



51281
1
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza

TOXICIDAD REPRODUCTIVA DEL
VANADIO (IV) EN EL RATÓN MACHO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANDRÉS ARAGÓN MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

MÉXICO, D.F.



JULIO, 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de mayo de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) **Andrés Aragón Martínez**, con número de cuenta 88205638 y número de expediente 0, con la tesis titulada: "**Toxicidad reproductiva del vanadio (IV) en el ratón macho.**", bajo la dirección del (la) **Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano**.

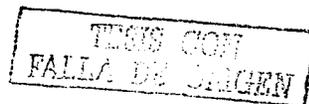
Presidente:	Dra. Patricia Ostrosky Wegman
Vocal:	Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz
Secretario:	Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Suplente:	Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre
Suplente:	Dra. Bertha Fenton Navarro

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de junio de 2003


Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



"....La gente que tiene un profundo compromiso personal con una cierta visión del futuro está plenamente justificada en la lucha por sus objetivos, aunque hoy los resultados parezcan remotos e improbables. En la vida, como en cualquier otra partida cuyo resultado depende tanto de la suerte como de la habilidad, la respuesta racional en caso desventaja consiste en luchar con más vehemencia".

María Harris

Una más.....

Pregunta Jorge Luis Borges: porqué publicamos?

Responde Alfonso reyes: para no pasarnos la vida corrigiendo los borradores.

**TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Agradecimientos

Durante el desarrollo de la tesis se participó como becario del CONACYT y de la DGEP, así mismo se contó con el apoyo del CONACYT proyecto 25417-M, DGAPA proyecto IN-214597 y DGEP/PAEP proyecto 201-301.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradezco al Dr. Mario Altamirano Lozano el haberme permitido realizar el presente trabajo en su Laboratorio bajo su dirección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dedicatoria

A María Elena por su invaluable apoyo y compañía.

A todos aquellos con quienes tuve, y tengo la fortuna de discutir.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN.....	8
<i>USOS DEL VANADIO</i>	<i>8</i>
<i>ASPECTOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON EL VANADIO</i>	<i>9</i>
<i>ASPECTOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO.....</i>	<i>11</i>
<i>ESPERMATOGÉNESIS.....</i>	<i>12</i>
<i>REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS</i>	<i>13</i>
<i>EL CICLO DEL EPITELIO SEMINÍFERO</i>	<i>16</i>
<i>ESPERMIOGÉNESIS.....</i>	<i>18</i>
<i>APOPTOSIS Y ESPERMATOGÉNESIS</i>	<i>19</i>
<i>DAÑO EN EL ADN DE LA LÍNEA GERMINAL.....</i>	<i>22</i>
<i>ORIGEN DE ANORMALIDADES EN LA CROMATINA DEL ESPERMATOZOIDE.....</i>	<i>23</i>
<i>EFFECTOS DEL VANADIO EN LOS PROCESOS REPRODUCTIVOS DE LOS MAMÍFEROS.....</i>	<i>25</i>
<i>ENSAYO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA).....</i>	<i>27</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
OBJETIVOS.....	29
<i>OBJETIVO GENERAL.....</i>	<i>29</i>
<i>OBJETIVOS PARTICULARES.....</i>	<i>29</i>
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
<i>PROTOCOLOS</i>	<i>31</i>
<i>EVALUACIONES ESPERMÁTICAS</i>	<i>31</i>
<i>HISTOPATOLOGÍA</i>	<i>31</i>
<i>Histología clásica, apoptosis y análisis del ciclo del epitelio seminífero</i>	<i>31</i>
<i>Microscopía electrónica de transmisión.....</i>	<i>32</i>
<i>ENSAYO DE LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA).....</i>	<i>33</i>
<i>CITÓMETRO DE FLUJO.....</i>	<i>33</i>
<i>TESTOSTERONA Y PROGESTERONA.....</i>	<i>34</i>

TESIS COM

ESTADÍSTICA.....	34
RESULTADOS.....	35
<i>PROTOCOLO DE 10 DÍAS.....</i>	35
<i>Peso de los órganos del sistema reproductor.....</i>	35
<i>Movilidad espermática.....</i>	35
<i>ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.....</i>	37
<i>Ciclo del epitelio seminífero y apoptosis.....</i>	37
<i>TESTOSTERONA Y PROGESTERONA.....</i>	40
<i>PROTOCOLO DE 60 DÍAS.....</i>	44
<i>Peso de los órganos del sistema reproductor.....</i>	44
<i>Movilidad espermática.....</i>	44
<i>Estructura de la cromatina espermática.....</i>	44
<i>Histología clásica, apoptosis y ciclo del epitelio seminífero.....</i>	49
<i>Testosterona y progesterona.....</i>	53
<i>Microscopía electrónica.....</i>	55
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	71
PERSPECTIVAS.....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
PUBLICACIONES.....	89

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

Índice de abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CL	Célula de Leydig
COMP	Cells outside main population (células fuera de la población principal)
CS	Célula de Sertoli
DFI	Denaturation fluorescence index (índice de desnaturalización fluorescente)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FSH	Hormona estimulante del folículo
I.P.	Intraperitoneal
LH	Hormona luteinizante
NA	Naranja de acridina
P	Progesterona
RA	Receptor de andrógenos
SCSA	Sperm chromatin structure assay (ensayo de la estructura de la cromatina espermática)
T	Testosterona
TUNEL	Tdt-mediated dUTP nick end labeling (Marcaje de extremos con dUTP mediante TdT)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

El vanadio y sus compuestos han mostrado ser capaces de inducir efectos tóxicos en diferentes órganos de modelos animales. Previamente nosotros mostramos que el tetraóxido de vanadio puede inducir alteraciones en la citología de la gónada masculina, así como en los gametos; sin embargo, el proceso de la espermatogénesis involucra muchos procesos de división y diferenciación que se conocen en conjunto como el ciclo del epitelio seminífero y en un primer acercamiento al problema con estudios de histología clásica no identificamos etapas sensibles al daño inducido por la administración de tetraóxido de vanadio. De la misma forma, el análisis clásico de semen no proporciona información acerca de la integridad de la cromatina espermática.

Con el propósito de hacer una evaluación que comprendiera los diferentes compartimientos del sistema reproductor masculino decidimos investigar en el modelo de ratón los efectos nocivos del tetraóxido de vanadio a nivel de la gónada, contemplando diferentes tiempos de tratamiento para caracterizar los efectos en diferentes etapas del desarrollo espermatogénico, de la misma forma estudiamos los efectos del tetraóxido de vanadio en la estructura de la cromatina espermática y en las hormonas reguladoras de la espermatogénesis testosterona y progesterona.

En el presente estudio encontramos la inducción de muerte celular por apoptosis en la células germinales detectada por TUNEL en etapas particulares del ciclo del epitelio seminífero, las cuales coinciden con la deleción de las células germinales en condiciones fisiológicas, lo que hace suponer que el tetraóxido de vanadio podría estimular las rutas normales de muerte celular en el linaje germinal testicular. Aunado a lo anterior, no se observó modificación en la concentración de las hormonas esteroides progesterona y testosterona, lo que nos ayuda a explicar la distribución de células germinales muertas en etapas semejantes a las de los grupos testigo. La presencia de células germinales en apoptosis se corroboró por microscopía electrónica, lo que también reveló la presencia de estructuras intracelulares atípicas en prácticamente todos los tipos celulares del epitelio seminífero.

La estructura de la cromatina espermática en los animales tratados con tetraóxido de vanadio sufre modificaciones que la hacen más sensible a la desnaturalización.

TESIS CON
FALLA DE CALIDAD

Posiblemente el fenómeno observado tenga relación con los procesos de estabilización de la cromatina a nivel del epidídimo, puesto que los espermatozoides que pasan por este proceso durante el tratamiento con tetraóxido de vanadio son más sensibles a la desnaturalización que aquellos expuestos durante más tiempo al vanadio.

En este trabajo mostramos que a nivel de la gónada la administración intraperitoneal de tetraóxido de vanadio puede inducir la muerte de células germinales en etapas específicas del desarrollo espermatogénico, y que este fenómeno puede no estar relacionado con las hormonas testosterona y progesterona; de la misma forma ocasiona alteraciones ultraestructurales demostradas por la aparición de estructuras intracelulares atípicas, mientras que en los gametos aumenta la sensibilidad a la desnaturalización de la cromatina durante la estabilización en el epidídimo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Summary

Vanadium and their compounds have shown to induce toxic effects in different organs of animal models. We have shown that the vanadium tetraoxid can induce alterations in the cytology of the male gonad, as well as in the gametes; however, the process of the spermatogenesis involves many division processes and differentiation that are known as a whole as the cycle of the seminiferous epithelium. In a first approach with classical histology we could not be identified that stages sensitives to the damage induced by the administration of vanadium tetraoxid. In the same way, the classic analysis of semen don't provide information about the integrity of the spermatic chromatin.

Having the purpose of evaluating the different compartments of the male reproductive system, we investigated in the mouse the noxious effects of the vanadium tetraóxido in the gonad, contemplating different schedules of treatment to characterize the effects in the different stages of the spermatogenic development, in the same way, we did study the action of the vanadium tetraoxid on the structure of the spermatic chromatin and the hormones that control the spermatogenesis, testosterone and progesterone.

In the testis of the animals treated with vanadium tetraoxid we detect by TUNEL the induction of cellular death by apoptosis of the germinal cells in stages specific of the cycle of the seminiferous epithelium, which coincided with the deletion of the germinal cells under physiologic conditions, this indicates that the vanadium tetraoxid could stimulate the normal routes of cellular death in the germ cells. Joined to the above-mentioned, modification was not observed in the concentration of the hormones steroids progesterone and testosterone, this helps us to explain the distribution of germinal cells died in stages similar to those of the control groups. The presence of germinal cells in apoptosis was corroborated by electronic microscopy, also revealing the presence of structures atypical intracellular in practically all the cellular types of the seminiferous epithelium.

The structure of the spermatic chromatin in the animals treated with vanadium tetraoxid suffers modifications that make it sensitives to the denaturation under the conditions the structure of the spermatic chromatin assay. The observed phenomenon is possibly related to the chromatin stabilization processes from at the level of the epididymis, since the sperms that go by this process during the treatment with vanadium

TESIS C-10
FALLA DE OCEANO

Posiblemente el fenómeno observado tenga relación con los procesos de estabilización de la cromatina a nivel del epidídimo, puesto que los espermatozoides que pasan por este proceso durante el tratamiento con tetraóxido de vanadio son más sensibles a la desnaturalización que aquellos expuestos durante más tiempo al vanadio.

En este trabajo mostramos que a nivel de la gónada la administración intraperitoneal de tetraóxido de vanadio puede inducir la muerte de células germinales en etapas específicas del desarrollo espermatogénico, y que este fenómeno puede no estar relacionado con las hormonas testosterona y progesterona; de la misma forma ocasiona alteraciones ultraestructurales demostradas por la aparición de estructuras intracelulares atípicas, mientras que en los gametos aumenta la sensibilidad a la desnaturalización de la cromatina durante la estabilización en el epidídimo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Introducción

El desarrollo industrial actual y el tipo de vida predominante, principalmente en las grandes ciudades, enfrentan al hombre a un elevado número de substancias químicas a las cuales no había estado expuesto, y aunque algunas de esas substancias se hallaban presentes desde hace tiempo no se encontraban en las concentraciones actuales.

La contaminación del ambiente y la exposición humana a elementos metálicos y a sus compuestos puede ocurrir naturalmente debido a la erosión de los depósitos de minerales así como de las actividades humanas como la minería, la fundición, la quema de combustibles fósiles y la utilización industrial de metales (Friberg y Nordberg, 1986).

Usos del vanadio

El vanadio es un elemento traza presente en las gasolinas derivadas de elementos fósiles, por lo que la combustión de estos materiales proporciona una significativa fuente ambiental de este elemento. Las emisiones de partículas de vanadio debido a la actividad industrial se estima que comprenden cerca del 53% del total de vanadio en la atmósfera (Hope, 1994).

La producción global de vanadio ha crecido de 4,000 toneladas durante el período comprendido de 1952 a 1956 hasta aproximadamente 40,000 toneladas en 1980. De 1980 a 1990 la producción ha fluctuado entre 30,000 y 40,000 toneladas por año (Nriagu, 1998).

Algunos compuestos de vanadio presentan una alta actividad farmacológica, debido a lo cual se ha sugerido la explotación de este elemento con fines benéficos, además de que los complementos nutrimentales que contienen vanadio actualmente son ampliamente comercializados (Baran, 1998). En humanos el vanadio (IV) es utilizado para mejorar el rendimiento físico de atletas durante entrenamientos pesados (Fawcett y col., 1997), en líneas celulares tumorales humanas ha mostrado propiedades antineoplásicas (Jacksson y col., 1997; Sakurai y col., 1995) y recientemente ha sido propuesto como un posible anticonceptivo vaginal (D´Cruz y col., 1998).

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

Aspectos biológicos relacionados con el vanadio

Es un elemento traza esencial, importante en el metabolismo del hueso, cartílago y en el proceso de crecimiento de ratas y pollos. Juega un papel importante en la nutrición de varias formas de vida, principalmente acuáticas (Carson y *col.*, 1987; French y Jones, 1993; Sabbioni y *col.*, 1983).

Las rutas por las cuales el vanadio entra en contacto con los animales terrestres son: el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal y la piel. Se estima que el 25% del vanadio inhalado se absorbe y transporta al torrente sanguíneo y al sistema linfático. La ingestión contribuye en menor grado a la absorción ya que solo del 1-10% que pasa a través del tracto gastrointestinal es retenido y el restante se elimina con las heces, al parecer la bilis facilita la excreción, especialmente cuando las concentraciones en el plasma son altas (Sabbioni y *col.*, 1983). Los trabajos que evalúan la absorción de vanadio por la piel son escasos, aunque se piensa que la cantidad absorbida es mínima (Elinder y *col.*, 1988; French y Jones, 1993; WHO, 1988). El estado de oxidación del vanadio y la presencia de otros componentes en la dieta tienen influencia en la absorción del vanadio por el tracto gastrointestinal (Hill, 1990; Nielsen, 1995).

El mecanismo de absorción del vanadio no está bien entendido, aunque posiblemente el vanadio comparta, al igual que otros elementos, el mismo acarreador que el hierro, entre estos elementos se encuentran el cobalto, el níquel, el manganeso, el zinc, el cadmio y el plomo (Powell y Halliday, 1981). Los trabajos realizados en cultivos celulares muestran que las formas de vanadio V (vanadato) y IV (vanadilo) pueden transportarse al interior de las células, posiblemente el vanadato ingrese vía un sistema transportador de aniones (Macara y *col.*, 1980) en forma de monómero, mientras que el vanadilo lo hace gracias a un transportador de cationes divalentes presente en la membrana citoplasmática (Etcheverry y Cortizo, 1998). Una vez dentro de las células el vanadio (V) es reducido a vanadio (IV) (Redher, 1995; Sakurai, 1994), y posiblemente este proceso funcione como un mecanismo de desintoxicación (Etcheverry y Cortizo, 1998; Sabbioni y *col.*, 1993).

TESIS GRUPO
FALLA DE ...

En general la absorción del vanadio se da en función de su solubilidad en agua y en medios biológicos. La solubilidad de los compuestos de vanadio en jugos gástricos en orden decreciente es sulfato de vanadilo, vanadato de amonio y pentóxido de vanadio; mientras que en suero su solubilidad se ordena como vanadato de sodio, pentóxido de vanadio y sulfato de vanadilo (Sitprija y Eiam-Ong, 1998).

De la cantidad ingerida de vanadio que no se absorbe cerca del 12% es excretado en la orina. Es incierta la correlación entre la exposición a vanadio, las concentraciones sanguíneas y aquellas excretadas en la orina (Sitprija y Eiam-Ong, 1998). El vanadio excretado en la orina está en forma de complejos de bajo peso molecular (Chasteen y col., 1986).

Una vez que ingresa al organismo el vanadio se distribuye en el cuerpo, lo cual ocurre en el siguiente orden: hueso > riñón > hígado > bazo > intestino > estomago > músculo > testículo > pulmón > cerebro (Sharma y col., 1980), mientras que algunos experimentos sugieren el siguiente orden de retención: hueso > riñón > hígado > bazo > intestino > estomago > sangre > pulmón > cerebro (Chasteen, 1983).

De acuerdo con Baran (1998), para el caso del vanadio, podemos dividir en dos grandes bloques los procesos de desintoxicación: a) desintoxicación por acumulación en hueso y en tejido conectivo, y b) desintoxicación por procesos reductivos y por la formación de complejos.

En condiciones fisiológicas el vanadio se encuentra principalmente como vanadato en los fluidos extracelulares, al ingresar a las células es reducido por el glutatión y otros agentes a vanadilo y es estabilizado con algunos ligandos (Bruech y col., 1984; Nechay y col., 1986; Sakurai y col., 1980).

Los efectos pro-oxidativos del vanadio en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) en preparaciones mitocondriales (Byczkowsky y Zychlinsky, 1978) han sido muy discutidos (Erdmann y col., 1981; Liochev y Fridovich, 1990), mientras que en modelos animales *in vivo* el vanadio induce estrés oxidativo y peroxidación de lípidos (Sheriff, 1991; Stohs y Bagchi, 1995). Algunas sales inorgánicas que contienen vanadio con estado de oxidación IV funcionan como moduladores de potenciales redox en

TESIS CON
FALLA DE CUBRER

diferentes sistemas biológicos y catalizan la generación de especies reactivas de oxígeno (Ozawa y Hanaki, 1989; Sakurai y col., 1992; Shi y col., 1996).

Algunos trabajos sugieren que el vanadio mimetiza las acciones de la insulina, por lo que puede ser usado en el tratamiento de diabetes tipo I en aquellos casos en que la insulina no es aceptada (Léonard y Gerber, 1994; Srivastava y col., 1996). Este uso potencial del vanadio redirige el interés por los aspectos toxicológicos del metal, en particular, al potencial mutagénico y efectos teratogénicos (Dai y col., 1994; Léonard y Gerber, 1994; Srivastava y col., 1996).

Aspectos relacionados con el sistema reproductor masculino

Las funciones del sistema reproductor masculino son dos: 1) producir espermatozoides morfológica y fisiológicamente competentes en número suficiente para llevar a cabo la fertilización, y 2) sintetizar y secretar la testosterona, función a cargo de las células de Leydig (Sharpe, 1994).

Para que las funciones del sistema reproductor del macho puedan llevarse a cabo, se requiere de la comunicación neural entre el sistema nervioso central, el hipotálamo y las gónadas. Las señales hormonales y neuroquímicas transmiten la información entre el hipotálamo, la adenohipófisis, células de Leydig, células de Sertoli y el epitelio germinal (Amman, 1986; Griswold, 1995). Debido a que el gameto masculino es el producto final de las interacciones entre los componentes mencionados, su integridad y adecuado funcionamiento es necesario para transmitir a la siguiente generación la información genética que contienen (Sharpe, 1994).

Los datos de roedores, primates y humanos sugieren que la duración de la espermatogénesis no se altera por la modulación del ambiente gonadotrópico (Clermont y Harvey, 1965) o por el tratamiento con antagonistas de GnRH en ratas (Aslam y col., 1999), de igual manera se a visto que la frecuencia de las etapas del ciclo del epitelio seminífero no se ven afectadas por la resultante supresión de las gonadotropinas (O'Donnell y col., 2001). Por otro lado, al menos un estudio en humanos sugiere

TEGIC CON
FALLA DE ENLACE

que la longitud del ciclo espermatogénico no se ve afectado por el tratamiento hormonal (Heller y Clermont, 1964).

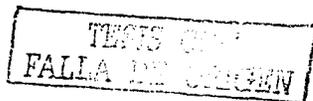
Espermatogénesis

La espermatogénesis consiste de tres procesos: La proliferación de las espermatogonias, la meiosis en espermatoцитos y la diferenciación de las espermátidas redondas hacia espermatozoides (Desjerdine y Ewing, 1993).

Las células espermáticas involucradas en el proceso de meiosis son los espermatoцитos primarios y secundarios. El proceso de meiosis implica dos divisiones celulares. En la primera, relacionada con los espermatoцитos primarios, los cromosomas aparecen como pares de cromátidas que formarán pares de cromosomas por sinapsis, y así darán origen a los cromosomas bivalentes. Cada miembro del bivalente se moverá hacia las células hijas, que ahora se denominan espermatoцитos secundarios y que en este momento ya contienen la mitad del número de cromosomas, pero puesto que cada cromosoma esta compuesto por un par de cromátidas hermanas la cantidad total de ácido desoxiribonucléico (ADN) es equivalente al de las células somáticas (De Kretser y Kerr, 1994).

La segunda división ocurre después de un tiempo relativamente corto, y durante este, las cromátidas de cada cromosoma se separan hacia las células hijas por mecanismos similares a los de la división mitótica. Las células hijas, denominadas espermátidas, contienen el número haploide de cromosomas y la mitad de ADN contenido en las células somáticas.

En la espermiogénesis las espermátidas redondas experimentan extensos cambios que las llevan a adquirir la forma característica del espermatozoide, con un flagelo, un núcleo que contiene a la cromátina condensada y un organelo acrosomal (De Kretser y Kerr, 1994).



