO[·]), hidroxilo (·OH), peroxilo (RO₂[·]) e hidroperoxilo (HO₂[·]), singulete de oxígeno (¹O₂), anión superóxido (O₂^{·-}) y ozono (O₃). También elimina especies reactivas y radicales derivados de nitrógeno y de cloro, e incluso radicales que proceden de otros antioxidantes (Carr y Frei 2002). En general, gran cantidad de estudios se han llevado a cabo para mostrar los efectos benéficos del ácido ascórbico. La evidencia indica que la suplementación con este compuesto protege contra la oxidación de los lípidos *in vivo*, particularmente en individuos expuestos a condiciones exacerbadas de estrés oxidante, como los fumadores (Enstrom 2002).

Los estudios epidemiológicos han mostrado efectos favorables consistentes del tratamiento con este antioxidante de pacientes con enfermedades cardiovasculares o con riesgo coronario. Además, se ha sugerido que el incremento en el consumo de ácido ascórbico disminuye significativamente la incidencia y mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Incluso, en patologías relacionadas con los radicales libres y con la incapacidad del organismo para defenderse de ellos, como es el caso del cáncer, los estudios epidemiológicos demuestran que a mayor consumo de ácido ascórbico disminuye la incidencia y la mortalidad por cáncer (Enstrom 2002).

Lo anterior, hace del ácido ascórbico un antioxidante muy importante que puede reaccionar con una amplia gama de radicales, su consumo y presencia está relacionada con un mejor

pronóstico en varias patologías y sobre todo, está considerado como la primer línea de defensa antioxidante en los sistemas biológicos (Carr y Frei 2002).

Muchos contaminantes ambientales ocupan las vías de señalización que son activadas en respuesta al estrés oxidante. La misma secuencia de eventos que son asociados con la etiología y temprana patología de muchas enfermedades crónicas. Por lo tanto, entender las vías que permiten la inducción de respuestas antioxidantes permitirá desarrollar estrategias de protección contra el daño oxidante.

2.3.2. Ácido ascórbico y metales

La evidencia experimental señala que la toxicidad de los metales puede disminuir si se administran agentes con actividad antioxidante, como es el caso del ácido ascórbico, lo cual se resume en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Efecto *in vivo* del ácido ascórbico sobre la toxicidad de los metales.

<i>Metal</i>	<i>Especie animal</i>	<i>Efecto del ácido ascórbico</i>	<i>Referencia</i>
Cobre	Cerdo	Reduce la deficiencia de hierro inducida por el cobre.	Elmore 2005
Rubidio	Rata	Proporciona protección contra las alteraciones de ciertas enzimas hepáticas y en los cambios histológicos.	Elmore 2005
Plomo	Humano	Disminuye la toxicidad	Elmore 2005
Plomo	Humano	No se observó efecto	Elmore 2005
Plomo	Conejillo de Indias	Toxicidad variable	Elmore 2005
Plomo	Rata	Previene la anemia y decremanta la acumulación de plomo en los tejidos a largo plazo.	Elmore 2005
Plomo	Rata	Inhibe la generación de ERO, protege a los espermatozoides de la pérdida de motilidad y la capacidad de penetrar al oocito.	Hsu <i>et al.</i> 1998
Plomo	Ratón	En el testículo: reduce la lipoperoxidación, incrementa el conteo espermático, disminuye la presencia de células aberrantes y anormales.	Acharya <i>et al.</i> 2003
Plomo	Ratón	Minimiza significativamente el malondialdehído testicular, aumenta el conteo espermático y reduce el número de espermatozoides anormales. La vitamina C es más eficaz que la E en las mismas condiciones experimentales.	Mishra y Acharya 2004
Plomo	Ratón	En conjunto con la tiamina se observó reversión de los efectos adversos (disminución de: hemoglobina, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión).	Wang <i>et al.</i> 2007
Plomo	Ratón	En las células testiculares, reduce la apoptosis y el daño al ADN. Disminuye el daño tisular del testículo. Sin embargo, las dosis altas de ascorbato, promueven la apoptosis.	Zang <i>et al.</i> 2006
Plomo	Ratón	En conjunto con la tiamina, reduce la incidencia de daño al ADN, y la apoptosis en células testiculares	Wang <i>et al.</i> 2006

Plomo	Ratón	En conjunto con la tiamina, disminuye la apoptosis de las células testiculares y restaura la motilidad y el conteo de espermatozoides.	Shan <i>et al.</i> 2009
Selenio	Rata	Beneficios marginales a la toxicidad	Elmore 2005
Vanadio	Pollo	Disminuye la toxicidad	Elmore 2005
Cromo	Rata	Previene la proteinuria porque favorece la reducción extracelular del cromo IV a cromo III	Elmore 2005
Cromo	Ratón	El metal suprime la actividad de las enzimas antioxidantes y del ácido ascórbico.	Acharya <i>et al.</i> 2006
Cromo	Ratón	Previene parcialmente la incidencia de espermatozoides anormales e incrementa el conteo espermático. Comparada con la vitamina E, la vitamina C es más eficaz para la disminución de los efectos adversos.	Acharya <i>et al.</i> 2004
Cadmio	Rata	En células testiculares: previene la apoptosis y la necrosis; reduce los niveles de peroxidación lipídica y restaura la concentración sérica normal de testosterona.	Gupta <i>et al.</i> 2004
Cadmio	Ratón	Disminuye la peroxidación lipídica, incrementa el conteo espermático, evita la formación de espermatozoides anormales, eleva la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, Cat y peroxidasa).	Acharya <i>et al.</i> 2008

2.3.3. Ácido ascórbico y vanadio

La evidencia experimental indica que el ácido ascórbico funciona como antídoto en contra de la intoxicación aguda de vanadio. En ratones, Jones y Basinger (1983) examinaron varios compuestos y concluyeron que el ácido ascórbico era el más prometedor para el uso humano.

Domingo y colaboradores (1985) administraron metavanadato de sodio por vía intraperitoneal a ratones y observaron, al igual que Jones y Basinger que el ácido ascórbico mostró ser el antídoto más efectivo contra la intoxicación por vanadio.

En otro estudio, Domingo y colaboradores (1990) evidenciaron que el ácido ascórbico estimula la excreción por vía urinaria del vanadio cuando los ratones son inyectados vía intramuscular con sulfato de vanadilo.

Sin embargo, a pesar de todas las bondades que tiene ese antioxidante y de su probada eficacia durante la intoxicación aguda, no se ha utilizado para evaluar los efectos celulares de la administración de ácido ascórbico en intoxicación a largo plazo.

2.4. El sexo y la madurez sexual: implicaciones en la respuesta a xenobióticos

Se ha reportado que existen diferencias por género en la respuesta posterior a la exposición a metales. Actualmente, existe un cuerpo creciente de evidencias sobre los efectos en la salud que ciertos metales tóxicos ejercen y que sus consecuencias se manifiestan de manera diferente en hombres y mujeres (hembras y machos en modelos experimentales). Estas respuestas distintas son debidas a las diferencias en la cinética, en el mecanismo de acción o la susceptibilidad. Sin embargo, los datos sobre este tópico, son aún escasos y, con pocas excepciones, las diferencias y las susceptibilidades por género debidas a la exposición de xenobióticos, no han sido consideradas en el riesgo a la salud que representan los contaminantes ambientales (Vahter *et al.* 2007).

Para muchos agentes (químicos o contaminantes ambientales), la investigación sobre el riesgo a la salud ha sido mayoritariamente basada en personal ocupacionalmente expuesto (con la excepción de aquellos estudios sobre los efectos reproductores), y los resultados han sido utilizados como si fueran representativos de la población general, incluidas mujeres, niños y ancianos (Vahter *et al.* 2007). Aunado a esto, los estudios toxicológicos son casi exclusivamente llevados a cabo en modelos experimentales que sólo incluyen animales machos (Vahter *et al.* 2002, Vahter *et al.* 2007). Por esta razón, no son detectados los posibles mecanismos diferenciales o las interacciones con las hormonas sexuales (Vahter *et al.* 2007).

Hoy día, es necesario prestar mucha atención a la investigación de interacciones potenciales entre el género y la exposición ambiental, para prevenir los posibles efectos sobre la salud y el entendimiento de los mecanismos de acción para identificar a los grupos susceptibles y determinar las medidas más efectivas para mitigar los efectos (Vahter *et al.* 2007).

2.4.1. Estudios experimentales sobre las diferencias por sexo

Scheirs y colaboradores (2006) reportaron que en ratones silvestres residentes de lugares altamente contaminados, el daño genético (rompimientos de cadena sencilla de ADN) fue mayor en los ratones machos que en las hembras. Se encontró que el metal más abundante en esas zonas era el cadmio, por lo tanto los autores atribuyen los efectos observados a la presencia de ese metal.

En humanos, Fortoul y colaboradores (2004) describieron el daño genotóxico e histológico de células del epitelio nasal encontrado en una población de estudiantes de medicina (hombres y mujeres) expuestos a una atmósfera altamente oxidante. En este estudio, se reporta que el

daño al ADN fue mayor en los hombres que en las mujeres (tanto en los expuestos como en los testigos). Asimismo, los porcentajes de metaplasia escamosa fueron mayores en los hombres. Los autores indican que los hombres, comparados con las mujeres, presentan mayor susceptibilidad de desarrollar daño al material genético.

En 2005, el grupo de Fortoul y colaboradores identificó la diferencia en la concentración de plomo en pulmones y en la respuesta bronquiolar de ratones expuestos a este metal por vía inhalada. En este estudio, las hembras tuvieron mayores concentraciones de plomo en los pulmones. Sin embargo, los machos mostraron un daño celular mayor, en ellos se encontró mayor proporción de pérdida de células bronquiales no ciliadas, descamación y necrosis. En ambos trabajos, los autores explican que pueden existir diferencias en: la eliminación de partículas, respuesta al estrés oxidante, actividad de enzimas importantes en la desintoxicación (p.e. citocromo P450) y que todo lo anterior, podría estar influenciado por las hormonas sexuales. Las hormonas sexuales, estrógenos y testosterona, se ha sugerido que juegan un papel esencial en estas respuestas diferenciales.

Morgan y El-Tawil (2003) expusieron ratas hembras y machos sexualmente maduros a metavanadato de amonio en agua de bebida, en ambos casos, la fertilidad se redujo significativamente, pero en los machos este efecto fue más pronunciado.

La ingestión crónica de cloruro de manganeso produce, según el reporte de Elbetieha y colaboradores (2001), disminución significativa de la fertilidad en los ratones hembras y machos que ingirieron la dosis más alta (8000 mg/L), por lo que los autores concluyen que en los ratones la ingestión crónica de manganeso causa algunos efectos adversos sobre la fertilidad y la reproducción.

En pacientes hombres y mujeres, con carcinoma gástrico, Ono y colaboradores (2005) midieron TNF-alfa (factor de necrosis tumoral-alfa), interleucina 10 (IL-10) e INF-gamma (interferon-gamma), en el día previo a la cirugía, y en los días 1 y 3 post-cirugía. Ellos reportan que las mujeres presentaron niveles mayores de TNF-alfa e IL-10, y después de la cirugía los hombres mostraron mayores niveles de TNF-alfa y menores niveles de INF-gamma, sugiriendo que esos son factores que contribuyen al incremento de susceptibilidad de los hombres a desarrollar respuesta inflamatoria sistémica y complicaciones post-operatorias.

Al respecto, los estudios que se han llevado a cabo utilizando diferentes modelos animales, han mostrado que en roedores hembras se observa una mejor respuesta inmunológica que los machos, lo que resulta en una mayor tasa de sobrevivencia después de sufrir algún daño. Por

otro lado, al comparar machos contra hembras ovariectomizadas, la administración de 17-beta-estradiol después de un trauma hemorrágico, se ha notado que se restablece la función cardíaca, hepática e inmune (Ono *et al.* 2005).

Todos los anteriores son ejemplos que muestran la necesidad de llevar a cabo investigación para identificar las diferencias por género en exposición, cinética y toxicidad de los contaminantes (Vahter *et al.* 2007).

Es de interés mencionar, que la edad de los organismos (lo cual indica la madurez sexual), es un factor importante en la respuesta diferencial ante la exposición que pueden presentar. Sin embargo, los estudios relativos a este punto, son escasos. Al respecto, lo que se evalúa con mayor frecuencia, es la disimilitud que existe entre animales que son considerados adultos jóvenes y animales ancianos, pero no hay reportes en la literatura que indiquen las posibles diferencias que presenten animales sexualmente inmaduros (prepúberes), puesto que el estado hormonal del organismo puede ser un factor de suma importancia en los efectos que ejercen los xenobióticos y por lo tanto, en la respuesta de los individuos.

Al respecto, López-Díazguerrero y colaboradores (2005) evaluaron la severidad del daño genotóxico, tanto *in vivo* como *in vitro*, causado por tetracloruro de carbono (CCl₄) y por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre ratones jóvenes (60 días de edad) y ratones ancianos (420 días de edad). Sus resultados indican que los niveles de 8-oxoG fueron significativamente más altos en los ratones ancianos que en los jóvenes cuando fueron expuestos simultáneamente a ambos compuestos. Sin embargo, el daño inicial de ambas edades, fueron similares. Los autores sugieren que el daño al ADN observado en los animales ancianos, es probablemente el resultado de la acumulación del daño endógeno relativo a la edad, como lo es la reparación insuficiente, lo cual genera que aumente el efecto causado por la exposición a agentes tóxicos. Dorman y colaboradores (2004) reportan la influencia del género y la edad de ratas adultas y ancianas sobre la farmacocinética del sulfato y fosfato de manganeso. Los autores indican que el género y la edad no afectan la distribución del manganeso en algunas zonas del sistema nervioso central (estriado), pero sí influyen en las concentraciones de manganeso en otros tejidos. Ellos encontraron que al final del período de exposición, estructuras tales como el bulbo olfatorio, los pulmones y tejidos como la sangre, presentaron mayores concentraciones de manganeso, particularmente en los machos jóvenes que las hembras de la misma edad y que en los machos ancianos. Lo anterior, indica que existen diferencias sustanciales entre organismos de la misma especie, mismo género pero con distinto estado hormonal.

En farmacología clínica, los cambios relacionados con la edad han sido revisados exhaustivamente y aunque está bien establecido el manejo diferente de los xenobioticos en términos fisiológicos y toxicológicos por los animales más jóvenes con respecto a los adultos, pocos esfuerzos se han hecho en investigar las alteraciones relacionadas con la edad y específicamente en las relacionadas con el estado hormonal y la toxicidad de xenobióticos (De la Torre *et al.* 1999).

2.4.2 Terapia antiestrogénica: anastrozol

La terapia anti-estrogénica se ha desarrollado especialmente como una estrategia terapéutica para combatir el cáncer de mama dependiente de hormonas (Lonning y Geisler 2010). La formación de estrógenos (estradiol y estrona) está catalizada por la enzima aromatasa y se lleva a cabo principalmente en los ovarios (Brodie 2002), aunque no es el único tejido en el organismo capaz de sintetizarlos.

Dentro de los fármacos empleados para inhibir la actividad de la aromatasa y por ende, la formación de estrógenos, se encuentran los de tipo no esteroideos, entre ellos el triazol y sus compuestos: el letrozol y el anastrozol (Brodie 2002).

La aromatasa es un blanco excelente para inhibir la formación de estrógenos, porque es la catalizadora del último paso en la serie de reacciones que se llevan a cabo durante la biosíntesis de esteroides, así que su inhibición no interfiere con la síntesis de otras hormonas (Brodie 2002). El anastrozol evita selectivamente la conversión de andrógenos a estrógenos, porque suprime la actividad del complejo enzimático a través de la unión competitiva al grupo hemo de la unidad citocromo p450 (CYPP450) de la aromatasa.

En humano, el anastrozol abatió la aromatización total en el organismo (no sólo la que se lleva a cabo en el ovario), en un 96% (Brodie 2002). Sin embargo, la eficacia de este fármaco, ha sido demostrada sólo en humanos, ratas y cerdos, pero no en ratón.

2.5. Técnicas para la detección de genotoxicidad

La generación de daño al ADN es considerado como un evento inicial importante en la carcinogénesis (Moller 2005); es más probable que las células con ADN dañado desarrollen mutaciones después de la exposición a agentes genotóxicos (Olive *et al.* 2001).

Hoy día, se utilizan diferentes pruebas, con un alto grado de sensibilidad para evaluar diversos tipos de daño al ADN (Fatima *et al.* 2001). Existe una considerable batería de técnicas para la

detección de efectos genotóxicos (Moller 2005) tanto *in vitro* como *in vivo* en sistemas celulares procarióticos y eucarióticos (Sorsa *et al.* 1988, Fatima *et al.* 2001) que son utilizadas para evaluar diferentes agentes ya sea en condiciones experimentales, ambientales u ocupacionales (Moller 2005). Entre ellas están la prueba de Ames, micronúcleos, aberraciones cromosómicas (Sorsa *et al.* 1988, Fatima *et al.* 2001), aductos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), intercambio de cromátidas hermanas (Herrera *et al.* 1999, Shahan *et al.* 2001) y la electroforesis unicelular o ensayo cometa (Rojas *et al.* 2000, Vrhovac y Zeljezic 2000).

2.5.1. Ensayo Cometa

Durante la última década, el ensayo cometa ha sido uno de los métodos estándar para evaluar daño al ADN que ha encontrado aplicaciones en pruebas de genotoxicidad, biomonitorio, epidemiología molecular, ecogenotoxicología, y fundamentalmente en la investigación sobre daño y reparación del ADN (Tice *et al.* 2000, Collins 2004). Este ensayo se ha establecido como una prueba específica y sensible para evaluar genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003).

Comparado con otras pruebas para evaluar genotoxicidad, las ventajas del ensayo cometa incluyen una demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al ADN, el requerimiento de un reducido número de células por muestra, flexibilidad, relativamente bajo costo, sencilla aplicación y se requiere corto tiempo para realizarla (Tice *et al.* 2000) aunado a que puede ser aplicado en cualquier tipo de célula eucarionte sin requerir cultivo celular (Moller 2005).

En esta técnica, las células son embebidas en agarosa y sometidas a lisis, esto genera en el gel estructuras parecidas a núcleos (referidas como nucleoides). Durante la electroforesis horizontal en condiciones alcalinas, las cadenas de ADN disociadas migran hacia el ánodo, y la extensión de la migración (“cola” del cometa) depende del número de rompimientos en las cadenas del nucleoide. La migración es visualizada y cuantificada por medio de fluorocromos (Moller 2005). Es de especial interés el efecto adverso potencial de la degradación del ADN asociado con la citotoxicidad en la interpretación de resultados del ensayo cometa, por lo tanto es necesario aplicar una prueba de viabilidad celular simultáneamente con el ensayo (Tice *et al.* 2000).

La versión alcalina (pH >13) es capaz de detectar rompimientos de cadena sencilla (RCS), sitios álcali lábiles (SAL), entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína y rompimientos de cadena

sencilla asociados con sitios de reparación por escisión incompleta (Tice *et al.* 2000). La versión **semi-alcaldina (pH12.3)** se emplea para evaluar, de manera indirecta, el daño por estrés oxidante producido por la remoción de bases oxidadas (sitios alcali-lábiles), dado que a ese grado de alcalinidad, los sitios AP no se desestabilizan y por ende no se causan rompimientos.

2.5.2. Ensayo de micronúcleos

En décadas recientes, el ensayo de micronúcleos (MN) en roedores, ha sido ampliamente utilizado. La evaluación de la frecuencia de MN es, *in vivo*, una de las principales pruebas para detectar actividad genotóxica y está recomendada por las agencias reguladoras en el mundo para ser llevado a cabo como parte de la evaluación de bioseguridad (Krishna y Hayashi 2000). Los trabajos sobre los mecanismos por los cuales los agentes median los efectos genéticos adversos y los estudios epidemiológicos de la frecuencia de los efectos genéticos relativos a la exposición a xenobióticos, son de gran importancia para dilucidar mayor información sobre los tres niveles de mutación: a) genes, b) cromosomas y c) aparato celular necesario para la segregación cromosómica. Esta información es necesaria para proveer una amplia cobertura de la mutagenicidad y del potencial carcinogénico del xenobiótico probado. En este sentido, el ensayo de MN ha sido ampliamente validado para evaluar genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Krishna y Hayashi 2000).

Un MN es un cuerpo citoplásmico de naturaleza nuclear que corresponde a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular (Zalacain *et al.* 2005), por tanto, es un pequeño núcleo, separado del núcleo principal de la célula, que se produce durante la mitosis (en telofase) (EPA 1998). Los MN (conocidos también como cuerpos de Howell-Jolly), son de forma redonda y de contorno liso (Krishna y Hayashi 2000). Reflejan aberraciones cromosómicas que pueden ser debidas a errores durante la replicación del material genético y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Zalacain *et al.* 2005). Los MN contienen material genético que puede provenir de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos (EPA 1998). El propósito de este ensayo, es identificar xenobióticos que inducen formación de MN, los cuales son resultado de rompimientos cromosómicos (clastogenicidad) o de cromosomas completos (aneugenicidad) (Krishna y Hayashi 2000).

El ensayo de MN con laminillas cubiertas con naranja de acridina (NA), aprovecha el proceso de eritropoyesis (producción de eritrocitos). En el ratón adulto, el bazo y la médula ósea son órganos hematopoyéticos, en los cuales las células troncales forman la base de la

eritropoyesis; estas células deben pasar por diversos estadios de proliferación y maduración. Durante la división celular el xenobiótico puede actuar y causar daños, tales como rompimientos e intercambios cromosómicos o inhibición de las biomoléculas relacionadas con la disyunción de las cromátidas hermanas (p.e. tubulina), y de esta manera causar que el aparato mitótico no funcione adecuadamente. Estos efectos, dependerán del mecanismo de acción del agente evaluado (Krishna y Hayashi 2000).

Durante la diferenciación del linaje eritroide, cuando un eritroblasto se desarrolla en un eritrocito policromático o reticulocito (eritrocito joven que aún contiene ARN), el carácter que define esta etapa es la expulsión del núcleo principal, por tanto, cualquier micronúcleo que se haya formado permanece en el citoplasma de la célula, que ahora es una célula anucleada, lo cual facilita la visualización de los micronúcleos (Krishna y Hayashi 2000).

El incremento en la frecuencia reticulocitos micronucleados (R-MN) en los animales tratados con el agente, es una indicación de daño genético (Krishna y Hayashi 2000).

Los reticulocitos, con el tiempo, degradan el ARN y contienen primordialmente hemoglobina, entonces se conocen como eritrocitos normocrómicos (ENC) o eritrocitos maduros. Los reticulocitos y los ENC se tiñen de manera diferencial cuando se fluorocromizan con NA (Krishna y Hayashi 2000). Los reticulocitos son células que tienen menos de 24 h de haber sido liberadas a la circulación, por lo tanto, el fluorocromo al interactuar con el ARN de los ribosomas, emite fluorescencia rojo-naranja, por tanto, pueden ser distinguidos fácilmente de los maduros que no emiten fluorescencia, debido a que éstos no presentan ningún tipo de ácido nucléico en su citoplasma (EPA 1998). Los resultados positivos indican que el xenobiótico induce la formación de MN, los cuales son resultado de daño cromosómico y/o daño en el aparato mitótico de los eritroblastos (EPA 1998). Si se obtienen resultados positivos en la prueba de rutina, pueden emplearse posteriormente anticuerpos centroméricos o pruebas de ADN para determinar la etiología de los MN (Krishna y Hayashi 2000) (Figura 1).

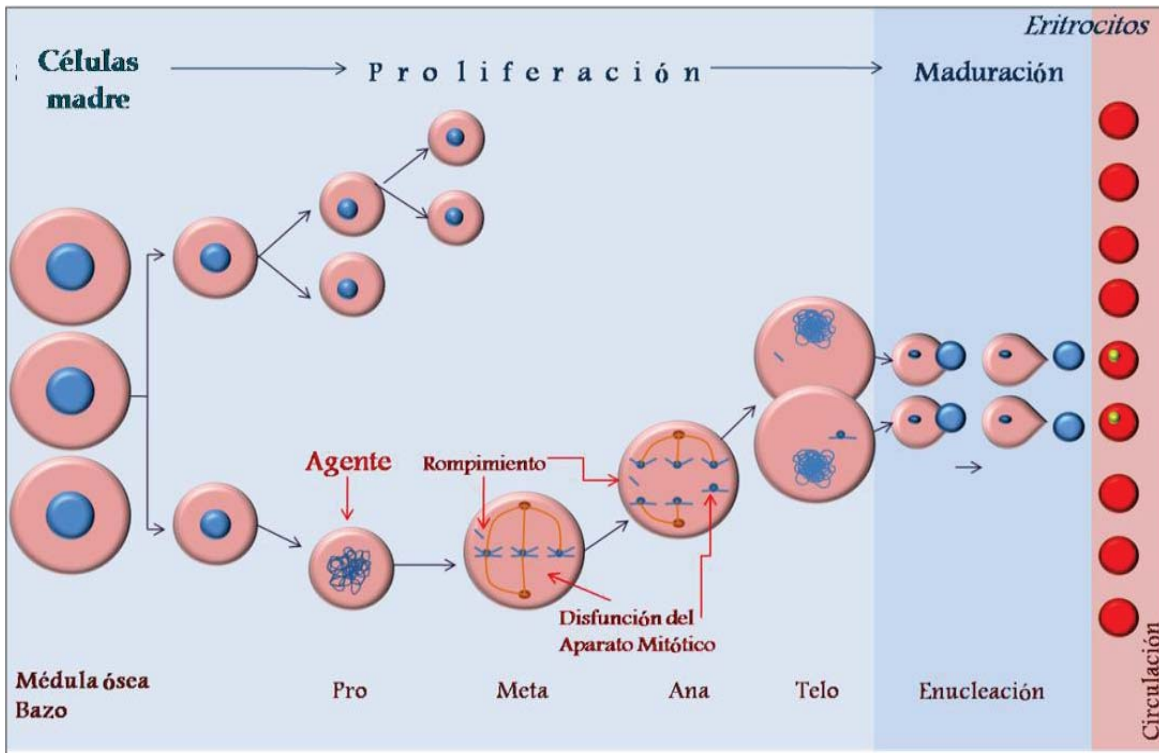


Figura 1. Mecanismo de generación de micronúcleos durante la eritropoyesis (Modificado de Krishna y Hayashi 2000).

Actualmente, el ensayo de micronúcleos está considerado como una prueba práctica, universalmente validada y accesible tecnológicamente, útil para evaluar la inestabilidad genética inducida por agentes con actividad genotóxica (Zalacain et al. 2005).