Regulación de la espermatogénesis

La secreción de testosterona y la producción de espermatozoides son dependientes de la estimulación testicular por la gonadotropinas hipofisarias, es decir, la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales son secretadas en respuesta a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), esta hormona es sintetizada y secretada por el hipotálamo (figura 1). La testosterona es esencial para promover la espermatogénesis y es secretada por las células de Leydig adultas estimuladas por la LH y actúa vía los receptores de andrógenos (AR) en las células de Sertoli, las células de Leydig y las células mioideas peritubulares (Bremner y col., 1994). La testosterona ejerce sus efectos en las células somáticas más que en las células germinales, como lo muestran los estudios de trasplante (Johnston y col., 2001). La FSH actúa vía receptores de superficie acoplados a proteínas G localizados exclusivamente en las células de Sertoli. Aunque la FSH tiene un papel clave en el desarrollo del testículo inmaduro particularmente en el control de la proliferación de las células de Sertoli (Orth, 1993), existen datos controversiales tanto en humanos como en animales acerca de la esencialidad de la FSH en la espermatogénesis del adulto (Amory y Bremner, 2001; McLachlan y col., 1996; McLachlan y col., 2002).

El papel relativo a la acción de la FSH/testosterona en la espermatogénesis de los primates y de los humanos está bien definido. Los estudios en ratas indican que la FSH, la testosterona y el estradiol tienen acciones similares en el mantenimiento de la vitalidad de las células germinales (O'Donnell y col., 2001; Russell, 1991; Russell y Clermont, 1977; Saito y col., 2000). Existe también evidencia de los papeles independientes de cada hormona (Kerr y col., 1992; McLachlan y col., 1996). Por ejemplo, el citoesqueleto de las células de Sertoli y las uniones celulares entre las células de Sertoli y las células germinales son dependientes de la FSH en ratas (Muffly y col., 1994), pero la adhesión de las espermátidas redondas a las células de Sertoli muestra una necesidad absoluta de testosterona (Cameron y Muffly, 1991; Muffly y col., 1993; O'Donnell y col., 1996; O'Donnell y col., 1994).

El sinergismo entre la FSH y la testosterona en ratas es, en apariencia tal, que las concentraciones de andrógenos necesarias para mantener la espermatogénesis son mucho menores en presencia de FSH (Awoniyi y col., 1990; Huang y col., 1991; Kerr y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

col., 1992; Sun y *col.*, 1989; Zirkin y *col.*, 1989). Aunque es posible que semejantes interrelaciones entre la testosterona y la FSH también existan en primates y humanos, aunque desafortunadamente actualmente se carece de evidencias directas (McLachlan y *col.*, 2002).

Es claro que la FSH juega un papel primario en la regulación de la espermatogénesis en las ratas adultas (Chandolia y *col.*, 1991; El Shennawy y *col.*, 1998; McLachlan y *col.*, 1995; Meachem y *col.*, 1998; Sinha Hikim y Swerdloff, 1995) y en primates (Marshall y *col.*, 1995; Weinbauer y *col.*, 1991), posiblemente actuando como factor de sobrevivencia y como mitógeno. El sitio o sitios exactos en los que la FSH tiene influencia sobre el desarrollo de las espermatogonias se desconoce (McLachlan y *col.*, 2002).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

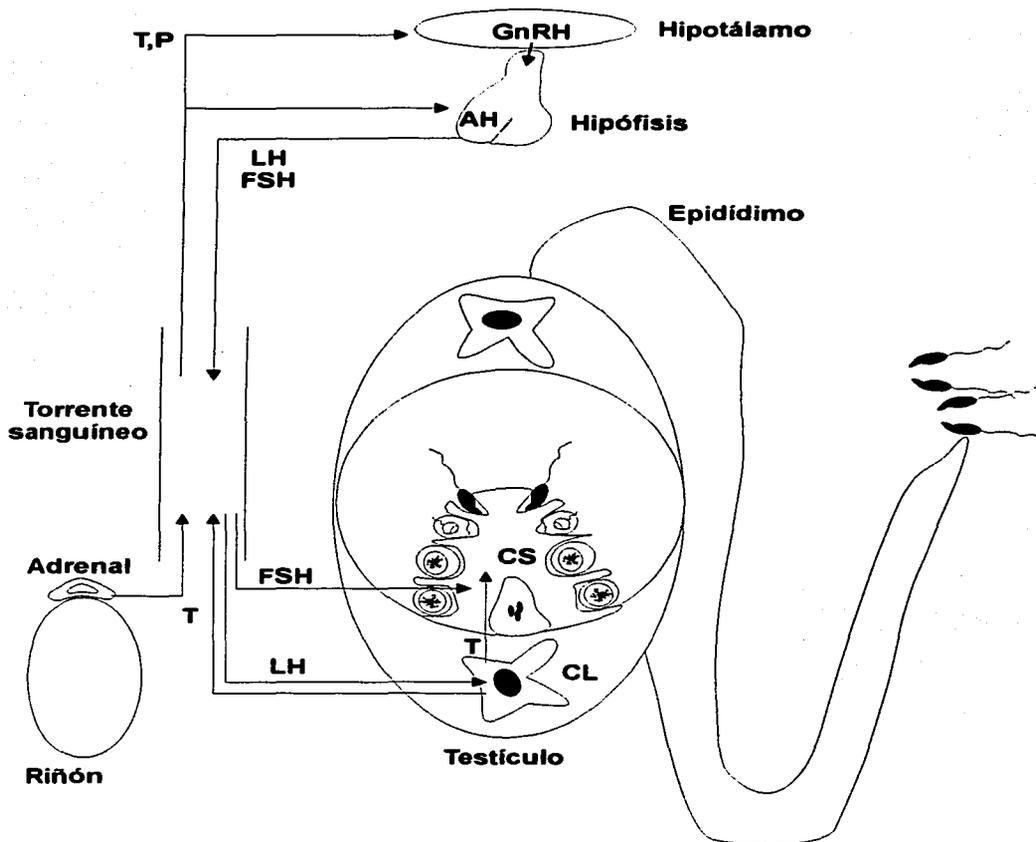


Figura 1. Ilustración esquemática de los diferentes compartimentos del eje hipotálamo-hipófisis-testicular, la comunicación endocrina dentro del compartimento testicular y la interacción de éste compartimento con el resto de los componentes. AH= adenohipófisis, CS= célula de Sertoli, CL= célula de Leydig, GnRH= hormona liberadora de las gonadotropinas, LH= hormona luteinizante, FSH= hormona estimulante del folículo, P= progesterona, T= testosterona.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

El ciclo del epitelio seminífero

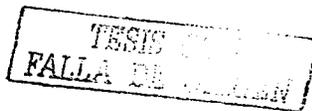
En un corte histológico de testículo pueden observarse diferentes asociaciones celulares dentro de los túbulos seminíferos. Una asociación celular o etapa se define como los tipos de células germinales en una fase de desarrollo particular presentes en un corte transversal de túbulo seminífero. Cada tipo celular dentro de la asociación se encuentra morfológicamente integrado con los otros durante el proceso de desarrollo. Las espermátidas son el tipo celular comúnmente utilizado para clasificar las etapas del ciclo de la espermatogénesis; la clasificación se basa en la forma del núcleo y en la presencia tamaño y disposición del acrosoma (Oakberg, 1956; Russell y *col.*, 1990).

Si se cuenta con fotografías de todas las asociaciones celulares de una especie en particular de acuerdo a la progresión natural de la espermiogénesis, se puede mostrar la secuencia de desarrollo de las asociaciones celulares y su localización en un tiempo dado. Una serie completa de cambios de las asociaciones celulares arregladas en una secuencia lógica de desarrollo se conoce como el ciclo del epitelio seminífero, mientras que una descripción pictórica del proceso se conoce como mapa del ciclo del epitelio seminífero (Russell y *col.*, 1990) (Figura 2).

En un mapa del epitelio seminífero las células inmaduras se colocan en la parte inferior de la ilustración y las más maduras en la parte superior. Por convención, las asociaciones celulares a la izquierda del mapa normalmente ilustran a las espermátidas redondas recién formadas y que aun no han desarrollado el acrosoma (Russell y *col.*, 1990).

Un mapa del ciclo del epitelio seminífero sirve no solo para comprender el proceso normal de la espermatogénesis, sino también para localizar con precisión los diferentes tipos celulares y entender las alteraciones que pueden ocurrir durante el proceso de espermatogénico (Russell y *col.*, 1990).

En el caso del ratón el ciclo del epitelio seminífero consta de doce etapas y una duración total de la espermatogénesis de 34.5 días (Oakberg, 1956; Russell y *col.*, 1990) (Figura 2).



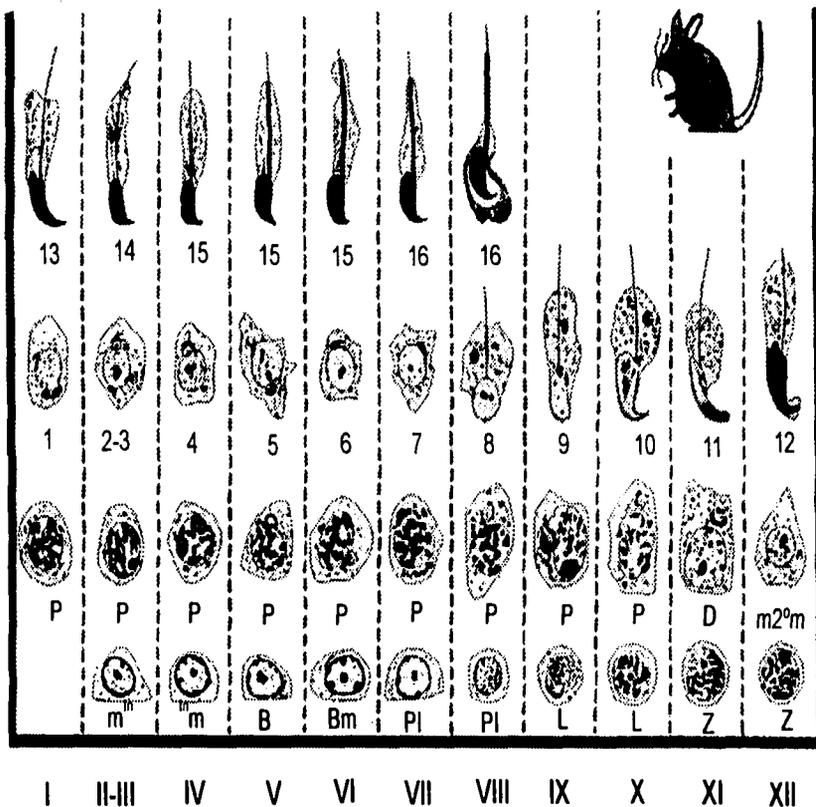


Figura 2. Esquema del ciclo del epitelio seminífero del ratón. Pueden observarse las diferentes asociaciones celulares (etapas) señaladas con números romanos. Los pasos de la espermiogénesis se marcan con números arábigos. P: paquiteno, D: diploteno, m2m: meiosis, Pl: preleptoteno, L: leptoteno, Z: zigoteno, m: espermatogonía intermedia en mitosis, B: espermatogonía B, Bm: espermatogonía B en mitosis. Tomado de Russell y col., 1990.

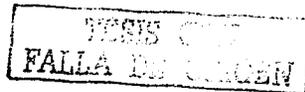
Espermiogénesis

La transformación de espermátidas a espermatozoides involucra una compleja secuencia de eventos que en conjunto constituyen la espermiogénesis, proceso, en esencia, de metamorfosis, en la que una célula convencional se convierte en una estructura móvil altamente organizada (De Kretser y Kerr, 1994).

La sustitución de histonas por proteínas de transición y posteriormente por protaminas se asocia temporalmente con la condensación de la cromatina durante la espermiogénesis, mientras que los enlaces disulfuro que estabilizan de forma intra e intermolecular a las protaminas son las responsables primarias de la estabilización de la cromatina del espermatozoide en el epidídimo (Balhorn y col., 1984).

Las histonas asociadas con el ADN son reemplazadas por proteínas de transición durante el alargamiento de las espermátidas en la espermiogénesis (Golan y col., 2000), y posteriormente por protaminas. Las protaminas se depositan en el ADN durante la etapa de espermátida, cuando el núcleo cambia de una forma redonda, menos compacta, a una forma más alargada (Golan y col., 2000; Hecht, 1989). En las ratas, por ejemplo, las histonas presentes en las espermátidas redondas son reemplazadas por proteínas de transición en los pasos 9-11 de la espermiogénesis (Kistler y col., 1996; Oko y col., 1996) y estas a su vez son reemplazadas por protaminas en los pasos 16-19 (Grimes, 1986). Se han reportado cambios similares en la cromatina de los espermatozoides de ratón (Balhorn y col., 1984; Grimes, 1986).

Los espermatozoides provenientes del testículo presentan un núcleo compacto y obtienen la capacidad para fertilizar durante su tránsito por el epidídimo, a este proceso se le denomina maduración. El papel biológico de la compactación de la cromatina puede ser el de crear una estructura altamente resistente a los mutágenos, así como el mantener la integridad del ADN hasta que se lleve a cabo la fertilización (Love y Kenney, 1999). La compactación de la cromatina del espermatozoide puede dividirse en dos procesos que ocurren en compartimentos distintos: la condensación en el testículo y la estabilización en el epidídimo (Romanini y col., 1986).

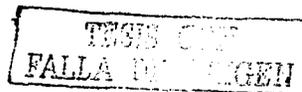


Durante el tiempo de permanencia en el epidídimo los espermatozoides experimentan cambios en su composición y su función (Bedford, 1975; Eddy y O'Brien, 1994), mientras que la cromatina y los componentes de la pieza media y la cola son gradualmente estabilizados (Calvin y Bedford, 1971). Durante la estabilización se forman enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína (esto es: oxidación de los grupos sulfhidrilo -SH a enlaces disulfuro -SS-) de las protaminas en la cromatina espermática (Evenson y *col.*, 1989; Love y Kenney, 1999; Seligman y *col.*, 1991; Shalgi y *col.*, 1989) (Bedford y Calvin, 1974; Pellicciari y *col.*, 1983); un evento semejante ocurre en muchas fracciones proteicas de la cola del espermatozoide (Seligman y Shalgi, 1991; Shalgi y *col.*, 1989).

La formación de los enlaces disulfuro en las proteínas presentes en la membrana flagelar también puede estar relacionada con la adquisición de la movilidad (Cornwell y *col.*, 1988), ya que la sobreoxidación de los grupos sulfhidrilo en la membrana flagelar induce una reducción en la movilidad espermática (Seligman y *col.*, 1989), la cual posiblemente ocurra por pérdida de la fluidez en la membrana (Mammoto y *col.*, 1996). En este sentido, se ha mostrado que los grupos -SH son muy sensibles a las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Snyder y *col.*, 1988). Las ERO también afectan el axonema espermático como resultado de la disminución en las concentraciones de adenosina trifosfato (ATP) (De Lamirande y Gagnon, 1992), inhiben las funciones mitocondriales, la síntesis de ADN, ácido ácido (ARN) y proteínas (Comporti, 1989) y producen modificaciones en el citoesqueleto (Hindshaw y *col.*, 1986).

Apoptosis y espermatogénesis

Para mantener la homeostasis de una población celular es necesario que haya un balance entre el número de células que mueren y el de aquellas que se dividen. La muerte celular programada (apoptosis) es un mecanismo importante en la regulación del número celular (Wilson y *col.*, 2000). La apoptosis también es considerada como un mecanismo por el que son eliminadas las células dañadas o que presentan mutaciones (Wyllie y *col.*, 1980).



El proceso de apoptosis va acompañado por el encogimiento y fragmentación de las células y sus núcleos, la pérdida de microvellosidades y una extensa degradación del ADN cromosómico (Nagata, 2000). La inducción de la apoptosis es relativamente diversa e incluye factores de muerte como FasL (ligando de Fas), TNF (factor de necrosis tumoral) y TRAIL (ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF), el retiro de factores de crecimiento, agentes genotóxicos como drogas empleadas en el tratamiento contra el cáncer y el estrés oxidativo (Ashkenazi y Dixit, 1998; Nagata, 1997). Con respecto al origen del estímulo apoptótico, el compromiso celular a morir por apoptosis ocurre mediante la activación de las caspasas (cysteinyI aspartate specific proteases), que son una familia de proteasas de cisteína que se encuentran presentes en las células como precursores inactivos (Slee y col., 1999; Thornberry y Lazebnik, 1998). Al momento se han identificado al menos 14 miembros de la familia de las caspasas. Las caspasas involucradas en la apoptosis se pueden dividir en dos subfamilias: las iniciadoras y las ejecutoras. Las iniciadoras se activan formando complejos heteroméricos con moléculas accesorias como el receptor de un factor de muerte y su adaptador, o Ced4/Apaf-1 y citocromo c. Esto es seguido por el rompimiento y la subsecuente activación de una cascada de caspasas como la 3 y la 6. El rompimiento de un grupo selecto de substratos por esta cascada es el responsable del desmantelamiento de los componentes celulares esenciales, lo que resulta en los cambios bioquímicos y morfológicos que caracterizan a la muerte celular por apoptosis: rearrreglo del citoesqueleto, "burbujeo" de la membrana celular, condensación nuclear y fragmentación del ADN (Stroh y Schulze-Ostroff, 1998).

La muerte espontánea de las células espermáticas es un rasgo constante de las células germinales durante el proceso espermatogénico normal en una variedad de especies de mamífero (Allan y col., 1987; Brinkworth y col., 1995; Oakberg, 1956; Russell y col., 1990). Las células que degeneran de forma natural en el epitelio seminífero se han identificado como espermátogonias y espermaticitos (Brinkworth y col., 1995; Kerr, 1992).

La apoptosis de las espermátogonias, de los espermaticitos y de las espermátidas redondas ocurre de forma espontánea durante la espermatogénesis normal y es el mecanismo primario por el que ocurre la muerte de las células germinales durante la supresión hormonal (Sinha Hikim y Swerdloff, 1999). La evidencia primaria en roedores sustenta el papel de la FSH y la testosterona en la inhibición de la apoptosis y en el mantenimiento de la de la viabilidad celular durante el inicio y mantenimiento de la

ESTRÉS OXI
BARRA DEL ORIGEN

espermatogénesis. Se observan cambios apoptóticos en los espermatoцитos y en las espermátidas redondas de ratas cuando son tratadas con antagonistas de GnRH (Sinha Hikim y col., 1995) o hipofisectomía en la que la FSH (Russell y col., 1993) la testosterona o ambas parcialmente inhiben su degeneración (Tapanainen y col., 1993). Los datos en roedores sugieren que la FSH y la testosterona actúan en rutas similares para evitar la apoptosis y promover la viabilidad de las células germinales (El Shennawy y col., 1998; Russell y col., 1998). Los estudios *in vitro* de las células testiculares humanas también demuestran la capacidad de la FSH, de los andrógenos y de los estrógenos para evitar la apoptosis de las células germinales (Erkkila y col., 1997; Pentikainen y col., 2000; Tesarik y col., 2000).

Actualmente se sabe que casi todas las células espermáticas degenerantes en animales intactos tienen una muerte apoptótica (Brinkworth y col., 1995; Sinha Hikim y col., 1997). En situaciones experimentales el bloqueo de diferentes estímulos hormonales, como los provenientes de las gonadotropinas (hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo), la hormona liberadora de gonadotropinas, la testosterona, pueden inducir este tipo de muerte celular (Billig y col., 1995; Henriksen y col., 1995; Russell y col., 1993; Shetty y col., 1996; Sinha Hikim y col., 1995).

Se ha demostrado que diferentes compuestos químicos pueden inducir efectos tóxicos en el epitelio seminífero y alterar el desarrollo de las células germinales durante el proceso de espermatogénesis. Ejemplo de los compuestos mencionados son la mitomicina C (Nakagawa y col., 1997), el ácido metoxiacético (Brinkworth y col., 1995), el mono-(2-etilhexil)ftalato (Richsburg y Boekelheide, 1996) la hidroxiaurea (Shin y col., 1999) y las metanfetaminas (Yamamoto y col., 2002). Algunos compuestos que presentan iones metálicos en su estructura pueden funcionar como inductores de apoptosis a nivel testicular, como por ejemplo el cloruro de cadmio (Xu y col., 1996) y el metilmercurio (Homma-Takeda y col., 2001).

TESIS CONF
FALLA DE ORIGEN

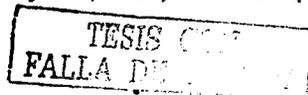
Daño en el ADN de la línea germinal

El daño en el ADN de la línea germinal puede ocurrir por dos procesos fundamentales: los errores ocurridos durante la replicación del ADN y la fragmentación del ADN (Aitken y Krausz, 2001).

Debido a que las espermatogonias se dividen durante toda la vida reproductiva del individuo, pueden acumularse mutaciones como resultado de los errores en la replicación, en consecuencia puede esperarse que los gametos de aquellos individuos con edad avanzada presenten una mayor incidencia de mutaciones (Aitken y Krausz, 2001). Es por esta razón, que la ocurrencia de enfermedades genéticas dominantes (como por ejemplo la acondroplasia) en los niños de padres genéticamente normales invariablemente involucran una mutación en la línea germinal del padre y esta fuertemente correlacionada con la edad paterna (Crow, 1997).