3. Antecedentes directos

La inhalación es la vía por la cual los organismos estamos principalmente expuestos a los contaminantes atmosféricos y por la que mejor se absorbe el vanadio. Por lo que el grupo de Fortoul y colaboradores (2011), han desarrollado un modelo experimental en el cual los animales son expuestos a la inhalación de partículas de diámetro similar a las que respiramos cotidianamente (0.5-5 μm). Con este esquema de inhalación se han obtenido una serie de resultados que son importantes para el presente trabajo.

Concerniente a la genotoxicidad del vanadio Fortoul y colaboradores (2011) han descrito que la inhalación de pentóxido de vanadio causa daño primario al ADN de leucocitos de sangre periférica de ratones macho; mismo efecto que se observó en células de médula ósea de ratones hembra y macho, con una respuesta diferencial en el número de células dañadas, dependientes del sexo, sin cambios en la viabilidad celular en los dos tejidos.

Ambos trabajos indicaron que el vanadio es un elemento con actividad genotóxica, sin producir citotoxicidad y que los machos son más susceptibles, lo que pone de manifiesto la posible implicación de los estrógenos y las diferencias intrínsecas al sexo.

Por otro lado, Mussali y colaboradores (2005), describieron que el pentóxido de vanadio causa decremento significativo en la gamma-tubulina, proteína importante para la formación de los microtúbulos, por lo que el vanadio podría tener efectos adversos sobre la formación del aparato mitótico durante la división celular.

Uno de los mecanismos de acción principales de los metales, es la generación de estrés oxidante en los tejidos; esto también se ha demostrado con el modelo de inhalación debido a que se observó el aumento de 4-hidroxinonanal y de T-Bars (Fortoul *et al.* 2011), por ello, se considera que la intervención con un potente antioxidante podría mitigar los daños que causa en los organismos.

Todos los experimentos, han sido llevados a cabo en animales adultos, sexualmente maduros, sin embargo, para el humano una de las subpoblaciones más susceptibles a los efectos de la contaminación ambiental, son los niños. Es por ello que se deben llevar a obtener más datos utilizando modelos experimentales con animales que todavía no alcancen la madurez sexual, es decir en pre-púberes.

Por todos los efectos reportados que causa la inhalación de vanadio, es importante identificar los efectos sobre el material genético, comprender los mecanismos de acción y establecer el riesgo potencial que representa sobre la salud, así como proponer estrategias para

contrarrestar los efectos. Evaluar la respuesta de los organismos en etapas previas a la madurez sexual, complementadas por terapias anti-estrogénicas, permitiría establecer las diferencias inherentes al sexo. Por otro lado, la intervención con antioxidantes, podría indicar la participación del estrés oxidante en los efectos adversos que causa el vanadio.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

En ratones pre-púberes CD-1, hembras y machos, evaluar y comparar los efectos genotóxicos de la inhalación de vanadio, administración de anastrozol e ingesta de ascorbato durante un tiempo experimental de 4 semanas.

4.2. Objetivos específicos

- **Fase 1**

En machos (30 g; 60 d):

- Determinar la concentración de ácido ascórbico (0, 50, 100, 150 y 225 mg/kg/día) que se les administrará a los ratones por vía oral, mediante una curva dosis-respuesta.

En hembras (30 g; 60 d):

- Evaluar la eficacia del anastrozol (20 µg/kg/día) como anti-estrogénico en ratones hembra empleando la citología exfoliativa vaginal.

- **Fase 2**

En 12 diferentes grupos experimentales* de ratones CD-1 pre-púberes (21-23 días; 10±1 g; ♀ y ♂), durante 4 semanas:

- En sangre periférica:
 - Evaluar la citotoxicidad empleando la técnica de viabilidad celular por fluorocromos.
 - Identificar la presencia de rompimientos de cadena sencilla del ADN mediante el ensayo cometa (pH≥13) y comparar estos valores con los obtenidos por sitios álcáli-lábiles (ensayo cometa pH 12.3).
 - Cuantificar los micronúcleos en reticulocitos circulantes, mediante la tinción supravital con naranja de acridina (ensayo de micronúcleos).
 - Comparar por sexo y por grupo experimental los efectos sobre los parámetros evaluados.

*Grupos experimentales:

- Machos: 1-testigo; 2-vanadio (0.02 M/1h/2vps/4s); 3- vanadio+ácido ascórbico (50 mg/kg/día/v.o.); 4-ácido ascórbico.

- *Hembras*: 1-testigo; 2-vanadio (0.02 M/1h/2vps/4s); 3- vanadio+ácido ascórbico (50 mg/kg/día/v.o.); 4- vanadio+ácido ascórbico+ anastrozol (20 µg/kg/día/v.o.); 5- vanadio+anastrozol; 6- ácido ascórbico+anastrozol; 7-ácido ascórbico; 8- anastrozol.

- **Fase 3**

En machos (30 g; 60 d)

- Identificar la presencia de centrómero en los micronúcleos causados por la inhalación de vanadio en eritrocitos circulantes, mediante hibridación fluorescente *in situ* con sonda pancentromérica.

5. Método

5.1. Selección de grupos experimentales

Se emplearon ratones hembras y machos de la cepa CD-1. La selección de edades se consideró con respecto a las etapas de vida del ratón y de acuerdo a Saiz y colaboradores (1983).

Los ratones pre-púberes tenían 21-23 días y los adultos 60 días, que es la edad de la primera cubrición; con esta diferencia, se asegura que los ratones prepúberes no presenten los cambios hormonales propios de la madurez sexual, y de este modo, tratar de omitir los efectos de las hormonas (testosterona y estrógenos). Los ratones de 60 días, son considerados como animales sexualmente maduros que son aptos para la reproducción, lo cual indica que se encuentran en un momento en el que sus hormonas sexuales están en niveles óptimos.

En todos los casos, los animales experimentales se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad (12:12 h) con agua y alimentación (Purina Rodent Chow, México) *ad libitum*. Los animales fueron manejados de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

5.2. Esquema de inhalación

Inhalación: los animales se colocaron en una caja de acrílico transparente (45 x 21 x 35 cm) conectada a un ultranebulizador UltraNeb[®]99 con flujo de 10 L/min que contenía la solución de V (0.02M). Los animales se sometieron a este procedimiento durante 1 hora dos veces a la semana, hasta completar 4 semanas de exposición.

5.3. Estrategias experimentales

5.3.1. Administración oral de ácido ascórbico

Se les administró por vía oral la solución de ácido ascórbico (Redoxón[®] Bayer, México) durante 4 semanas. La dosis utilizada (calculada por la curva dosis respuesta) fue de 50 mg/kg/día.

5.3.2. Administración oral de anastrozol

1mg de anastrozol (Arimidex[®] AstraZeneca, México) se disolvió en 30 ml de amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7.4). Se separó en alícuotas de 500 µL que se mantuvieron a 4 °C. Se les administró 20 µg/kg/día por vía oral, durante todo el tiempo experimental.

5.3.3. Toma de muestras

Sangre entera. Antes de comenzar con la administración o la exposición, se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal y se consideró como tiempo cero (TO). Transcurridas las primeras 24 h y cada 7 días (durante 28 días), se tomó la muestra de sangre entera (10 µL) de los 5 ratones de cada grupo. Las muestras se procesaron para viabilidad celular por fluorocromos, ensayo cometa (pH 13 y pH 12.3) y ensayo de micronúcleos con naranja de acridina.

Los animales se pesaron al TO, 7, 14, 21 y 28 días durante la exposición y/o administración.

5.4. Técnicas

5.4.1. Citología exfoliativa vaginal

La citología exfoliativa vaginal se realizó de acuerdo con Caligioni (2009) 1 grupo de 8 hembras (60 días de edad) se aclimataron durante 7 días. Posteriormente se inició el muestreo diario de citología vaginal: con 20 µL de PBS estéril a 37 °C se realizó un lavado vaginal suave. La solución se recuperó, se colocó en un portaobjetos y se tiñó con 20 µL de azul de metileno (0.1%) y se observó inmediatamente al microscopio de campo claro.

En el ciclo estral del ratón hembra, se pueden diferenciar 4 etapas, el pro-estro, el estro, el metaestro y el diestro; las cuales se identificaron por el tipo celular predominante en la muestra (Figura 2).

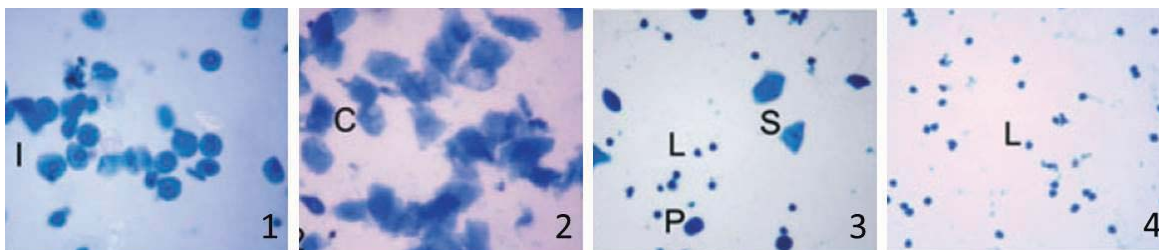


Figura 2. Citología exfoliativa vaginal de ratón hembra. En 1 se muestra el **pro-estro** con células nucleadas, características de esta etapa, en 2 el **estro**, en el cual se observan las células escamosas cornificadas (C), en 3 el **metaestro** con leucocitos (L), células cornificadas (S) y células nucleadas (P), en 4 el **diestro** con abundantes leucocitos (L). (Imagen modificadas de Caligioni, 2009).

Cada ratón hembra se muestreó y se clasificó la etapa en la que se encontraba durante 15 días, cada 24 hrs y con base en la regularidad de su ciclo estral se separaron en 2 grupos, las que ciclaban de manera regular conformaron el grupo anastrozol y las que presentaron menos regularidad, formaron parte del grupo testigo (al que sólo se le administró PBS como vehículo).

Durante el día 16 comenzó la administración de anastrozol y de vehículo. El muestreo continuó hasta el día 32.

5.4.2. Viabilidad celular por fluorocromos

La técnica de viabilidad celular por fluorocromos se llevó a cabo como reporta Strauss (1991) con algunas modificaciones. Brevemente, se disolvieron 5 mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en 1 ml de acetona y 2 mg/ml de bromuro de etidio (Br-Et) en 1 ml de PBS. Posteriormente, 15 µL de la solución de FDA y 100 µL de Br-Et se mezclaron con 2.4 ml de PBS, esta solución se utilizó inmediatamente.

La sangre entera se mezcló en proporción 1:1 con la solución BrEt-FDA-PBS y se observó con el microscopio de epifluorescencia (200 X). Se cuantificaron las células muertas (fluorescen en rojo) y las metabólicamente activas (emiten fluorescencia verde) en campos al azar hasta completar un total de 100 células, obteniéndose la proporción de células vivas con respecto a las muertas.

5.4.3. Ensayo cometa pH13 y pH 12.3

La técnica se llevó a cabo como reporta Singh y colaboradores (1988) con ciertas modificaciones. Cada muestra de sangre entera se mezcló con agarosa de bajo punto de fusión y colocó en una laminilla a la que previamente se le adicionó una capa de agarosa regular. Cada muestra se realizó por duplicado.

Las muestras se sumergieron en una solución de lisis (EDTA 100 mM-Tris 10 mM-NaCl 2.5 M, Tritón X-100 1%, DMSO 10%) y se mantuvieron a 4°C en condiciones de oscuridad durante 1 h.

En una cámara de electroforesis horizontal, las muestras fueron embebidas en amortiguador de corrida (NaOH 300mM- EDTA 1mM, pH 13) durante 20 min (tiempo de desenrollamiento del ADN) y posteriormente 20 minutos de corrimiento a 300 mA y 25 V.

Después, las muestras se lavaron con una solución de TRIS-HCl (0.4 M) a pH 7.5 durante 15 min. Al término de la neutralización, se empleó etanol absoluto para fijarlas.

La observación de las muestras se llevó a cabo con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm y uno de absorción de 570 nm. En la flourocromización se empleó bromuro de etidio (0.02 mg/ml) disuelto en agua destilada. Se midió al azar la longitud de la cola de 200 nucleoides por muestra, estas medidas se emplearon para categorizar el daño.

De acuerdo con la longitud de la cola del cometa, se clasificaron en 5 categorías de daño: 1 (sin daño), 2 (bajo), 3 (medio), 4 (alto) y 5 (severo o “nubes”). Una vez clasificados se obtuvo el índice de migración (IMg) de cada individuo (Rodríguez-Mercado *et al.* 2011). El IMg es un indicador de rompimientos del ADN que facilita la interpretación de los resultados obtenidos con ensayo cometa.

Ensayo Cometa a pH 12.3, es otra versión alcalina, pero el desenrollamiento y la electroforesis se llevan a cabo con amortiguador ajustado a pH 12.3, se realiza como medida para conocer el daño al ADN sin incluir lesiones debidas a sitios álcali-lábiles.

5.4.4. Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina

El ensayo de MN con laminillas cubiertas NA se llevó a cabo de acuerdo con Krishna y Hayashi (2000) con algunas modificaciones.

Primero, el fluorocromo (NA) se disolvió en agua destilada (1 mg/ml). Una pequeña cantidad de la solución de NA se extendió sobre una laminilla pre-calentada (~70 °C) y libre de impurezas. Las laminillas cubiertas con NA se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seco.

La sangre periférica se obtuvo por corte de la vena caudal del ratón. 5 µL de sangre se colocaron en el centro de una laminilla con NA y se protegieron con un cubreobjetos; cada muestra se realizó por duplicado. Las preparaciones se mantuvieron a 4°C durante al menos 24 h (para maximizar la tinción) y hasta 2 días.

Una región adecuada de la preparación se seleccionó con un objetivo de bajo aumento (20X) antes de comenzar la cuantificación de los MN que se realizó con el objetivo de mayor aumento (100X). En la preparación se observaron: i) células intactas, ii) el núcleo de los leucocitos exhibiendo fluorescencia verde-amarilla y iii) reticulocitos o eritrocitos policromáticos con fluorescencia rojo-naranja. El reconocimiento de un MN es sencillo, porque presentan forma redonda y muestran una fuerte fluorescencia verde-amarilla (Figura 3).

Los 5 animales de cada grupo fueron muestreados. Por cada 1000 eritrocitos se cuantificó el número de reticulocitos. De esta manera se obtuvo la proporción de reticulocitos de los individuos. Posteriormente, por cada 2000 reticulocitos se cuantificaron los MN que son observados, de esta manera se calcula la frecuencia en los reticulocitos.

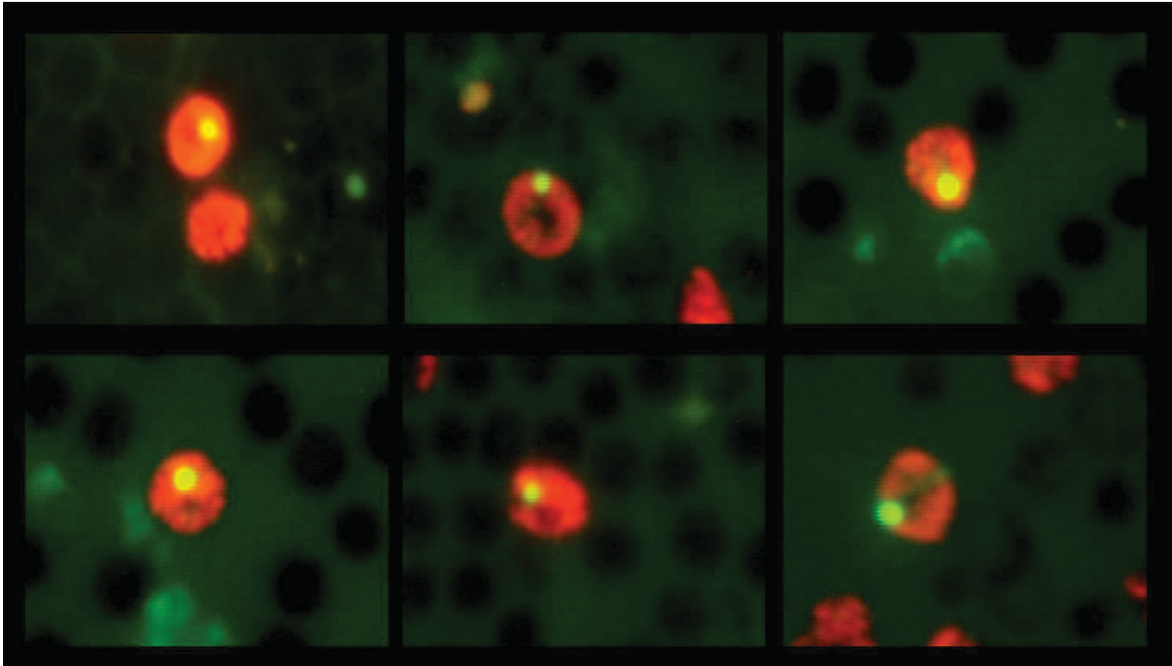


Figura 3. Micronúcleos con naranja de acridina. Los reticulocitos exhiben fluorescencia rojo-naranja debido a la remanencia citoplásmica de ARN-ribosomal. El ADN (MN) emite fluorescencia amarillo-limón.

5.4.5. Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH)

El protocolo para realizar el marcaje de la región centromérica se llevó a cabo con el método reportado por Schriever-Schwemmer y Adler (1994), con algunas modificaciones. Brevemente, la muestra de 5 μ L de sangre entera se extendió sobre un portaobjetos, posteriormente se fijó por inmersión durante 5 min en metanol.

Las muestras fijadas y secas se incubaron en una solución de SSC-2x (pH 7.0) en baño maría a 37 °C durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, se colocaron en un tren de etanol a concentración creciente (70, 80 y 100 %) durante 2 min en cada uno. Se dejaron secar a temperatura ambiente. Para la co-desnaturalización se extendieron 3 μ L de sonda (Kreatech POSEIDON DNA probes. All mouse centromereprobe KBI-30500G), con un cubreobjetos limpio y se sellaron con rubet-cement. Las muestras se colocaron en un hibridador a 75 °C durante 2 min. Un segundo período de incubación en cámara húmeda se llevó a cabo en oscuridad, a 37 °C por 12 horas. Posteriormente, se retiró el cubreobjetos y en una solución de 0.4xSSC/0.3 % Igepal se lavaron durante 2 min a 72 °C. Inmediatamente después, se colocaron en una solución de 2XSSC/0.1 % Igepal durante 1 min a temperatura ambiente.

Para la deshidratación se empleó etanol a concentraciones crecientes (70, 80 y 100 %) durante un minuto en cada una y las muestras se secaron a temperatura ambiente.

Finalmente, para la contratinción se utilizó DAPI y VectaShield en proporción 1:2. Las muestras fueron protegidas un cubreobjetos y se observaron con el microscopio de epifluorescencia. Se cuantificó el número total de micronúcleos en los eritrocitos (color azul por el fluorocromo DAPI) y se identificaron aquellos que emitían también fluorescencia verde que indicó la presencia de centrómero (Figura 4).

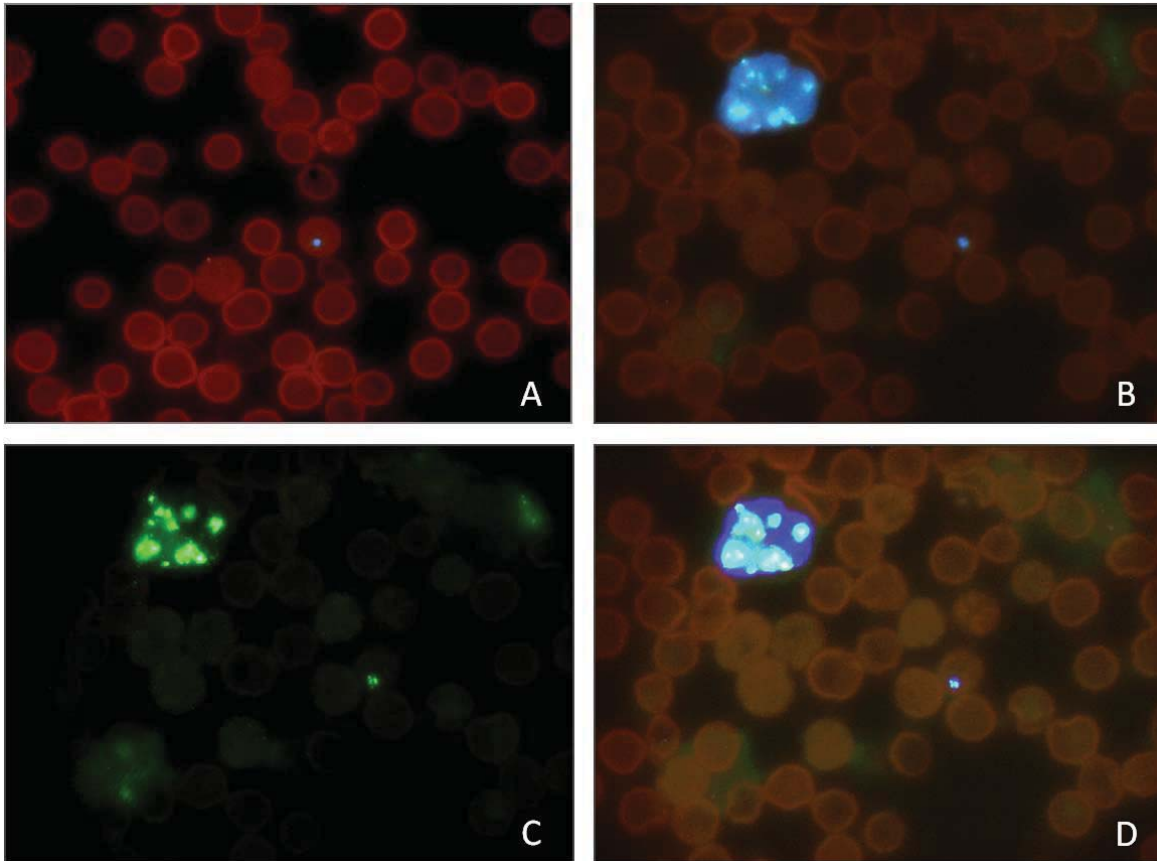


Figura 4. En A se observa gran cantidad de eritrocitos, uno de ellos presenta un punto azul, es un micronúcleo teñido con DAPI, en B se encuentra el núcleo de un leucocito (azul) y un micronúcleo dentro del citoplasma de un eritrocito. En C se evidencia un MN-centrómero positivo, porque la sonda pancentromérica está acoplada a un fluorocromo verde. Finalmente en D ambos fluorocromos se observan: azul (ADN) y verde (centrómero).

5.5. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (versión 5.0). Para identificar diferencias entre grupos (tiempo cero *versus* tiempo de exposición y la comparación entre grupos experimentales) se utilizó el análisis de multivarianza ANOVA y la prueba post-Hoc Bonferroni. Para identificar la correlación entre dos variables (tiempo y efecto) se empleó el índice de correlación de Pearson.

Para comparar dos grupos (pH13 *versus* pH12.3 y hembras *versus* machos) se empleó la prueba de t pareada de dos colas.

En todos los experimentos los datos fueron reportados como media \pm error estándar y los valores de $P < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. Resultados

6.1. Fase 1.

6.1.1. Dosis de ácido ascórbico en machos

Viabilidad celular: las dosis (0, 50, 100, 150, 225 mg/kg/día) de ácido ascórbico administradas no mostraron causar efectos citotóxicos; en todos los grupos y en todos los tiempos la viabilidad celular fue mayor al 90 %. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de células viables de ratones a los que se les administró ácido ascórbico a diferentes dosis durante 4 semanas.

Tiempo	Dosis (Viabilidad celular %)				
	0 mg	50 mg	100 mg	150 mg	225 mg
To	96.9 ± 1.1	94.3 ± 1.3	96.5 ± 0.5	96.0 ± 1.0	95.0 ± 1.0
1 s	96.2 ± 1.3	96.8 ± 1.0	95.7 ± 1.8	95.7 ± 1.8	94.0 ± 1.0
2 s	95.0 ± 1.0	94.6 ± 2.3	93.7 ± 0.7	93.5 ± 1.5	94.0 ± 2.0
3 s	95.1 ± 1.0	94.4 ± 2.6	93.5 ± 1.5	94.2 ± 1.2	93.5 ± 0.5
4 s	95.7 ± 2.0	93.0 ± 1.0	94.5 ± 0.5	94.0 ± 3.0	95.5 ± 0.5

Micronúcleos: la frecuencia de MN se incrementó de manera significativa a partir de la semana 1 y hasta la 4 en las dosis 100, 150 y 225 mg/kg/día. La dosis de 50 mg/kg/día no mostró diferencia significativa comparada con el tiempo cero ni con el grupo testigo (0 mg/kg/día) durante las 4 semanas de administración (Figura 5). El índice de correlación de Pearson es positivo y significativo sólo para la dosis más alta (225 mg/kg) con un valor de $r = 0.9230$.

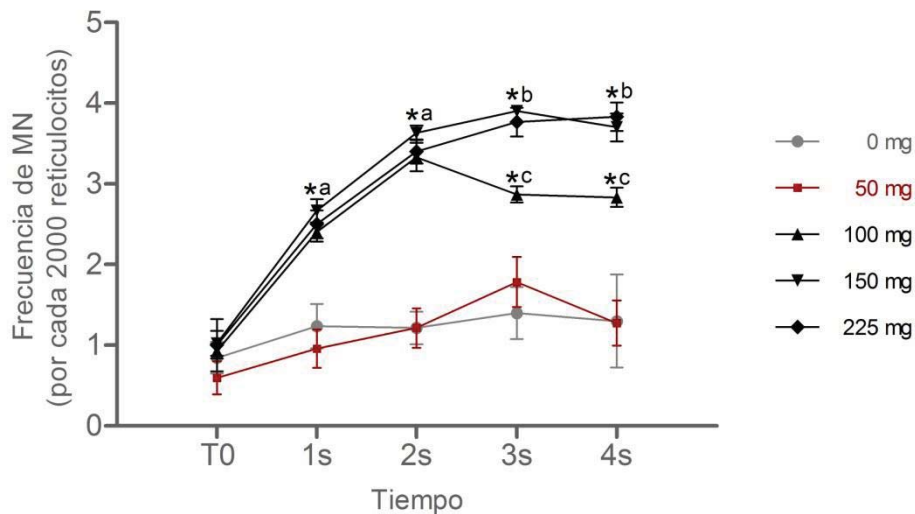


Figura 5. Frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones machos suplementados con ácido ascórbico por vía oral. ANOVA y prueba post hoc Bonferroni. * $P \leq 0.05$ (tiempo de administración vs T0), ^a $P \leq 0.05$ (100, 150 y 225 mg/kg vs 0 y 50 mg/kg), ^b $P \leq 0.05$ (150 y 225 mg/kg vs 100, 50 y 0 mg/kg), ^c $P \leq 0.05$ (100 mg/kg vs 50 y 0). Índice de correlación de Pearson: MN- 225 mg/kg $r = 0.9230$.