La fragmentación en el ADN puede ser de cadena doble o sencilla. La fragmentación no constituye por sí misma una mutación, pero es un cambio promutagénico que puede potencialmente generar mutaciones en la descendencia como consecuencia de una reparación inadecuada o defectuosa. Este tipo de daño en los gametos proviene de tres fuentes diferentes: el estrés oxidativo, la apoptosis abortiva – como se menciona más adelante- mediada por Fas o por deficiencias en los procesos naturales de recombinación y el empaquetamiento de la cromatina (Aitken y Krausz, 2001).

La composición de la membrana de los espermatozoides incluye lípidos insaturados, en cuyos dobles enlaces pueden iniciarse reacciones en cadena de peroxidación, promovidas por especies reactivas de oxígeno. Esta peroxidación puede ser catalizada por metales de transición (Aitken y col., 1993), los cuales se hallan presentes en el fluido seminal (Kwenang y col., 1987). Sin embargo, los espermatozoides se encuentran protegidos por antioxidantes durante su trayecto por el epidídimo y en el semen; entre las moléculas antioxidantes se encuentran la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa (Perry y col., 1993; Vernet y col., 2001). Mientras que en el plasma



seminal se cuenta con captadores de radicales libres como la vitamina C, el alfa tocoferol, la tirosina y la hipotaurina (van Overveld y col., 2000).

Los espermatozoides inmaduros que presentan aún la gota citoplásmica en la pieza intermedia tienen una marcada disfuncionalidad, esto debido a que en el citoplasma de la gota se encuentran presentes enzimas que pueden catalizar la formación de ERO, aunque los mecanismos por los que esto ocurre se encuentran aun poco entendidos (Aitken y Krausz, 2001).

La inducción de apoptosis por la ruta Fas es un mecanismo importante por el que las células de Sertoli regulan el número de las células germinales, particularmente en situaciones de estrés (Boekelheide y col., 2000). Fas se expresa en las células de Sertoli y su ligando en las células germinales (Lee y col., 1997). Sakkas y col., 1999, encontró que un gran número de espermatozoides eyaculados por hombres infértiles presentan al ligando Fas, lo cual resulta controversial ya que esas células debieron ser eliminadas por apoptosis. Sin embargo, estas células presentan rompimientos de cadena sencilla en el ADN. A este fenómeno se le conoce como apoptosis abortiva (Sakkas y col., 1999a).

La fragmentación del ADN parece estar correlacionada inversamente con la calidad del semen, particularmente en el conteo, la morfología y la movilidad (Shen y col., 1999; (Irvine y col., 2000; Muratori y col., 2000; Shen y Ong, 2000). Además se han observado correlaciones negativas entre la estabilidad del ADN en el núcleo espermático y la capacidad de fertilización de los espermatozoides, tanto *in vivo* como *in vitro* (Aitken y col., 1998; Evenson y col., 1999; Host y col., 2000; Sun y col., 1997)

Origen de anomalías en la cromatina del espermatozoide

El estrés fisiológico y ambiental, las mutaciones y las anomalías cromosómicas pueden alterar los altamente refinados eventos bioquímicos que ocurren durante la espermatogénesis. Estas alteraciones pueden llevar al desarrollo de una estructura de la cromatina que es incompatible con el desarrollo (Evenson y Jost, 2000). Aunque también el estrés puede inducir anomalías estructurales de la cromatina semejantes a la apoptosis o a la necrosis (Darzynkiewicz y col., 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En condiciones fisiológicas los problemas estructurales de la cromatina espermática pueden surgir durante la espermiogénesis si los eventos de corte y unión del ADN de cadena sencilla (nicks) por parte de la topoisomerasa II (topo II) son anormales. Lo anterior, se deriva de la presencia de la topo II y de los nicks en grandes cantidades en la cromatina de las espermátidas alargadas de ratas, ratones y pollos (Cobb y col., 1997; McPerson y Longo, 1993; Roca y Mezquita, 1989).

La presencia de los nicks puede reflejar la necesidad de aliviar la tensión ocasionada por la torsión resultante del superenrollamiento negativo asociado con el desplazamiento de las histonas por protaminas y por la modificación de la estructura terciaria en las espermátidas alargándose (Balhorn, 1982; McPerson y Longo, 1993; Risley y col., 1986). Por lo tanto la presencia por más tiempo de los nicks en las espermátidas es posiblemente una necesidad fisiológica (Evenson y col., 2002). Estos nicks no son deletéreos cuando son ligados por la topo II antes de que se complete la espermiogénesis y de que ocurra la eyaculación (McPerson y Longo, 1993). Sin embargo, si la actividad de la topo II es anormal o se bloquea con inhibidores (Morse-Gaudio y Risley, 1994), los nicks no se reparan apropiadamente, y permanecen en los espermatozoides maduros, y morfológicamente normales durante la eyaculación (Evenson y col., 2002).

Un estudio reciente (Caron y col., 2001) indica que la reparación de los nicks transitorios puede estar acompañada por la actividad indefinida de las proteínas de transición. Estas proteínas se encuentran relacionadas con la reparación de las lesiones inducidas por la luz ultravioleta. Por lo tanto, el papel de las proteínas de transición se extiende más allá de la compactación y pueden participar en la reparación del ADN después de que ocurra algún daño durante la espermatogénesis o la espermiogénesis. De hecho, hay una relación temporal entre la proteína de transición 1 (TP1) y los rompimientos del ADN: TP1 aumenta y los rompimientos en el ADN se hacen menos prominentes conforme se completa la espermiogénesis (Kierszenbaum, 2001). Si los rompimientos anormales en la cadena de ADN permanecen, el marcaje con el ensayo de TUNEL puede llevar a la conclusión errónea de que los espermatozoides son apoptóticos (Evenson y col., 2002).

Las anomalías de la cromatina espermática asociadas con la infertilidad también pueden resultar del contenido anormal de protaminas; específicamente una baja cantidad de la protamina 2 (P2). Un hombre fértil con fiebre de 39,9°C inducida por la influenza expresó un precursor no procesado de P2, lo que fue coincidente con un aumento en la tasa de histonas/protaminas, disminución de los grupos sulfidrilos libres y un aumento en la tinción del ADN con el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) (Evenson y Jost, 2000). La presencia de un precursor no procesado de P2 (de Yebra y col., 1998) combinado con la evidencia de que los genes que codifican para P1, P2 y para las proteínas de transición son normales (Schlicker y col., 1994) indican que el procesamiento incompleto de P2 puede llevar a anomalías en la cromatina.

Efectos del vanadio en los procesos reproductivos de los mamíferos

Se ha descrito que la administración de 8.5 µg/g de pentóxido de vanadio en ratones hembra CD-1 disminuye la fertilidad, el número de implantes, el número de fetos vivos, el peso fetal y aumenta las reabsorciones, mientras que en ratones macho disminuye significativamente el peso testicular después de 50 y 60 días de tratamiento. Reduce el porcentaje de movilidad espermática a partir de 10 días de tratamiento, el conteo espermático a partir de 20 días y el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas se incrementa a los 20, 50 y 60 días (Altamirano-Lozano y col., 1996).

Por otro lado, se ha observado que el metavanadato de sodio, administrado en el agua para beber, produce un descenso significativo en el número de ratones hembra preñadas a dosis de 60 y 80 mg/kg/día; mientras que en los machos disminuye el peso del epidídimo con 80 mg/kg por día y reduce el conteo espermático a 40, 60 y 80 mg/kg por día, pero no afecta la movilidad espermática (Llobet y col., 1993).

La aplicación intraperitoneal de metavanadato de sodio (2.5 y 5 mg/kg) durante 2 ó 7 días en los homogeneizados de testículo de rata había una disminución en las concentraciones de glutatión y un aumento en la peroxidación de lípidos (Sheriff, 1991).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, (Domingo y col., 1986) no observaron efectos adversos en la fertilidad y la reproducción de ratas macho tratadas con metavanadato de sodio (5, 10 y 20 mg/kg/día) durante 60 días por vía oral

La presencia de espermatozoides con morfología anormal indica que el proceso de espermatogénesis fue afectado (Krzanowska y col., 1995), en este punto cabe mencionar que durante la morfogénesis de la cabeza espermática intervienen factores genéticos (Krzanowska y col., 1995; Wyrobek y Bruce, 1975) y elementos citoesqueléticos (Cole y col., 1988; Meistrich, 1993; Meistrich y col., 1987).

Se sabe que el vanadio con estados de oxidación (IV) y (V) inhibe la polimerización de los microtúbulos (Hantson y col., 1996; Ramírez y col., 1997), por lo que la acumulación de vanadio (IV) en las células del epitelio germinal podría afectar a estructuras compuestas por microtúbulos, como el manchette que proporciona fuerza mecánica durante la morfogénesis nuclear del espermatozoide (Meistrich, 1993; Meistrich y col., 1987).

Se ha reportado que compuestos con vanadio (IV) inducen hidroxilación de 2'-deoxiguanosina y rompimientos en el ADN vía reacciones mediadas por radicales libres (Sakurai *et al.* 1992; Sakurai *et al.* 1995; Shi *et al.* 1996) y que el vanadio (V) ocasiona rompimientos de cadena sencilla en el ADN, por lo que no se puede descartar un posible daño al ADN pueda contribuir al incremento en el porcentaje de formas espermáticas anormales.

Diferentes estudios han mostrado que cuando se exponen roedores a mutágenos conocidos, hay una correlación positiva entre el porcentaje de anomalías morfológicas en espermatozoides y el aumento en sensibilidad a la desnaturalización ácida en el ensayo de estabilidad de la cromatina espermática, (Evenson, 1986; Evenson y Jost, 1993).

Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)

Una serie de estudios muestran una correlación entre la estructura de la cromatina espermática y la exposición a compuestos tóxicos que afectan el sistema reproductor del macho (Evenson y Jost, 1993; Potts y col., 1999), a compuestos mutagénicos (Evenson y col., 1993), así como una correlación con la tasa de fertilidad en mamíferos (Ballachey et al., 1987; Evenson et al., 1980; Spano et al., 2000).

La cromatina de las células eucariotas es un complejo de proteínas y ácidos nucleicos. Cuando el ADN es tratado con elevadas temperaturas, disoluciones ácidas o básicas las dos cadenas se separan. Este fenómeno se conoce como desnaturalización y es el resultado de la destrucción de los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases de cadenas opuestas (Darzynkiewicz, 1990).

El SCSA se basa en el principio de que la cromatina del espermatozoide normal es más susceptible a la desnaturalización física *in situ* (Evenson, 1990), así como en las propiedades metacromáticas del colorante fluorescente naranja de acridina (NA) cuando se asocia con el ADN. Si el NA se intercala en el ADN de cadena doble se produce una fluorescencia verde (F530), mientras que cuando se asocia en ADN de cadena sencilla presenta una fluorescencia de roja (F600) (Darzynkiewicz y col., 1975).

El grado de desnaturalización del ADN después de calentarlo o al ser tratado con ácido (Evenson y col., 1980) se determina al medir por citometría de flujo el cambio metacromático del NA de la fluorescencia verde (ADN nativo) a la roja (ADN desnaturalizado). Este cambio se expresa como DFI, que es la relación de la fluorescencia roja/ fluorescencia roja + fluorescencia verde. En el SCSA el DFI se calcula para cada espermatozoide.

Finalmente se sabe que las concentraciones de vanadio en el ambiente han aumentado como consecuencia de las actividades antropogénicas que lo liberan a la atmósfera (Hope, 1994), que por su amplio uso y liberación ha recibido atención como contaminante ambiental, y que por su elevado potencial toxicológico es considerado como peligroso (Carson y col., 1987; Léonard y Gerber, 1994; WHO, 1988).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

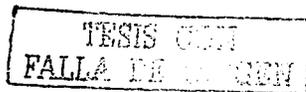
Planteamiento del problema

La exposición a compuestos que contienen iones metálicos es ocasionada principalmente por la actividad humana. Distintos metales y sustancias derivadas tienen actividad fisiológica en diferentes modelos animales. De los efectos que pueden ser ocasionados por la administración de compuestos metálicos algunos se presentan a nivel del sistema reproductor.

El vanadio y sus compuestos han mostrado funcionar como moduladores de potenciales redox además de ocasionar alteraciones sobre la función reproductiva del macho. Los efectos tóxicos del vanadio sobre el sistema reproductor masculino se pueden localizar a diferentes niveles: En los espermatozoides puede disminuir la movilidad y aumentar las anomalías morfológicas, mientras que en la gónada induce la aparición de células degenerantes en el epitelio seminífero. Se desconoce si la causa de estos efectos se encuentra relacionada con la regulación de la función gonadal por hormonas como la testosterona y la progesterona.

Por otro lado, se ha comprobado que la muerte celular por apoptosis ocurre de forma natural en etapas particulares del ciclo del epitelio seminífero, pero puede aumentar su expresión debido a la administración de compuestos tóxicos (incluyendo iones metálicos) o de aquellos que alteran las concentraciones de FSH, LH y T por lo que la presencia de células degenerantes debida a la administración de vanadio posiblemente tenga un origen apoptótico.

Los espermatozoides adquieren la capacidad de movimiento durante su paso por el epidídimo. Aquí los espermatozoides maduros sufren una serie de modificaciones moleculares a nivel de la membrana citoplasmática y de la cromatina que en conjunto se conocen como estabilización. Al parecer, los espermatozoides que presentan anomalías morfológicas, tienen también alteraciones en la estructura de la cromatina. El vanadio es capaz de inducir un aumento en la presencia de gametos con anomalías morfológicas y las alteraciones en la estructura de la cromatina pueden evaluarse por citometría de flujo.



Objetivos

Objetivo general

Estudiar los efectos tóxicos del vanadio (IV) en el tejido gonadal y en los gametos masculinos utilizando como modelo el ratón.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto citotóxico del tetraóxido de vanadio en la movilidad espermática de gametos expuestos durante su trayecto por el epidídimo.
2. Evaluar el efecto del tetraóxido de vanadio en la estructura de la cromatina espermática durante el proceso de estabilización cromatínica.
3. Evaluar el efecto del tetraóxido de vanadio en la estructura de la cromatina espermática de gametos expuestos durante todo el proceso de espermatogénesis y estabilización cromatínica.
4. Identificar en las gónadas de los animales tratados durante 10 ó 60 días con tetraóxido de vanadio la etapas del ciclo del epitelio seminífero en las cuales es frecuente observar células germinales en apoptosis.
5. Cuantificar el número de células germinales en apoptosis en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero en las gónadas de animales tratados durante 10 ó 60 días con tetraóxido de vanadio.
6. Cuantificar el efecto de la administración de tetraóxido de vanadio sobre las hormonas esteroides reguladoras de la espermatogénesis testosterona y progesterona.

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

7. Identificar en la gónada de animales expuestos durante todo el proceso de espermatogénesis las anomalías ultraestructurales presentes en el epitelio seminífero.

Material y métodos

Protocolos

Con base en los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio (Altamirano-Lozano y col., 1996) se procedió al diseño de dos protocolos de prueba. El primero contempló la administración de tetraóxido de vanadio durante 10 días; esto con el motivo de mantener expuestos a los espermatozoides durante su trayecto por el epididimo. En el segundo protocolo se sigue el procedimiento de dosificación de 60 días, de acuerdo con experimentos previamente realizados en nuestro laboratorio. A las muestras biológicas obtenidas en cada protocolo les serán realizadas las mismas evaluaciones.

Evaluaciones espermáticas

Cuatro grupos de seis ratones macho cada uno fueron tratados i.p. con tetraóxido de vanadio (0, 9.4, 18.8, ó 37.5 mg/kg) cada tercer día durante 10 ó 60 días. Los animales se sacrificaron por decapitación, se obtuvieron los espermatozoides a partir de los conductos deferentes y se colocaron en 2 ml de solución Tyrode's a 37°C. La suspensión espermática se homogeneizó por agitación y se colocó una gota en un portaobjetos precalentado; se contaron 200 espermatozoides a 40X en un microscopio Nikon equipado con el sistema de contraste de fases y se clasificaron como móviles (si presentan cualquier tipo de movimiento) y no móviles (Linder y col., 1992; Seed y col., 1996). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células con movimiento (Seed y col., 1996).

Histopatología

Histología clásica, apoptosis y análisis del ciclo del epitelio seminífero

Cuatro grupos de 6 ratones cada uno fueron tratados i.p. con tetraóxido de vanadio 0, 9.4, 18.8, ó 37.5 mg/kg cada tercer día durante 10 días o bien con 0, 4.7, 9.4 ó 18.8 mg/kg cada tercer día durante 60 días. Los animales fueron sacrificados por

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

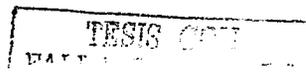
decapitación y se obtuvieron los testículos, el derecho se fijó en paraformaldehído al 4% en fosfato de sodio 0.1 M (pH 7.4). La gónada se deshidrató e incluyó en parafina de acuerdo a los procedimientos estándar. Para el estudio de histología clásica se utilizaron las gónadas de los animales tratados durante 60 días, se hicieron cortes de 10 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Para identificar a las células germinales en apoptosis se realizaron cortes histológicos de 7 μm , los cuales se colocaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina, se desparafinizaron e incubaron con proteinasa K a 37°C. Se utilizó un kit de apoptosis comercial (Boehringer Mannheim) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las secciones de tejido se observaron en un microscopio Nikon de campo claro.

Las etapas del ciclo del epitelio seminífero que contienen células positivas a TUNEL se identificaron en cortes seriales tratados para TUNEL y por PAS-hematoxilina respectivamente de acuerdo a los criterios de Oakberg, 1956 y Russell y col., 1990. De 20 a 25 túbulos seminíferos que contenían células positivas a TUNEL se seleccionaron al azar, por lo tanto más de 120 túbulos seminíferos que contenían células positivas a TUNEL se seleccionaron en cada dosis (Nakagawa y col., 1997). El porcentaje se calculó como sigue:

$$\% = \frac{\text{\# de túbulos seminíferos que contienen células positivas a TUNEL en cada etapa del ciclo y en cada dosis}}{\text{\# total de túbulos seminíferos (I-XII) que contienen células positivas a TUNEL en cada dosis}}$$

Microscopía electrónica de transmisión

El testículo izquierdo se fijó en glutaraldehído (Electrón Microscopy Sciences, Washington, Pennsylvania) al 2.5% en cacodilato de sodio (Electrón Microscopy Sciences, Washington, Pennsylvania) 0.1 M, pH 7.2, se post-fijó en tetraóxido de osmio al 1% en buffer de fosfatos con sacarosa 0.1M durante una hora y se lavó tres veces con amortiguador de cacodilato de sodio (0.15 M, pH 7.4) 15 minutos cada uno. Las muestras



se infiltraron con una mezcla de Araldita 6005 y tolueno 1:1 a 60°C durante una hora y después en una mezcla resina-tolueno 3:1 a temperatura ambiente por 24 horas. Las muestras se colocaron en moldes de inclusión con Araldita 6005 y se dejaron a 60°C por 24 horas.

Las secciones semifinas (10 μm) se tiñeron con azul de toluidina y se examinaron por microscopía de luz. Las secciones finas (60-80 nm) se colocaron en rejillas de cobre y posteriormente fueron contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo para ser examinadas en el microscopio electrónico de transmisión.

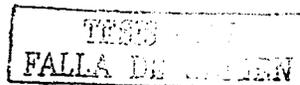
Se tomaron fotografías para determinar alteraciones ultraestructurales en las células de Sertoli y en las células germinales.

Ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA)

Las muestras de espermatozoides obtenidos a partir de conductos deferentes se descongelaron en baño de agua a 37°C. Alicuotas de 0.20 ml se mezclaron con 0.40 ml de disolución ácida (Triton X-100 0.1 %, NaCl 0.15 M, HCl 0.08 N, pH 1.4). 30 segundos después se agregaron 1.2 ml de una disolución que contenga 6 μg de naranja de acridina por ml de buffer (Ácido cítrico 0.1 M, Na_2HPO_4 0.2 M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, pH 6.0). Las mediciones en el citómetro de flujo se realizaron 3 minutos después de haber agregado la solución amortiguadora de naranja de acridina.

Citómetro de flujo

Las muestras se colocaron en el citómetro de flujo (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA), a una velocidad de flujo de 200-250 células/segundo; se evaluaron 5000 células por muestra. El equipo cuenta con un láser de argón Lexer 100 mW, se opera a 35 mW (488 nm). Se utilizó el software de captura Cell Quest (Becton Dickinson) y los datos se procesaron con el programa FCSEXpress 2 (DeNovo Software) para obtener el índice de desnaturalización y el porcentaje de células fuera de la población principal.



Testosterona y progesterona

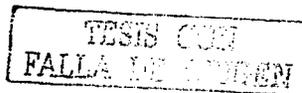
Los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 10 ó 60 días se sacrificaron por decapitación y la sangre se colectó en tubos eppendorf; la sangre se centrifugo a 3500 RPM durante 15 minutos, se obtuvo el suero y se mantuvo a -20°C hasta que se cuantificaron las concentraciones de hormonas esteroides. La cuantificación de testosterona y progesterona se realizó por radioinmunoanálisis. Se utilizó un kit comercial (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, CA, USA) que consiste de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de conejo, viales de hormona marcada con ^{125}I testosterona y siete calibradores con diferente concentración para realizar la curva patrón.