Ensayo Cometa pH 13: el IMg indicó que los rompimientos de cadena sencilla se incrementaron significativamente comparado con el grupo testigo (0 mg/kg/día) durante las 4 semanas de administración de ácido ascórbico en la dosis que no mostró aumento en la frecuencia de MN (50 mg/kg/día) (Figura 6).

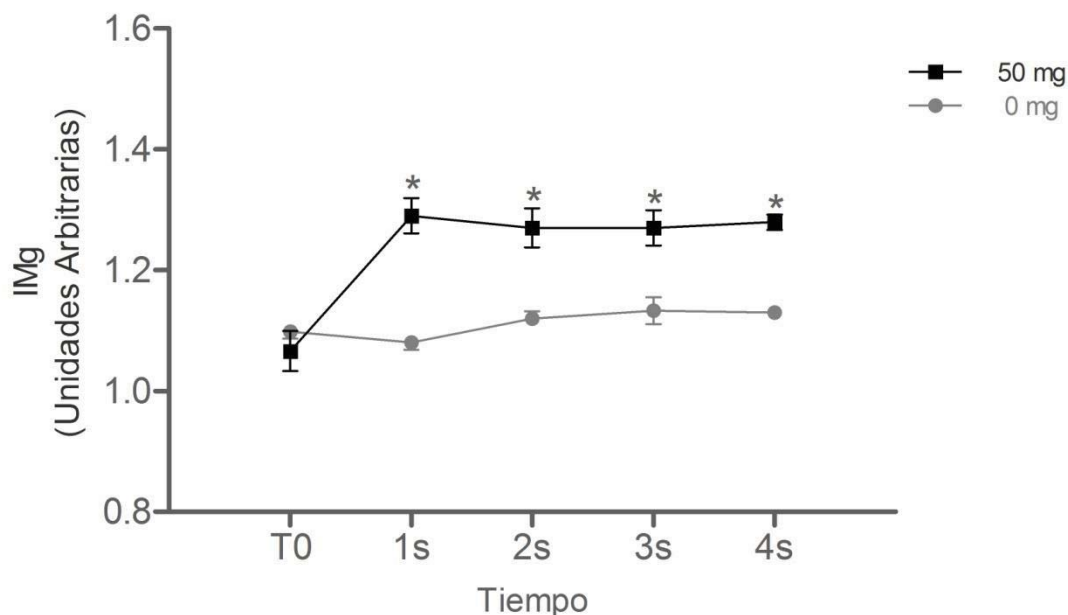


Figura 6. Índice de migración del ADN de leucocitos de sangre periférica de ratones a los que se les administró ácido ascórbico por vía oral (50 mg/kg/día) comparados con el grupo testigo (0 mg/kg/día). Prueba t (dos colas), * $P \leq 0.05$.

6.1.2. Eficacia del anastrozol

La citología exfoliativa vaginal se realizó durante 15 días consecutivos al grupo completo (n=8) de ratones hembra. Se observó que 7 de los 8 individuos, presentaron 3 e incluso las 4 etapas del ciclo estral (Tabla 3).

Tabla 3. Etapas del ciclo estral durante la etapa de aclimatación (día 1 al 15).

G	Días sin administración														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	P	M	M	M	E	E	M	M	D	P	M	M	E	E	M
R2	P	P	P	E	E	M	M	E	P	E	E	E	M	M	E
R3	M	E	M	M	M	D	M	D	D	M	D	D	D	M	M
R4	P	M	M	M	M	M	M	M	P	E	E	E	M	M	P
R5	E	E	M	M	E	E	M	M	P	M	M	M	M	E	E
R6	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
R7	E	E	M	M	M	M	M	D	M	M	M	D	M	E	E
R8	E	E	E	E	E	M	M	M	P	E	E	E	E	E	M

P, pro-estro; M, metaestro; D, diestro; E, estro.

A partir del día 16 el grupo de 8 animales se dividió en 2. Se seleccionaron cuatro de los animales que tuvieron un ciclo más regular (especialmente la etapa de estro) y se les administró anastrozol (20 µg/kg/día). Al otro grupo, se le administró PBS (vehículo). Se observó que a partir del día 21, los ratones hembra que ciclaban regularmente después de que se les administró anastrozol, presentaron sólo las etapas de metaestro y diestro (Tabla 4).

Tabla 4. Etapas del ciclo estral durante la administración de anastrozol y PBS (vehículo) del día 16 al 32.

Ratona	Días de administración																
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
An R1	E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
An R2	M	M	E	E	E	M	D	M	M	M	D	M	D	M	M	M	D
An R3	M	M	D	E	M	D	M	M	D	M	M	M	M	M	M	D	M
An R4	M	M	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T-R5	E	E	M	M	E	E	M	M	P	M	M	M	M	E	E	M	D
T-R6	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
T-R7	E	E	M	M	M	M	M	D	M	M	M	D	M	M	D	E	E
T-R8	E	E	E	E	E	M	M	M	P	E	E	E	E	E	M	M	D

An, anastrozol; P, pro-estro; M, metaestro; D, diestro; E, estro.

6.2. Fase 2. Comparación por sexo de los efectos genotóxicos de vanadio, ácido ascórbico y anastrozol en ratones pre-púberes.

6.2.1. Machos

Viabilidad celular: en todos los casos y durante el tiempo experimental la viabilidad celular fue mayor o igual al 91 %. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de células viables de ratones a los que se les expuso a la inhalación de vanadio y se les administró ácido ascórbico (50 mg/kg/día) durante 4 semanas.

Tiempo	Grupo			
	Testigo	Vanadio	V + AO	A O
To	95.8 ± 0.8	95.7 ± 0.6	95.7 ± 0.5	92.6 ± 2.1
1 sem	94.9 ± 1.5	90.1 ± 1.4	96.3 ± 1.6	97.6 ± 0.8
2 sem	96.0 ± 1.4	97.0 ± 0.4	95.6 ± 1.6	92.3 ± 1.8
3 sem	95.3 ± 1.8	94.8 ± 2.1	92.0 ± 2.2	91.8 ± 1.4
4 sem	95.5 ± 0.3	95.0 ± 0.4	91.6 ± 2.2	92.0 ± 3.9

V+AO, vanadio+ácido ascórbico; AO, ácido ascórbico.

Ensayo cometa pH13: el grupo vanadio mostró efecto significativo en el aumento del IMG desde la semana 1 hasta la 4, comparado con los grupos testigo, V+AO y AO. El grupo AO mostró aumento significativo respecto al grupo control en las semanas 1, 2 y 3. El grupo V+AO no evidenció diferencia significativa con el grupo testigo (Figura 7).

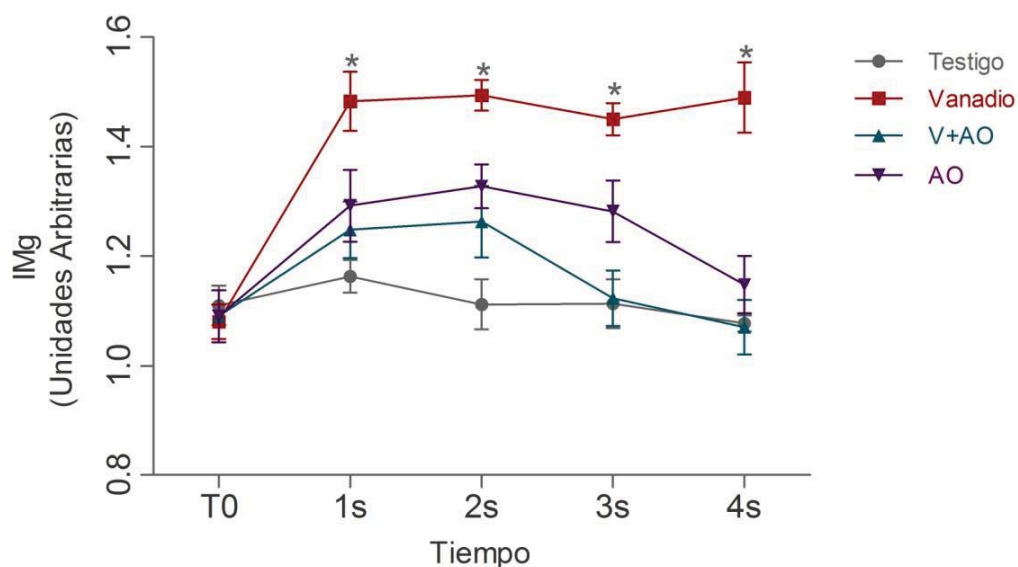


Figura 7. Índice de Migración del ADN en los 4 grupos experimentales de machos durante 4 semanas. ANOVA, Tukey * $P \leq 0.05$, vanadio vs testigo, V+AO y AO.

Ensayo cometa pH12.3: la versión semi-alcalina de esta prueba, mostró que en la semana 3 y 4 de exposición a vanadio, disminuyen significativamente los rompimientos causados por sitios álcali-lábiles (Figura 9).

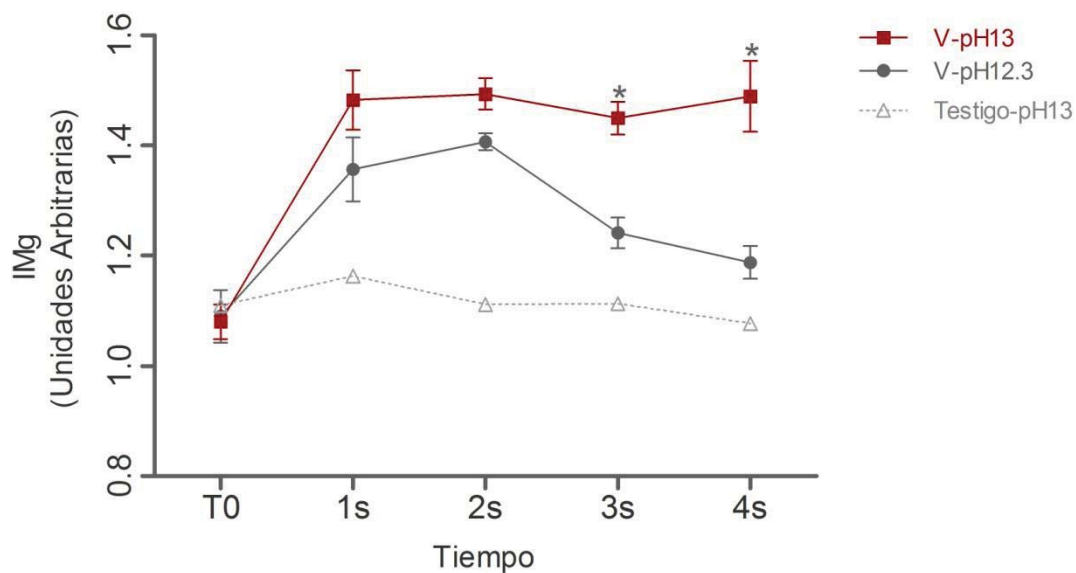


Figura 9. Índice de migración del ADN de machos expuestos a vanadio. Comparación entre el ensayo cometa pH 13 y pH 12.3. Prueba t, dos colas, * $P \leq 0.05$.

Ensayo de micronúcleos: se observó incremento significativo y progresivo en la frecuencia de MN en el grupo vanadio; el índice de correlación de Pearson es significativo y positivo con un valor de $r=0.92$ (Figura 10). Los tres grupos restantes (V+AO, AO y Testigo) no mostraron diferencia significativa comparados con el tiempo cero, ni entre ellos.

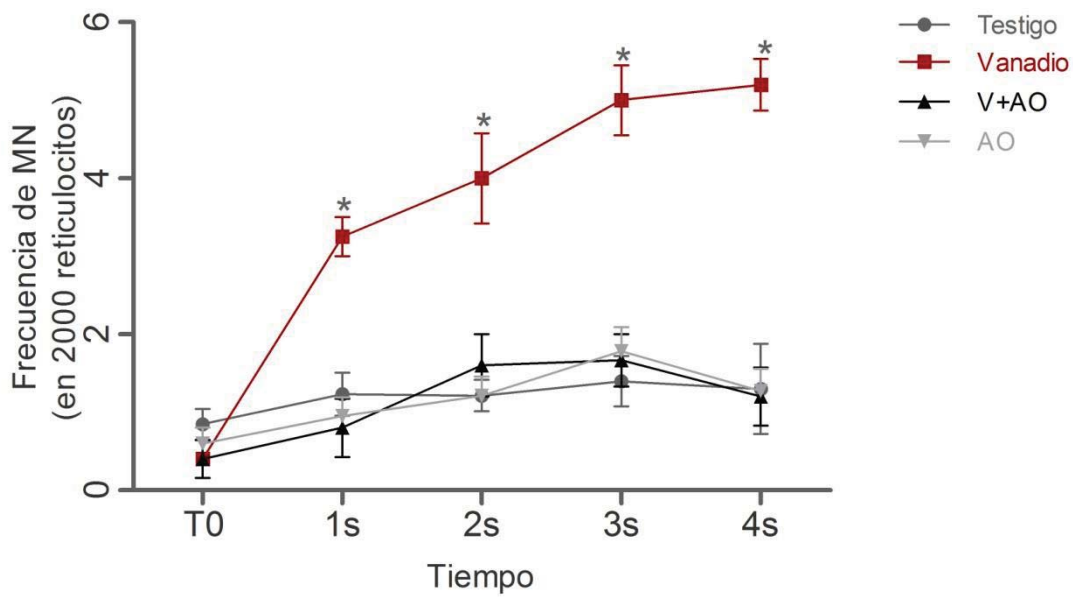


Figura 10. Frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica en machos de los 4 grupos experimentales durante 4 semanas. ANOVA, Tukey * $P \leq 0.05$

Peso: en la semana 4 sólo los grupos V+AO y AO presentaron incremento significativo en el peso (Figura 11).

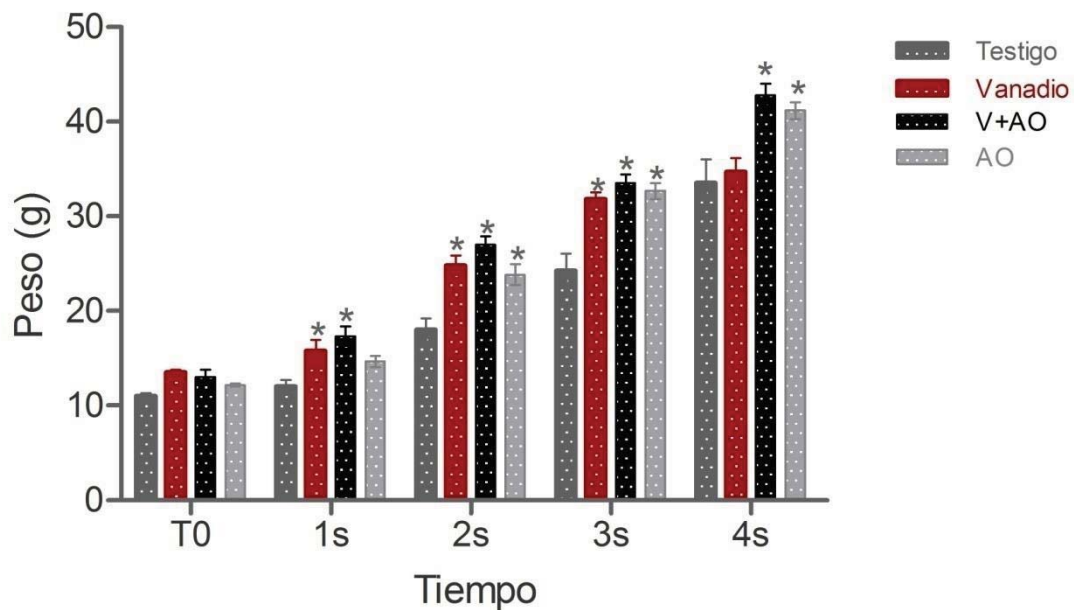


Figura 11. Diferencias de peso en machos de los 4 grupos experimentales durante 4 semanas. ANOVA, Tukey * $P \leq 0.05$

6.2.2. Hembras

Viabilidad celular: en todos los grupos y durante todo el tiempo experimental la viabilidad celular fue mayor o igual al 91 %. No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de células viables en los distintos grupos experimentales de hembras durante 4 semanas.

Grupo	Tiempo de exposición Viabilidad celular (%)				
	To	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem
Testigo	97.2 ± 1.7	98.0 ± 0.1	98.5 ± 0.7	91.5 ± 0.7	97.0 ± 1.4
V	96.3 ± 1.5	94.9 ± 2.8	96.3 ± 1.8	92.7 ± 6.1	91.8 ± 2.9
V + AO	97.0 ± 2.0	96.0 ± 1.7	95.0 ± 1.0	95.7 ± 1.0	97.0 ± 1.0
V+ AO+ AN	96.7 ± 1.5	95.7 ± 2.3	97.3 ± 0.6	96.3 ± 2.5	91.3 ± 0.6
V+ AN	97.3 ± 2.1	98.3 ± 0.6	94.0 ± 1.0	97.3 ± 0.6	91.0 ± 3.6
AO+AN	97.0 ± 2.0	96.7 ± 4.2	96.3 ± 0.6	94.3 ± 3.1	96.3 ± 2.3
AO	97.3 ± 2.1	94.7 ± 1.5	96.3 ± 2.5	98.7 ± 0.6	96.3 ± 0.6
AN	96.7 ± 2.1	99.3 ± 1.2	98.0 ± 1.0	93.3 ± 1.5	91.3 ± 5.7

V, vanadio; V+AO, vanadio+ácido ascórbico; V+AO+AN, vanadio+ácido ascórbico+anastrozol; V+AN, vanadio+anastrozol; AO+AN, ácido ascórbico+anastrozol; AO, ácido ascórbico.

Ensayo cometa pH 13: los únicos grupos de hembras comparados fueron: V, V+AO y V+An. Los resultados muestran que no hubo diferencia significativa en el IMg de los grupos V+AO y V durante todo el tiempo experimental, sólo se observó que a las 4 semanas se incrementó significativamente el IMg del grupo V+An comparado con el tiempo cero y con los otros dos grupos experimentales (Figura 12).

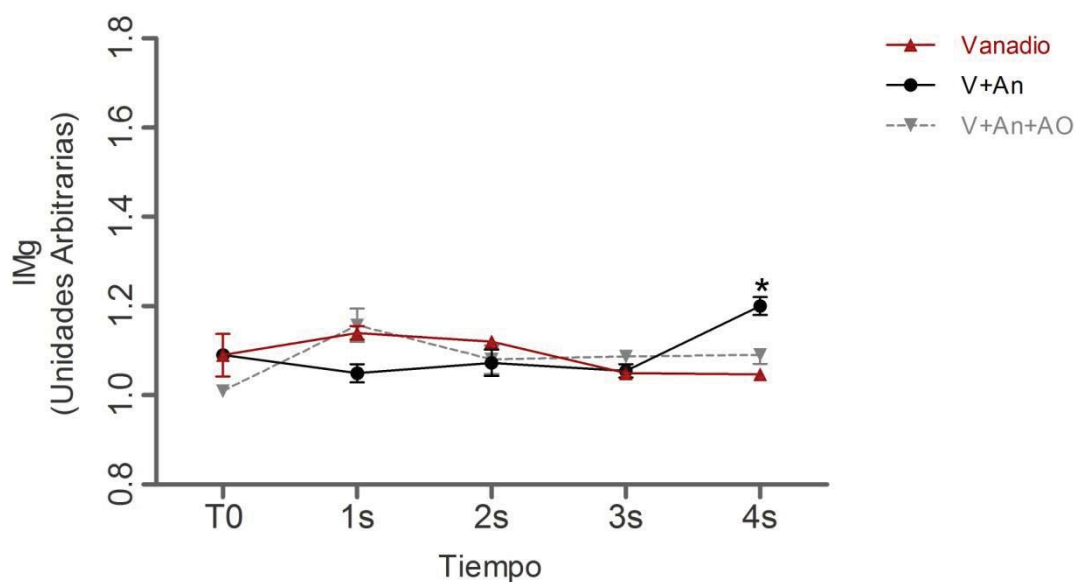


Figura 12. Índice de migración del ADN en leucocitos de hembras durante 4 semanas. ANOVA, Tukey * $P \leq 0.05$ (Diferencia V+An vs V y V+An+AO).

Ensayo Cometa pH 12.3: no se observó diferencia significativa entre los resultados obtenidos con la versión alcalina y la semi-alcalina del grupo vanadio (Figura 13).

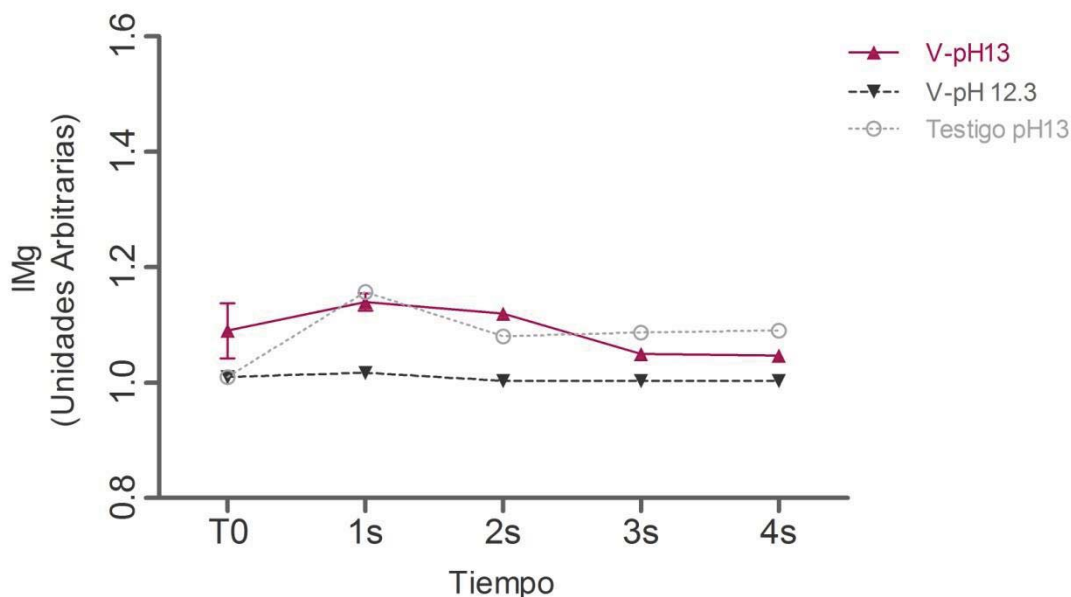


Figura 13. Índice de migración del ADN de hembras expuestas a vanadio. Comparación entre el ensayo cometa pH13 y pH 12.3.

Ensayo de micronúcleos: grupos testigo, An, V+AO, V+AO+An, AO, AO+An, An; no se observaron cambios significativos entre el tiempo cero comparado con el tiempo experimental, ni se presentaron diferencias entre grupos (Figuras 14, 15 y 16).

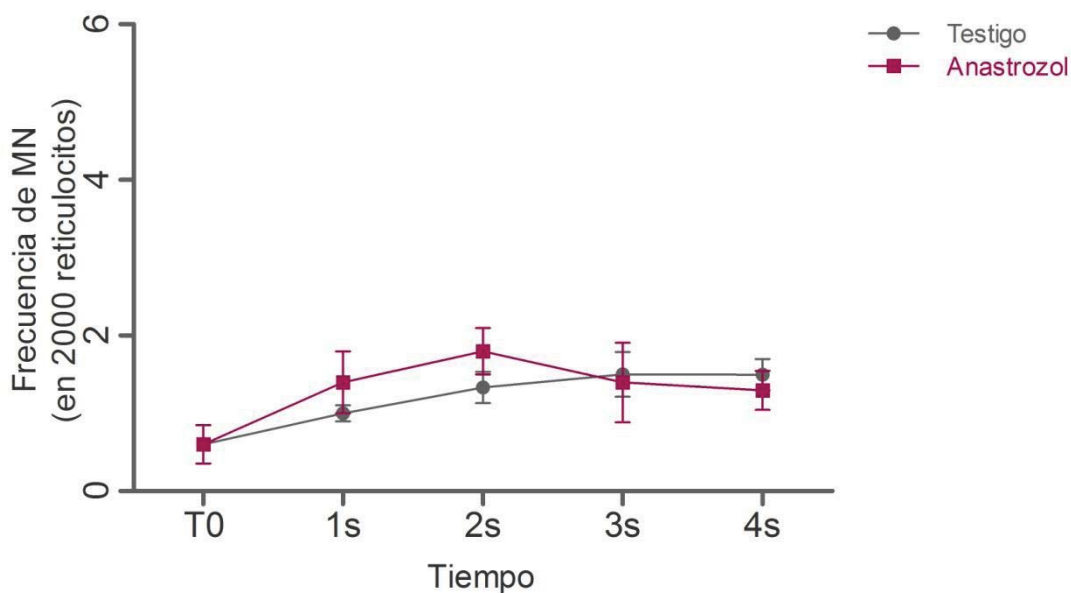


Figura 14. Frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica en las hembras de los grupos testigo y anastrozol (An) durante 4 semanas.

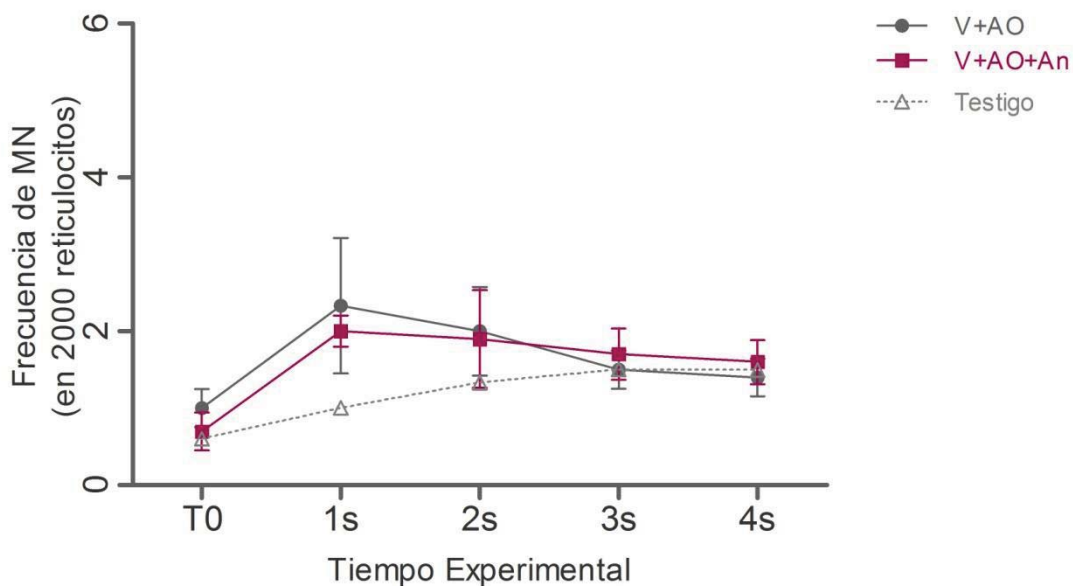


Figura 15. Frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica en las hembras de los grupos V+AO (vanadio+ácido ascórbico) y V+AO+An (vanadio+ácido ascórbico+anastrozol) durante 4 semanas.

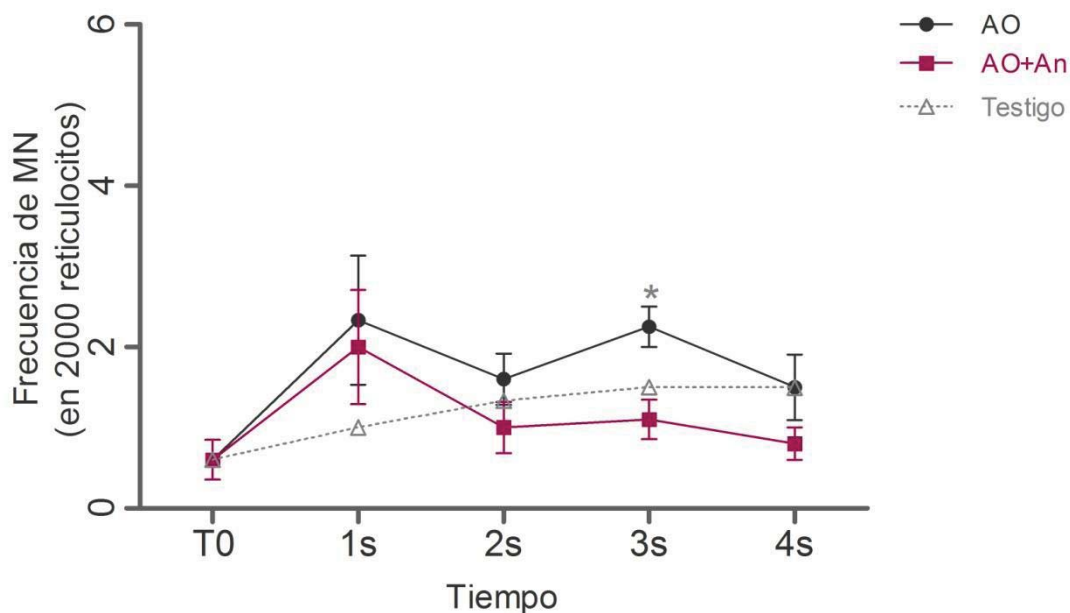


Figura 16. Frecuencia de MN en reticulocitos de sangre periférica en las hembras de los grupos AO (ácido ascórbico) y AO+An (ácido ascórbico+anastrozol). * $P \leq 0.05$ prueba t (dos colas).

Grupo V+An: la frecuencia de MN aumentó de manera significativa y progresiva desde la semana 1 y hasta la 4 (comparada con el tiempo cero y durante todo el tiempo experimental). El índice de correlación de Pearson fue significativo y positivo ($r = 0.98$) (Figura 17).

Grupo V: en este grupo se observó aumento significativo comparado con el tiempo cero durante las semanas 1, 2 y 3. Sin embargo, en la semana 4 la frecuencia de MN disminuye significativamente con respecto a la semana 3, sin llegar a ser tan bajos como los del T0. El índice de correlación de Pearson no fue significativo ($r= 0.26$). Este grupo, contrastado con el grupo V+An, presenta mayor frecuencia de MN durante la semana 1, pero en la semana 4 es significativamente menor (Figura 17).

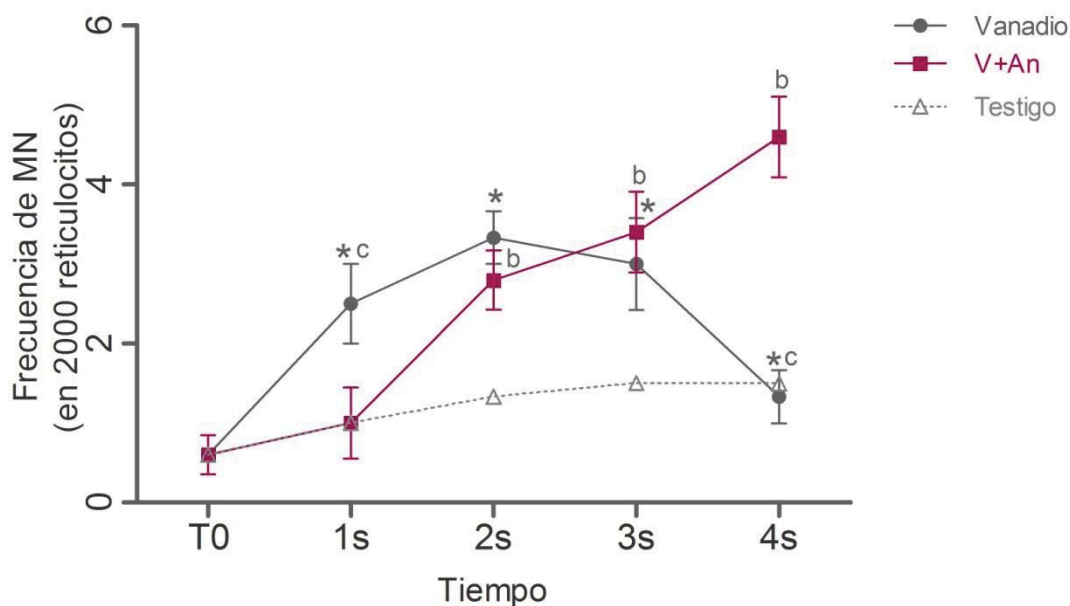


Figura 17. Frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos de sangre periférica de las hembras expuestas a V (vanadio) y a V+An (vanadio+anastrozol). Prueba t (dos colas): * $P \leq 0.05$ Tiempo cero vs 1, 2, 3 y 4 sem; ^b $P \leq 0.05$ V+An vs V; ^c $P \leq 0.05$ vanadio vs V+An.

Grupos V+AO vs V: se observa que la frecuencia de MN es mayor durante las semanas 2 y 3 en el grupo vanadio comparado con el grupo que inhaló vanadio y se le administró ácido ascórbico. Durante la semana 4 no se presenta diferencia significativa entre ambos grupos (Figura 18).

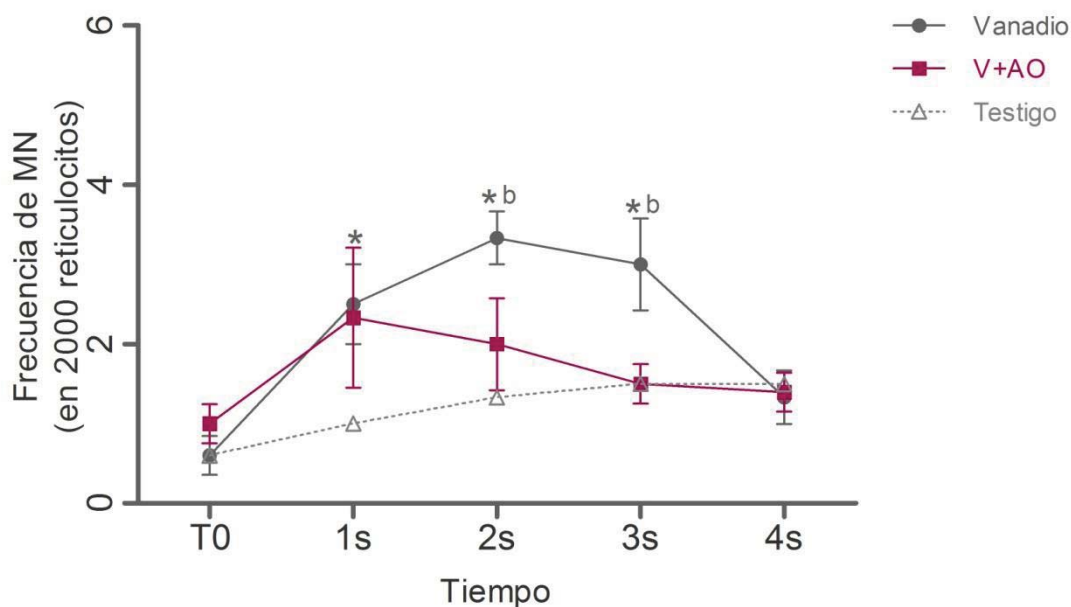


Figura 18. Frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos de sangre periférica de las hembras expuesta a V (vanadio) y a V+AO (vanadio+ácido ascórbico) durante 4 semanas. Prueba t (dos colas): * $P \leq 0.05$ Tiempo cero vs 1, 2, 3 y 4 sem; ^b $P \leq 0.05$ V vs V+AO; ^c $P \leq 0.05$ vanadio vs V+AO.

Grupos V vs V+An vs V+AO+An: la comparación de estos grupos experimentales, muestra que durante la semana 4 el grupo V+An presenta la mayor frecuencia de MN comparado con el grupo V y V+AO+An (Figura 19).

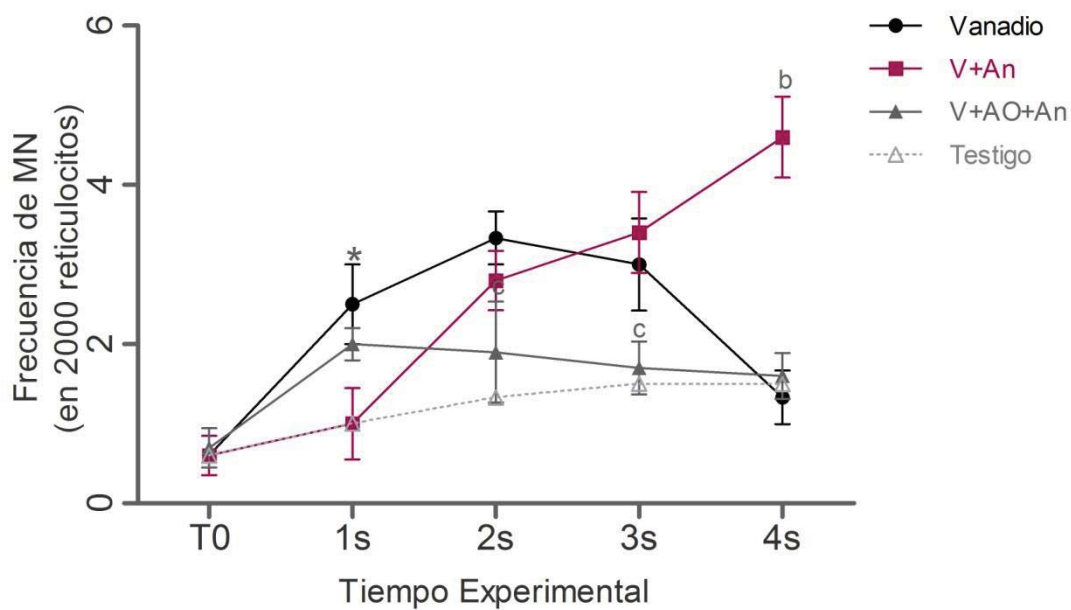


Figura 19. Frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos de sangre periférica de las hembras durante 4 semanas. ANOVA *post Hoc* Bonferroni, $*P \leq 0.05$, vanadio vs V+An; $^bP \leq 0.05$, V+An vs vanadio y V+AO+An; $^cP \leq 0.05$ V+AO+An vs V+An.

Peso: durante la semana 4 se observó la disminución significativa del peso de los grupos V, V+AO y V+AO+An comparados con el grupo testigo (Figura 20).

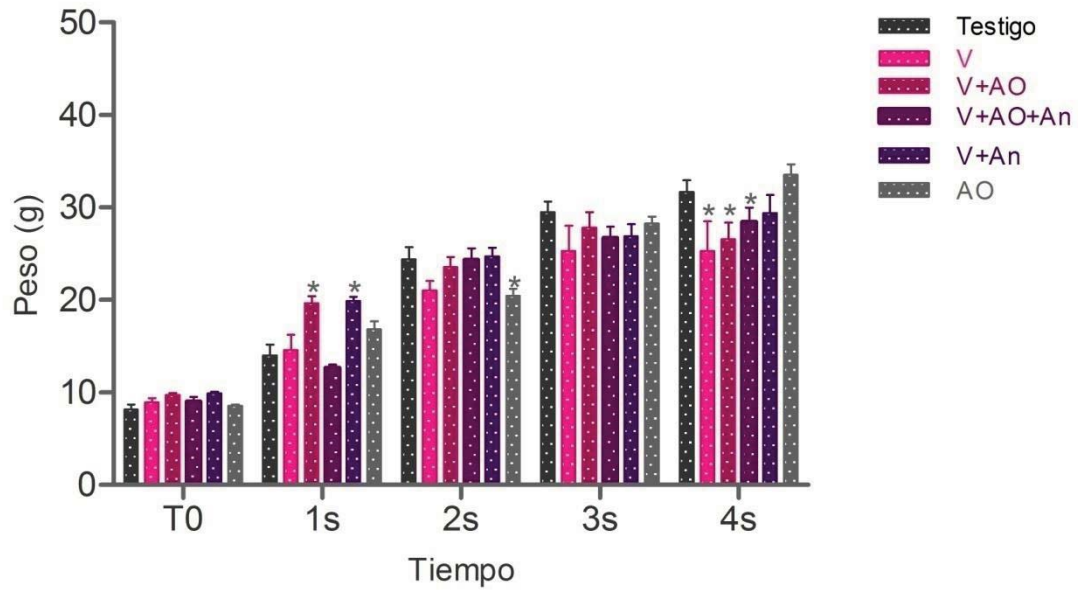


Figura 20. Peso de 6 grupos de hembras experimentales durante 4 semanas. ANOVA, Bonferroni, $*P \leq 0.05$.

6.2.3. Comparación por sexo: hembras vs machos

Ensayo Cometa pH13 y 12.3: el grupo de machos V presenta incremento significativo del IM comparado con el grupo de hembras V con ambas variantes de la prueba (Figura 21).

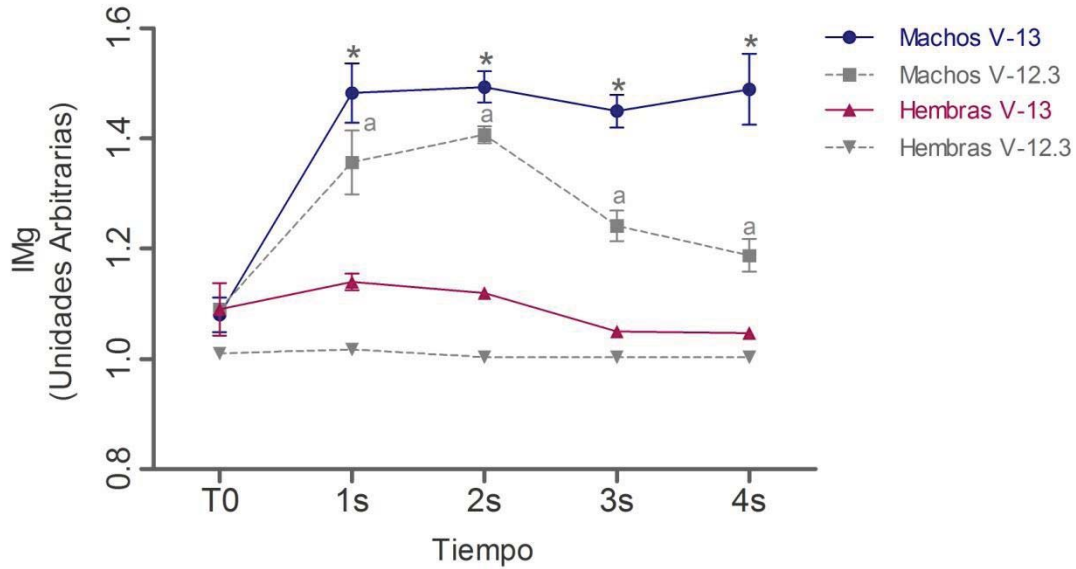


Figura 21. Índice de migración del ADN de las hembras y los machos expuestos a vanadio. Comparación entre el ensayo cometa pH13 y 12.3. ANOVA, Tukey, * $P \leq 0.05$.

Micronúcleos: grupos testigo-hembras, testigo-machos y anastrozol. No se presentó diferencia significativa entre los 3 grupos durante todo el tiempo experimental (Figura 22).

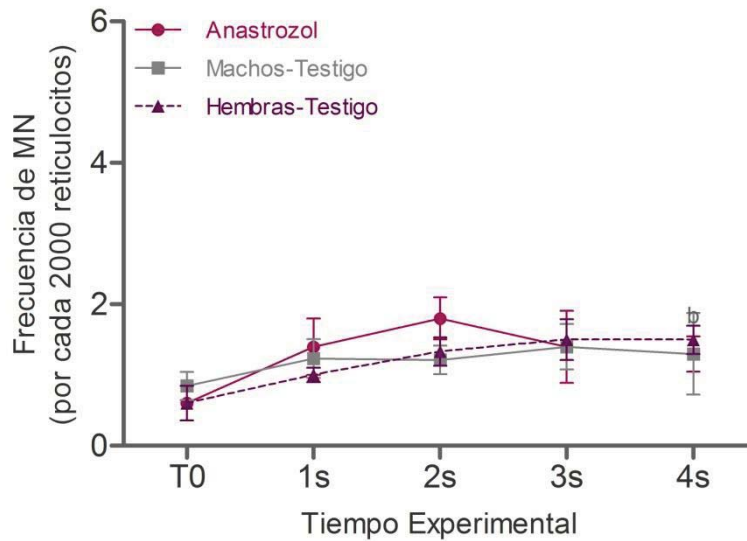


Figura 22. Frecuencia de micronúcleos en los reticulocitos de sangre periférica de los grupos anastrozol vs machos-testigo vs hembras-testigo durante 4 semanas.

Grupos hembras-vanadio, machos-vanadio y hembras V+An: en la semana 3, el grupo machos-V presenta mayor frecuencia de MN que los grupos de hembras. Durante la semana 4, el grupo machos-V y hembras-V+An no muestran diferencia significativa entre ellos. Por el contrario, el grupo hembras-V evidencia menor frecuencia de MN (Figura 23).

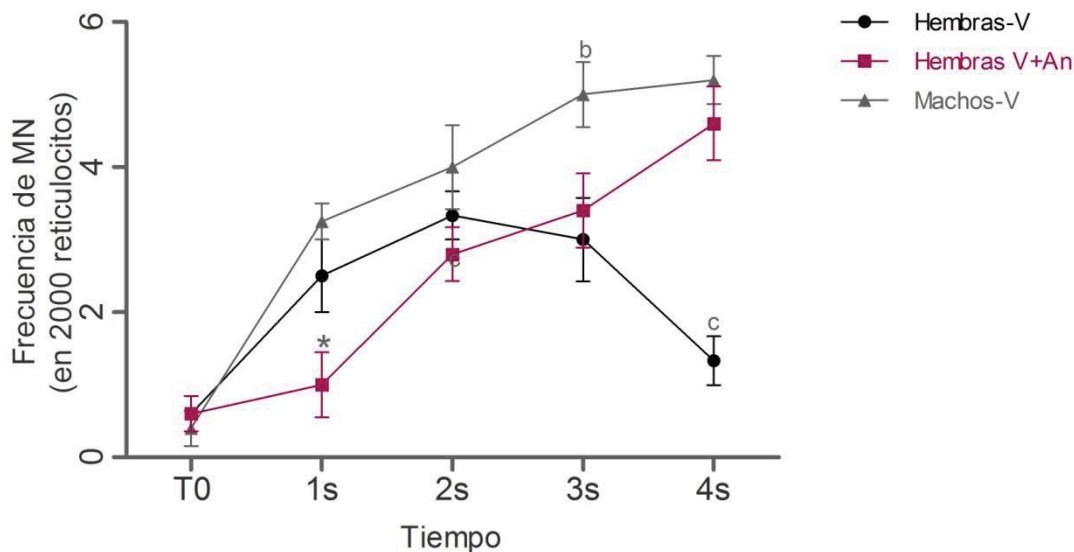


Figura 23. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de los grupos machos-V, hembras-V y hembras-V+An durante 4 semanas. ANOVA, *post Hoc* Bonferroni, * $P \leq 0.05$ hembras-V+An vs machos-V y hembras-V; ^b $P \leq 0.05$ machos-V vs V+An y hembras-V; ^c $P \leq 0.05$ hembras-V vs machos-V y hembras V+An.

Grupos hembras-V+AO, hembras V+AO+An y machos-V+AO: no presentaron diferencias significativas entre ellos durante todo el tiempo experimental (Figura 24).

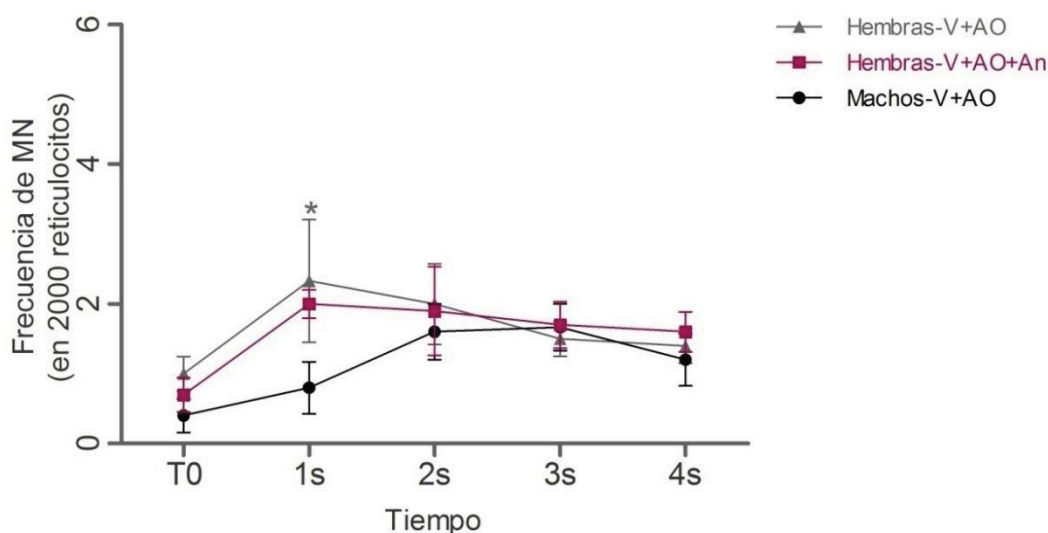


Figura 24. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de los grupos machos-V+AO, hembras-V+AO y V+AO+An durante 4 semanas. ANOVA, *post Hoc* Bonferroni, * $P \leq 0.05$ hembras-V+AO vs machos-V+AO y hembras-V+AO+An.

Peso: a las 4 semanas de exposición y administración de los distintos fármacos, los grupos de hembras expuestas a vanadio, a vanadio+ácido ascórbico y a ácido ascórbico, presentan disminución significativa del peso comparadas con los machos de los grupos equivalentes (Figura 25).

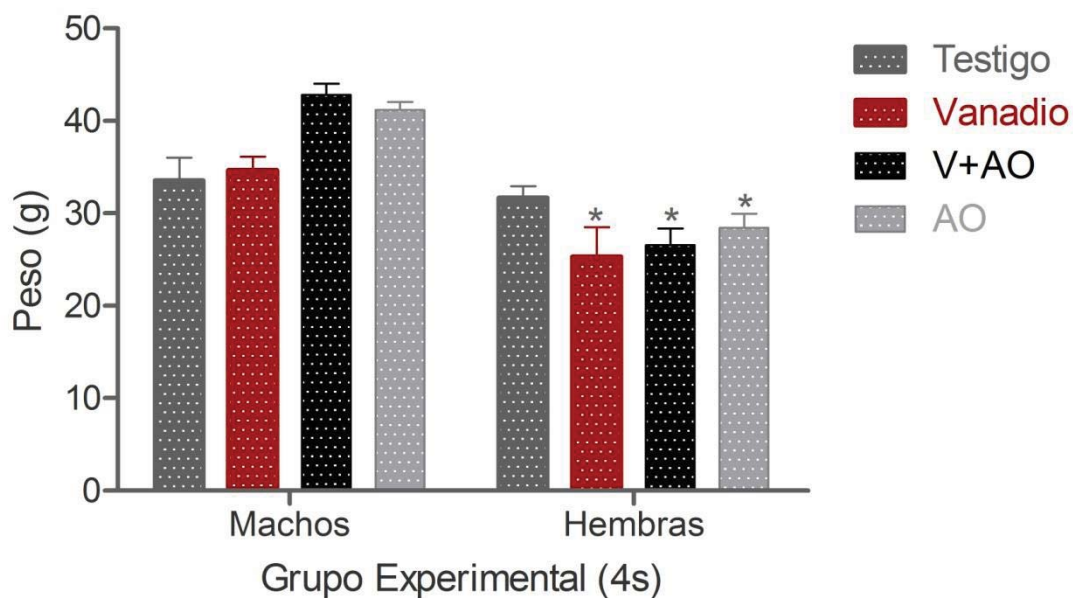


Figura 25. Peso a las 4 semanas de los grupos experimentales de machos y hembras. ANOVA, post Hoc Bonferroni, * $P \leq 0.05$ hembras vs machos.

6.3. Fase 3. Identificación de centrómero en micronúcleos presentes en eritrocitos causados por la inhalación de vanadio.

Sonda pan-centromérica: la frecuencia de MN aumenta significativamente durante todo el tiempo de exposición comparado con el grupo testigo (Figura 26).