Se tomaron 50 μl del suero problema y se mezclaron con 1000 μl de la hormona marcada, todos los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantó el sobrenadante de cada tubo se secaron las paredes del mismo y se colocaron en un contador de centelleo para su conteo. La sensibilidad del ensayo fué de 0.01 ng/ml.

La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.1, 0.5, 2.0, 10, 20 y 40 ng/ml. La unión máxima contiene mas de 1000 μl de hormona marcada, mientras que las cuentas totales contienen 1000 μl de la hormona marcada. Los resultados se muestran como ng/ml de testosterona.

Estadística

Los datos de DFI, COMP, hormonas y número de células germinales muertas de los animales tratados con tetraóxido de vanadio en los diferentes protocolos se compararon con su respectivo control mediante la prueba t de Student, y los resultados se consideraron significativos cuando $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en una PC con el software SPSS 10.



Resultados

Protocolo de 10 días

Peso de los órganos del sistema reproductor

Los animales fueron tratados durante 10 días con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio al termino de los cuales se realizó la disección y se extrajeron los órganos y glándulas relacionadas con el sistema reproductor, así como los conductos deferentes, a partir de los cuales se evaluó la movilidad espermática.

En la cuadro 1 se observa que la administración de 9.4 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 10 días indujo una disminución estadísticamente significativa en el peso de la próstata, así como un incremento en el peso de las glándulas adrenales. En esta misma dosis se presentó una reducción en el peso de la vesícula seminal, aunque no fué significativa, mientras que el peso testicular y de epidídimos permaneció sin cambios. En el grupo tratado con 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio el peso de la vesícula seminal y el de la próstata disminuyó significativamente, mientras que el peso de las adrenales permaneció mas alto que el valor del testigo; no se encontraron cambios significativos en cuanto al peso testicular y de los epidídimos. En el tratamiento de 37.5 mg/kg de tetraóxido de vanadio hubo una reducción del peso de los epidídimos, la vesícula seminal y de la próstata, mientras que las adrenales no presentan cambio con relación al grupo testigo. Hubo una marcada reducción en el peso de la vesícula seminal y de la próstata conforme se aumentó la dosis del tetraóxido de vanadio.

Movilidad espermática

Cuando se evaluó la movilidad espermática en los grupos tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 10 días, todos los porcentajes de movilidad presentaron valores superiores al 50%. En los animales tratados con 9.4 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 10 días el porcentaje de espermatozoides móviles no fue diferente del valor testigo (59.6 ± 2.1 y 62.5 ± 2.9), pero disminuyó en las dosis de 18.8 y de 37.5 mg/kg (56.2 ± 1.3 y 57.3 ± 1.7 respectivamente), aunque la diferencia estadísticamente significativa ocurre en la dosis de 18.8 mg/kg.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Peso corporal, de los órganos y de las glándulas accesorias del sistema reproductor de ratones tratados durante 10 días con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio.

	mg/kg de tetraóxido de vanadio			
	Control	9.4	18.8	37.5
N	6	6	6	6
Peso corporal inicial	44.2±0.3	39.9±2.0	45.4±0.7	43.9±1.1
Peso corporal final	43.5±0.5	42.9±1.1	43.3±0.7	39.6±0.8
Testículos promedio	133.0±9.0	134.2±7.2	131.4±10.7	129.7±9.9
Epidídimos promedio	61.4±2.5	55.3±3.2	58.9±6.9	44.2±2.2 **
Vesícula seminal	172.9±10.5	144.5±20.1	113.8±9.3 **	92.7±5.5 **
Próstata	70.5±5.4	42.2±2.7 **	33.3±3.4 **	27.1±2.1 **
Adrenales promedio	5.0±0.4	6.4±0.4 *	6.4±0.4 *	4.6±0.1

El peso corporal esta expresado en gramos y el peso de los órganos y glándulas en miligramos.

*P< 0.05, **P< 0.01, t de Student, m±EEM.



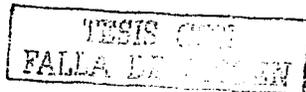
Estructura de la cromatina espermática

Para el análisis de la estructura de la cromatina espermática las gráficas de dispersión fueron regionalizadas para eliminar los fragmentos celulares de los datos adquiridos y muestran las emisiones a 530 nm (dsDNA) versus 630 nm (ssDNA). En la gráfica 1A se muestran los datos típicos de los espermatozoides de un ratón control, así como el histograma de la distribución del índice de desnaturalización en el cual se observa un solo pico haploide muy estrecho y con pocas células fuera de la población principal (Gráfica 1B). En contraste la distribución del DFI en los espermatozoides de un animal tratado con 37.5 mg/kg es más amplia y el número de células fuera de la población principal es mayor (Gráficas 1C y 1D).

El análisis de los resultados muestra que el DFI aumenta significativamente en los espermatozoides de los animales tratados con las diferentes dosis de tetraóxido de vanadio durante 10 días (cuadro 2), mientras que el porcentaje promedio de células con un mayor DFI localizadas fuera de la población principal (COMP) aumentó significativamente en los animales tratados con 9.4 y 37.5 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 10 días (cuadro 2).

Ciclo del epitelio seminífero y apoptosis

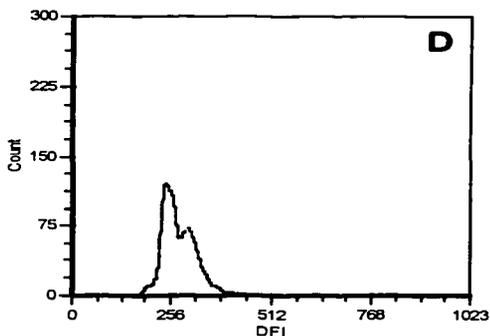
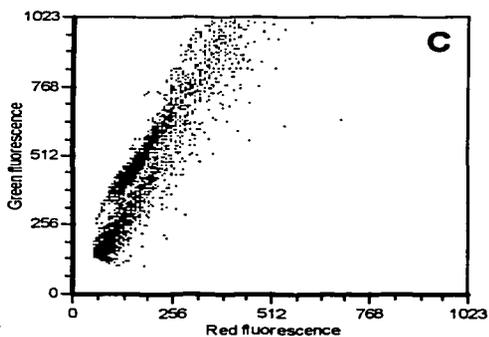
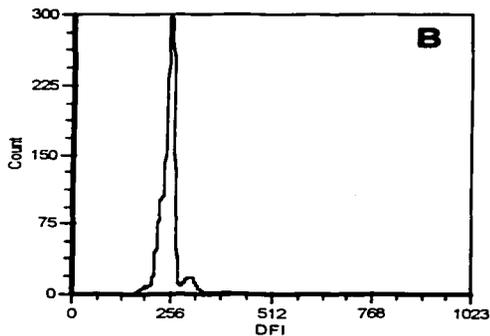
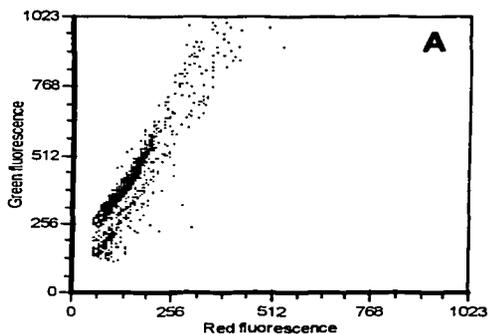
No se encontraron diferencias en el número de células positivas a TUNEL en las diferentes dosis de tetraóxido de vanadio, en la gráfica 2 se muestra el porcentaje de túbulos con células germinales positivas a TUNEL en cada etapa del ciclo del epitelio seminífero se muestra en la gráfica 3. En el grupo testigo aproximadamente el 60% de los túbulos positivos pertenecen a las etapas I-III y X-XII, mientras que el 40% restante se halla repartido en las etapas IV-IX. En la dosis de 9.4 mg/kg hay una disminución no significativa en la incidencia de túbulos positivos en la etapa I-III. En la dosis intermedia el porcentaje para todas las etapas es semejante a la observada en el grupo testigo.



Cuadro 2. Valores derivados del ensayo SCSA (FCS Express[®]) correspondientes a los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 10 días.

Dosis mg/kg de Tetraóxido de vanadio	Fluorescencia roja	Fluorescencia verde	DFI	% COMP
0	130.4±6.4	405.4±12.6	241.6±4.0	6.5±1.0
9.4	131.5±7.55	363.2±15.7	266.7±7.3 *	32.0±5.3 *
18.8	142.8±5.6	408.8±6.6	260.0±6.7 *	18.8±6.6
37.5	142.3±3.1	410.2±3.1	258.3±4.8 *	15.5±2.9 *

* P<0.05, t de Student, media±EEM, n=6,



Gráfica 1. Citogramas e histogramas representativos que muestran la dispersión de la muestra espermática en relación a las fluorescencias verde y roja, así como la distribución de la muestra con respecto al parámetro DFI. A y B corresponden a una muestra control, C y D a la muestra de un animal tratado con 37.5 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 10 días.

TRABAJO DE
FALLA DE JUEGO

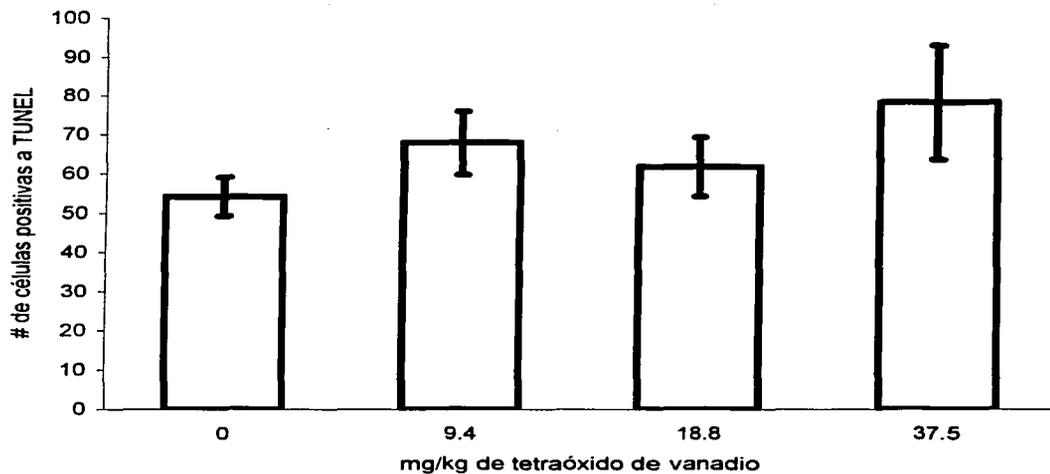
Como se muestra en la gráfica 3 el mayor porcentaje de células positivas a TUNEL se encontró en las etapas I-III y X-XII, aunque en ningún caso se presentaron diferencias significativas. Al analizar los datos del ciclo del epitelio seminífero de esta forma observamos que el número de células positivas a TUNEL aumenta significativamente en las etapas I-III y X-XII en la dosis de 37.5 mg/kg. De la misma forma se observó un marcado aumento en las etapas IV-VI en todas las dosis de tetraóxido de vanadio con respecto al grupo testigo, en ningún caso la diferencia es significativa.

En la gráfica 4 se muestra el número de células positivas a TUNEL por etapa del ciclo del epitelio seminífero. Las etapas que presentaron el mayor número de células positivas a TUNEL son la I-III y X-XII en el grupo control y tratados con tetraóxido de vanadio, aunque se presentó un incremento significativo en la dosis de 37.5 mg/kg en ambas etapas.

Testosterona y progesterona

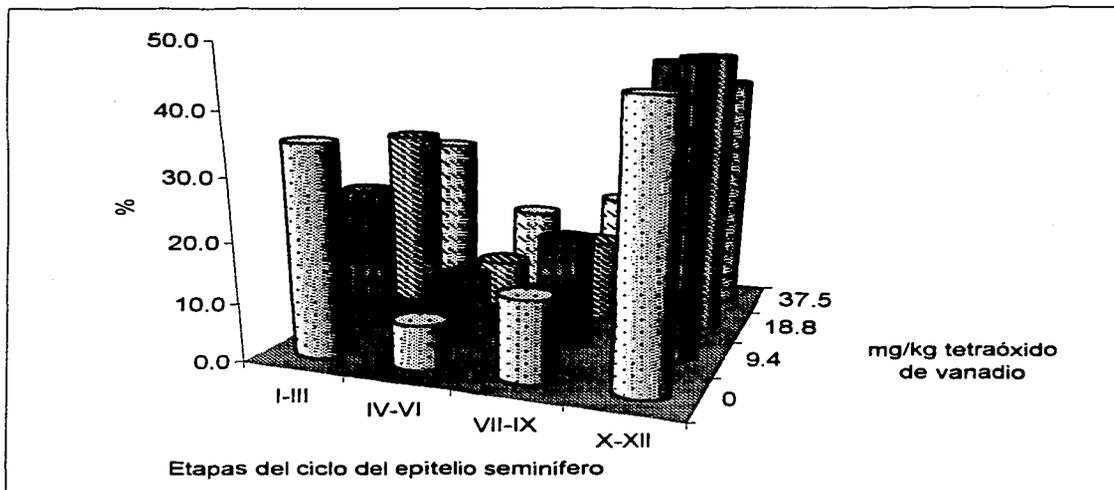
Las concentraciones de testosterona de los animales tratados durante 10 días se observan en la gráfica 5A. Se aprecia un notable aumento en las concentraciones de testosterona en las dosis intermedias que es diferente estadísticamente en la dosis de 9.4, mientras que en la dosis de 37.5 el valor no difiere del grupo testigo. Los valores de progesterona aumentan ligeramente en todas las dosis, aunque la concentración promedio en las dosis más altas es ligeramente menor que aquella de 9.4 mg/Kg, aunque en ningún caso la diferencia fué estadísticamente significativa (Gráfica 5B).

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

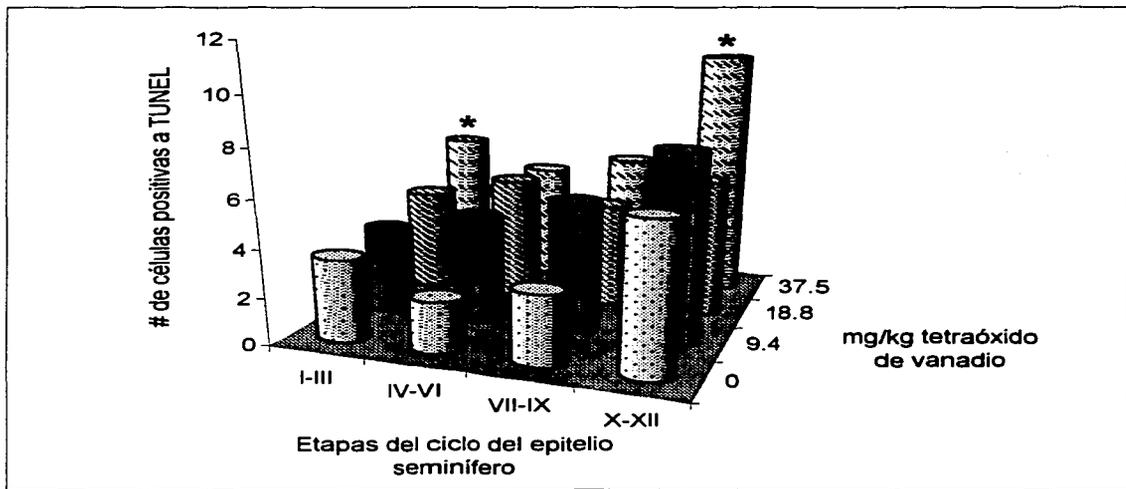


Gráfica 2. Numero de células germinales positivas a TUNEL en ratones tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 10 días. Media+EE, n=6.

TESIS COM
FALLA DE ORIGEN

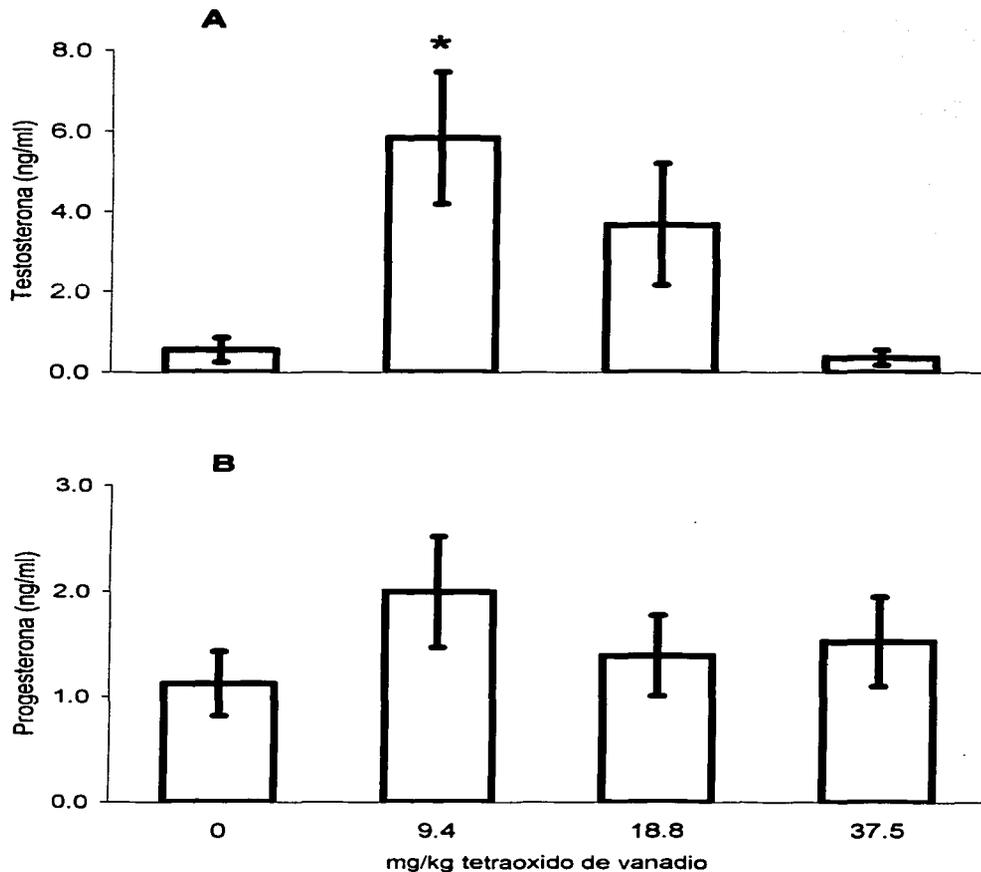


Gráfica 3. Identificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero que contienen una o más células germinales positivas a TUNEL y la frecuencia con que se presentan en el testículo de ratones tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 10 días. Media±EE, n=6.



Gráfica 4. Número de células germinales positivas a TUNEL en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero en ratones tratados con concentraciones crecientes de tetraóxido de vanadio durante 10 días. * P<0.05, t de Student. Media±EE, n=6.

17018 CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5. Concentraciones de A) testosterona y B) progesterona en ratones tratados con diferentes concentraciones de vanadio durante 10 días. * $P < 0.05$, t de Student, $E \pm EEM$, $n = 6$

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Protocolo de 60 días

Peso de los órganos del sistema reproductor

Se trataron animales durante 60 días con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio, se realizó la disección y se registraron los pesos de los órganos y las glándulas accesorias del sistema reproductor. En la cuadro 3 se observa que no ocurrieron cambios estadísticamente significativos en el peso de los órganos y glándulas del sistema, con excepción de la próstata, en la que hubo una marcada reducción del peso con respecto al valor control en todas las dosis de tetraóxido de vanadio, mientras que el peso de la vesícula seminal mostró una tendencia a disminuir conforme aumentó la dosis de tetraóxido de vanadio, aunque solamente en la concentración de 18.8 mg/kg la reducción es significativa.

Movilidad espermática

En el caso de los animales tratados durante 60 días los porcentajes de movilidad fueron de 62.6 ± 3.17 , 62.0 ± 2.32 , 68.2 ± 3.04 y 50.3 ± 3.91 para el grupo control y los tratados con 4.7, 9.4 y 18.8 mg/k de tetraóxido de vanadio respectivamente. La disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles en la dosis de 18.8 mg/kg difiere significativamente del valor del grupo testigo.

Estructura de la cromatina espermática

Se obtuvieron espermatozoides de ratones tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio. Las evaluaciones de la diferentes fluorescencias realizadas con el citómetro de flujo se procesaron en computadora para obtener los valores del índice de desnaturalización y de COMP.

En la gráfica 6 se observan los histogramas de dispersión para las fluorescencias evaluadas en el ensayo y la distribución de los valores de DFI, la cual se observa estrecha en el testigo y con pocas células fuera de la población principal; mientras que en un

animal tratado con 18.8 mg/kg (Gráficas 6C y 6D) aumenta el porcentaje de células fuera de la población principal.

En las muestras de los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días se observó un aumento significativo del DFI en la dosis de 4.7 mg/kg, en la dosis de 18.8 se apreció también un incremento en el DFI, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa; sin embargo, en esta misma dosis aumentó la fluorescencia roja, lo que indica un incremento en la desnaturalización de la cromatina espermática (cuadro 4); con respecto al porcentaje de células fuera de la población principal no se presentaron diferencias significativas, aunque hubo un ligero aumento en las dosis de 4.7 y 18.8 mg/kg.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Peso corporal, de órganos y de glándulas accesorias del sistema reproductor de ratones tratados durante 60 días con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio.

	Dosis mg/kg tetraóxido de vanadio			
	Control	4.7	9.4	18.8
N	6	6	6	5
Peso corporal inicial (g)	45.6±1.0	47.2±1.2	44.5±1.1	44.6±1.5
Peso corporal final (g)	46.8±1.3	49.2±1.4	48.3±1.9	44.2±1.8
Testículos promedio	140.2±5.5	137.7±6.0	139.9±10.0	127.2 ± 14.2
Epidídimos promedio	56.7±2.9	56.5±1.9	58.9±3.0	49.2 ± 3.7
Vesícula seminal	192.8±10.1	177.1±15.4	158.3±16.3	137.1 ± 10.1 *
Próstata	87.0±6.4	44.4±3.1 **	49.9±5.3 **	33.4 ± 3.8 **
Adrenales promedio	5.6±0.4	5.3±0.4	6.3±0.6	6.1 ± 0.3

Los datos representan la media ± el error estándar expresados en mg

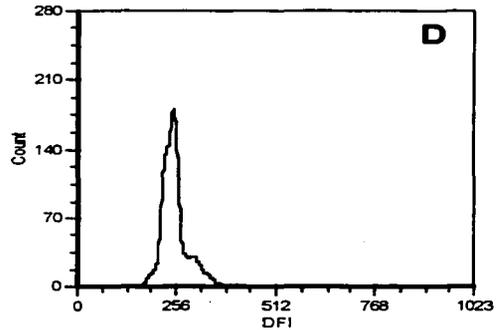
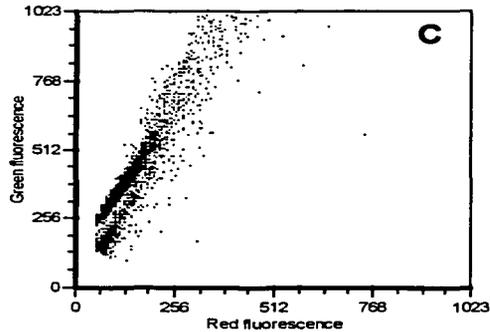
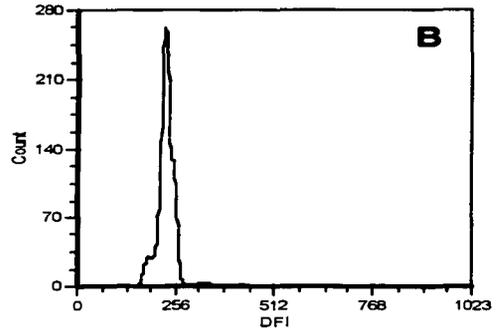
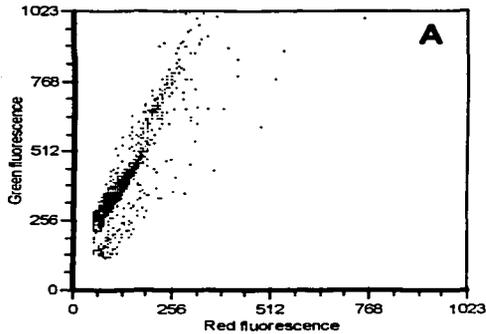
*P< 0.05, **P< 0.01, t de Student, m±EEM.



Cuadro 4. Valores derivados del ensayo SCSA (FCS Express[®]) correspondientes a los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días.

Dosis mg/kg de tetraóxido de vanadio	Fluorescencia Roja	Fluorescencia verde	DFI	% COMP
0	138.4±4.9	380.8±10.7	267.3±5.4	30.3±4.6
4.7	172.4±14.4 *	379.8±17.6	291.2±9.9 *	41.8±6.9
9.4	145.3±4.5	408.9±13.9	264.4±6.1	31.8±5.2
18.8	154.5±5.3 *	398.9±7.2	281.1±5.7	42.5±4.9

* P<0.05, t de Student, media±EEM, n=6,



Gráfica 6. Citogramas e histogramas representativos que muestran la dispersión de la muestra espermática en relación a las fluorescencias verde y roja, así como la distribución de la muestra con respecto al parámetro DFI. A y B corresponden a una muestra control, C y D a la muestra de un animal tratado con 4.7 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 60 días.

TIENE QUE
FALLA DE ORIGEN

Histología clásica, apoptosis y ciclo del epitelio seminífero

En los animales tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio se observaron diferentes alteraciones en el epitelio seminífero. Fue notoria la presencia de células atípicas con núcleo amorfo en la periferia del lumen de algunos túbulos (micrografía 1B). Se observaron túbulos con el lumen invadido por detritos celulares y con espermatidas redondas cuyo núcleo presentaba la cromatina en forma marginal (micrografía 1C), mientras que algunos túbulos presentaron daño severo, manifestado por la ausencia casi total de células germinales, en estos túbulos permanecen aún las células de Sertoli y algunas células germinales en proceso de degeneración (micrografía 1D).

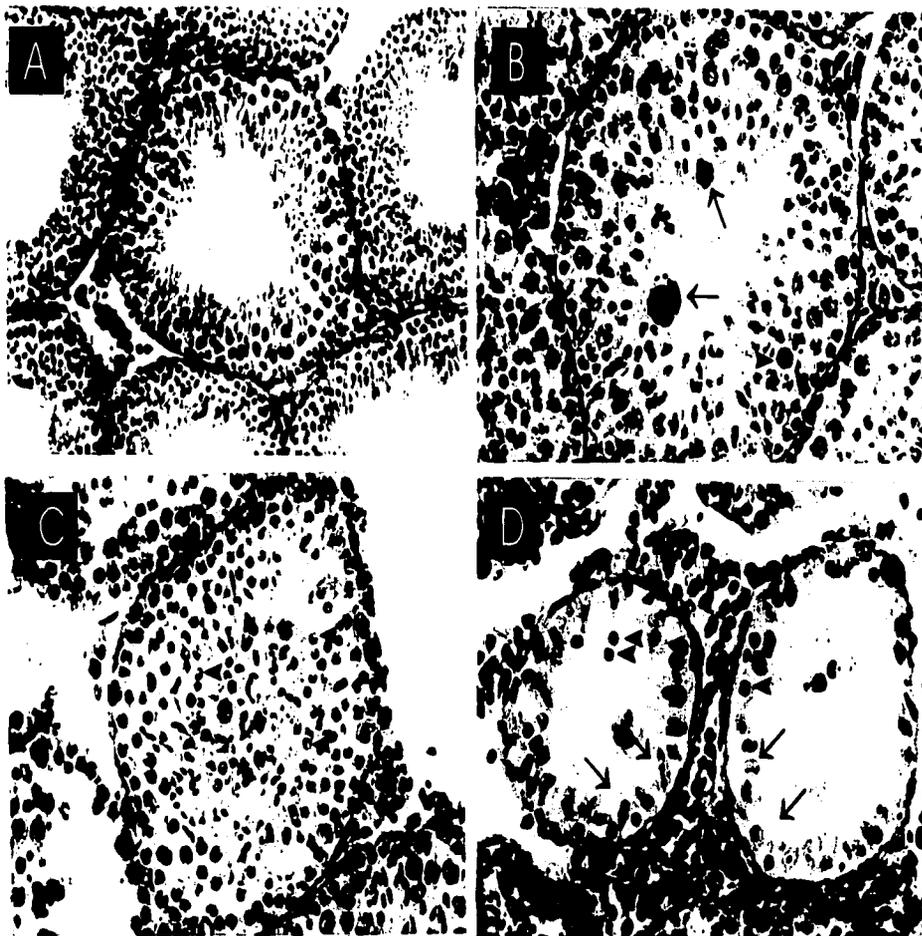
La gráfica 7 muestra el número de células germinales positivas a TUNEL por dosis de tetraóxido de vanadio. En todas las dosis administradas se presentó un incremento en el número de células muertas con respecto al control, aunque la diferencia estadísticamente significativa se observó únicamente en la dosis de 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio.

De la misma forma que en el caso de los experimentos realizados durante 10 días al agrupar los datos y realizar el análisis estadístico se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de túbulos positivos a TUNEL en las etapas IV-VI conforme aumenta la dosis de tetraóxido de vanadio, mientras que en las etapas X-XII se observó una disminución de aproximadamente el 15% en la dosis de 18.8 mg/kg (Gráfica 8).

En el caso de el número de células positivas a TUNEL se apreció una tendencia a aumentar la cantidad conforme se incrementó la dosis de tetraóxido de vanadio en las etapas I-III con una diferencia significativa en la dosis de 18.8 mg/kg, mientras que en las etapas X-XII la diferencia se presentó en las dosis de 4.7 y 18.8 mg/kg. En las etapas IV-VI hubo un aumento notable en las dosis de 9.4 y 18.8, pero el análisis estadístico no arrojó diferencias (Gráfica 9).

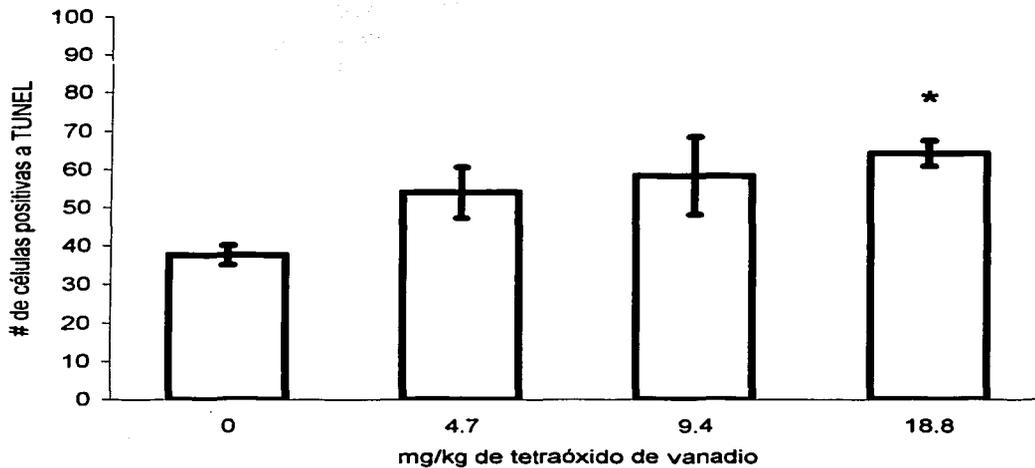
Aquellas etapas del ciclo del epitelio seminífero, en las que con mayor frecuencia se observaron células germinales positivas a TUNEL, en general presentaron también un mayor número de células muertas con respecto a las etapas restantes.

TESIS CON
FALLA DE TUNEL



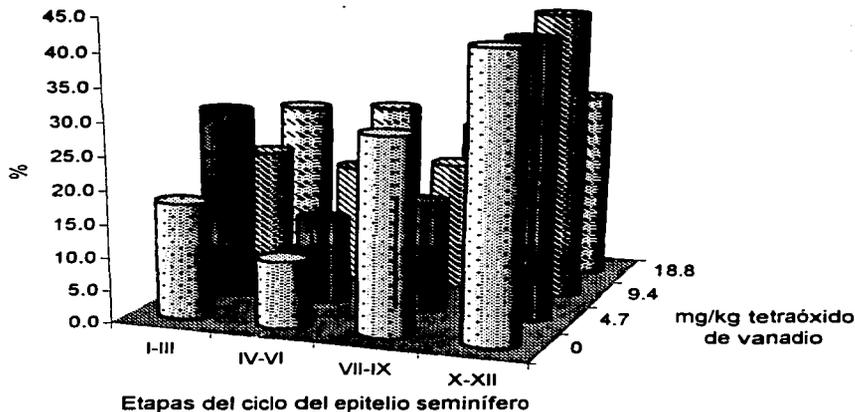
Micrografía 1. Histología testicular de ratones control (A) y tratados intraperitonealmente con tetraóxido de vanadio durante 60 días (B-D). A) se aprecian túbulos intactos con diferentes asociaciones celulares. B) Túbulo con presencia de células atípicas cercanas al lumen (flechas) y célula degenerante (cabeza de flecha). C, Túbulo con ausencia de lumen que presenta además espermatidas redondas con cromatina marginal (cabezas de flecha). D) túbulo severamente afectado, la mayoría de las células dentro del túbulo son células de Sertoli (flechas) y algunas células degenerantes (cabezas de flecha). A: 20X, B-D: 40X, B-C: 9.4 y D: 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio.

TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

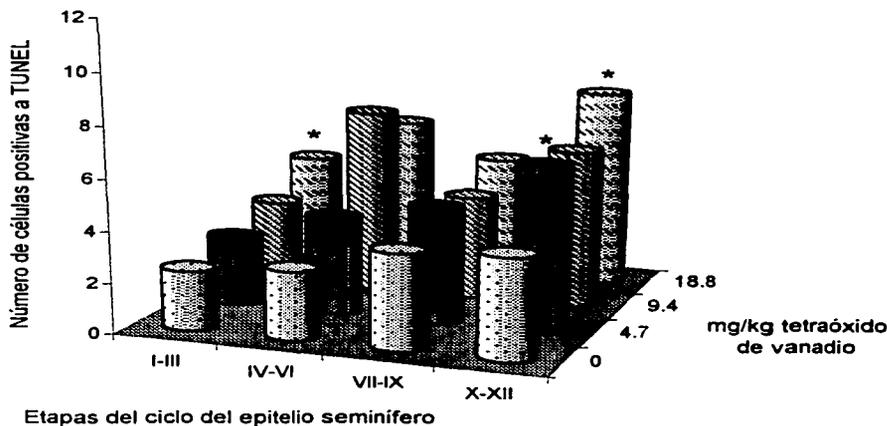


Gráfica 7. Numero de células germinales positivas a TUNEL en ratones tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 60 días. * $P < 0.05$, t de Student. Media+EE, n=6.

TESTS CON
FALLA DE REGISTRO



Gráfica 8. Identificación de las etapas del ciclo del epitelio seminífero que contienen una o más células germinales positivas a TUNEL y la frecuencia con que se presentan en el testículo de ratones tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 10 días. Media±EE, n=6.



Gráfica 9. Número de células germinales positivas a TUNEL en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero en ratones tratados con concentraciones crecientes de tetraóxido de vanadio durante 60 días. P<0.05, t de Student. Media±EE, n=6.

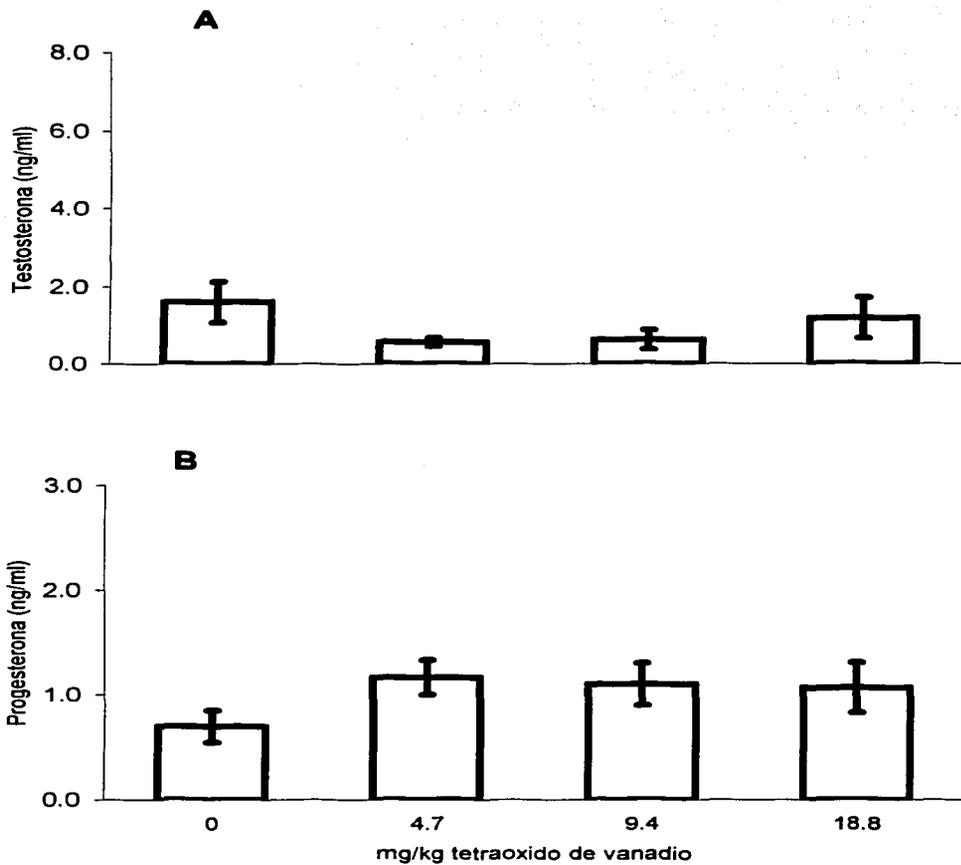
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Testosterona y progesterona

Los resultados obtenidos de evaluar las concentraciones de testosterona de los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días se observan en la gráfica 10A. Se aprecia una disminución en las dosis de 4.7 y 9.4, mientras que en la dosis de 18.8 hay un aumento con respecto a las dosis inferiores, aunque menor al valor del grupo control. Los valores de progesterona (Gráfica 10B) muestran un aumento en todas las dosis experimentales, aunque al igual que en el caso de la testosterona los cambios observados no difieren significativamente.

En el caso de los animales tratados durante 60 días con tetraóxido de vanadio, se observó una disminución en las concentraciones de testosterona que no resulta significativa; sin embargo, al igual que en el caso de los animales tratados durante 10 días las concentraciones de progesterona presentaron un ligero aumento que no se modifica en todas las dosis administradas y tampoco difiere significativamente de la concentración

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 10. Concentraciones de A) testosterona y B) progesterona en ratones tratados con diferentes concentraciones de vanadio durante 60 días. $P < 0.05$, t de Student, $E \pm EEM$, $n = 6$

TESIS CON
FALLA DE JUREN

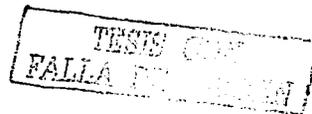
Microscopía electrónica

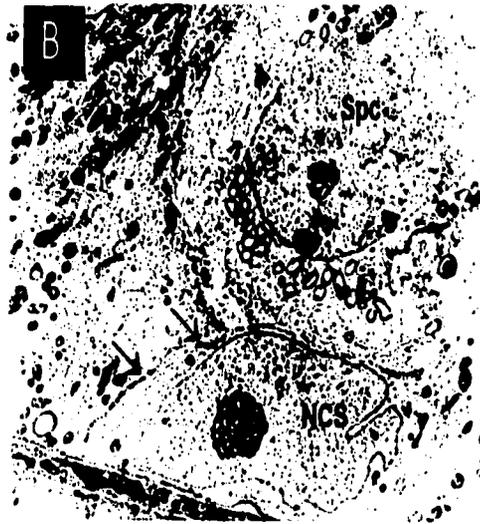
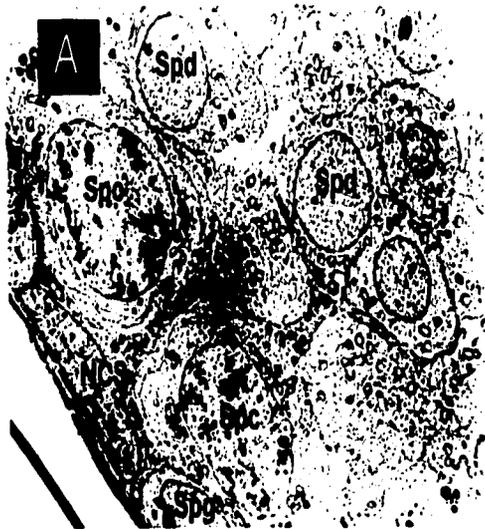
Se analizó la ultraestructura de la gónada izquierda obtenida de los animales tratados durante 60 días con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio. Los túbulos seminíferos se analizaron en busca de células germinales en apoptosis y de daño ultraestructural manifiesto en células de Sertoli y células germinales.

Los túbulos seminíferos de los animales testigo presentaron integro el tejido, en donde se apreciaron todos los tipos celulares constituyentes del epitelio, los cuales se presentaron en forma típica y con localización normal (micrografía 2A-C), ocasionalmente se observaron espermatogonias o espermatocitos en proceso de apoptosis, aunque el resto del tejido presentó apariencia normal. En los túbulos seminíferos de los animales tratados con 9.4 ó 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio se observaron con mayor frecuencia espermatogonias o espermatocitos en distintas etapas de apoptosis (micrografías 5B y 6B), no se apreciaron espermátidas o células de Sertoli en apoptosis en ninguna de las dosis de tetraóxido de vanadio utilizadas.