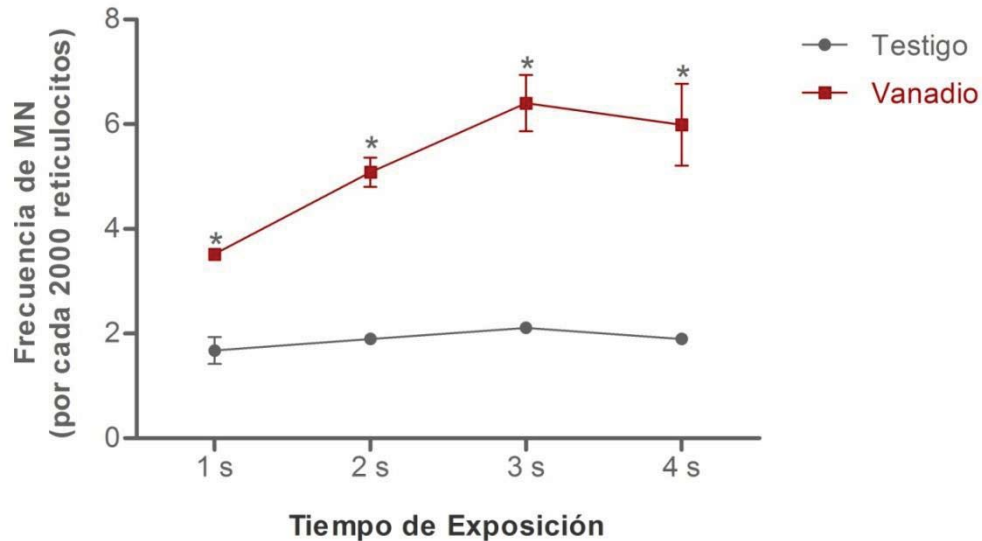


Figura 26. Frecuencia de micronúcleos en sangre periférica de los grupos de Machos adultos expuestos a vanadio y el grupo Testigo. Prueba t (dos colas)* $P \leq 0.05$

Comparación con los grupos de Testigos Positivos para daño al ADN (Figura 27):

- *MMS*: se observa el aumento significativo de MN, comparados con el grupo testigo, a las 24 h posteriores a la inyección intraperitoneal de este agente clastógeno (40 mg/kg).
- *CT*: se observa el aumento significativo de MN, comparados con el grupo testigo, a las 24 h posteriores a la inyección intraperitoneal de este agente inhibidor de los mecanismos de reparación de cadena sencilla de ADN (4 mg/kg).
- *Col*: se observa el aumento significativo de MN, comparados con el grupo testigo, a las 24 h posteriores a la administración oral de este agente aneugénico (5 ml/kg).

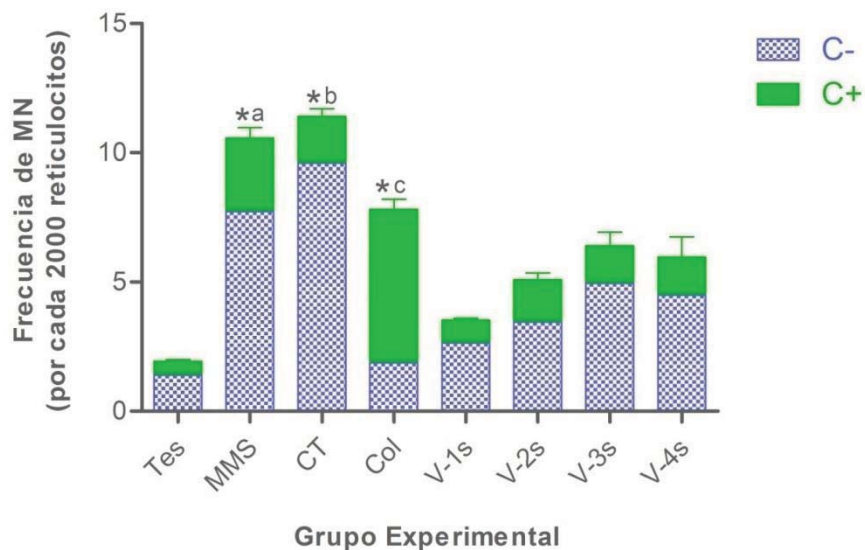


Figura 27. Frecuencia de MN en los diferentes grupos experimentales. ANOVA, *post Hoc* Bonferroni. * $P \leq 0.05$ MMS, CT y Col vs Testigo; ^a $P \leq 0.05$ MMS vs Vanadio (1 a 4 sem), ^b $P \leq 0.05$, CT vs Vanadio (1 a 4 sem), ^c $P \leq 0.05$, Col vs Vanadio (1 a 4 sem). Tes, testigo; MMS, metilmetanosulfonato; CT, camptotecina; Col, colchicina; V, vanadio.

6.4. Resumen de Resultados

Fase 1.

- **Efectos genotóxicos del ácido ascórbico:** a dosis de 100, 150 y 225 mg/kg/día este antioxidante causa MN durante todo el tiempo experimental. A la dosis de 50mg/kg/día el ácido ascórbico no causa MN, pero sí provoca rompimientos de cadena sencilla. Los porcentajes de células viables fueron mayores al 90 %, es decir el ácido ascórbico tiene efectos genotóxicos, pero no citotóxicos en los leucocitos de ratones.
- **Eficacia del anastrozol como anti-estrogénico:** se comprobó que la dosis empleada (20 µg/kg/día) de anastrozol evita de manera eficiente la formación de estrógenos; las ratonas a las que se les administró este fármaco, se mantuvieron en las dos fases del ciclo estral (metaestro y diestro) que se caracterizan por ser las que presentan las concentraciones menores de estrógenos.

Fase 2. Comparación por sexo de los efectos genotóxicos del vanadio, ácido ascórbico y anastrozol en ratones pre-púberes.

Machos

- El ácido ascórbico y el vanadio no son agentes citotóxicos.
- El vanadio causa rompimientos de cadena sencilla en el ADN y también MN, sin embargo cuando se administra simultáneamente ácido ascórbico, ambos tipos de daño disminuye significativamente.
- Los rompimientos causados por vanadio, son principalmente producidos por daño oxidante; por lo tanto disminuyen cuando se administra un antioxidante como el ácido ascórbico.
- El peso aumenta sólo en los grupos que consumieron ácido ascórbico (AO y V+AO).

Hembras

- Ni el vanadio, ni el ácido ascórbico y tampoco el anastrozol solos o en combinación causaron citotoxicidad en los leucocitos de las ratonas experimentales.
- En la cuarta semana, el vanadio cuando se administra simultáneamente con anastrozol, causa rompimientos de cadena sencilla. En ningún otro grupo se observaron rompimientos.
- El vanadio genera MN durante las semanas 1, 2 y 3, pero en la semana 4 disminuyen. Por el contrario, las hembras que inhalan vanadio y se les administra anastrozol generan MN significativa y progresivamente todo el tiempo. Los MN en este grupo están correlacionados en un 98 % con la ausencia de estrógenos y la inhalación de vanadio. Las hembras a las que se les inhibe la formación de estrógenos son más susceptibles al daño genotóxico.
- Los grupos suplementados con ácido ascórbico no generan MN. El ácido ascórbico protege a las hembras contra la generación de MN causados por V y por la ausencia de estrógenos.
- Los grupos de hembras V, V+AO y V+AO+An, pesaron menos que el grupo testigo y que los grupos V+An y AO.

Comparación por sexo

- Las hembras son menos susceptibles al daño al material genético causado por el vanadio; no presentan rompimientos de cadena sencilla de ADN. Sólo durante la semana 4 los machos muestran MN y las hembras ya no. Sin embargo, cuando la

formación de estrógenos es inhibida, las hembras tienen la misma frecuencia de MN que los machos.

- Ambos sexos responden positivamente a la suplementación con ácido ascórbico; cuando este antioxidante se administra, la frecuencia de MN disminuye en todos los casos.
- El peso de los animales se ve afectado a las 4 semanas de tiempo experimental, es decir, cuando están más cerca de la edad adulta. Las hembras son las más afectadas; entre los grupos testigo (hembras o machos) no hay diferencias, pero en los grupos V, V+AO y AO (comparados con el grupo equivalente) las hembras tienen un peso menor.

Fase 3. Identificación de centrómero en micronúcleos presentes en eritrocitos causados por la inhalación de vanadio

- **Sonda pancentromérica para MN causados por vanadio:** Los resultados muestran que la mayor proporción de MN que se generan como consecuencia de la inhalación de V, son C-. Es decir, la etiología predominante en los MN que causa el vanadio, es la clastogénesis.

7. Discusión

Todas las células que fueron analizadas en esta investigación (leucocitos y eritrocitos de sangre periférica) provienen de un tejido esencial para los organismos: la médula ósea (MO), por ello es necesario aclarar de qué manera los xenobióticos (como el vanadio o el ácido ascórbico) arriban a este tejido.

Por otro lado, es importante explicar la etiología de los MN en términos generales, ya que independiente de su origen, la morfología se observa idéntica cuando son evaluados con la técnica de MN con NA. Para identificar su origen (que va de acuerdo con el mecanismo de acción del fármaco o del xenobiótico), se emplean técnicas complementarias como el uso de sonda pancentromérica para marcar la región centromérica en los MN.

7.1. Irrigación de la médula ósea

En los mamíferos superiores, la MO constituye aproximadamente del 1 al 2.5% del total del peso corporal (Iversen 1997). Es el principal tejido en el que se lleva a cabo la producción de células sanguíneas, a través del complejo proceso conocido como *hematopoyesis* (Mayani *et al.* 2007), que es un proceso que conlleva la proliferación de los diferentes linajes celulares. Para mantener una hematopoyesis adecuada, la MO depende de un aporte sanguíneo adecuado. En reposo, recibe del 2 al 4 % del gasto cardíaco. La microvasculatura de la médula ósea, consiste en una red de sinusoides fenestrados (endotelio y lámina basal discontinua) lo cual permite alta permeabilidad a los solutos (Iversen 1997), entre ellos cualquier xenobiótico que viaje en el torrente sanguíneo.

7.2. Ausencia de efectos citotóxicos

De manera general, en ninguno de los grupos experimentales (hembras o machos) se observó la disminución de la viabilidad celular: ni la inhalación de vanadio, ni la administración oral de anastrozol o de ácido ascórbico, solos o en combinación, comprometen la integridad de las células o causan su muerte. La ausencia de citotoxicidad, permitió llevar a cabo el ensayo cometa, ya que es necesario un porcentaje de células viables mayor al 80 % para considerar que los resultados del ensayo sean considerados válidos (Tice *et al.* 2000).

7.3. Etiología de los micronúcleos

Los micronúcleos se originan de dos maneras (Fenech 2000):

1. **Clastogénesis:** Por el rompimiento de la doble hebra de ADN, lo cual generaría que el MN observado contenga un fragmento de cromosoma que al no tener centrómero, no puede migrar ni incorporarse a los núcleos principales durante la división celular. El rompimiento cromosómico se debe a daño al ADN, entre ellos: aductos, bases oxidadas o rompimientos de cadena sencilla, es decir daños que deban ser escindidos por los mecanismos de reparación. De esta manera, un rompimiento de cadena sencilla, cuando el material genético pasa por la fase de síntesis, se puede convertir en un rompimiento de cadena doble y originar así, un micronúcleo. Los micronúcleos generados por este mecanismo, se caracterizan porque la probabilidad de que no tengan centrómero, es muy alta.

2. **Aneugénesis:** Por la alteración del aparato mitótico o la inhibición del centrómero, lo cual provocaría que el MN observado en el citoplasma del EPC contenga un cromosoma completo que no se incorporó correctamente al núcleo de la célula hija. Durante la división celular, es de vital importancia que el aparato mitótico y/o el centrómero lleven a cabo sus funciones adecuadamente, si esto no es así, el huso acromático podría no interactuar con los cromosomas y causar pérdidas de material genético. Los micronúcleos generados durante este proceso, se caracterizan porque presentan región centromérica.

Ambos mecanismos se resumen en la figura 29.

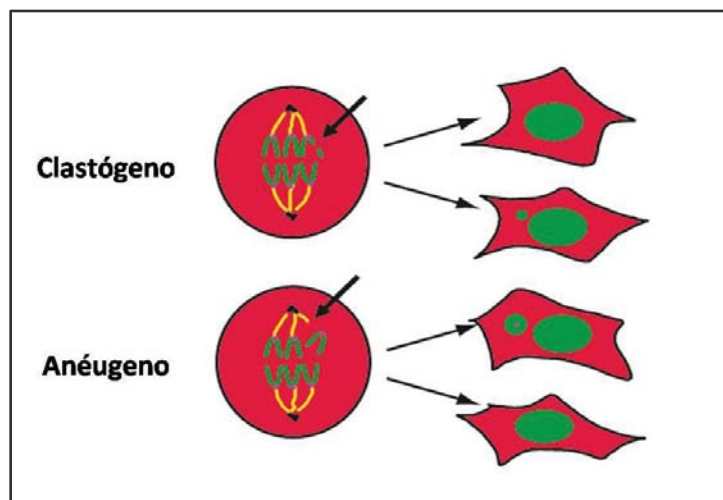


Figura 29. Esquematación de la etiología de los micronúcleos.

7.4. Fase 1.

7.4.1. Genotoxicidad del ácido ascórbico

Los resultados de este trabajo muestran que a dosis de 100, 150 y 225 mg/kg/día el ácido ascórbico administrado por vía oral genera incremento de MN en los ratones machos experimentales. La dosis más baja que fue probada (50 mg/kg/día) no aumentó la frecuencia de MN, pero incrementó el IMG del ADN, es decir, produjo rompimientos de cadena sencilla. Lo anterior indica que el ácido ascórbico origina efectos genotóxicos, incluso cuando bajas dosis son administradas. Se consideran bajas dosis, porque el

rango que se reporta en los estudios experimentales fluctúa entre 5 mg hasta 2,500 mg al día de este antioxidante (Levine *et al.* 1999).

Los estudios *in vitro* llevados a cabo en líneas celulares cancerosas, principalmente, muestran que el ácido ascórbico tiene efectos pro-oxidantes. Se ha reportado que la administración de este antioxidante, inhibe el crecimiento, causa muerte por apoptosis o necrosis, genera daño al ADN (rompimientos de cadena doble y sencilla), disminuye la sobrevivencia de la clona, interrumpe el ciclo celular y causa daño mitocondrial. Sin embargo, en otros estudios con esos mismos linajes celulares, también se ha reportado que no causa efecto o incluso que promueve el crecimiento. La revisión detallada al respecto la presentó Du y colaboradores (2012). Es importante mencionar, que los efectos pro-oxidantes del ácido ascórbico, fueron descritos en linajes de células aberrantes, cuya fisiología es distinta a la de las células normales o no malignas.

Por otro lado, en modelos *in vivo*, el principal ha sido el de ratón desnudo. Este modelo experimental ha servido para probar, en diversos tipos de tumores, los efectos del ácido ascórbico. Los resultados muestran que la administración por diversas vías del antioxidante, suele ser benéfica, porque en la mayor parte de los casos, se reporta la disminución del tamaño de los tumores (Du *et al.* 2012). Sin embargo, ese modelo murino, no representa a los ratones sanos, como es el caso de los ratones que se emplearon en este trabajo.

Sólo unos pocos estudios experimentales han sugerido que el ácido ascórbico tiene actividad antioxidante y pro-oxidante en sistemas *in vivo* (Buettner 1996).

Al respecto, en este estudio, no se analizó la etiología de los MN causados por ácido ascórbico, no obstante la posible actividad pro-oxidante sea la causa probable y por tanto, los MN sean de origen clastógeno.

7.4.2. Eficacia del anastrozol

El ciclo estral completo en las ratonas (así como en las ratas) ocurre en 4 ó 5 días y se divide en 4 etapas (Caligioni 2009):

1. **Proestro:** En esta etapa, las células epiteliales nucleadas predominan. Esas células se observan en grupo o individuales. Ocasionalmente, algunas células cornificadas pueden

estar presentes en la muestra. Esta etapa corresponde al día pre-ovulatorio, cuando los estrógenos (E₂) se incrementan y como consecuencia, se liberan las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y la ovulación ocurre.

2. **Estro:** Esta etapa se caracteriza por células escamosas cornificadas, que al microscopio se observan en conglomerados. No hay núcleos visibles, el citoplasma es granular y de forma irregular. La concentración de E₂ permanece elevada.
3. **Metaestro:** En esta etapa existe una mezcla de tipos celulares: leucocitos, células epiteliales nucleadas y células escamosas cornificadas. La concentración plasmática de E₂ es baja.
4. **Diestro:** En esta etapa predominan los leucocitos. Durante la misma las concentraciones de E₂ comienzan a elevarse.

Los resultados muestran que durante 16 días de realizar la citología exfoliativa vaginal para determinar la etapa del ciclo en el que se encontraban las ratonas experimentales, presentaron las 4 etapas del ciclo estral, especialmente el estro que es la etapa en la cual la concentración de E₂ es mayor. A partir del día 5 de la administración de anastrozol, los ratones hembra de ese grupo no volvieron a presentar dicha etapa; las dos que se observaron fueron principalmente metaestro y en pocas ocasiones diestro. Lo anterior indica, que como consecuencia de la administración del fármaco, los niveles de E₂ decayeron significativamente, ya que los cambios en el epitelio vaginal son debidos, en gran medida, a la acción de los estrógenos.

La hoja técnica de este fármaco, indica que la supresión máxima en la concentración de estrógenos es a los 3 ó 4 días posteriores a la administración oral diaria, lo cual coincide con los resultados del presente trabajo, dado que, efectivamente a partir del día 5 no mostraron la etapa de estro.

Este método sencillo de evaluación indirecta de concentración plasmática de estrógenos, permitió utilizar el anastrozol como un fármaco eficaz para inhibir la formación de estrógenos y obtener así, un modelo experimental no invasivo (como lo es la ovariectomía) para evaluar la respuesta de los individuos ante la ausencia de estrógenos, y de este modo, acercarse a la comprensión de su posible acción protectora contra la genotoxicidad inducida por vanadio.

7.5. Fase 2. Comparación por sexo de los efectos genotóxicos del vanadio, ácido ascórbico y anastrozol en ratones pre-púberes.

7.5.1. Efectos del Vanadio

7.5.1.1. Ingreso al sistema y a las células

En este trabajo, la vía por la cual los animales experimentales fueron expuestos a vanadio fue la inhalación. A continuación, se explica la manera en que este metal ingresa al sistema y alcanza los órganos y tejidos, entre ellos, la médula ósea.

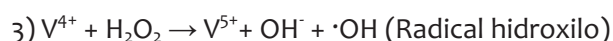
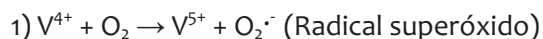
El vanadio cuando es inhalado, ingresa profundamente en las vías respiratorias, llega a los sacos alveolares y posteriormente alcanza el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo *et al.* 2001). En el plasma el V^{5+} es rápidamente reducido a V^{4+} , sin embargo ambos estados de oxidación existen debido a que el V^{4+} sufre oxidación espontánea a V^{5+} (Evangelou 2002, Mukherjee *et al.* 2004). El vanadio tetravalente es transportado por albúmina y transferrina, mientras que el pentavalente sólo por transferrina (Mukherjee *et al.* 2004, Gandara *et al.* 2005).

El vanadio ingresa a las células por canales iónicos inespecíficos, ambas formas pueden penetrar, sin embargo, el V^{5+} se absorbe cinco veces más que el V^{4+} (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). Una vez dentro de la célula, el vanadio pentavalente es reducido nuevamente por antioxidantes enzimáticos (p.e. NADPH) y no enzimáticos (p.e. L-ácido ascórbico) (Valko *et al.* 2006). Este metal en diferentes estados de oxidación es capaz de interactuar con gran número de componentes celulares, ejerciendo al mismo tiempo extensa variedad de efectos biológicos entre los que se encuentran la lipoperoxidación de las membranas, desnaturalización y oxidación de proteínas, en los ácidos nucleicos oxidación de bases nitrogenadas, rompimientos de cadena sencilla y doble, entrecruzamientos ADN- proteínas, entre otros (Attia *et al.* 2005, Ávila-Costa *et al.* 2005, Leopardi *et al.* 2005). En este sentido, datos sobre el potencial mutagénico de este metal, muestran que el vanadoceno (Evangelou 2002) y el V^{4+} y V^{5+} son capaces de reaccionar con el grupo fosfato y con el azúcar de los nucleótidos. También son efectivos inhibidores de proteínas propias del metabolismo del ADN como las polimerasas y ribonucleasas (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). Se considera que los efectos adversos que el vanadio ejerce sobre los sistemas biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, así como también por diferente vía de exposición, son debidos en gran medida a la inducción de estrés oxidante: generación de especies reactivas de oxígeno y de radicales libres (Evangelou 2002).

7.5.1.2. Estrés oxidante causado por vanadio

La valencia del metal de transición, como en el caso del Fe y del Cu, ha sido establecida como un factor importante en la habilidad del metal para catalizar la formación de ERO's en reacciones de tipo Fenton (HaMai *et al.* 2001, HaMai y Bondy 2004).

El vanadio es un metal que es posible encontrar en varios estados de oxidación y participa en reacciones que conllevan a la producción de radicales libres y que tienen lugar dentro de la célula (Valko *et al.* 2006):



Por otro lado, es importante mencionar que el vanadio demostró ser un compuesto capaz de generar peroxidación lipídica en tejido hepático en este modelo (Fortoul *et al.* 2011).

7.5.1.3. Efectos genotóxicos del vanadio

Se ha reportado que una gran variedad de metales pueden actuar como agentes mutagénicos y carcinogénicos en modelos humanos y animales (Leonard *et al.* 2004a), muchos estudios se han enfocado en el mecanismo por el cual los metales inducen acción adversa, como es el caso de los efectos genotóxicos (Valko *et al.* 2006).

El daño al ADN es causado por gran variedad de agentes, éstos pueden ser exógenos como los rayos ultravioleta, el humo del cigarro, las radiaciones gamma, los antibióticos, los contaminantes (Taylor 1994) y también por agentes endógenos como las especies reactivas de oxígeno (Lindahl y Wood 1999). Los tipos de daño son tan numerosos como los agentes que los causan y un buen ejemplo de ello son los rompimientos de cadena sencilla en el ADN que son frecuentemente el resultado del ataque a esta biomolécula por radicales libres (Lindahl y Wood 1999).

7.5.1.4. Vanadio y rompimientos de cadena sencilla del ADN

Los resultados obtenidos en la presente investigación, mostraron que la inhalación de vanadio genera el incremento de rompimientos de cadena sencilla (ensayo cometa pH13) en los leucocitos de sangre periférica. Asimismo, una gran parte de esos rompimientos, fueron causados por sitios álcali-lábiles (ensayo cometa pH 12.3) es decir, aquellos que son producto de los sitios AP (sitios apúricos o apirimidínicos). Por lo anterior, explicaremos las posibles

causas de ambos tipos de daños al ADN. Cabe mencionar, que este trabajo no es el primero que reporta que el vanadio causa rompimientos en esta importante biomolécula: en un estudio previo con el modelo de inhalación, se encontró que el vanadio fue capaz de generar rompimientos de cadena sencilla en leucocitos de ratones macho adultos (Rojas-Lemus 2006), lo cual concuerda con estudios previos que se han llevado a cabo con otros modelos y con otros compuestos de este metal (Roldán y Altamirano 1990, Cohen *et al.* 1992, Migliore *et al.* 1993, Rodríguez Mercado 1996, Rojas *et al.* 1996, Altamirano-Lozano *et al.* 1996, Altamirano *et al.* 1999, Ivancsist *et al.* 2002, Evangelou 2002, Kleinsasser *et al.* 2003, Rodríguez-Mercado *et al.* 2003).

Dentro del espectro de alteraciones que puede sufrir el ADN por acción de los radicales libres se describe la oxidación de desoxirribosas, modificación de bases nitrogenadas, entrecruzamientos de cadenas y rupturas, principalmente (Chihuailaif *et al.* 2002). Los rompimientos de cadena doble o sencilla que se generan por la interacción de radicales libres con el ADN, son producidos por la fragmentación del esqueleto azúcar-fosfato o indirectamente por la escisión de bases oxidadas (Mitra *et al.* 2002).

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) es presumiblemente el más reactivo de los radicales, y puede ser *in vivo* el oxidante más importante de componentes celulares como es el caso del ADN, proteínas y lípidos (Mitra *et al.* 2002). El aumento en la producción de $\cdot\text{OH}$ puede conducir a que este radical reaccione con las bases nitrogenadas o con el esqueleto pentosa-fosfato del ADN y de esta manera producir daño a las bases o rompimientos de cadenas (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). Se ha propuesto que los rompimientos producidos por el radical $\cdot\text{OH}$ en esta biomolécula son debidos a la accesibilidad de los átomos de hidrógeno del esqueleto del ADN. Este radical es conocido por reaccionar con todos los componentes de la molécula del ADN, dañando tanto bases púricas como pirimídicas y también al esqueleto del azúcar desoxirribosa (Valko *et al.* 2006). La generación de radicales hidroxilo que son altamente tóxicos pueden a su vez disparar nuevas reacciones que generan más radicales, ocasionando lo que se conoce como reacción en cadena, perpetuando así la generación de éstos (Evangelou 2002). El aumento en la producción de $\cdot\text{OH}$ puede conducir a que este radical reaccione con las bases nitrogenadas o con el esqueleto de la desoxirribosa del ADN y de esta manera producir daño a las bases o rompimientos de cadenas (Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). Se ha propuesto que los rompimientos producidos por el radical $\cdot\text{OH}$ en esta biomolécula son debidos a la accesibilidad de los átomos de hidrógeno del esqueleto del ADN. Este radical es conocido por reaccionar con

todos los componentes de la molécula del ADN, dañando tanto bases púricas como pirimídicas y también al esqueleto del azúcar desoxirribosa (Valko *et al.* 2006). Otro radical importante es el superóxido, que también puede oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Slupphaug *et al.* 2003). En el caso de la oxidación a nivel del azúcar desoxirribosa, la abstracción de uno de los hidrógenos puede iniciar el proceso de la ruptura oxidante (Lorente 2005). La oxidación de bases nitrogenadas ocurre preferentemente a nivel de la guanina fundamentalmente por ser la base nucleica de menor potencial de oxidación (Lorente 2005) (Figura 30).

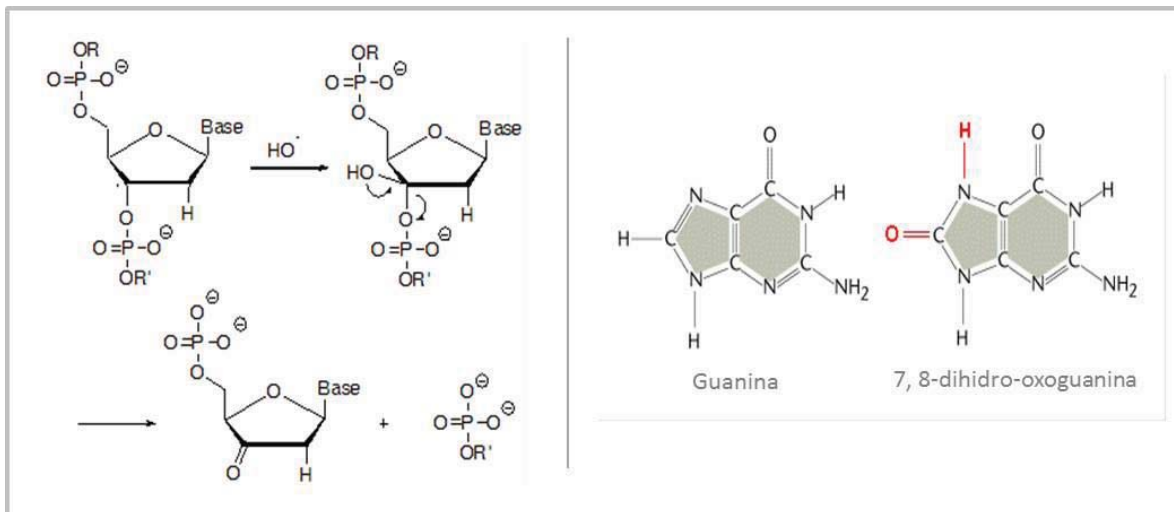


Figura 30. En 1 se representa el rompimiento de la cadena de ADN por la interacción del radical hidroxilo con el esqueleto del azúcar-fosfato. En 2 se indica la oxidación de la guanina.

Se han identificado más de 20 diferentes tipos de daño a las bases del ADN por estrés oxidante, uno de los más comunes es la purina 7, 8-dihidro-8-oxoguanina, comúnmente llamada también 8-oxoguanina u 8-oxoG. Mientras que el daño más común a las pirimidinas es la formación de timina glicol (Tg) (Slupphaug *et al.* 2003).

Por otro lado, Kehrer (1993) reporta los cambios que pueden desencadenar los radicales libres en su acción sobre las proteínas al describir los efectos sobre el gradiente de iones Ca^{2+} . El contenido intracelular de este ión es habitualmente diez mil veces menor en comparación con la concentración extracelular y cualquier perturbación que afecte su transporte altera significativamente la función celular. La enzima calcio ATPasa, encargada de mantener el gradiente de iones Ca^{2+} , contiene grupos tioles que pueden ser inactivados por los radicales

libres. Cuando ello ocurre, la enzima pierde su actividad catalítica y se modifica la homeostasis del Ca^{2+} . El incremento en la concentración intracelular de estos iones estimula la activación de proteasas, que atacan al citoesqueleto y de nucleasas que fragmentan al ADN.

7.5.1.5. Vanadio y micronúcleos

La técnica de MN es ampliamente usada para evaluar daños irreversibles sobre el material genético, el incremento en la frecuencia de micronúcleos predice el riesgo de cáncer en humanos (Bonassi *et al.* 2007).

Los resultados de este trabajo muestran que el vanadio es un metal de transición capaz de generar daño genotóxico irreversible en forma de micronúcleos en los ratones (hembras y machos pre-púberes). Los mecanismos por los cuales se explica este resultado se comentan a continuación.

La inducción de MN por el vanadio o sus compuestos han sido reportados por varios autores (Migliore *et al.* 1993, Zhong *et al.* 1994, Ciranni *et al.* 1995). Recientemente, en un estudio de comparación por sexo de animales adultos, Rojas-Lemus y colaboradores (2014) se encontró que la inhalación de vanadio causa el incremento en la frecuencia de MN de los ratones machos expuestos, sin embargo, las hembras adultas presentaron menor susceptibilidad al daño al ADN causado por vanadio. En general, el daño al ADN producido por estrés oxidante comprende oxidación y modificación de bases nitrogenadas y grupos azúcares, entrecruzamientos y también rompimientos de cadena sencilla y doble (Slupphaug *et al.* 2003; Valko *et al.* 2006), todos ellos son daños al ADN que en células que se encuentran en proliferación, podrían traducirse en micronúcleos. Cualquier agente que reaccione con el ADN es potencialmente peligroso (Halliwell *et al.* 1984); el daño al ADN puede resultar en arresto mitótico, inducción de la transcripción de genes, errores en la replicación e inestabilidad genómica, todo esto implicado en procesos carcinogénicos (Valko *et al.* 2006).

7.5.1.6. Interacción con el aparato mitótico

La interferencia con la organización y el ensamblaje del huso mitótico es un proceso crítico para el movimiento normal de los cromosomas, de hecho es el mecanismo propuesto de cómo contribuye el vanadio al incremento de las aneuploidías (Ramírez *et al.* 1997).

El ortovanadato de sodio inhibe de manera considerable el ensamble (más del 65 %) y la tasa de desensamble (aprox el 60 %) de los microtúbulos. Aparentemente el vanadio produce un

cambio alostérico en las proteínas de los microtúbulos lo que conlleva a una cinética de polimerización anormal de la tubulina (Kirazov y Weiss, 1986). El resultado, es la alteración en el aparato mitótico y, por tanto, cambios relacionados con el número cromosómico que puede producir transformaciones neoplásicas en una vía similar a la previamente observada con colcemida y dietilestilbestrol (Ramírez *et al.* 1997).

Los mecanismos por los cuales este metal interfiere con el ensamble de los microtúbulos no es totalmente conocido, sin embargo su toxicidad ha sido atribuida por su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Ramírez y colaboradores (1997) reportaron que las tubulinas alfa y la beta contienen 12 y 8 residuos de cisteína (aminoácido con abundantes grupos sulfhidrilo), respectivamente y que algunos de esos residuos son críticos para la formación y función normal de la proteína.

Los datos experimentales indican, que los compuestos de vanadio tienen potencial aneugénico. Son potentes inhibidores de fosfatasa de tirosina, incluyendo a las fosfatasas cdc25 y de la dineína ATP-asa, lo cual explica por qué interfieren con la formación apropiada del aparato mitótico y predisponen a la mala segregación cromosómica (Attia *et al.* 2005).

Por otro lado, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y las proteínas son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoácidas mediadas por radicales libres (Martínez-Cayuela 1998). Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Martínez-Cayuela 1998), como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína, formación de grupos carbonilos e impiden el desarrollo normal de sus funciones (Rodríguez *et al.* 2001).

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido (Martínez-Cayuela 1998). Aunado a que los grupos tioles son inactivados por las ERO's (Chihuailaf *et al.* 2002).

Por todo lo anterior, el vanadio es un elemento que puede tener potencial mutagénico, porque es genotóxico y causa efectos aneugénicos y clastogénicos, aunque no existen datos que

indiquen de manera contundente que el vanadio es carcinógeno, no debe eliminarse esa posibilidad, debido a que causa aberraciones cromosómicas y por lo tanto inestabilidad genética, procesos estrechamente relacionados con la generación de malignidad (Leónard y Gerber 1994).

7.5.1.7. ¿Los efectos genotóxicos del vanadio dependen del sexo y de la edad?

Como último punto al respecto, las hembras adultas son menos susceptibles a la genotoxicidad causada por vanadio (Rojas-Lemus *et al.* 2014), sin embargo, las hembras pre-púberes no tienen la misma ventaja; éstas, presentan aumento significativo de MN, respuesta similar a la de los machos pre-púberes y adultos. Por lo anterior, la susceptibilidad al daño causado por vanadio, es diferente con la edad y con el sexo del individuo.

7.5.1.8. Diferencias entre hembras y machos

Los resultados de esta investigación muestran que las hembras pre-púberes expuestas presentan menos MN conforme se acercan a la edad adulta. Sin embargo, los machos pre-púberes son más susceptibles al daño genotóxico (rompimientos y micronúcleos) durante todo el tiempo que duró la exposición.

7.5.1.9. Diferencias intrínsecas al sexo

En 2003, Borrás y colaboradores aportan evidencia experimental sobre las diferencias *per se* entre hembras y machos. Debido a que la mitocondria es la mayor fuente de radicales libres en las células, se analizaron los niveles basales de antioxidantes mitocondriales en hembras normales, hembras ovariectomizadas y en machos, todos adultos. En ese estudio, los autores encontraron que las hembras generan la mitad de la cantidad de peróxidos que los machos y esto no ocurre en hembras ovariectomizadas, aunado a que las hembras presentan mayores niveles de glutatión reducido que los machos, mientras que las ovariectomizadas tienen los mismos niveles que éstos últimos.

Las mitocondrias hepáticas de los machos, producen 40 % más de peróxido que las mitocondrias hepáticas de las hembras, de igual manera, las mitocondrias cerebrales de los machos generan 80% más de peróxidos que las de las hembras de la misma edad (Borrás *et al.* 2003).

Por otro lado, el daño oxidante al DNA mitocondrial en los machos es 4 veces mayor que en las hembras, el nivel de 8-OxoG en la mitocondria de los machos es mayor en un 400 %. Esto es debido a la alta expresión y a la gran actividad de la Mn-superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa en hembras, lo cual confiere protección contra el daño oxidante (Borrás *et al.* 2003). Es importante mencionar que cuando a las hembras ovariectomizadas y a los machos se les administraron estrógenos, se observó que éstos tienen un efecto protector contra la producción de radicales libres en la mitocondria. Esto refuerza la idea de la actividad protectora de los estrógenos (Borrás *et al.* 2003).

También se reconocen diferencias por sexo en la farmacocinética de los xenobióticos. Los reportes indican que los hombres tienen menos concentración de ferritina en el suero y absorben menos manganeso desde el tracto gastrointestinal, que las mujeres. Sin embargo, las concentraciones de manganeso en el suero son más altas en hombres sanos que en mujeres sanas; los hombres tienen aproximadamente 24 % más alta la concentración del metal en el suero que las mujeres, además de que este metal, en los hombres, es retenido por un mayor tiempo (Dorman *et al.* 2004).

7.5.1.10. Diferencias hormonales: estrógenos

La formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), están implicadas en la patogénesis de gran cantidad de enfermedades (Tamir *et al.* 2002). Hoy día, es bien conocido que los estrógenos confieren protección a la célula en varias enfermedades relacionadas con estrés oxidante (p.e. Alzheimer y Parkinson) (Tamir *et al.* 2002).

La protección de los estrógenos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* incluyen activación del receptor nuclear a estrógenos, expresión de Bcl2 y de proteínas antiapoptóticas relacionadas, activación de la vía de las MAPKs, activación de las vías de transducción de AMPc, modulación de la homeostasis del calcio y actividad directamente antioxidante (Tamir *et al.* 2002).

Los datos sugieren, que los estrógenos y sus derivados funcionan como antioxidantes por ser atrapadores de radicales libres y que ejercen esta función de manera independiente del receptor e involucra el atrapamiento de radicales, así como también la reducción y/o quelación de los iones oxidantes (Badeau *et al.* 2005). Los requerimientos estructurales para la actividad antioxidante de los estrógenos son los compuestos que presentan un anillo monofenólico son poderosos barredores de radicales libres porque pueden donar con facilidad electrones, por ejemplo, los antioxidantes flavonoides polifenólicos como la vitamina E y A. Varias

investigaciones indican que el grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo fenólico A de los estrógenos, es de suma importancia (Amantea *et al.* 2005, Badeau *et al.* 2005). Este grupo hidroxilo del anillo A, puede donar un hidrógeno, evitando la acumulación de radicales libres. De esta manera, los estrógenos pueden actuar como “escudo químico” en contra del estrés oxidante (Behl 2002).

Aunado a su estructura química, los estrógenos pueden interactuar con otros antioxidantes, proveyendo protección adicional (Badeau *et al.* 2005). Experimentalmente, se ha sugerido que la conexión entre las propiedades antioxidantes de los estrógenos y la protección, es debida a que las propiedades protectoras a bajas concentraciones de estradiol (<1nM) aumentan considerablemente en la presencia de glutatión (Xia *et al.* 2002).

Por otro lado, la disfunción mitocondrial resultado del estrés oxidante ha sido implicada en la cascada patológica que culmina en la muerte de la célula. Se ha propuesto que los estrógenos que ejercen un efecto estabilizante sobre la mitocondria y mitigan el daño mitocondrial. Los estrógenos aportan un efecto citoprotector contra el estrés oxidante *in vitro*, manteniendo la integridad y previniendo la despolarización mitocondrial (Moor *et al.* 2004).

Los niveles de estrógenos en los machos adultos sanos, son inmensamente menores que en las hembras adultas sanas, por lo que las concentraciones mayores de estrógenos en los ratones hembra (tanto en las adultas, como en las prepúberes durante el período de recuperación), podrían estar ejerciendo un efecto protector, previniendo el daño genotóxico.

7.5.1.11. Vanadio y anastrozol: ausencia de estrógenos

Los resultados de este trabajo muestran que la ausencia inducida de estrógenos causa el incremento de MN en las hembras a las que se les administró el inhibidor de la enzima aromatasa, es decir el anastrozol.

7.5.1.12. Vanadio y su interacción con los mecanismos antioxidantes

Dado que las EROs y otras formas de radicales libres se producen constante e inevitablemente durante los procesos metabólicos o aquellos implicados en la patogenicidad, la célula ha desarrollado un poderoso y complejo sistema de defensa para limitar la exposición a estos agentes. Las moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones con estructuras biológicas, reciben el nombre genérico de antioxidantes (Chihuailaf *et al.* 2002, Scibior y Zaporowska 2007). La gama de antioxidantes celulares

endógenos incluyen al glutatión reducido (GSH), la dismutasa de súper óxido, la glutatión peroxidasa, así como también a los exógenos como el alfa-tocoferol, el beta-caroteno y al ácido ascórbico, todos ellos son importantes componentes de la defensa antioxidante de los mamíferos (Scibior y Zaporowska 2007).

Se ha reportado que el vanadio puede disminuir significativamente los niveles de la concentración de ácido ascórbico y de GSH en la sangre y en algunos órganos importantes como hígado y riñón (Scibior y Zaporowska 2007).

7.5.1.13. Vanadio y el efecto protector del ácido ascórbico

Entre las acciones positivas que lleva a cabo el ácido ascórbico en el organismo, se encuentran la participación esencial en la síntesis de colágena, de carnitina, norepinefrina, hormonas peptídicas y en el metabolismo de la tirosina. Su acción antioxidante es amplia, ya que disminuye la cantidad de oxidantes que ataca al ADN y a las proteínas, la lipoperoxidación, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, la oxidación y las nitrosaminas en el jugo gástrico, los oxidantes liberados por los neutrófilos, y aumenta: la vasodilatación dependiente del endotelio y la absorción de hierro en el tracto gastrointestinal (Levine *et al.* 1999).

Se observó, que en todos los grupos a los que se les administró ácido ascórbico, el daño genotóxico disminuyó de manera significativa. Es decir, el suministro de ácido ascórbico por vía oral funcionó para mitigar de forma importante el daño al material genético que causa el vanadio.

El ácido ascórbico elimina: radicales alcoxilo ($RO\cdot$), hidroxilo ($\cdot OH$), peroxilo ($RO_2\cdot$) e hidroperoxilo ($HO_2\cdot$), singulete de oxígeno (1O_2), anión superóxido ($O_2\cdot^-$) y ozono (O_3) (Carr y Frei 2002); los reportes indican que el vanadio es capaz de generar el aumento de $\cdot OH$ y $O_2\cdot^-$, por tanto, el mecanismo principal por el cual el ácido ascórbico disminuye el daño causado por vanadio posiblemente es debido a su capacidad de reducir, en condiciones de pH fisiológico, al vanadio y a los radicales libres que genera (Ding *et al.* 1994).

7.5.1.14. Peso en los animales expuestos

De acuerdo con Sainz y colaboradores (1983), los ratones de la cepa CD1 a la edad de 60 días deben pesar entre 30 y 32 g. Este peso debe ser igual entre ambos sexos. Sin embargo, los

resultados aquí presentados, mostraron que las hembras expuestas a vanadio, tienen un peso menor comparadas con el grupo equivalente de machos.

Aunque el interés principal no era establecer las diferencias en masa corporal de los ratones (ni sus causas) era importante registrar el peso de los animales, debido a que el excipiente que acompaña al ácido ascórbico que les fue administrado, es azúcar (50%) y el peso del individuo está relacionado especialmente con la concentración de estrógenos.

El vanadio es un componente común en los suplementos alimenticios, porque se le atribuyen propiedades anabólicas. Sin embargo, en los animales experimentales utilizados, los machos que sólo inhalan vanadio, no presentan diferencia con respecto al peso del grupo testigo. Sólo se observa el incremento de peso en los animales expuestos a vanadio y que tomaron ácido ascórbico, y en los que sólo tomaron ácido ascórbico. En el caso de los machos, esta diferencia es posible que se deba al azúcar que contenía la tableta de ácido ascórbico. En las hembras el efecto es totalmente contrario los animales de los grupos vanadio, ácido ascórbico y vanadio+ácido ascórbico, presentaron menor peso. Por lo anterior, se puede decir que por vía inhalada, los efectos anabólicos del vanadio no se observan y que las hembras son más susceptibles que los machos a perder peso (o a no ganarlo) debido a la exposición de vanadio y por la administración de ácido ascórbico.

Es necesaria investigación futura para ampliar y comprender este resultado.

7.6. Fase 3.

7.6.1. Vanadio: Clastógeno y Aneugénico

Una ventaja importante del método de MN, es la capacidad de detectar efectos clastogénicos y aneugénicos, lo que permite identificar aberraciones estructurales o numéricas, respectivamente. Varias técnicas se han desarrollado para distinguir los MN causados por clastógenos o aneúgenos, sin embargo, la mejor es la que marca centrómeros. De hecho, la Hibridación Fluorescente *In situ* (FISH) con sonda centromérica permite detectar regiones centroméricas de los cromosomas en metafase y en interfase, así como también los que se encuentran en MN individuales. Una ventaja adicional, es que las alteraciones que puedan sufrir las preparaciones durante la realización de la técnica, rara vez afectan el ADN centromérico (Attia *et al.* 2009).

- **Testigos positivos para MN: mecanismos de acción**

Para identificar la etiología de los MN causados por vanadio, es importante incluir dentro de las muestras controles de mecanismo de acción conocidos. De esa manera, se asegura el funcionamiento correcto del protocolo.

Colchicina: es un aneugénico de mecanismo de acción conocido, ya que interactúa con el aparato mitótico provocando la mala segregación cromosómica y por lo tanto, los MN que causa son de origen aneugénico. Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado por Attia y colaboradores (2009), acerca de que el 77.5 % de los MN causados por este fármaco fueron C+.

Camptotecina: es un fármaco importante en el tratamiento contra el cáncer, debido a que su actividad antitumorigénica es debida a la estabilización del complejo ADN-Topoisomerasa I, evitando el paso de re-ligación de rompimiento-reunión, que es la reacción que está mediada por esta enzima. El resultado final que causa esta droga es lesión en el ADN fragmentación del ADN cromosómico que conduce al intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y finalmente a la muerte celular (Attia *et al.* 2009). Los resultados concuerdan con lo reportado para este fármaco: <70 % de MNC- (Attia *et al.* 2009).

Metilmetanosulfonato: Es un clastógeno. Induce N-metilaciones en la cadena de ADN, las cuales son las responsables de los rompimientos en la biomolécula. La mayor parte de los MN que induce este agente son C- (Christmann *et al.* 2007).

7.6.2. Vanadio y región centromérica del ADN

Los resultados aquí presentados con la técnica de FISH con sonda pan-centromérica mostró que los micronúcleos causados por la inhalación de vanadio, fueron centromero-negativos (C-). Esta evidencia, indica que el mecanismo de acción predominante es la clastogénesis. Es decir, que los micronúcleos son causados por los rompimientos de una de las hebras del ADN, que en células que se encuentran en proliferación, al pasar por la fase de síntesis, se convierten en rompimientos de cadena doble, generando así, un micronúcleo.

Sin embargo, la evidencia experimental publicada hasta el momento, apoya de manera mayoritaria a la aneugénesis como mecanismo de formación de MN, tanto *in vivo* como *in vitro* (Cande y Woniak 1978, Roldán y Altamirano 1990, Migliore *et al.* 1993, Léonard y Gerber 1994, Zhong *et al.* 1994, Migliore *et al.* 1995, Ciranni *et al.* 1995, Ramírez *et al.* 1997, Navara *et al.* 2001,

Attia *et al.* 2005). Sólo el reporte de Rodríguez-Mercado y colaboradores (2003) lo sugiere como un agente clastógeno.

La evidencia de este trabajo indica que el vanadio es capaz de generar MNC- en mayor porcentaje que los MNC+, a semejanza de agentes clastógenos reconocidos como el metilmetanosulfonato y la camptotecina. Sin embargo, hay que considerar dos puntos importantes. El primero es el tiempo de exposición, donde los MNC- fueron el resultado de la exposición subcrónica (4 semanas), a diferencia del trabajo de Attia y colaboradores (2005) cuyo resultado fue el de la exposición aguda (el resto de los reportes fueron el resultado de experimentos *in vitro*). El segundo, es la vía de exposición también puede ser un factor importante, ya que los efectos clastogénicos que se observaron fueron el producto de la inhalación y no de la inyección intraperitoneal, por ejemplo.

Lo anterior implica que el vanadio cuando es inhalado, tiene el potencial de causar aberraciones cromosómicas de tipo numérico (aneugénesis) y estructural (clastogénesis), ambos tipos de aberraciones están estrechamente relacionadas con procesos carcinogénicos.

8. Conclusiones y consideraciones finales

- El ácido ascórbico tiene actividad genotóxica, pero sólo cuando es administrado en la ausencia de un estímulo negativo (como el vanadio o la ausencia de estrógenos). Esta evidencia indica que es importante no administrarlo (aunque sea en bajas dosis) si no es necesario. Pero, hoy en día, la presencia de metales como contaminantes ambientales cobra cada vez mayor importancia y por tanto, no sólo deben recibir atención los mecanismos de defensa propios de la célula ante el peligro potencial que representan las grandes concentraciones de metales, sino también las estrategias que pueden reducir el impacto negativo que tienen los metales sobre los organismos, como es el caso de la administración de agentes con capacidad antioxidante.
- La pre-pubertad para ambos sexos, es una etapa susceptible al daño genotóxico; sin embargo, los machos son más propensos a sufrir daño genotóxico también en la vida adulta, a diferencia de las hembras adultas. Es posible, que la protección esté mediada, en parte por los estrógenos, pero otras posibilidades como la mayor eficacia en los mecanismos de reparación de daño al ADN, también podría estar implicada. Lo cierto es, que en las hembras de edad fértil, el daño no es evidente como en los machos, así que eso les confiere una ventaja, cuando menos en esa etapa.
- La ausencia de estrógenos en las hembras, causa que el daño genotóxico sea similar al de los machos, esto indica que los estrógenos les confieren protección. Sin embargo, no hay que descartar otras vías por las cuales las hembras sean menos susceptibles al daño al ADN, por ejemplo, mayor eficacia en los mecanismos de reparación de esa biomolécula.
- En la exposición sub-crónica, el vanadio se comporta como un agente clastógeno, pero es debido al estrés oxidante que genera. La acción de los radicales libres originados por este metal, es la causa principal del daño genotóxico. Es por ello, que la administración de un potente antioxidante, disminuye los efectos sobre el material genético. Lo anterior cobra importancia cuando se considera que en la ciudad en la que vivimos, muy contaminada y altamente oxidante, se está expuesto de manera crónica, no sólo al vanadio si no a otros miles de elementos que son capaces de causar estrés oxidante en el organismo, pero al mismo tiempo, no se

está indefenso y es posible ayudar a los mecanismos antioxidantes con los que contamos, y así tener la oportunidad de contrarrestar los efectos negativos de la contaminación atmosférica.

- Finalmente, estos resultados podrán ser tomados en consideración para inclinar la balanza sobre el potencial carcinogénico del vanadio, especialmente cuando es inhalado, porque es una de las principales formas en la que estamos expuestos los seres humanos.

9. Referencias

- **Acharya UR, Mishra M, Mishra I, Tripathy RR.** Potential role of vitamins in chromium induced spermatogenesis in Swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2004; 15 (2-3): 53-59.
- **Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK.** Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology*. 2008; 25(1): 84-88.
- **Acharya UR, Mishra M, Thripathy RR, Mishra I.** Testicular dysfunction and antioxidative defense system of Swiss mice after chromic acid exposure. *Reproductive Toxicology*. 2006; 22(1): 87-91.
- **Acharya UR, Rathore R, Mishra M.** Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003; 13(1): 9-14.
- **Altamirano-Lozano M, Alvarez BL, Roldán RE.** Cytogenic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Medical Science Research*. 1993; 21: 711-713.
- **Altamirano-Lozano M, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara, Valverde M, Rojas E.** Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1996; 16:7-17.
- **Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez BL, Molina B, Rojas E.** Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1999; 19: 243-255.
- **Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT.** From clinical evidence to molecular mechanism underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacological Research*. 2005; 52: 119-132.
- **ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease.** 2012. *Toxicological Profile for Vanadium*. Department of Health and Human Services, Public Health Service: Atlanta, GA.
- **Attia SM, Aleisa AM, Bakheet SA, Al-Yahya AA, Al-Rejaie SS, Ashour AE, Al-Shabanah O.** Molecular cytogenetic evaluation induced by camptothecin, topotecan, and irinotecan. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2009. DOI 10.1002/em
- **Attia SM, Badary OA, Hamada FM, Hrab'e de Angelis M, Adler ID.** Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bone marrow erythrocytes at the same dose level. *Mutation Research*. 2005; 583: 158–167.
- **Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC.** Particle characteristics responsables for effects on human lung epithelial cells. *Research Report (Health Effects Institute)*. 2002; 110: 1-65.
- **Ávila-Costa MR, Colín BL, Zepeda RA, Antuna BS, Saldivar L, Espejel MG, Mussali GP, Ávila CMC, Reyes OA, Anaya MV, Fortoul TI.** Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience Letters*. 2005; 381: 21-25.
- **Ávila-Costa MR, Montiel FE, Colín BL, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño CHG, Mussali GP, Fortoul TI.** Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29: 1365-1369.
- **Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ.** Estrogen A-ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 96: 271-278.
- **Barceloux DG.** Vanadium. *Clinical Toxicology*. 1999; 37: 293-307.
- **Behl C.** Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002; 3: 433-442.
- **Boobis AR, Cohen SM, Doerrer NG, Galloway SM, Haley PJ, Hard GC, Hess FG, Macdonald JS, Tribault S, Wolf DC, Wright J.** Data-based assessment of alternative strategies for identification of potential human cancer hazards. *Toxicology and Pathology*. 2009; 37:714-732.
- **Borrás C, Satre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J.** Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 34: 546-552.
- **Brodie A.** Aromatase inhibitors in breast cancer. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*. 2002. 13; 2: 61-65.
- **Buettner GR, Jurkiewicz BA.** Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res*. 1996. 145; 5: 532-41.
- **Caligioni C.** Assessing Reproductive Status/Stage in mice. *Current Protocols in Neuroscience*. 2009. DOI: 10.1002/0471142301.nsa04is48
- **Carr AC, Frei B.** Chapter 8. Vitamin C and cardiovascular diseases, in: *Handbook of antioxidants*. Second Ed. 2002.
- **Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG.** Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*. 2002; 33: 265-283.