Algunos túbulos seminíferos presentaron células de Sertoli con múltiples vacuolas citoplasmáticas (micrografía 3A) y ocasionalmente mitocondrias con pérdida de crestas (micrografía 3B). En el tejido de los animales expuestos al tetraóxido de vanadio se hicieron evidentes estructuras inclusivas atípicas de forma oval a redonda que presentaron localización variable: intranuclear en espermátidas (micrografía 4A) o células de Sertoli (micrografía 4B), citoplásmicas en espermátidas (micrografía 5A) o espermatogonias en proceso de apoptosis (micrografía 5B); sobre (micrografía 6A) o subyacentes a la membrana basal del túbulo seminífero (micrografía 6B); las estructuras inclusivas no se observan en las muestras de los animales testigo.

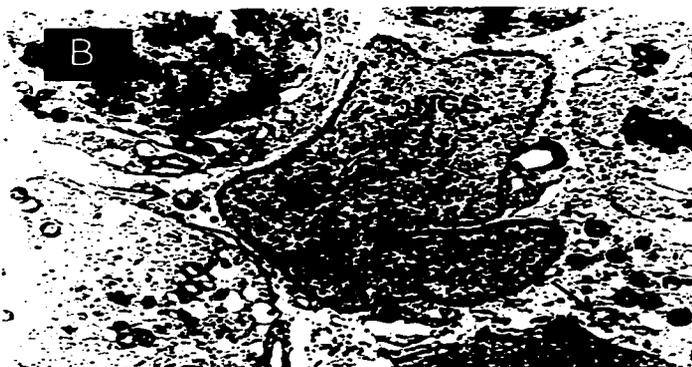
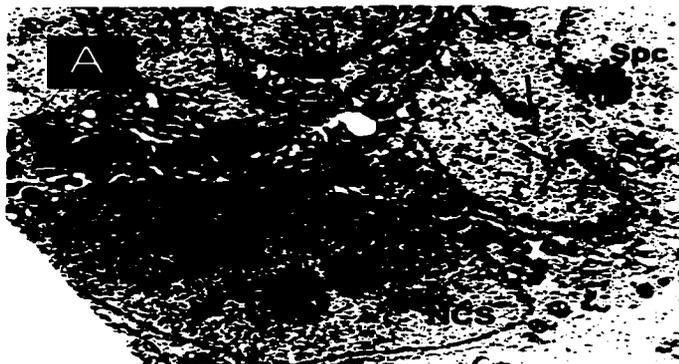
Cuando las estructuras inclusivas presentaron una localización citoplasmática o se encontraron sobre la membrana basal (micrografías 5A-B y 6A) se observó una zona electrodensa en su exterior, o bien presentaron estructuras membranosas (micrografía 5B). El interior de las estructuras inclusivas fue de contenido variable, generalmente resultó electrodenso y difuso. En el caso de las estructuras inclusivas intranucleares el contenido fue aproximadamente similar a la cromatina del núcleo en el que se encontraron (figura 4A-B).





Micrografía 2. Túbulo seminífero correspondientes a animales control. A) Sección transversal de un túbulo seminífero a baja amplificación en donde se observan células germinales intactas en distintas etapas de diferenciación. B) Dos células de Sertoli con uniones estrechas (flechas), se aprecia su citoplasma homogéneo con numerosas mitocondrias típicas, destaca también la presencia de un espermatocito. C) Espermátidas redondas en etapa VII integras. Spg: espermatogonia, Spc: espermatocito, spd: espermátida, NCS: núcleo de célula de Sertoli. A) 3000 aumentos, B) y C) 4800 aumentos.

TESIS CON
FALLA DE CONTENIDO



Micrografía 3. Sección transversal de un túbulo seminífero correspondiente a un animal tratado con 9.4 mg/kg de tetraóxido de vanadio. A) se observa el núcleo y las mitocondrias típicas de una célula de Sertoli en un citoplasma muy vacuolado, se aprecia una espermatida redonda (spg) en etapa IV y un espermatocito (spc) con puente intercelular intacto (flechas). B) corresponde a un animal tratado con 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio, el núcleo de la célula de Sertoli (NCS) es típico y se observa íntegro, aunque el citoplasma se encuentra muy vacuolado y se notan mitocondrias con pérdida de crestas (flechas). A) y B) 7560 aumentos.

TESIS CON
FALLA DE SERGEN



Micrografía 4. Cuerpos inclusivos intranucleares. A) Espermátida redonda en etapa VII con un cuerpo inclusivo intranuclear de orientación acrosomal (flecha blanca). B) Núcleo de una célula de Sertoli con un cuerpo inclusivo de orientación basal (flecha negra). El contenido de los cuerpos inclusivos en estas micrografías es aproximadamente semejante al contenido nuclear (insertos), ambas micrografías corresponden a diferentes animales tratados con 9.4 A) ó 18.8 B) mg/kg de tetraóxido de vanadio. mb: membrana basal. A) 9450 aumentos, inserto 75600 aumentos, B) 12000 aumentos, inserto 67000 aumentos.

TESIS COP
FALLA DE TIPO



Micrografía 5. Cuerpos inclusivos de localización citoplasmática. A) espermátida redonda en etapa VII con un cuerpo inclusivo perinuclear (flecha en el inserto). B) espermátogonia en una etapa temprana de apoptosis, presenta desprendimiento de la célula de Sertoli (asteriscos), mitocondrias de contenido difuso (puntas de flecha negra) y un cuerpo inclusivo cercano a la membrana citoplasmática con orientación basal (flecha). En el interior del cuerpo inclusivo se aprecian estructuras membranales (punta de flecha blanca). A y B corresponden a animales tratados con 9.4 y 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio respectivamente. A) 7560 aumentos, inserto 75600 aumentos, B) 16400 aumentos.

ESTE CON
FALLA DE ORIGEN



Micrografía 6. Cuerpos inclusivos localizados en la membrana basal. A) Cuerpo inclusivo (flecha negra) subyacente a la membrana citoplasmática de las células de Sertoli (flechas blancas en el inserto) y sobre la membrna basal (asterisco en el inserto). B) espermatogonias en etapas tempranas (punta de flecha negra) y tardías de apoptosis (punta de flecha blanca); en el espacio intersticial, adyacente a la membrana basal se localiza un cuerpo inclusivo flecha. A) y B) corresponden a animales tratados con 9.4 y 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio respectivamente. A) 3000 aumentos, inserto 17750 aumentos, B) 4800 aumentos.

1981
FALLA DE CALIBRACION

Discusión

La movilidad espermática se adquiere durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo (Cooper, 1990; Robaire y Hermo, 1988). En los animales tratados con 18.8 mg/kg tetraóxido de vanadio durante 10 días se presenta una disminución significativa en el porcentaje de células móviles; mientras que los espermatozoides de los ratones tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días mostraron un comportamiento semejante en la inhibición de la movilidad, la cual posiblemente se encuentre relacionada con la formación de especies reactivas de oxígeno producidas por la interacción del vanadio con la membrana de los espermatozoides (Jounes y Strobel, 1991; Keller y col., 1988; Shi y col., 1996).

El uso de la citometría de flujo en el análisis de espermatozoides obtenidos a partir de animales tratados con compuestos químicos, revela mucho acerca de los efectos tóxicos que pueden ser inducidos en las células germinales, tales como las alteraciones en la estructura de la cromatina.

El principio del SCSA se basa en que algunos colorantes, incluido el NA, se intercalan entre las bases del ADN y producen una señal fluorescente (Evenson, 1990; Evenson y col., 1980). La intensidad de fluorescencia emitida por los fluorocromos y el ADN se modifica al unirse las proteínas al ADN, lo que indica que la capacidad del fluorocromo para alcanzar al ADN se ve modificada (Lewin y col., 1999; Love y Kenney, 1999).

En el presente estudio se evaluó la sensibilidad de la cromatina espermática a la desnaturalización ácida en ratones tratados con tetraóxido de vanadio. Observamos que la sensibilidad a la desnaturalización aumenta en los espermatozoides de los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 10 días; sin embargo, no se observa el mismo efecto en los espermatozoides de los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días. Estos resultados sugieren que los espermatozoides maduros que transitan por el epidídimo son más sensibles a la desnaturalización inducida por el tetraóxido de vanadio, que aquellas células espermátogénicas expuestas durante 60 días al compuesto. Este fenómeno de sensibilidad diferencial a la desnaturalización espermática se ha observado



con otros agentes, como el estrés testicular con temperaturas elevadas (Love y Kenney, 1999).

Durante la diferenciación de las células germinales, el núcleo de las espermatidas redondas derivadas del proceso meiótico en los espermatoцитos, empieza a alargarse para obtener la forma característica de la cabeza espermática en cada especie. Durante este proceso la cromatina de las espermatidas se condensa al substituirse las histonas asociadas al ADN por proteínas de transición y posteriormente por protaminas, estos eventos tienen lugar en el testículo; las protaminas son estabilizadas por la formación de enlaces disulfuro. La formación de los enlaces disulfuro ocurre debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilo presentes en los residuos de cisteína de las protaminas; la oxidación de los grupos sulfhidrilo ocurre durante el trayecto de los espermatozoides por el epidídimo (Evenson y col., 1989; Seligman y col., 1991; Shalgi y col., 1989; Yossefi y col., 1994).

En relación a lo anterior, se ha demostrado que cuando la cantidad de enlaces disulfuro es menor, la cromatina se desnaturaliza más fácilmente, por lo tanto, cuando el número de enlaces disulfuro entre las protaminas disminuye, la cromatina se hace más susceptible a la desnaturalización (Lewin y col., 1999; Love y Kenney, 1999), y al contrario, una estructura cromatínica altamente condensada impide el acceso del NA a la molécula de ADN y por lo tanto disminuye la intensidad de la fluorescencia medida por citometría de flujo (Lewin y col., 1999).

Aunque se desconoce la etiología de la desnaturalización espermática, diferentes grupos de investigación recientemente han señalado algunos puntos acerca del origen de las anomalías que pueden conducir a la sensibilidad a la desnaturalización; entre ellos se incluyen la alteración en la tasa de protaminas 1 y 2 (Evenson y Jost, 2000), el fenómeno de apoptosis abortiva y la presencia de nicks endógenos (Sakkas y col., 1999b; Sakkas y col., 2002), aunque también se considera que una cantidad de enlaces disulfuro inter e intraprotaminas pueden jugar un papel en la desnaturalización (Love y Kenney, 1999). Alteraciones como las mencionadas pueden ser inducidas por agentes exógenos, como ha sido ya demostrado (Evenson y Jost, 1993; Evenson y col., 1993; Love y Kenney, 1999).

TESIS CON
FALLA DE ENTEN

La información anterior nos indica que la sensibilidad a la desnaturalización espermática tiene un origen multifactorial y, que el tipo de alteración en la cromatina del espermatozoide depende del estímulo aplicado para observar el fenómeno, así como del momento de la espermatogénesis en que el estímulo se aplica.

En los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 10 días el proceso de empaquetamiento de la cromatina esta completo y, en el epidídimo, la cromatina espermática se encuentra en el proceso de estabilización (Evenson y *col.*, 1989; Seligman y *col.*, 1991; Shalgi y *col.*, 1989; Yossefi y *col.*, 1994), esto nos indica que la formación de los enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas se halla en proceso. Evenson y *et al.*, (1989) señalan que la cantidad de enlaces disulfuro en la cromatina espermática no tiene relación con el proceso de desnaturalización en las condiciones del SCSA; sin embargo, los resultados del DFI en los animales tratados con tetraóxido de vanadio durante 10 días nos indica una alteración en el proceso de estabilización de la cromatina en el epidídimo, el cual lleva a un aumento en la sensibilidad a la desnaturalización.

El vanadio puede funcionar como aceptor de electrones por parte de los residuos de cisteína y promover la formación de los enlaces disulfuro (Stokinger, 1981; Thompson y *col.*, 1991). Se ha detectado vanadio tanto en el epidídimo como en los propios espermatozoides (Al-Bayati y *col.*, 1991) por lo que es factible una alteración en la cromatina derivada la interacción del metal con los residuos de cisteína en las protaminas, aunque queda por determinarse el papel de los grupos sulfidrido en la sensibilidad a la desnaturalización espermática.

Las espermatogonias son el tipo celular más primitivo en el epitelio seminífero y en el presente estudio, estas células se encontraron expuestas a los efectos del tetraóxido de vanadio durante los procesos de proliferación, meiosis y diferenciación hacia espermatozoides cuando los animales fueron tratados durante de 60 días con tetraóxido de vanadio. Nosotros mostramos que este mismo tratamiento induce un aumento en el porcentaje de las anomalías morfológicas en la cabeza de los espermatozoide. Se han publicado algunos reportes en los que se muestra que los factores determinantes de la forma de la cabeza del espermatozoide son tanto genéticos como mecánicos (Cole y *col.*, 1988; Meistrich, 1993; Meistrich y *col.*, 1987; Wyrobek y Bruce, 1975); por lo que,

TESIS
FALLA DE ORIGEN

aunque no se observan diferencias significativas en los valores de DFI, no puede descartarse un tipo de daño en la cromatina a los 60 días, el cual no es detectado por el SCSA.

Otra posibilidad es que el daño espermático ocasionado por la administración de vanadio no se observe a los 60 días puesto a que el organismo hecha a andar mecanismos fisiológicos que le permiten proteger sus tejidos y mantener la homeostasis. En el caso del presente trabajo observamos a los 60 días la formación de tejido fibroso alrededor del testículo y del epidídimo, lo cual apoya esta idea .

Queda por determinarse durante el proceso de la espermatogénesis que tipo celular es afectado inicialmente y los proceso fisiológicos y bioquímicos involucrados en la generación del daño. Sin embargo, se esperaría que los espermatozoides presentes en la cabeza del epidídimo, los cuales no han completado aún el proceso de estabilización de la cromatina, presentaran un patrón de desnaturalización semejante al de los espermatozoides recuperados del conducto deferente en los animales tratados durante 10 días con tetraóxido de vanadio.

Actualmente resulta de interés para la comunidad científica avocada al estudio de la toxicidad reproductiva la relación que sobre el sistema reproductor pueden tener los compuestos químicos presentes en el ambiente (Kavlock y col., 1996). Algunos compuestos químicos han mostrado ser capaces de alterar la comunicación química a semejanza de los mensajeros endocrinos y ocasionan así alteraciones en el sistema endocrino. "Un perturbador endocrino es un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o la eliminación de las hormonas naturales del cuerpo, las cuales son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo o comportamiento" (Kavlok y col., 1996) y "ocasiona efectos adversos a nivel de organismo, su progenie, poblaciones o subpoblaciones" (EDSTAC, 1997).

Las anomalías en la expresión del genoma, la interferencia con la acción de los genes, así como la aceleración en la tasa e división celular pueden inducirse en los órganos del sistema reproductor masculino por compuestos químicos que tienen actividad endocrina. Debido a que el sistema endocrino-reproductor masculino involucra a componentes del hipotálamo, hipófisis y del testículo, esta presente la oportunidad de

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

perturbación en diferentes niveles y con diferentes tipos de acción endocrina. Revisten particular interés los productos químicos con la capacidad para afectar directamente la producción de testosterona o alterar el control en la secreción de gonadotropinas (EPA, 1997).

En el presente estudio, nosotros observamos que la administración i.p. de tetraóxido de vanadio durante 10 días aumenta las concentraciones circulantes de testosterona, aunque en el tratamiento durante 60 días no se observaron diferencias. La testosterona se sintetiza en las células de Leydig a partir del colesterol. La ruta de biosíntesis de testosterona inicia en la matriz de la membrana mitocondrial interna y concluye en los microsomas. A la mitocondria ingresa el colesterol y es liberada la pregnenolona o la progesterona hacia los microsomas (Stocco, 1998).

La testosterona es una hormona esencial para el mantenimiento de la espermatogénesis (Stocco, 1998; Zirkin, 1998). Existe al menos un reporte en el que se menciona que las concentraciones de testosterona secretadas por las CL en cultivo y estimuladas con LH no se ven modificadas por la exposición a pentóxido de vanadio, lo que indica que las CL no son blanco del vanadio (Li y col., 1995). Sin embargo, nosotros observamos modificaciones en las concentraciones de testosterona a los 10 días, aunque no hay una relación evidente entre las concentraciones de vanadio y aquellas de testosterona. La revisión bibliográfica no muestra estudios que relacionen los efectos del vanadio con las hormonas involucradas en la producción de testosterona.

La biosíntesis de testosterona en las células de Leydig es regulada por la hormona luteinizante, la cual se sintetiza y secreta en la hipófisis anterior. La testosterona y la progesterona regulan a su vez la secreción de la hormona luteinizante mediante la interacción con sus receptores en el hipotálamo, lo que aumenta o disminuye la concentración de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por ende de LH (Turner y col., 2001).

Con base en lo anterior se exploró la posibilidad de que las concentraciones de progesterona se encontraran modificadas, y esto nos ayudaría a explicar las modificaciones observadas en las concentraciones de testosterona. Sin embargo, en los diferentes tiempos de tratamiento se observa un ligero aumento en la cantidad medida de

TESIS C-10
FALLA DE ORIGEN

progesterona que no es significativa y que por el sistema establecido de retroalimentación negativa entre LH, testosterona y progesterona no nos permite explicar por esta vía los efectos del tetraóxido de vanadio en las concentraciones de hormonas esteroides testiculares.

Una posibilidad que nos ayudaría explicar el aumento en las concentraciones de testosterona a los 10 días, es el hecho de que pequeñas cantidades de andrógenos se producen en la zona glomerular de las glándulas adrenales de manera natural, y precisamente se observó un aumento en el peso de estas glándulas, el cual coincide con las dosis en que se modifican las concentraciones de testosterona; por lo que una hipertrofia de la zona glomerular nos permitiría inferir un aumento en la producción de andrógenos susceptibles de ser transformados en testosterona.

Diferentes estudios describen a la testosterona como factor necesario para la sobrevivencia de las células germinales en epitelio seminífero de modelos animales con supresión hormonal (El Shennawy y col., 1998; Tapanainen y col., 1993). En el caso de los grupos de animales tratados con 9.4 y 18.8 mg/kg de tetraóxido de vanadio durante 10 días se observó un aumento en las concentraciones de testosterona, y no se encontró diferencia en el porcentaje de túbulos positivos a TUNEL y en el número células positivas a TUNEL con respecto al control, mientras que en la dosis más alta aumenta el número de células positivas a TUNEL en las etapas I-III y IX-XII y no se modifica la concentración de testosterona.

Recientemente Zhou y col., 2002, describieron la expresión inmunohistoquímica etapa-específica del receptor de andrógenos en las células de Sertoli, e indican que la mayor expresión se presenta en las etapas VI-VII y la menor intensidad en las etapas I-III y VIII-XII. Lo anterior nos indica que un aumento en la concentración de testosterona podría inhibir la muerte celular provocada por la administración de vanadio en las etapas intermedias del ciclo del epitelio seminífero, mientras que en las etapas con una menor expresión del receptor de andrógenos que también son aquellas en las que se presenta de forma más frecuente la muerte celular por apoptosis aumenta el número de células germinales positivas a TUNEL por la administración de 37.5 mg/kg de tetraóxido de vanadio.

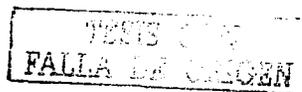
TESIS CON
FALLA EN EL JENGEN

Si consideramos que la espermatogénesis es un fenómeno cíclico de proliferación, meiosis y diferenciación celular podemos apreciar que la importancia del estudio del ciclo del epitelio seminífero radica en la serie de eventos bioquímicos que conducen precisamente a los eventos de proliferación, de meiosis y de diferenciación. La muerte celular espontánea de las células germinales ocurre principalmente durante los eventos de mitosis y de meiosis en las etapas I y XII respectivamente (Sharpe, 1994). En el presente trabajo las etapas XII-I fueron aquellas en que las que con mayor frecuencia se presentaron células germinales positivas a TUNEL y también en las que se observaron incrementos significativos en el número de células positivas a TUNEL espontáneas e inducidas por la administración del tetraóxido de vanadio. Nuestros resultados son consistentes con lo mencionado por Sharpe, 1994 y con los resultados de apoptosis en células germinales de ratones y ratas control (Billig *y col.*, 1995; Homma-Takeda *y col.*, 2001; Nakagawa *y col.*, 1997).

Resulta notable el hecho de que en los tratamientos con tetraóxido de vanadio durante diferentes tiempos se presente un aumento en el número de células germinales en apoptosis en las mismas etapas del ciclo del epitelio seminífero. Esta situación sugiere que los mecanismos naturales por los cuales se decide la depleción de una célula germinal en el testículo se ven alterados de tal forma que exclusivamente las etapas de desarrollo en que inciden son aquellas que se ven afectadas.

La muerte espontánea de las células espermáticas parece ser un rasgo constante de las células germinales en el proceso espermatogénico normal para una variedad de especies de mamífero (Allan *y col.*, 1987; Brinkworth *y col.*, 1995; Oakberg, 1956; Russell *y col.*, 1990). Las células que degeneran de forma natural en el epitelio seminífero se han identificado como espermátogonias y espermatoцитos (Brinkworth *y col.*, 1995; Kerr, 1992).