- **Choi** JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. Comparative study of PM_{2.5}- and PM₁₀-induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *Journal of Veterinary Science*. 2004; 5: 11-18.
- **Ciranni** R, Antonetti M, Migliore L. Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. *Mutation Research*. 1995; 343: 53-60.
- **Cohen** MD, Klein CB, Costa M. Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutation Research*. 1992; 269: 141-148.
- **Collins** AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26:249-261.
- **Cooke** MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanism, mutation and disease. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 1995- 1214.
- **Cooper** R. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2007; 11(3): 97-103.
- **Crans** DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*. 2004; 104: 849-902.
- **Davies** KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000; 50:279-289.
- **De la Torre** A, Granero S, Mayayo E, Corbella J, Domingo JL. Effect of age on vanadium nephrotoxicity in rats. *Toxicology Letters*. 1999; 105: 75-82.
- **Dill** JA, Lee KM, Mellinger KH, Bates DJ, Burka LT, Roycroft JH. Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicological Sciences*. 2004; 77: 6-18.
- **Ding** M, Gannet PM, Rojanasakul Y. Liu K, Shi X. One-electron reduction of vanadate by ascorbate and related free radical generation at physiological pH. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1994; 55: 101-112.
- **Domingo** JL, Gomez M, Llobet JM, Corbella J. Chelating agents in the treatment of acute vanadyl sulphate intoxication in mice. *Toxicology*. 1990. 31; 62: 203-11.
- **Domingo** JL, Llobet JM, Corbella J. Protection of mice against the lethal effects of sodium metavanadate: A quantitative comparison of a number of chelating agents. *Toxicology Letters*. 1985. 26; 2: 95-9.
- **Dorman** DC, McManus BE, Marshall MW, James RA, Struve MF. Old age and gender influence the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate and manganese phosphate in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 197:113-24.
- **Du** J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. 1826; 443-457.
- **Duffus** JH. Carcinogenicity classification of vanadium pentoxide and inorganic vanadium compounds, the NTP study of carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide, and vanadium chemistry. 2007. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47: 110-114.
- **Elbetieha** A, Bataineh H, Darmani H, Al-Hamood MH. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicology Letters*. 2001; 8: 193-201.
- **Elmore** AP. Final report of the safety assessment of L-ascorbic acid, calcium ascorbate, magnesium ascorbate, magnesium ascorbyl phosphate, sodium ascorbate, and sodium ascorbyl phosphate as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2005; 24(2): 51-111.
- **Englert** N. Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149: 235-242.
- **Enstrom** JE. Chapter 9. Epidemiological and Clinical Aspects of Ascorbate and Cancer, in: *HandBook of Antioxidants*, 2002.
- **EPA (Environmental Protection Agency)**. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5395 Mammalian erythrocyte micronucleus test. Prevention, pesticides and toxic substances (7101). US, EPA, 1998, 712-C-98-226.
- **Evangelou** AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 42: 249-265.
- **Fatima** SK, Prabhavathi A, Reddy PP. Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. *Mutation Research*. 2001; 490: 179-186.
- **Fenech** M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
- **Fernandez** A, Wendt JOL, Wolski N, Hein KRG, Wang S, Witten ML. Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chemosphere*. 2003; 51: 1129-1137.
- **Flores** RJ. Contaminación Atmosférica. En: *Toxicología Ambiental*. Lilia A. Albert (ed). 2004. México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- **Fortoul** TI, Moncada-Hernández S, Saldívar-Osorio, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Ávila-Casado MC, Colín-Barenque L, Hernández-Serrato MI, Ávila-Costa MR. Sex differences in bronchiolar epithelium response after the inhalation of lead acetate (Pb). *Toxicology*. 2005; 207: 323-330.

- **Fortoul** TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldívar L, Espejel-Maya G, Ávila-Casado MC, Ávila-Costa MR, Colín BL, Navarro VD, Olai-Fernández G. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of Environmental Health*. 2002; 57: 446-449.
- **Fortoul** TI, Valverde M, López MC, Avila-Costa MR, Avila-Casado MC, 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. *Environmental Research*. 2004; 94: 243-8.
- **Fortoul**, Rodríguez-Lara V, González-Villalva A, Rojas-Lemus M, et al. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particles systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 11 pages, 2011. DOI: 10.1155/2011/951043.
- **Gándara** RMC, Soares SS, Martins H, Gutiérrez MC, Aureliano M. Vanadate oligomers : In vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99: 1238-1244.
- **Ghio** AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic Effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110: 89-94.
- **Gupta** S, Kim J, Gomes C, Oh S, Park J, Im WB, Seong JY, Ahn RS, Kwon HB, Soh J. Effect of ascorbic acid supplementation on testicular steroidogenesis and germ cell death in cadmium-treated male rats. *Molecular Cellular Endocrinology*. 2004; 221(1-2): 57-66.
- **Gutiérrez-Castillo** ME, Roubicek DA, Cebrian-García ME, De Vizcaya-Ruíz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA Damage by Urban Airborne Particulate Matter. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2006; 47: 199-211.
- **Halliwell** B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*. 1984; 21: 1-14.
- **Halliwell** B. "Chapter 1. Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo", in: *Handbook of Antioxidants*. 2a Ed. 2002. Taylor & Francis Group, LLC.
- **HaMai** D, Bondy SC. Pro-or-anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation. *Neurochemistry International*. 2004; 44: 223-229.
- **HaMai** D, Campbell A, Bondy SC. Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31: 763-768.
- **Hayashi** M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. The Micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. 1990; 245: 245-249.
- **Herrera** NP, Quintal JMC, Escalante DP. Prevalencia de intercambio de cromátides hermanas en una población libre de exposición a agentes clastogénicos. *Revista Biomédica*. 1999; 10: 71-76.
- **Hsu** PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology*. 1998; 128:169-179.
- **Ivancsits** S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger W. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutation Research*. 2002; 519: 25-35.
- **Iversen** PO. Blood flow to the haemopoietic bone marrow. Review article. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1997; 159: 269-276
- **Jones** MM, Basinger MA. Chelate antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulfate intoxication in mice. *J. Toxicology Environmental Health*. 1983. 12(4-6): 749-56.
- **Katsouyanni** K. Ambient air pollution and health. *British Medical Bulletin*. 2003; 68: 143-156.
- **Kehrer** JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*. 1993; 23: 21-48.
- **Kirazov** EP, Weiss DG. Effects of vanadate on the assembly and disassembly of purified tubulin. *Cell Motility Cytoskeleton*. 1986; 6: 313-323.
- **Kleinsasser** NH, Dirschedl P, Staudenmaier R, Harréus UA, Wallner BC. Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *International Journal of Environmental Health Research*. 2003; 13: 373-379.
- **Krishna** G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 2000; 455: 155-166.
- **Léonard** A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research*. 1994; 317: 81-88.
- **Leonard** SS, Bower JJ, Shi Xianglin. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004a; 255: 3-10.
- **Leopardi** P, Villani P, Cordelli 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. *Toxicology Letters*. 2005; 158: 39-49.

- **Levine M**, Rumsey SC, Duruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Journal of American Medical Association*. 1999; 281(15): 1415-1423.
- **Lindahl T**, Word RD. Quality control by DNA repair. *Science*. 1999; 286: 76-82.
- **Lonning PE**, Geisler J. Evaluation of plasma and tissue estrogen suppression with third-generation aromatase inhibitors: of relevance to clinical understanding. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2010; 118: 288-293.
- **López-Diazguerrero NE**, Luna-López A, Gutiérrez-Ruiz MC, Zentella A, Königsberg M. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in Young and aging mice. *Life Sciences*. 2005; 77: 2840-2854.
- **Lorente, PA**. Universidad de Alcalá, Departamento de Química Orgánica. 2005. <http://www2.uah.es> (Última visita: abril, 2013)
- **Marconi A**. Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*. 2003; 39: 329-342.
- **Martínez-Cayuela M**. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 1998; 39: 5-18.
- **Mayani H**, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.
- **Migliore L**, Bocciardi R, Macri C, Lo Jacono F. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research*. 1993; 319: 205-13
- **Mishra M**, Acharya UR. Protective actions of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2004; 18(2): 173-178.
- **Mitra S**, Izumi T, Boldolgh I, Bhadak KK, Hill JW, Hazra TK. Choreography of oxidative damage and repair in mammalian genomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 33: 15-28.
- **Molina MJ**, Molina LT. Megacities and atmospheric pollution. *Air and Waste Manage Association*. 2004; 54: 644-680.
- **Moller P**. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*. 2005; 96:1-42.
- **Moor AN**, Gottipati S, Mallet RT, Sun J, Giblin FJ, Roque R, Cammarata PR. Aputative mitochondrial mechanism for antioxidative cytoprotection by 17beta-estradiol. *Experimental Eye Research*. 2004; 78: 933-944.
- **Morgan AM**, El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacological Research*. 2003; 47: 75-85.
- **Morinville A**, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS*. 1998; 19: 452-460.
- **Mukherjee B**, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium- an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*. 2004; 150: 135-143.
- **Mussali GP**, Rodríguez LV, Hernández TB, Ávila-Costa MR, Colín BL, Bizarro NP, Martínez LG, Rojas LM, Piñón ZG, Saldívar OL, Herrera EMA, Tovar SE and Fortoul T. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicology and Industrial Health*. 2005; 21: 215-222.
- **NIOSH** Centers of Disease Control and Prevention. Pocket Guide to Chemical Hazards. Vanadium Dust. 2011. Sitio Web: www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0653.html (última visita mayo, 2012).
- **NORMA** Oficial Mexicana sobre las especificaciones de los combustibles fósiles para la protección ambiental. NOM-086-SEMARNAT-SENER-SFCI-2005. México, 2005.
- **NTP**. Technical Report on the Toxicology and Carcinogenicity Studies of Vanadium Pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). National Toxicology Program, Research Triangle Park NC. NTP TR 507, NIH Publication No. 03-4441, 2002; 352 pp.
- **Olive PL**, Durand RE, Banáth JP, Johnston PJ. Analysis of DNA Damage in Individual Cells. *Methods in Cell Biology*. 2001; 64: 235-249.
- **Ono S**, Tsujimoto H, Hiraki S, Takahata R, Kinoshita M, Mochisuki H. Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells after surgery. *The American Journal of Surgery*. 2005; 190: 439-444.
- **OSHA** Occupational Safety and Health Administration. Chemical sampling information vanadium fume (as V2O5). 2011. Sitio Web: www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_275000.html (última vista agosto 2013).
- **OSHA** Occupational Safety and Health Administration. Occupational Safety and Health Guideline for vanadium Pentoxide Dust. Sitio web: www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/vanadiumpentoxidedust/recognition.html

- **Padayatty SJ**, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song J, Koh WS, Levine M. Chapter 7. Vitamin C; from molecular actions to optimum intake, in: Handbook of Antioxidants. Second Ed. 2002.
- **Ramírez P**, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1997; 386: 291-8.
- **Ress NB**, Chou BJ, Renne RA, Dill JA, Miller RA, Roycroft JH, Hailey JR, Haseman JK, Bucher JR. Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N Rats and B6C3F Mice. *Toxicological Sciences*. 2003; 74: 287-296.
- **Rodríguez PJM**, Menéndez LJR, Trujillo LY. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Médica Militar*. 2001; 30(1): 36-44.
- **Rodríguez-Mercado JJ**, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides in vitro. *Toxicol. In Vitro* 25: 1996–2002.
- **Rodríguez-Mercado JJ**, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 2003; 144: 359-369.
- **Rojas E**, Valverde M, López MC, Naufal I, Sánchez I, Bizarro P et al. Evaluation of DNA in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*. 2000; 468: 11-17.
- **Rojas-Lemus M**, Altamirano-Lozano MA, Fortoul-TI. Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;
- **Rosales-Castillo JA**, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto H. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. 2001; 43: 544-555.
- **Saiz** Moreno L, García de Osma JL, Compaire Fernández C. Animales de laboratorio, producción, manejo y control sanitario. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias Madrid. Colección de Monografías INIA, 1983. 596 pp.
- **SCF**. Opinion of the Scientific Panel of Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the tolerable upper intake level of vanadium. Request no. EFSA-Q- 2003- 018. *The EFSA Journal*. 2004; 33: 1-22.
- **Scheirs J**, De Coen A, Covaci A, Beernaert J, Kayawe VM, Caturia M, De Wolf H, Baert P, Van Oostveldt P, Verhagen R, Blust R, De Coen W. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-age- and gender-related effects. *Environmental Toxicology Chemistry*. 2006; 25: 2154-62.
- **Schriever-Schwemmer G**, Adler ID. Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining and fluorescent in situ hybridization with centromeric and telomeric DNA probes. *Mutagenesis*. 1994. 9; 4: 333-340.
- **Scibior A**, Zaporowska H. Effects of vanadium(V) and/or chromium (III) on L-ascorbic acid and glutathione as well as iron, zinc, and copper levels in rat liver and kidney. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2007; 70: 696-704.
- **Shahan J**, Kaufman Z, Gurvich R, Levi Z. Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers to pesticides. *Mutation Research*. 2001; 491: 71-80.
- **Shan G**, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *J. Huazhong. Univ. Sci. Technology Med. Sci*. 2009; 29(1):68-72.
- **Slupphaug G**, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*. 2003; 531: 231-251.
- **SMA** Secretaría del Medio Ambiente. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM. 2008. Sitio web: www.sma.df.gog.mx (última visita septiembre 2013).
- **Sorensen M**, Schins RPF, Hertel O, Loft S. Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 2005; 14: 1340-1343.
- **Sorsa M**, Pyy L, Salomaa S, Nylund L, Yager JW. Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutation Research*. 1988; 204: 465-479.
- **Starr TB**, Macgregor JA, Ehman KD, Kikiforov AI. Vanadium pentoxide: use of relevant historical control data shows no evidence for carcinogenic response in F344/N rats. 2012. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 64: 155-160.
- **Stern A**, Yin X, Tsang SS, Davidson A, Moon J. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochemistry and Cell Biology*. 1993; 71: 103-112.
- **Strauss GHS**. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res*. 252: 1–15.

- **Tamir S**, Izrael S, Vaya J. The effect of oxidative stress on ER-a and ER-b expression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2002; 81: 327-332.
- **Thompson KH**. Vanadium and diabetes. *Biofactors*. 1999; 10: 43-51.
- **Tice RR**, Agurell E. et al. Single Cell Gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 2000; 35: 206-221.
- **Vahter M**, Akeson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research*. 2007; 104: 85-95.
- **Vahter M**, Berglund M, Akesson A, Lidén C. Metals and women's health. *Environmental Research Section*. 2002; 88: 145-155.
- **Valko M**, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 2006; 160: 1-40.
- **Vallejo M**, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana*. 2003; 139: 57- 63.
- **Vrhovac VG**, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research*. 2000; 343: 201-207.
- **Wang C**, Liang J, Zhang C, Bi Y, Shi X, Shi Q. Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Ann Occup Hyg*. 2007; 51(6): 563-9.
- **Wang C**, Zhang Y, Liang J, Shan G, Wang Y, Shi Q. Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis. *Clin. Chim. Acta*. 2006; 370(1-2): 82-88.
- **World Health Organization (WHO)**. International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. 2001.
- **Xia S**, Cai ZY, Thio LL, Kim-Ham JS, Dugan LL, Covey DF, Rothman SM. The estrogen receptor is not esencial for all estrogen neuroprotection: new evidence from a new analog. *Neurobiology of Disease*. 2002; 9: 282-293.
- **Zalacain M**, Sierrasésúmagá L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005; 28: 227-236.
- **Zang Y**, Wang CH, Liang JC, Zhang C, Wang CQ. Impacts of combined supplementation with ascorbic acid and thiamine on certain biochemical and morphological indexes of testes in mice treated by lead. *Wei Sheng Yan Liu*. 2006; 35(6):731-734.
- **Zhong BZ**, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*. 1994; 321: 35-42.

10. Apéndice

Artículo aprobado por el Comité Académico:

Rojas-Lemus M, Altamirano-Lozano MA, Fortoul-TI. Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation. *Journal of Applied Toxicology*. 2013. DOI: 10.1002/jat.2873.

Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of vanadium inhalation: micronucleus assay evaluation

Marcela Rojas-Lemus^a, Mario Altamirano-Lozano^b and Teresa I. Fortoul^{a*}

ABSTRACT: Vanadium is an environmental pollutant attached to the smallest air suspended particles that enters into the respiratory tract reaching the systemic circulation. The oxidative state of this element and sex are factors related to its toxicity. In this study, we explored sex-associated genotoxic and cytotoxic differences in a mouse experimental model. Mice inhaled V₂O₅ (0.02 M) 2 h/twice a week; blood samples were obtained at 24 h and every week until the end of the 4-week exposure. Samples were processed for fluorochrome-mediated viability and a micronucleus assay in slides pre-covered with acridine orange (AO). The results showed that males were more susceptible to genotoxicity during the exposure in contrast to the females. In peripheral blood leukocytes, no cytotoxic differences were observed in both, females or males, but the decrease in circulating reticulocytes provides evidence of the metal's cytotoxic effect on the bone marrow (BM). A significant decrease in reticulocytes was observed during the experiment independent of the animal's sex. The present findings might be explained by the interaction of the metal with the enzymes that control erythropoiesis or a direct effect on erythropoietin production might explain our findings; however, an absence of the genotoxic effects in females could be a consequence of the protective effect against oxidative stress by their higher estrogen levels. This study contributes to a better understanding of the mechanisms by which vanadium induces adverse effects in biological systems. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: vanadium pentoxide; genotoxicity; micronucleus; cytotoxicity; sex differences; reticulocytes

Introduction

Some air pollution components have been reported as carcinogenic, especially those transported on air suspended particles, such as metals (Ghio *et al.* 2002; Vallejo *et al.* 2003; Yip & Madl, 2002).

Vanadium (V) is a transition element liberated into the atmosphere as a consequence of burning fossil fuels (Ávila-Costa *et al.* 2004, 2005; Cohen *et al.* 1992) and metallurgical industry activities (Dill *et al.* 2004). Vanadium pentoxide is adsorbed onto the smallest suspended particles and by these means reaches the respiratory system and subsequently the systemic circulation (Cooper, 2007; Leonard & Gerber, 1994; Rodríguez-Mercado *et al.* 2010).

In vivo vanadium adverse effects on genetic material are still being evaluated. Ciranni *et al.* (1995) reported an increase in the micronuclei frequency and hyperploidy in bone marrow (BM) cells from CD-1 male mice exposed to vanadium sulphate and metavanadate (100, 70 and 50 mg kg⁻¹) after intragastric administration. Furthermore, a report from Altamirano-Lozano *et al.* (1999) using intraperitoneal administration in CD-1 mice (5.75, 11.5 and 23 mg kg⁻¹) reported DNA single-strand breaks in kidney, liver and lung cells but not in BM. Villani *et al.* (2007) evaluated the genotoxic potential (micronucleus and DNA damage) of tetravalent vanadium (VOSO₄) administered orally in CD1 mice. The authors reported no increase in the frequency of micronucleated peripheral reticulocytes or BM cells, similarly no DNA damage was observed in testicular or BM cells. In contrast to the genotoxic potential of vanadium, there are reports that suggest it is an antigenotoxic and anticarcinogenic

agent in previous studies in rats (Samanta *et al.* 2008) and a chemopreventive against diethyl nitrosamine genotoxicity in a rat model of hepatocellular transformation in rats (Chakraborty *et al.* 2007).

The hematologic effects of vanadium exposure in humans induce anemia and leukopenia (Cooper 2007); anemia was attributed to vanadium interference in erythropoiesis (Leonard and Gerber, 1994).

Moreover, sex differences in response to xenobiotic have been reported by our group in nasal epithelium exposed to a highly oxidative atmosphere distinguishing an increased DNA damage in male compared with female medical students (Fortoul *et al.* 2004). In 2005, the same group reported sex differences between mice exposed to inhaled lead (Pb) (Fortoul *et al.* 2005). Female mice had higher Pb lung concentrations compared with males, but bronchiolar damage was more severe in males, identified as an increased loss of non-ciliated bronchiolar cells, as well as more necrosis and shedding of these cells. The

*Correspondence to: Teresa I. Fortoul, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México DF, 04510. E-mail: fortoul@unam.mx

^aDepartamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, DF, 04510

^bUnidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Campus II, UNAM, México, DF, México

ion for these differences was attributed to sex hormones on cytochromes (i.e. cyto-

International Agency for Research on Cancer (IARC) vanadium pentoxide as possibly carcinogenic (IARC 2012) based on evidence of lung cancer caused by the NTP (2002). However, the evidence of carcinogenicity by the NTP has been widely questioned (Saffus (2007) and Starr *et al.* (2012)). Informative on genotoxicity and the carcinogenic potential of vanadium pentoxide is still limited and not conclusive (Saffus *et al.* 2003, 2010, 2011; Boobis *et al.* 2003). Numerous studies have been conducted to evaluate the action of vanadium compounds *in vivo* (Saffus 2002; Kleinsasser *et al.* 2003). In addition, the sex differences after vanadium inhalation are still nonexistent.

The existing body of evidence on the health effects of vanadium toxic metals and their consequences are generally similar in men and women (males and females) and in experimental models. These responses are similar to differences in kinetics in the mechanism of genotoxicity. However, data on this topic are limited. With a few exceptions, sex differences owing to vanadium exposure have not been considered in the context of exposure by environmental contaminants (Vahter

The Ames test in rodents has been widely used to evaluate genotoxicity. *In vivo*, the primary test battery to detect genotoxicity is recommended by regulatory agencies and is carried out as part of the safety assessment. The Ames assay has been extensively validated to detect *in vitro* and *in vivo* genotoxicity. Currently, the Ames test is considered practical, universally applicable, and is useful in assessing the genotoxicity induced by genotoxic agents. The increase in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) in animals treated with the agent is a clear indication of genetic damage (Krishna and

analyzed in this protocol arose from BM, it is important to know how vanadium arrived in this tissue.

In bone marrow (BM), BM is about 1% to 2.5% of the total body weight (Forsgren, 1997). It is the primary tissue that is the site of production of blood cells through a complex process of hematopoiesis (Mayani *et al.* 2007). To support hematopoiesis, BM depends on an adequate blood supply. It obtains about 2% to 4% of the total body blood flow. The bone marrow microvasculature is a fenestrated network (discontinuous endothelium and high permeability to solutes) allowing for easy entry of xenobiotic traveling in the bloodstream, especially albumin. In the bloodstream, vanadium travels as a complex with albumin. It enters the cells through various channels and once inside it affects the cell membrane and such as lipids, proteins and nucleic acids. Based on the previous information, we decided to evaluate the effect of vanadium in a mice model sex differences in micronuclei formation and cytotoxicity, after a 4-week vanadium pentoxide (0.02 M). Our results will supply information on the sex differences after the exposure to inhaled vanadium in the case for vanadium.

Materials and Method

Animals

Twelve female and twelve male CD-1 mice (2 months old, body weight 32 ± 35 g) were obtained from the Faculty of Medicine, UNAM vivarium. Animals were allowed adjusted to laboratory conditions (22 ± 3 °C, 57% humidity and controlled lighting 12: 12 h light/dark regime) for 7 days during which they received a commercial standard mouse food (Purina Rodent Chow, Purina rodent Laboratory Chow, Mexico City, Mexico) and drinking water *ad libitum*. After being adjusted, mice were randomly clustered in four groups according to sex and identified as control and exposed groups. The mice were managed according to the Mexican official norm NOM-062-ZOO-1999 for the production, care and use of laboratory animals.

Chemicals and dosing

The main chemicals reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Company (St. Louis, MO, USA): vanadium pentoxide, 99.99% purity (CAS 1314-62-1), Tween[®]20 (CAS 9005-64-5), fluorescein diacetate (CAS 596-09-8), acetone (CAS 67-64-1), sodium chloride (CAS 7647-14-5), ethidium bromide (CAS 1239-45-8) and acridine orange (AO) (CAS 10127-02-3).

Exposure protocol

Inhalation exposure was performed as described by Fortoul *et al.* (2008). Briefly, exposure was carried with a 0.02 M V_2O_5 suspension in saline, containing 100 μ l Tween-20 per 100 ml. The aerosol inhalation chamber was a transparent acrylic box with a total volume of 3.3 l. A De Vilbiss Ultraneb 99 (Somerset, PA, USA) system with a constant flow of 10 l min^{-1} [mass median aerodynamic diameter (MMAD) of 0.5–5 μ m] generated the fog. The vanadium levels in the chamber were quantified as in Fortoul *et al.* (2002). The final concentration in the chamber was 1.4 mg V_2O_5 per m^3 . The concentration selected for our experimental model is in the range reported by the WHO in workplaces (2000) (i.e. 0.01–60 mg m^{-3}). High vanadium concentrations (> 600 mg kg^{-1}) have also been detected in soils in the vicinity of petrochemical plants in Mexico (Hernandez and Rodríguez, 2011). Thus, we deemed the level of vanadium used here would reflect airborne vanadium exposures that occur routinely among the citizens of many urban centers, including Mexico City (Fortoul *et al.* 2002), and are also readily found in occupational settings (Ustarroz-Cano *et al.* 2012).

Six animals per group (females, males and the respective controls) inhaled 0.02 M V_2O_5 (exposed) or saline (controls), for 1 h twice weekly over 4 weeks.

A tail's blood basal sample (T0) was obtained from each mouse, at the launch of the inhalation protocol. A second blood sample was obtained 24 h after the first exposure. Further sampling was implemented each week during the exposure time.

Dual fluorochrome-mediated viability assay in peripheral blood leukocytes

A viability assay in leukocytes was performed with some modifications, as described by Strauss (1991). Briefly, for stock solutions, fluorescein diacetate (FDA) were diluted 0.005 g ml^{-1} in acetone and ethidium bromide (Et-Br) was diluted 0.002 g ml^{-1} in phosphate-buffered (PBS). Then, in amber recipient, 15 μ l of

FDA stock solution and 100 μl of Et-Br stock solution were added to 2.4 ml PBS to produce a working solution. The fluorochromes solution and whole blood were mixed in a 1:1 proportion. Immediately, samples were analyzed in an epifluorescence microscope (Olympus BH-2) at 400 \times equipped with a 515–560 nm excitation filter and a barrier filter of 590 nm. Under these conditions, living cells were identified by their green fluorescence cytoplasm, whereas dead cells are identified by their red nucleus. Erythrocytes do not stain. In the present study, cell viability was obtained by counting the red and green cells proportion. A sample of 100 cells was scored for each mouse. Samples for each animal were analyzed in duplicate.

Peripheral blood micronucleus test *in vivo*

A micronucleus test was performed with some modifications, according to Hayashi *et al.* (1990). Briefly, AO fluorochrome was dissolved in distilled water (1 mg ml⁻¹). Next, 40 μl of the AO solution was extended on a previously cleaned and heated slide (~70 °C). Then, 5 μl of peripheral blood was collected from a cut mouse tail vein, and extended on an AO pre-covered slide, protected with a coverslip and maintained at 4 °C, for at least 24 h, for maximizing dyeing. A duplicated sample was taken from each mouse. The percentage of peripheral blood reticulocytes (red-orange cells) was determined using 1000 mature erythrocytes (dark cells), and the micronucleus frequency was determined using 2000 reticulocytes per animal, five animals per group. Micronuclei were easily recognized in the reticulocyte cytoplasm because of their strong green-yellowish fluorescence (Fig. 1). Samples were analyzed at 1000 \times with an epifluorescence microscope (Olympus BH-2) equipped with a 515–560 nm excitation filter and barrier filter of 590 nm.

Statistical analysis

Mean and standard errors were calculated from each group for each exposure time (T0, 24 h and 1–4 weeks). Paired Student's *t*-test was used to contrast viable cells, genotoxicity and the number of reticulocytes between exposed and their respective control, and males versus females. In addition, Pearson's correlation index was calculated to determine the relationship between exposure time and frequency of micronucleus, and exposure

time and decreased reticulocyte count. Finally, a two-way analysis of variance (two-way ANOVA) and a *post hoc* Holm Sidak Test were used to determine if the experimental groups (male and female) are affected by sex and exposure time (SigmaStat Software 3.5, 2007) (San José, California, USA). All analyzed data had a normal distribution, and statistical significance was set at $P < 0.05$. Values were expressed as the mean \pm SEM. One-tailed statistical tests were performed. The study was performed with six mice per group, and data showed are the results of two independent experiments. Cell samples were obtained from each group in duplicate and coded in a double blind manner.

Results

There were no deaths of exposed mice or controls. No clinical signs of toxicity in treated animals were observed.

Dual fluorochrome-mediated viability assay in peripheral blood leukocytes

No differences were observed in both, female or male. Only during the acute phase (24 h after inhalation), a significant decrease was noticed but, in neither case was below 90%, a value that is accepted for viability tests; however, as long the exposure progressed the differences among sexes disappeared. The raw data are presented in Table 1.

Micronucleus frequency

Our results showed that vanadium inhalation had genotoxic effects, because of the significant increase of the frequency of micronuclei in exposed males compared with the control. Throughout the experimental period females showed no significant difference compared with the control.

In contrast, Pearson's correlation index ($r = 0.845$) was positive and significant in males, indicating that the longer the exposure time, the greater the Micronucleus (MN) frequency. With regard to females, Pearson's correlation index was not significant ($r = -0.162$). Furthermore, statistical analysis (two-way ANOVA and *post-hoc* Holm-Sidak) showed that the factor that had the greatest

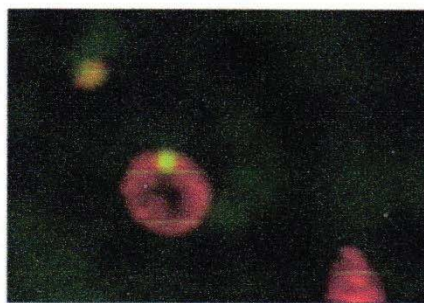


Figure 1. Peripheral blood reticulocytes and micronucleus observed in an epifluorescence microscope. Reticulocytes (red-orange fluorescence) and erythrocytes (dark cells) were present. Micronuclei (green-yellow fluorescence) were easily observed in reticulocytes cytoplasm.

Table 1. Cell viability (%) in male and female mice exposed to vanadium inhalation at different times.

Time	Males		Females	
	Control	Exposed	Control	Exposed
T0	97.7 \pm 1.2	95.7 \pm 1.3	97.1 \pm 1.3	96.2 \pm 2.3
24 h	96.0 \pm 1.8	90.0 \pm 2.8*	98.3 \pm 1.2	90.6 \pm 0.8*
1 week	98.0 \pm 1.8	97.0 \pm 0.8	96.2 \pm 3.5	97.2 \pm 0.8
2 weeks	95.7 \pm 2.1	94.7 \pm 3.1	95.7 \pm 3.1	95.1 \pm 4.1
3 weeks	96.0 \pm 1.8	95.0 \pm 3.8	92.4 \pm 4.3	91.3 \pm 1.8
4 weeks	97.6 \pm 2.3	95.6 \pm 1.3	96.6 \pm 2.8	96.2 \pm 1.4

Data shown are the results of two independent experiments. Results are reported as the mean \pm standard error (SE).

Saline was used in the control group.

* $P < 0.05$ vs. the control group of the same exposure time.

influence on MN frequency was the exposed animal's sex. Our results indicate that sex and MN frequency were significantly associated ($P = 0.017$) (Fig. 2).

Reticulocytes percentage

In both sexes, a significant decrease in reticulocyte counts during the experiment was noticed. Pearson's correlation index showed that in females ($P = -0.891$) the longer the exposure, the lower the reticulocyte's count was. This change was not observed in males (Fig. 3).

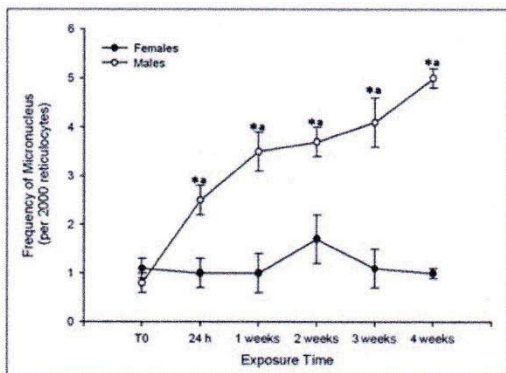


Figure 2. Micronucleus frequency in peripheral blood reticulocytes in female and male mice exposed to vanadium inhalation. Males showed a significant increase in micronucleus counts since 24 h until the end of the exposure. In females, no significant differences were detected. (t-test) $^*P < 0.05$ (exposure time vs. T0) and $^*P < 0.05$ (males vs. females). Pearson's correlation index MN: males $r = 0.845$; females $r = -0.162$. Two-way ANOVA and post hoc Holm Sidak test. Sex: $P = 0.017$; Exposure time: ND ($P = 0.505$).

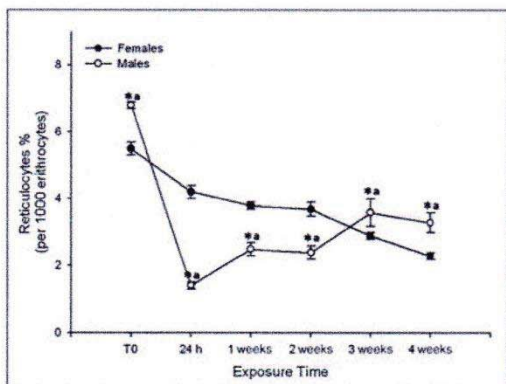


Figure 3. Percentage of reticulocytes in female and male mice exposed to vanadium inhalation. Both females and males showed a significant decrease in reticulocytes counts since 24 h until the end of the exposure. (t-test) $^*P < 0.05$ (exposure time vs. T0) and $^*P < 0.05$ (females vs. males). Pearson's correlation index: males $r = -0.0974$ (ND); females $r = -0.891$ (negative and significant). Two-way ANOVA: Sex ND ($P = 0.576$); Exposure time: ND ($P = 0.169$).

Discussion

Estimation of Cell Viability by Fluorochromes

Cellular viability in peripheral blood leukocytes is an easy way to evaluate systemic toxicity. This evaluation is suggested when micronucleus assay is performed (Krishna and Hayashi, 2000). An important advantage of this technique is that mice sacrifice is unnecessary, at least in the case of bone marrow cell viability.

The dual fluorochrome assay is an indicator of cell metabolism and death caused by cell membrane injury (Rodríguez-Mercado *et al.* 2011).

Kleinsasser *et al.* (2003) reported no cytotoxic effect of vanadium pentoxide in lymphocytes and human mucosal cells. The authors mentioned that cell viability in all the assessments was higher than 80%, which is consistent with our results. In this experiment, vanadium inhalation was devoid of the cytotoxic effects on peripheral blood leukocytes; this means that the cells do not die as a result of vanadium inhalation and are released into the systemic circulation even if they contain errors in their genetic material.

Micronucleus Frequency

A MN is a cytoplasmic body of nuclear genetic material resulting from an incorrect incorporation during cell division in the daughter cells (Zalacain *et al.* 2005). The micronucleus contains genetic material from chromosome fragments (clastogenicity) or whole chromosomes (aneugenicity) (Fenech, 2000; Krishna and Hayashi, 2000). In 2011, our group reported that vanadium inhalation causes DNA single strand breaks (Fortoul *et al.* 2011), which is consistent with other studies that used other animal models and with other vanadium compounds (Roldán and Altamirano, 1990; Cohen *et al.* 1992; Migliore *et al.* 1993; Altamirano-Lozano *et al.* 1996; Rojas *et al.*, 1996; Altamirano *et al.*, 1999; Evangelou 2002; Ivancsist *et al.* 2002; Kleinsasser *et al.* 2003; Rodríguez-Mercado *et al.* 2003). Micronuclei induction by vanadium or its compounds has been reported by Migliore *et al.* (1993), Zhong *et al.* (1994) and Ciranni *et al.* (1995).

One of the mechanisms by which vanadium induces DNA damage is the production of Reactive Oxygen Species (ROS) leading the cell to an oxidative stress state (Choi *et al.* 2004; Valko *et al.* 2006), generating damage in nitrogenated basis, carbohydrates oxidation, cross-links, or strand breaks in proliferating cells that will be manifested as micronucleus (Slupphaug *et al.* 2003; Valko *et al.* 2006).

Furthermore, the interference with the organization and the spindle apparatus assembly is a critical process for normal movement of chromosomes; in fact this is the proposed mechanism by which vanadium pentoxide contributes to increase aneuploidy (Ramírez *et al.* 1997). Previous results obtained in our laboratory indicate that vanadium inhalation causes a significant decrease in gamma-tubulin in testicular cells; this alteration may involve changes in microtubules function (Mussali-Galante *et al.* 2005) as well as the appropriate distribution of the genetic material.

Any agent that reacts with DNA is potentially dangerous (Halliwell *et al.* 1984). DNA damage may result in mitotic arrest, induction of gene transcription, replication errors and genomic instability, all implicated in the carcinogenic processes (Valko *et al.* 2006). The micronucleus assay is devised primarily for evaluating the ability of tested agents to induce structural and/

or numerical chromosomal damage. Both types of damage are associated with the development and/or progression of tumours, and with adverse reproductive and developmental outcomes (Krishna and Hayashi, 2000).

In this study, we observed a clear relationship between the animals' sex in exposed groups and the increased frequency of micronucleus: males were more susceptible to genotoxic damage than females. Similar results were obtained in another study when single strand breaks (by Comet Assay) were evaluated in bone marrow cells from male and female adult mice (Fortoul *et al.* 2011).

Because in our experiments we used young sexually mature adults, two main options have been considered to explain these findings: the differences between sexes *per se* and the substantial presence of sex hormones, especially estrogens.

In this context, Borrás *et al.* (2003) provided experimental evidence about intrinsic sex differences. Because mitochondria are the major source of cellular free radicals, the authors analyzed basal levels of mitochondrial antioxidants on males, females and ovariectomized females. The results showed that control females produced only half of the peroxides compared with males and ovariectomized females. In addition, control females had higher levels of reduced glutathione, compared with males and ovariectomized females.

When compared with control males and females of the same age, the authors found significant parameter differences in the male's liver mitochondria that produced 40% more peroxide whereas the brain mitochondria generated up to 80% more than females; oxidative damage of mitochondrial DNA was four times higher in males because the levels of 8-oxo-guanine were 400% higher. The authors concluded that these differences could be because of the increased expression in females of endogenous antioxidants such as Mn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase, which confer protection against oxidative damage.

When estrogens were administered to male and ovariectomized females, a protective effect against mitochondrial-free radical production was observed. These results support the idea of the protective activity of estrogens (Borrás *et al.* 2003). Evidence suggests that estrogen has an antioxidant capacity because they function as free radical 'scavenger' molecules (Badeau *et al.* 2005).

The estrogen protection in models both *in vitro* and *in vivo* include: activation of a nuclear estrogen receptor, anti-apoptotic protein expression, MAPKs pathway activation, modulation of calcium homeostasis and direct antioxidant activity (Tamir *et al.* 2002).

Estrogen molecules can act as antioxidants, because they have one phenolic ring that is ready to donate electrons (similar to polyphenolic antioxidants such as vitamin A and E). Previous studies indicate that the hydroxyl group at the C-3 phenolic A ring can donate hydrogen, which would help to reduce the accumulation of free radicals, such as a hydroxyl radical (Amantea *et al.* 2005, Badeau *et al.* 2005). This feature allows them to act as 'chemical shields' against oxidative stress (Behl, 2002). As there are no reports about differences in vanadium blood concentrations among sexes (WHO, 2001) our findings suggest that estrogens are protecting females.

Estrogen levels in adult males are notoriously lower compared with adult females because of this the higher levels of estrogens in female mice may be exerting a protective effect preventing genotoxic damage. Another possible explanation for these differences could be attributed to the influence of sex hormones on cytochromes (i.e. cytochrome P450) (Fortoul *et al.* 2005), or

intrinsic sex differences such as the production of ROS, that we previously mentioned (Borrás *et al.* 2003). In our experience, nasal epithelial cells caused more genotoxic damage in men compared with women when they were exposed to air pollutants (Fortoul *et al.* 2004).

Reticulocytes Percentage

In our experimental model, another finding was the decrease in reticulocyte counts, since the first exposure (24h) and through the whole experiment. In the micronucleus test, the percentage of reticulocytes with respect to erythrocytes in treated animals compared with controls provides two types of information: the cytotoxicity index (Krishna and Hayashi, 2000) and real-time evaluation of the functional status of erythropoiesis in bone marrow, because reticulocytes are released from the bone marrow 18 to 36 h before the final red cell maturation (Goodnough *et al.* 2000). Human studies have shown that exposure to vanadium induces changes in hematocrit, as well as leukopenia and anemia (Cooper, 2007), because it influences erythrocytes formation (Leonard and Gerber, 1994).

Hematic biochemical and the physiological role of vanadium have not been entirely elucidated. According to reports by Zaporowska and Wasilewski (1992) and Hogan (1990), the effects of vanadium can be summarized in three points: (i) reduced erythrocyte deformability, because the cells are often retained in the spleen's reticuloendothelial system and are removed from bloodstream; (ii) it produces lipid peroxidation in the erythrocyte membrane and this leads to hemolysis and (iii) erythrocytes' count decrease owing to red blood cells hemolysis and short survival time. So vanadium possibly interferes directly with the erythroid differentiation process. Experimental evidence supports this theory, because Aguirre *et al.* (2005) found count changes in erythroid precursors in the BM after injecting orthovanadate, and a significant increase was observed in the proportion of normoblasts and orthochromatic and polychromatic erythroblasts, indicating that erythropoiesis is stopped before the reticulocytes stage. In a previous report, our experimental model, in male mice a decrease in hemoglobin and hematocrit was observed (González-Villalva *et al.* 2009), which is consistent with the results reported here.

Our results showed that in peripheral blood leukocytes cell viability was not affected, this means that vanadium caused no cytotoxic effects on these cells. However, the amount of circulating reticulocytes significantly decreased. It is possible that the cause of this decline is mainly due to an impairment of erythroid precursors in bone marrow, and possibly to cell death, no affecting leukocytes. Importantly, the two-way ANOVA analysis revealed that a decrease in circulating reticulocytes was not associated with the animal's sex; therefore, all individuals are equally susceptible to the adverse effects of this metal.

Conclusion

Many environmental factors can damage DNA, and the understanding of the mechanisms associated with the outcomes of this process will provide researchers tools to understand the DNA environmental insults and ways to prevent or avoid it. Our results contribute to a better understanding of the mechanisms by which inhaled metals induce genotoxic and erythropoietic effects. The findings in the genetic material damage and decreased reticulocytes, should force the revision of

standards on air quality, considering that the toxic effects of vanadium affect the entire population, and contribute to the understanding of how vanadium exerts its toxicity. In addition, sex differences related to sex hormones effects and xenobiotic metabolism should be stressed, because almost half of world's population will experience different responses and would need a distinctive treatment to modify genotoxic damage. However, further investigation is needed to support sex-biased prevention schemes and treatments.

Acknowledgments

This research was partially supported by project PAPIIT-DGAPA IN-209612, UNAM. The first author is a student of Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM), and acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT), and UNAM. The authors thank Armando Zepeda Rodríguez for their technical assistance. We also appreciate the technical assistance of Enrique Pinzón Estrada and Ismael Torres Saldaña, members of the vivarium staff of the Faculty of Medicine, UNAM. The authors would also like to thank Alejandra Nuñez-Fortoul for style correction.

References

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2012. *Toxicological Profile for Vanadium*. Department of Health and Human Services, Public Health Service: Atlanta, GA.
- Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC. 2005. Characteristics of *in vivo* murine erythropoietic response to sodium orthovanadate. *Chem. Biol. Interact.* **156**: 55–68.
- Altamirano-Lozano M, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcántara, Valverde M, Rojas E. 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **16**: 7–17.
- Altamirano-Lozano M, Valverde M, Alvarez BL, Molina B, Rojas E. 1999. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V2O5) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **19**: 243–255.
- Amantea D, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT. 2005. From clinical evidence to molecular mechanism underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol. Res.* **52**: 119–132.
- Ávila-Costa MR, Colín BL, Zepeda RA, Antuna BS, Saldivar L, Espejel MG, Mussali GP, Ávila CMC, Reyes OA, Anaya MV, Fortoul TI. 2005. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. *A mice experimental model. Neurosci. Lett.* **381**: 21–25.
- Ávila-Costa MR, Montiel FE, Colín BL, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño CHG, Mussali GP, Fortoul TI. 2004. Niogrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem. Res.* **29**: 1365–1369.
- Badeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ. 2005. Estrogen A-ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **96**: 271–278.
- Behl C. Oestrogen as a neuroprotective hormone. 2002. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 433–442.
- Boobis AR, Cohen SM, Doerr NG, Galloway SM, Haley PJ, Hard GC, Hess FG, Macdonald JS, Thibault S, Wolf DC, Wrigth J. 2009. Data-based assessment of alternative strategies for identification of potential human cancer hazards. *Toxicol. Pathol.* **37**: 714–732.
- Borras C, Satre J, García-Sala D, Lloret A, Pallardó FV, Viña J. 2003. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 546–552.
- Chakraborty T, Chatterjee A, Rana A, Dhachinamoorthi D, Kumar PA, Chatterjee M. 2007. Carcinogen-induced early molecular events and its implication in the initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats: chemopreventive role of vanadium of this process. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**: 48–59.
- Choi JH, Kim JS, Kim YC, Kim YS, Chung NH, Cho MH. 2004. Comparative study of PM2.5- and PM10-induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J. Vet. Sci.* **5**: 11–18.
- Ciranni R, Antonetti M, Migliore L. 1995. Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. *Mutat. Res.* **343**: 53–60.
- Cohen MD, Klein CB, Costa M. 1992. Forward mutations and DNA-protein crosslinks induced by ammonium metavanadate in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* **269**: 141–148.
- Cooper R. 2007. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian J. Occup. Environ. Med.* **11**: 97–103.
- Dill JA, Lee KM, Mellinger KH, Bates DJ, Burka LT, Roycroft JH. 2004. Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* **77**: 6–18.
- Duffus JH. Carcinogenicity classification of vanadium pentoxide and inorganic vanadium compounds, the NTP study of carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide, and vanadium chemistry. 2007. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **47**: 110–114.
- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. 2002. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42**: 249–265.
- Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.* **455**: 81–95.
- Fortoul TI, Moncada-Hernández S, Saldivar-Osorio, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Ávila-Casado MC, Colín-Barenque L, Hernández-Serrato MI, Ávila-Costa MR. 2005. Sex differences in bronchiolar epithelium response after the inhalation of lead acetate (Pb). *Toxicology* **207**: 323–330.
- Fortoul TI, Piñón-Zarate G, Diaz-Bech ME, González-Villalva A, Mussali-Galante P, Rodríguez-Lara V, Colín-Barenque L, Martínez-Pedraza M, Montañó LF. 2008. Spleen and Bone Marrow Megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histol. Histopathol.* **23**: 1321–1326.
- Fortoul TI, Rodríguez-Lara V, González-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano-Gutiérrez G, Ustarroz-Cano M, Colín-Barenque L, Montañó LF, García-Pelez I, Bizarro-Neves P, Lopez-Valdez N, Falcon-Rodríguez CI, Jimenez-Martínez RS, Ruiz-Guerrero ML, López-Zepeda LS, Morales-Rivero A, Muñoz-Rivera-Cambas A. 2011. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 951043.
- Fortoul TI, Valverde M, López MC, Avila-Costa MR, Avila-Casado MC, Mussali-Galante P, Gonzalez-Villalva A, Rojas E, Ostrosky-Shejete P. 2004. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environ. Res.* **94**: 243–248.
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sanchez I, Lopez I, Bizarro P, Mendoza ML, Osorio LS, Espejel-Maya G, Avila-Casado MC, Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Villanueva DN, Olaiz-Fernandez G. 2002. Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health* **57**: 446–449.
- Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. 2002. Biologic effects of oil fly ash. *Environ. Health Perspect.* **110**: 89–94.
- González-Villalva A, Rodríguez LV, Montañó LF, Lima-Melo A, Ramírez G, Fortoul TI. 2009. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Curr. Topics Toxicol.* **6**: 31–38.
- Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. 2000. Erythropoietin, iron and erythropoiesis. *Blood* **96**: 823–833.
- Halliwel B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **21**: 1–14.
- Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. 1990. The Micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.* **245**: 245–249.
- Hernandez H, Rodriguez R. 2011. Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environ. Monit. Assess.* **184**: 5327–5342.
- Hogan GR. 1990. Peripheral erythrocyte levels, hemolysis and three vanadium compounds. *Experientia* **15**: 46: 444–446.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger W. 2002. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutat. Res.* **519**: 25–35.
- Iversen PO. 1997. Blood flow to the haemopoietic bone marrow. Review article. *Acta Physiol. Scand.* **159**: 269–276.
- Kleinsasser NH, Dirschedl P, Staudenmaier R, Harréus UA, Wallner BC. 2003. Genotoxic effects of vanadium pentoxide on human peripheral lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Environ. Health Res.* **13**: 373–379.
- Krishna G, Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* **455**: 155–166.
- Leonard A, Gerber GB. 1994. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* **317**: 81–88.

- Mayani H, Flores-Figueroa E, Pelayo R, Montesinos JJ, Flores-Guzmán P, Chávez-González A. 2007. Hematopoyesis. *Cancerología* **2**: 95–107.
- Migliore L, Bocciardi R, Macri C, Lo Jacono F. 1993. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* **319**: 205–213.
- Mussali-Galante P, Rodríguez LV, Hernandez TB, Avila CMR, Colin BL, Bizarro NP, Martínez LG, Rojas LM, Piñon ZG, Saldivar OL, Diaz BP, Fortoul TI. 2005. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure time. *Toxicol. Ind. Health* **21**: 215–222.
- NTP. 2002. *NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenicity Studies of Vanadium Pentoxide (CAS NO. 1314-62-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies)*. National Toxicology Program, Research Triangle Park NC. NTP TR 507, NIH Publication No. 03-4441, pp. 352, dated December 2002.
- Ramírez P, Eastmond DA, LaClette JP, Ostrosky-Wegman P. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* **386**: 291–298.
- Rodríguez-Mercado JJ, Alvarez-Barrera L, Altamirano-Lozano M. 2010. Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug Chem. Toxicol.* **33**: 97–102.
- Rodríguez-Mercado JJ, Mateos-Nava RA, Altamirano-Lozano MA. 2011. DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* **25**: 1996–2002.
- Rodríguez-Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol. Lett.* **144**: 359–369.
- Rojas E, Valverde M, Herrera LA, Altamirano-Lozano M, Ostrosky-Wegman P. 1996. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **359**: 77–84.
- Roldán RE, Altamirano LM. 1990. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* **245**: 61–65.
- Samanta S, Swamy V, Suresh D, Rajkumar M, Rana B, Rana A, Chatterjee M. 2008. Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon; removal of O(6)-methylguanine DNA adducts, p53 expression, inducible nitric oxide synthase down regulation and apoptotic induction. *Mutat. Res.* **650**: 123–131.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. 2003. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **531**: 231–251.
- Starr TB, Macgregor JA, Ehman KD, Kikiforov AI. Vanadium pentoxide: use of relevant historical control data shows no evidence for a carcinogenic response in F344/N rats. 2012. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **64**: 155–160.
- Strauss GHS. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT). I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.* **252**: 1–15.
- Tamir S, Izrael S, Vaya J. 2002. The effect of oxidative stress on ER- α and ER- β expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **81**: 327–332.
- Ustarroz-Cano M, Garcia-Pelaez I, Piñon-Zarate G, Herrera-Enriquez M, Soldevila G, Fortoul TI. 2012. CD11c decrease in mouse thymic dendritic cells after vanadium inhalation. *J. Immunotoxicol.* Early Online: 1–7.
- Vahter M, Akesson A, Lidén C, Ceccatelli S, Berglund M. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ. Res.* **104**: 85–95.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interac.* **160**: 1–40.
- Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. 2003. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gac. Med. Mex.* **139**: 57–63.
- Villani P, Cordelli E, Leopardi P, Siniscalchi E, Veschetti E, Fresegna AM, Crebelli R. 2007. Evaluation of genotoxicity of oral exposure to tetravalent vanadium *in vivo*. *Toxicol. Lett.* **170**: 11–18.
- Yip M, Madl P. 2002. Air Pollution in Mexico City: Project-Study paper. University of Salzburg, Austria. Academic Information Systems, Lund University Library.
- Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética. 2005. *Anales Sis San Navarra.* **28**: 227–236.
- Zaprowska H, Wasilewski W. 1992. Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. *Comp. Biochem. Physiol. C* **101**: 57–61.
- Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. 1994. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutat. Res.* **321**: 35–42.
- World Health Organization (WHO). 2001. *International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds*. WHO: Copenhagen.