La apoptosis de las espermátogonias, espermatoцитos y espermátidas redondas ocurre de forma espontánea durante la espermatogénesis normal y es el mecanismo primario por el que ocurre la muerte de las células germinales durante la supresión hormonal (Sinha Hikim *y Swerdloff*, 1999). La evidencia primaria en roedores sustenta el papel de la FSH y la testosterona en la inhibición de la apoptosis y en el mantenimiento de la de la viabilidad celular durante el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis.



Se ha observado la muerte celular por apoptosis de los espermatocitos y de las espermátidas redondas de ratas cuando son tratadas con antagonistas de GnRH (Sinha Hikim *y col.*, 1995) o hipofisectomía en la que la FSH (Russell *y col.*, 1993) la testosterona o ambas parcialmente inhiben su degeneración (Tapanainen *y col.*, 1993). Los datos en roedores sugieren que la FSH y la testosterona actúan en rutas similares para evitar la apoptosis y promover la viabilidad de las células germinales (El Shennawy *y col.*, 1998; Russell *y col.*, 1998). Los estudios *in vitro* de las células testiculares humanas también demuestran la capacidad de la FSH, andrógenos y estrógenos para evitar la apoptosis de las células germinales (Erkkila *y col.*, 1997; Pentikainen *y col.*, 2000; Tesarik *y col.*, 2000).

Actualmente se sabe que casi todas las células espermáticas degenerantes en animales intactos mueren por apoptosis (Brinkworth *y col.*, 1995; Sinha Hikim *y col.*, 1997) y que el bloqueo de diferentes estímulos hormonales, como los provenientes de las gonadotropinas (Billig *y col.*, 1995; Russell *y col.*, 1993; Shetty *y col.*, 1996), la hormona liberadora de gonadotropinas (Sinha Hikim *y col.*, 1995) y la testosterona (Henriksen *y col.*, 1995) pueden inducir este tipo de muerte celular.

Es posible que la muerte por apoptosis de las células germinales debida a la administración del tetraóxido de vanadio no guarde relación con las concentraciones de testosterona, puesto que con excepción de la dosis de 9.4 mg/kg en el tratamiento de 10 días, no se presentan modificaciones en el resto de las dosis ensayadas. Más aún, aquellas etapas del ciclo del epitelio seminífero en que se presenta una mayor expresión del receptor de andrógenos (RA) son las mismas en que se observa un menor número de células germinales en apoptosis, como se ilustra en el modelo de la figura 3.

Al momento se desconoce el significado biológico de la muerte constante de las células germinales en la gónada masculina; así como los mecanismos moleculares que lo regulan. Aunque posiblemente el significado de este fenómeno se encuentre relacionado con la remoción de una sobreproducción celular para ajustar la población de células germinales a la cantidad que puede ser sostenida por las células de Sertoli como ya lo han propuesto algunos autores (De Kretser y Kerr, 1994; Koji, 2001), o bien con la eliminación de las células con daño genético natural o inducido (Koji, 2001).

POSIS COM
FALLA DE CIRCULO

El hecho de que después de 60 días de tratamiento con tetraóxido de vanadio encontremos células germinales en apoptosis nos indica que las espermatogonias conservan su capacidad proliferativa. En relación a esto Koji, (2001) sugiere que la inducción del proceso de muerte en las células germinales puede atribuirse a la activación de una cascada molecular específica que se halla estrictamente regulada para evitar la transmisión de anomalías a la descendencia.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

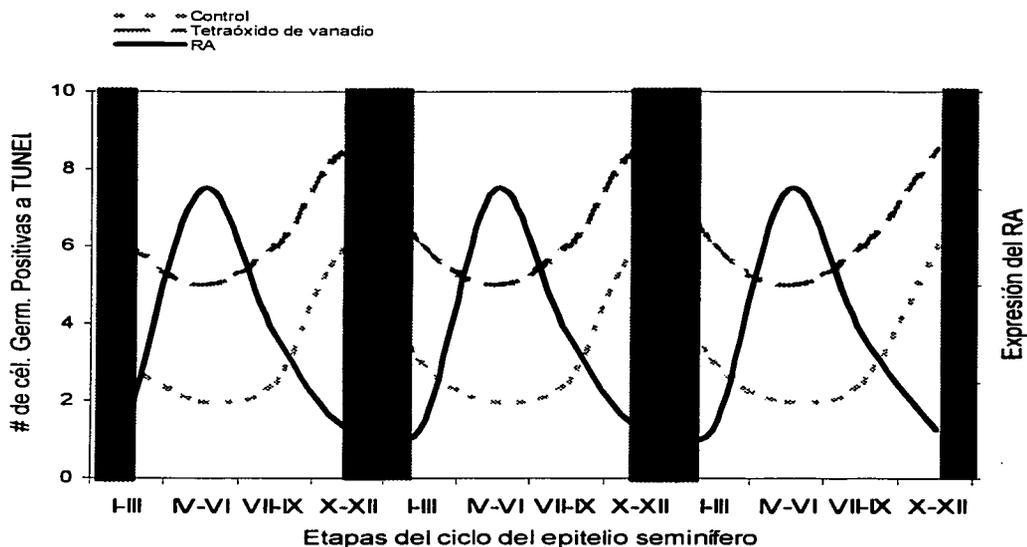
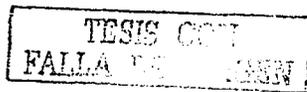


Figura 3. Modelo en el que se describe gráficamente la naturaleza cíclica de los eventos de muerte celular por apoptosis en las diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero y la relación de este fenómeno con la expresión de los receptores de andrógenos a lo largo del proceso espermatogénico. El mayor número de eventos apoptóticos en las células germinales ocurre en las etapas XII-I (área sombreada), situación coincidente con la más baja expresión del receptor de andrógenos en las células de Sertoli (línea sólida).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Conclusiones

1. El tetraóxido de vanadio es un una substancia espermatotóxica, ya que en el modelo de ratón su administración por vía intraperitoneal durante 10 ó 60 días induce una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles en las dosis de 37.5 y 18.8 mg/kg respectivamente.
2. En el modelo de ratón la administración intraperitoneal de tetraóxido de vanadio durante 10 días induce un aumento en la desnaturalización de la cromatina espermática en todas las dosis ensayadas, mientras que el tratamiento durante 60 días el aumento se presenta en las dosis de 4.7 y 18.8 mg/kg, por lo que este compuesto puede considerarse como un genotóxico.
3. En el modelo de ratón la administración intraperitoneal de tetraóxido de vanadio durante 10 días induce un aumento significativo en la concentración de testosterona en la dosis de 9.4 mg/kg, por lo que puede considerarse como un candidato a perturbador endocrino.
4. El tetraóxido de vanadio es un tóxico testicular, ya que en los ratones tratados intraperitonealmente induce un aumento del número de células germinales positivas a TUNEL en las mismas etapas en que este tipo de muerte celular se presenta en condiciones fisiológicas:
 - a. En los animales tratados durante 10 días aumenta significativamente el número de células positivas a TUNEL en las etapas I-III y X-XII en la dosis de 37.5 mg/kg.
 - b. En los animales tratados durante 10 días aumenta significativamente el número de células positivas a TUNEL en las etapas I-III en la dosis de 18.8 mg/kg y en las etapas X-XII en las dosis de 4.7 y 18.8 mg/kg.



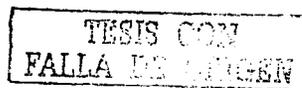
Perspectivas

1. El hecho de que la administración de vanadio pueda modificar las concentraciones circulantes de una hormona, le asigna un lugar como perturbador endocrino; y en virtud de los usos que este metal y sus compuestos tienen en la actualidad, y de las emisiones que de él se hacen al ambiente, se abre un amplio campo de estudio en el que se pueden contemplar efectos no considerados previamente.
2. Las gonadotropinas (LH y FSH) funcionan como reguladoras de la función testicular, a la vez su síntesis y secreción es modulada por la GnRH. En el presente estudio no se cuantificaron sus concentraciones, por lo que queda por investigar su papel en el proceso de inducción de la apoptosis en las células germinales por la administración de vanadio.
3. Se ha mostrado que el vanadio puede inducir daño en la gónada masculina aunque se desconoce el tipo celular afectado inicialmente, así como los eventos celulares y moleculares involucrados en este fenómeno, la dilucidación de estos eventos permitirá avanzar en la comprensión básica del fenómeno de apoptosis en las células germinales.
4. La utilización de ensayo de la estructura de la cromatina espermática como marcador de daño en el espermatozoide nos permitió ampliar el espectro de efectos tóxicos que pueden ser inducidos por el vanadio. Aunque se desconoce la etiología del origen del daño en la cromatina, las implicaciones que este tipo de daño tiene sobre la fertilidad hacen necesario profundizar en el conocimiento sobre su origen en relación a la exposición de un organismo a agentes tóxicos.
5. Si efectivamente la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína de las protaminas durante la estabilización de la cromatina no tienen relación con la sensibilidad a la desnaturalización se esperaríamos que los espermatozoides recuperados de cualquier región del epidídimo y del conducto deferente tuvieran un patrón de desnaturalización semejante, esta incógnita aún queda por despejarse.

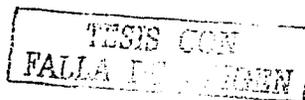
TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

Bibliografía

- Aitken, R. J., E. Gordon, D. Harkiss, J. P. Twigg, P. Milne, Z. Jennings y D. S. Irvine: Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998, **59**, 1037-46.
- Aitken, R. J., D. Harkiss y D. W. Buckingham: Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1993, **35**, 302-15.
- Aitken, R. J. y C. Krausz: Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001, **122**, 497-506.
- Al-Bayati, M. A., O. G. Raabe, S. N. Giri y J. B. Knaak: Distribution of vanadate in the rat following subcutaneous and oral routes of administration. *J Am Coll Toxicol.* 1991, **10**, 233-241.
- Allan, D. J., B. V. Harmon y J. F. R. Kerr: Cell death in spermatogenesis. In: *Perspectives on mammalian cell death*. Ed.: C. S. Potten. Oxford Science Publications, Oxford, 1987, pp. 229-258.
- Altamirano-Lozano, M. A., L. Álvarez-Barrera, M. Basurto-Alcántara, M. Valverde y E. Rojas: Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratog Carcinog Mutag.* 1996, **16**, 7-17.
- Amman, P. R.: Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ health Perspect.* 1986, **70**, 148-158.
- Amory, J. K. y W. Bremner: Endocrine regulation of testicular function in men: implications for contraceptive development. *Mol Cell Endocrinol.* 2001, **182**, 175-179.
- Aragón, M. A. y M. Altamirano-Lozano: Sperm an testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reprod Toxicol.* 2001, **15**, 145-151.
- Ashkenazi, a. y V. M. Dixit: Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998, **281**, 1305-1308.
- Aslam, H., G. Rosiepen, H. Krishnamurthy, M. Arslam, G. Clemen, E. Niechslag y G. F. Weinbauer: The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *J Endocrinol.* 1999, **161**, 281-288.
- Awoniyi, C. A., R. L. Sprando, R. Santulli, V. Chandrashekar, L. L. Ewing y B. R. Zirkin: Restoration of spermatogenesis by exogenously administered testosterone in rats



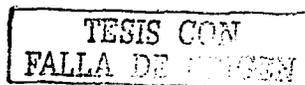
- made azoospermic by hypophysectomy or withdrawal of luteinizing hormone alone. *Endocrinology*. 1990, **127**, 177-84.
- Balhorn, R., S. Weston, C. Thomas y A. J. Wyrobek: DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp Cell Res*. 1984, **150**, 298-308.
- Balhorn, R. A.: A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982, **93**, 298-305.
- Baran, J. E.: Vanadium detoxification. In: *Vanadium in the environment*. Ed.: J. O. Nriagu. John Wiley and Sons, 1998, pp. 317-345.
- Bedford, J. M.: Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. In: *Handbook of physiology*. Eds.: D. W. Hamilton and R. O. Group. American Physiology Society, Bethesda, 1975, pp. 303-317.
- Bedford, J. M. y H. I. Calvin: Changes in the S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observation in submammalian species. *J Exp Zool*. 1974, **187**, 181-204.
- Billig, H., Y. Furuta, C. Rivier, J. Tapanheim, M. Parvinen y A. J. W. Hsueh: Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*. 1995, **136**, 5-12.
- Boekelheide, K., S. L. Fleming, K. J. Johnson, S. R. Patel y H. A. Schoenfeld: Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000, **225**, 105-15.
- Bremner, W. J., M. R. Millar, R. M. Sharpe y P. T. Saunders: Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology*. 1994, **135**, 1227-34.
- Brinkworth, M. H., G. F. Weinbahuer, S. Schlatt y E. Nieschlag: Identification of male germ cell undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil*. 1995, **105**, 25-33.
- Bruech, M., M. E. Quintanilla, W. Legrum, J. Koch, K. J. Netter y G. F. Fuhrmann: Effects of vanadate on intracellular reduction equivalents in mouse liver and the fate of vanadium in plasma, erythrocytes and liver. *Toxicology*. 1984, **31**, 283-295.
- Byczkowski, J. Z. y L. Zychlinsky: Interaction of vanadium with electron-transport chain in rat liver mitochondria in vitro. *16th Meeting of the Polish Biochemical Society*. Lodz, polonia, 1978, pp. 78. SH.4.



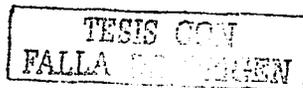
- Calvin, H. I. y J. M. Bedford: Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil (Supl)*. 1971, **13**, 65-75.
- Cameron, D. F. y K. E. Muffly: Hormonal regulation of spermatid binding. *J Cell Sci*. 1991, **100**, 623-33.
- Caron, N., S. Veilleux y G. Boissonneault: Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev*. 2001, **58**, 437-443.
- Carson, L. B., V. H. Ellis y L. J. McCann: Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis Publishers, INC, New York, 1987, pp. 276-282.
- Chandolia, R. K., G. F. Weinbauer, U. Fingscheidt, J. M. Bartlett y E. Nieshlag: Effects of flutamide on testicular involution induced by antagonist of gonadotrophin-releasing hormone and stimulation of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone in rats. *J Reprod Fertil*. 1991, **93**, 313-323.
- Chasteen, N. D.: The Biochemistry of vanadium. *Struct Bonding*. 1983, **53**, 105-138.
- Chasteen, N. D., E. M. Lord y H. J. Thompson: Vanadium metabolism. Vanadyl (IV) electron paramagnetic resonance spectroscopy of selected tissues in the rat. In: *Frontiers in bioinorganic chemistry*. Ed.: A. V. Xavier. Verlag Chemie, Weinheim, 1986, pp. 133-141.
- Clermont, Y. y S. C. Harvey: Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology*. 1965, **76**.
- Cobb, J., R. K. Reddy, C. Park y M. A. Handel: Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. *Mol Reprod Dev*. 1997, **46**, 489-98.
- Cole, A., M. Meistrich, L. Cherry y P. K. Trostle-Weige: Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biol Reprod*. 1988, **38**, 385-401.
- Cooper, T.: In defense of the human epididymis. *Fertil Steril*. 1990, **54**, 965-975.
- Cornwell, G. A., D. Vindivich, S. Tillman y T. S. K. Chang: The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa induced to acquire motility. *In Vitro Biol Reprod*. 1988, **39**, 141-155.
- Crow, J. F.: The high spontaneous mutation rate: is it a health risk? *Proc Nat Acad Sci USA*. 1997, **94**, 8380-8386.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

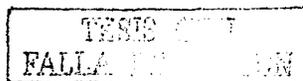
- D´Cruz, O. D., P. Ghosh y F. M. Uckum: Spermicidal activity of metallocene complexes containing vanadium (IV) in humans. *Biol Reprod.* 1998, **58**, 1515-1526.
- Dai, S., K. H. Thompson y H. McNeill: One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol.* 1994, **74**, 101-109.
- Darzynkiewicz, Z.: Acid-induced denaturation of DNA *in situ* as a probe of chromatin structure. In: *Meth Cell Biol.* Eds.: Z. Darzynkiewicz and H. Crissman. Academic Press, New York, 1990, pp. 337-352.
- Darzynkiewicz, Z., G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami y F. Traganos: Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry.* 1997, **27**, 1-20.
- De Kretser, D. M. y J. B. Kerr: The cytology of the testis. In: *The Physiology of Reproduction.* Eds.: E. Knobil and J. D. Neil. Raven Press, LTD, New York, 1994, pp. 1177-1290.
- De Lamirande, E. y C. Gagnon: Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl.* 1992, **13**, 368-378.
- de Yebra, L., J. L. Ballezá, J. A. Vanrell, M. Corzett, R. Balhorn y R. Oliva: Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2 levels. *Fertil Steril.* 1998, **69**, 755-759.
- Desjerdine, C. y L. L. Ewing: Cell and molecular biology of the testis. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- Domingo, J. L., J. L. Paternain, J. M. Llobet y J. Corbella: Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturition and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.* 1986, 819-824.
- Eddy, E. M. y D. A. O´brien: The spermatozoon. In: *Physiology of Reproduction.* Eds.: E. Knobil and J. D. Neil. Raven Press, Ltd, New York, 1994, pp. 30-77.
- El Shennawy, A., R. J. Gates y L. D. Russell: Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: cell viability after hormonal replacement in adults after intermediate periods of hypophysectomy. *J Androl.* 1998, **19**, 320-34; discussion 341-2.
- Elinder, G., L. Gerhardson y G. Oberdoerster: Biological monitoring of toxic metals-overview. In: *Biological Monitoring of Toxic Metals.* Eds.: W. T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg and R. Sanger. Plenum Press, New York, 1988, pp. 1-72.
- EPA: Guidelines for reproductive toxicity assessment. 1997.



- Erdmann, E., W. Krawietz, F. Vyskocil, H. Dlohua y J. Teisinger: Importance of cardiac cell membranes in vanadate-induced NADH oxidation. *Nature*. 1981, **294**, 288.
- Erkkila, K., K. Henriksen, V. Hirvonen, S. Rannikko, J. Salo, M. Parvinen y L. Dunkel: Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, **82**, 2314-21.
- Etcheverry, B. S. y M. A. Cortizo: Vanadium and metabolic problems. In: *Vanadium in the environment*. Ed.: J. O. Nriagu. John Wiley and Sons, Inc, 1998, pp. 359-395.
- Evenson, D. y L. Jost: Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*. 2000, **22**, 169-89.
- Evenson, D. P.: Male germ cell analysis by flow cytometry: effects of cancer, chemotherapy, and other factors on testicular function and sperm chromatin structure. *Ann N Y Acad Sci*. 1986, **468**, 350-67.
- Evenson, D. P.: Flow cytometry analysis of male germ cell quality. In: *Meth Cell Biol*. Eds.: Z. Darzynkiewicz and H. Crissman. Academic Press, New York, 1990, pp. 401-410.
- Evenson, D. P., R. K. Baer y L. K. Jost: Flow cytometric analysis of rodent epididymal spermatozoal chromatin condensation and loss of free sulphhydryl group. *Mol Reprod Dev*. 1989, **1**, 283-288.
- Evenson, D. P., Z. Darzynkiewicz y M. R. Melamed: Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980, **210**, 1131-3.
- Evenson, D. P. y L. K. Jost: Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure. *Cell Prolif*. 1993, **26**, 147-59.
- Evenson, D. P., L. K. Jost y R. K. Baer: Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *Environ Mol Mutagen*. 1993, **21**, 144-53.
- Evenson, D. P., L. K. Jost, D. Marshall, M. J. Zinaman, E. Clegg, K. Purvis, P. de Angelis y O. P. Claussen: Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999, **14**, 1039-49.
- Evenson, D. P., K. L. Larson y L. K. Jost: Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*. 2002, **23**, 25-43.
- Fawcett, J. P., S. J. Farquhar, T. Thou y B. I. Shand: Oral vanadium sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol*. 1997, **80**, 202-206.



- French, R. J. y J. H. Jones: Role of vanadium in nutrition: metabolism essentiality and dietary considerations. *Life Sci.* 1993, **52**, 339-346.
- Friberg, L. y G. F. Nordberg: Introduction. In: *Handbook on the Toxicology of Metals*. Eds.: L. Friberg, G. F. Nordberg and V. Vouk. Elsevier Science Publishers B.V, 1986, pp. 1-13.
- Golan, R., M. Vigodner, Y. Oshry, L. Shochat y L. M. Lewin: Chromatin condensation during spermiogenesis in the golden hamster (*Mesocricetus aureus*): a flow cytometric study. *Mol Reprod Dev.* 2000, **56**, 105-112.
- Grimes, S. R.: Nuclear proteins in the spermatogenesis. *Comp Biochem Physiol.* 1986, **83B**, 495-500.
- Griswold, M. D.: Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod.* 1995, **52**, 211-216.
- Hantson, P. h., L. Saint-Georges, P. Mahieu, E. D. Leonard, M. C. Crutzen-Fayt y A. Leonard: Evaluation of the ability of paracetamol to produce chromosome aberration in man. *Mutat Res.* 1996, **368**, 293-300.
- Hecht, N. B.: Molecular biology of structural chromosomal proteins of the mammalian testis. In: *Molecular biology of chromosome function*. Ed.: K. W. Adolph. Springer, Berlín, 1989, pp. 367-395.
- Heller, C. G. y Y. Clermont: Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res.* 1964, **20**, 184-186.
- Henriksen, K., H. Hakovirta y M. Parvinen: Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: In situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology.* 1995, **136**, 3285-3291.
- Hill, C. H.: Interaction of vanadate and chloride in chicks. *Biol Trace Element Res.* 1990, **23**, 1-10.
- Hindshaw, D. B., L. A. Sklar y B. Bohl: Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J pathol.* 1986, **123**, 454-464.
- Homma-Takeda, S., Y. Kugenuma, T. Iwamuro, Y. Kumagai y N. Shimojo: Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell- specific germ cell apoptosis. *Toxicology.* 2001, **169**, 25-35.
- Hope, B. K.: A biogeochemical budget for vanadium. *Sci Total Environ.* 1994, **141**, 1-10.
- Host, E., S. Lindenberg y S. Smidt-Jensen: The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Gyn Scan.* 2000, **79**, 559-563.



TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Huang, H. F., L. M. Pogach, E. Nathan, W. Giglio y J. J. Seebode: Synergistic effects of follicle-stimulating hormone and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen-binding protein status. *Endocrinology*. 1991, **128**, 3152-61.

Irvine, D. S., J. P. Twigg, E. L. Gordon, N. Fulton, P. A. Milne y R. J. Aitken: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*. 2000, **21**, 33-44.

Jacksson, J. K., W. Min, T. F. Cruz, S. Cindric, L. Arsenult, D. D. Von-Hoff, D. Degan, W. L. Hunter y H. M. Burt: A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(matolato) oxovanadium in mice. *Br J Cancer*. 1997, **75**, 1014-1020.

Johnston, D. S., L. D. Russell, P. J. Friel y M. D. Griswold: Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation. *Endocrinology*. 2001, **142**, 2405-8.

Jounes, M. y O. Strobelt: Vanadate-induced toxicity towards isolated perfused rat livers: the role of lipid peroxidation. *Toxicology*. 1991, **61**.

Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L. E. J. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks y H. A. Tilson: Research needs for the assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 1996, **104(Suppl 4)**, 715-740.

Keller, R. J., R. P. Sharma, T. A. Grover y L. H. Piette: Vanadium and lipid peroxidation: evidence for involvement of vanadyl and hydroxyl radical. *Arch Biochem Biophys*. 1988, **265**, 524-533.

Kerr, J. B.: Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil*. 1992, **95**, 825-830.

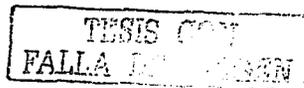
Kerr, J. B., S. Maddocks y R. M. Sharpe: Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res*. 1992, **268**.

Kierszenbaum, A. L.: Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev*. 2001, **58**, 357-8.

Kistler, W. S., K. Henriksen, P. Mali y M. Parvinen: Sequential expression of nucleoproteins during rat spermiogenesis. *Exp cell Res*. 1996, **225**, 374-381.

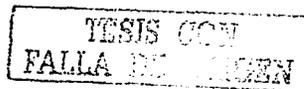
Koji, T.: Male germ cell death in mouse testes: possible involvement of Fas and Fas ligand. *Med Electron Microsc*. 2001, **34**, 213-22.

- Krzanowska, H., J. Styrna y B. Wabik-Sliz: Analysis of sperm quality in recombinant mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space. *J Reprod Fertil.* 1995, **104**, 347-354.
- Kwenang, A., M. J. Kroos, J. F. Koster y H. G. Van Eijk: Iron, ferritin and copper in seminal plasma. *Hum Reprod.* 1987, **2**, 387-388.
- Lee, J., R. J.H., S. C. Younkin y K. Boekelheide: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology.* 1997, **138**, 2081-2088.
- Léonard, A. y G. B. Gerber: Mutagenicity carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat Res.* 1994, **317**, 81-88.
- Lewin, L. M., R. Golan, P. Freidlin y L. Shochat: A comparative study of spermatozoal chromatin using acridine orange staining and flow cytometry. *Comp Biochem Physiol Part A.* 1999, **124**, 133-137.
- Li, H., Z. Yang y T. Zhang: Toxicity of vanadium to Leydig cell in vitro. *Hua His I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao.* 1995, **26**, 433-435.
- Linder, R. E., R. F. Strader, V. L. Slott y J. D. Suarez: Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol.* 1992, **6**, 491-505.
- Liochev, S. I. y I. Fridovich: Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in the presence of biological membranes and other sources of O₂. *Arch Biochem Biophys.* 1990, **279**, 1-7.
- Llobet, J. M., M. T. Colomina, J. J. Siruent, J. L. Domingo y J. Corbella: Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Toxicology.* 1993, **80**, 199-206.
- Love, C. C. y R. M. Kenney: Scrotal heath stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decreased in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod.* 1999, **60**, 615-620.
- Mammoto, A., N. Masumoto, M. Tahara, Y. Ikebuchi, M. Ohmichi, K. Tasaka y A. Miyake: Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of the sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod.* 1996, **55**, 1063-1068.
- Marshall, G. R., D. S. Zorub y T. M. Plant: Follicle-stimulating hormone amplifies the population of differentiated spermatogonia in the hypophysectomized testosterone-replaced adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology.* 1995, **136**, 3504-11.

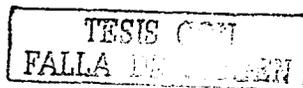


- McLachlan, R. I., N. G. Wreford, D. M. de Kretser y D. M. Robertson: The effects of recombinant follicle-stimulating hormone on the restoration of spermatogenesis in the gonadotropin-releasing hormone- immunized adult rat. *Endocrinology*. 1995, **136**, 4035-43.
- McLachlan, R. I., N. G. Wreford, L. O'Donnell, D. M. de Kretser y D. M. Robertson: The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol*. 1996, **148**, 1-9.
- McLachlan, R. J., L. O'Donell, S. J. Meachem, P. G. Stanton, D. M. de Kretser, K. Pratis y D. M. Robertson: Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. *J Androl*. 2002, **23**, 149-162.
- McPerson, S. M. y F. J. Longo: Nicking of rat spermatids and spermatozoa: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol*. 1993, **158**, 122-130.
- Meachem, S. J., N. G. Wreford, P. G. Stanton, D. M. Robertson y R. I. McLachlan: Follicle-stimulating hormone is required for the initial phase of spermatogenic restoration in adult rats following gonadotropin suppression. *J Androl*. 1998, **19**, 725-35.
- Meistrich, M. L.: Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. In: *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Ed.: D. De Kretser. Academic press, New York, 1993, pp. 67-97.
- Meistrich, M. L., A. Cole, M. L. Cherry y P. K. Trostle-Weige: Nuclear and manchette development during spermiogenesis of normal and *azh* mutant mice. In: *Cell Biology of Testis and Epididymis*. Eds.: M. C. Orgebin and B. J. Danzo. Ann New York Acad Sci, New York, 1987, pp. 304-307.
- Morse-Gaudio, M. y M. S. Risley: Topoisomerase II expression and VM-26 induction of DNA breaks during spermatogenesis in *Xenopus laevis*. *J Cell Sci*. 1994, **107**, 2887-2898.
- Muffly, K. E., S. J. Nazian y D. F. Cameron: Junction-related Sertoli cell cytoskeleton in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biol Reprod*. 1993, **49**, 1122-32.
- Muffly, K. E., S. J. Nazian y D. F. Cameron: Effects of follicle-stimulating hormone on the junction-related Sertoli cell cytoskeleton and daily sperm production in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biol Reprod*. 1994, **51**, 158-66.
- Muratori, M., P. Piomboni, E. Baldi, E. Filimberti, P. Pechioli, E. Moretti, L. Gambera, B. Baccetti, R. Biagiotti, G. Forti y M. Maggi: Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000, **21**, 903-912.

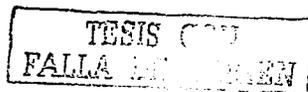
- Nagata, S.: Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997, **88**, 355-365.
- Nagata, S.: Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*. 2000, **256**, 12-18.
- Nakagawa, S., N. Nakamura, M. Fujioka y C. Mori: Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomicin C in the mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997, **147**, 204-213.
- Nechay, R. B., L. B. Nanninga y P. S. E. Nechay: Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxil, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch Biochem Biophys*. 1986, **251**, 128-138.
- Nielsen, F. H.: Vanadium in mammalian physiology and nutrition. En: Sigel H y Sigel A (Eds.). *Metal ions in Biological systems*. In: *Metal ions in Biological systems*. Eds.: H. Sigel and A. Sigel. Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 543-573.
- Nriagu, J. O.: History, occurrence and uses of vanadium. In: *Vanadium in the Environment*. Ed.: J. O. Nriagu. John Wiley and Sons, Inc, 1998, pp. 1-24.
- O'Donnell, L., K. M. Robertson, M. E. Jones y E. R. Simpson: Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Rev*. 2001, **22**, 289-318.
- Oakberg, E. F.: A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat*. 1956, **99**, 391-413.
- O'Donnell, L., R. I. McLachlan, N. G. Wreford, D. M. de Kretser y D. M. Robertson: Testosterone withdrawal promotes stage-specific detachment of round spermatids from the rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod*. 1996, **55**, 895-901.
- O'Donnell, L., R. I. McLachlan, N. G. Wreford y D. M. Robertson: Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. *Endocrinology*. 1994, **135**, 2608-14.
- O'Donnell, L., A. Narula, G. Balourdos, Y. Q. Gu, N. G. Wreford, D. M. Robertson, W. J. Bremner y R. I. McLachlan: Impairment of spermatogonial development and spermiation after testosterone-induced gonadotropin suppression in adult monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Clin Endocrinol Metab*. 2001, **86**, 1814-22.
- Oko, R. J., V. Jando, C. L. Wagner, W. S. Kistler y L. S. Hermo: Chromatin reorganization in rat spermatids during the disappearance of testis-specific histone h1t, and the appearance of transition proteins tp1 and tp2. *Biol Reprod*. 1996, **54**, 1141-1157.
- Orth, J. M.: Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. In: *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Eds.: C. Desjardins and L. L. Ewing. Oxford Unversity Press, New york, 1993, pp. 3-43.



- Ozawa, T. y A. Hanaki: ESR evidence for the formation of hydroxy radicals during the reaction of vandyl ions with hydrogen peroxide. 1989, **37**, 1407-1409.
- Pellicciari, C., Y. Hosokawa, M. Fukuda y M. G. M. Romanini: Cytofluorometric study of nuclear sulfhydryl and disulfide groups during sperm maturation in the mouse. *J Reprod Fertil*. 1983, **68**, 371-376.
- Pentikainen, V., K. Erkkila, L. Suomalainen, M. Parvinen y L. Dunkel: Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, **85**, 2057-67.
- Perry, A. C., R. Jones y L. Hall: Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. *Biochem J*. 1993, **293**, 21-5.
- Potts, R. J., C. J. Newbury, G. Smith, L. J. Notarianni y T. M. Jefferies: Sperm chromatin changes associated with male smoking. *Mutat Res*. 1999, **423**, 103-111.
- Powell, L. W. y J. W. Halliday: Iron absorption and iron overload. *Clin Gastroenterol*. 1981, **10**, 707-735.
- Ramírez, P., D. A. Eastmond, J. P. Laclete y P. Ostrosky-Wegman: Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*. 1997, **386**, 291-298.
- Redher, D.: Inorganic considerations on the function of vanadium in biological systems. In: *Metal ions in Biological Systems*. Eds.: H. Sigel and A. Sigel. Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 1-43.
- Richsburg, J. H. y K. Boekelheide: Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996, **137**, 42-50.
- Risley, M. S., S. Einheber y D. A. Bumcrot: Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma*. 1986, **94**, 217-227.
- Robaire, B. y L. Hermo: Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds.: E. Knobil and J. Neil. Raven Press, New York, 1988, pp. 999-1079.
- Roca, J. y C. Mezquita: Topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally anactive, chicken late spermatids. *EMBO J*. 1989, **8**, 1855-1860.
- Russell, L. D.: The perils of sperm release-"let my children go". *Int J Androl*. 1991, **14**, 307-311.

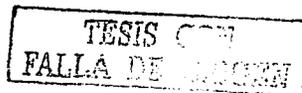


- Russell, L. D. y Y. Clermont: Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec.* 1977, **187**, 347-66.
- Russell, L. D., T. J. Corbin, K. E. Borg, L. R. De Franca, P. Grasso y A. Bartke: Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology.* 1993, **133**, 2062-2070.
- Russell, L. D., R. A. Etlin, A. P. Sinha Hikim y E. D. Clegg: Histological and Histopathological evaluation of the testis. Caché River Press, Florida, 1990, pp. 286.
- Russell, L. D., M. Kershaw, K. E. Borg, A. El Shennawy, S. S. Rulli, R. J. Gates y R. S. Calandra: Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: FSH maintenance of cellular viability during pubertal spermatogenesis. *J Androl.* 1998, **19**, 308-19; discussion 341-2.
- Sabbioni, E., L. Clerici y A. Bazelli: Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J Toxicol Environm Health.* 1983, **12**, 737-748.
- Sabbioni, E., G. Pozzi, S. Devos, A. Pintar, L. Casella y M. Fischbach: The intensity of vanadium(V)-induced cytotoxicity and morphological transformation in BALB/3t3 cells is dependent on glutathione-mediated bioreduction to vanadium(IV). *Carcinogenesis.* 1993, **14**, 2565-2568.
- Saito, K., L. O'Donnell, R. I. McLachlan y D. M. Robertson. Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *endocrinology.* 2000, **141**.
- Sakkas, D., E. Mariethoz, G. Manicardi, D. Bizzaro, P. G. Bianchi y U. Bianchi: Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999a, **4**, 31-7.
- Sakkas, D., E. Mariethoz y J. St. John: Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp. Cell Res.* 1999b, **251**, 350-355.
- Sakkas, D., O. Moffatt, G. C. Manicardi, E. Mariethoz, N. Tarozzi y D. Bizzaro: Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002, **66**, 1061-7.
- Sakurai, H.: Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect. Environ Health Perspect.* 1994, **102 (suplemento 3)**, 35-68.



- Sakurai, H., M. Naka, T. Miki, K. Tsuchiya, J. Takada y R. Matsuchita: DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in a vanadyl ion-hydrogen peroxide system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992, **189**, 1090-1095.
- Sakurai, H., S. Shimomura, K. Fukuzawa y K. Ishizu: Detection of oxovanadium(IV) and characterization of its ligand environment subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). *Biochem. Biophys Res Comm.* 1980, **96**, 293-298.
- Sakurai, H., H. Tamura y K. Okatani: Mechanisms for a new antitumor vanadium complex hydroxyl-radical-dependent DNA cleavage by 1-10-phenanthroline vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, **206**, 133-137.
- Schlicker, M., V. Schnulle, L. Schnepffel, V. I. Vorob'ev y W. Engel: Disturbances of nuclear condensation in human spermatozoa: search for mutations in the genes for protamine 1, protamine 2 and transition protein. *Human reprod.* 1994, **9**, 2313-2317.
- Seed, J., R. E. Chapin, E. D. Clegg, L. A. Dostal, R. H. Foote, M. E. Hurtt, G. R. Klinefelter, S. L. Makris, S. D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K. A. Treinen, D. N. R. Veeramachaneni y L. D. Wise: Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol.* 1996, **10**, 237-244.
- Seligman, J., N. S. Kosower y R. Shalgi: Effects of caput ligation on rats sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. *Biol Reprod.* 1989, **46**, 301-308.
- Seligman, J. y R. Shalgi: Protein thiols in rat sperm and epididymal fluid. *J Reprod Fertil.* 1991, **93**, 399-408.
- Seligman, J., R. Shalgi, Y. Oschry y N. S. Kosower: Sperm analysis by flow cytometry using the fluorescent thiol labeling agent monobromobimane. *Mol Reprod Dev.* 1991, **29**, 276-281.
- Shalgi, R., J. Seligman y N. S. Kosower: Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: Analysis with the fluorescent labelling agent monobromobimane. *Biol Reprod.* 1989, **40**, 1037-1045.
- Sharma, R. P., S. G. Oberg y R. D. Parkeer: Vanadium retention in rat tissues following acute exposures to different dose levels. *J Toxicol Environ Health.* 1980, **6**, 45-54.
- Sharpe, M. R.: Regulation of spermatogenesis. In: *The physiology of reproduction*. Eds.: E. Knobil and J. D. Neil. Raven Press, Ltd, New York, 1994, pp. 1363-1434.

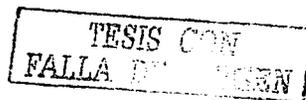
- Shen, H. M. y C. Ong: Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med.* 2000, **28**, 529-536.
- Sheriff, D. S.: Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reprod Toxicol.* 1991, **5**, 513-515.
- Shetty, J., G. K. Marathe y R. R. Dighe: Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology.* 1996, **137**, 2179-2182.
- Shi, X., P. Wang, H. Jiang, Y. Mao, N. Ahmed y N. Dalal: Vanadium (IV) causes 2'-deoxyguanosine hidroxilation and deoxyribonucleic acid damage via free radical reactions. *Ann Clin Lab Sci.* 1996, **26**, 39-49.
- Shin, J. H., C. Mori y K. Shiota: Involvement of germ cell apoptosis in the induction of testicular toxicity following hydroxyurea treatment. *Toxicol App Pharmacol.* 1999, **155**, 1139-149.
- Sinha Hikim, A. P., T. B. Rajavashisth, I. Sinha Hikim, Y. Lue, J. J. Bonavera, A. Leung, C. Wang y R. S. Swerdloff: Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod.* 1997, **57**, 1193-1201.
- Sinha Hikim, A. P. y R. S. Swerdloff: Temporal and stage-specific effects of recombination human-follicle stimulant hormone on the maintenance of the spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. *Endocrinology.* 1995, **136**, 253-261.
- Sinha Hikim, A. P. y R. S. Swerdloff: Hormonal ad genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod.* 1999, **4**, 38-47.
- Sinha Hikim, A. P., C. Wang, A. Leung y R. S. Swerdloff: Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology.* 1995, **136**, 2770-2775.
- Sitprija, V. y S. Eiam-Ong: Vanadium and metabolic problems. In: *Vanadium in the environment.* Ed.: J. Nriagu. John Wiley and Sons, Inc., 1998, pp. 91-120.
- Slee, E. A., C. Adrian y S. J. Martin: Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell death Diff.* 1999, **6**, 1067-1074.
- Snyder, L. M., N. L. Fortier, L. Leb, J. McKenney, J. Trainor, H. Sheerin y N. Mohandas: The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated



- membrane damage in human erythrocytes. *Biochim Biophys acta*. 1988, **937**, 229-240.
- Srivastava, A. K., J. L. Chiasson y S. K. Pandey: Mechanism of insulin of vanadium compounds. In: *Biology and medicine metal ions*. Eds.: P. Collery, J. Corbella, J. L. Domingo, J. C. Etienne and J. M. Llobet. Jhon Libbey Eurolex, Paris, 1996, pp. 328-330.
- Stocco, D. M.: Testosterone biosynthesis. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds.: E. Knobil and J. D. Neill. Academic press, San Diego, 1998, pp. 784-789.
- Stohs, S. J. y D. Bagchi: Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Radical Biol Med*. 1995, **18**, 321-336.
- Stokinger, H. E.: The metals. In: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Eds.: G. D. Clayton and E. C. Clayton. Wiley Interscience, New York, 1981, pp. 1493-2060.
- Stroh, C. y K. Schulze-Ostroff: Death by a thousands cuts: an ever-increasing list of caspases substrates. *Cell death Diff*. 1998, **5**, 997-1000.
- Sun, J. G., A. Jurisicova y R. F. Casper: Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*. 1997, **56**, 602-7.
- Sun, Y. T., D. C. Irby, D. M. Robertson y D. M. de Kretser: The effects of exogenously administered testosterone on spermatogenesis in intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology*. 1989, **125**, 1000-10.
- Tapanainen, J. S., J. L. Tilly, K. K. Vihko y A. J. Hsueh: Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*. 1993, **7**, 643-50.
- Tesarik, J., C. Mendoza y E. Greco: The effect of FSH on male germ cell survival and differentiation in vitro is mimicked by pentoxifylline but not insulin. *Mol Hum Reprod*. 2000, **6**, 877-81.
- Thompson, W. J., B. H. Tan y S. J. Strada: Activation of rabbit lever high affinity cAMP (type IV) phosphodiesterase by a vanadyl-glutathione complex. Characterization of the role of the sulfhydryl. *J. Biol. Chem*. 1991, **266**, 17011-17029.
- Thornberry, N. A. y Y. Lazebnik: Caspases: enemies within. *Science*. 1998, **281**, 1312-1316.
- Turner, A. I., A. J. Tilbrook, I. J. Clarke y C. J. Scott: Progesterone and testosterone in combination act in the hypothalamus of castrated rams to regulate the secretion of LH. *J endocrinol*. 2001, **169**, 291-298.

TESIS COM
FALLA DE JARGEN

- van Overveld, F. W., G. R. Haenen, J. Rhemrev, J. P. Vermeiden y A. Bast: Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chem Biol Interact.* 2000, **127**, 151-161.
- Vernet, P., N. Fulton, C. Wallace y R. J. Aitken: Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2001, **65**, 1102-13.
- Weinbauer, G. F., H. M. Behre, U. Fingscheidt y E. Nieschlag: Human follicle-stimulating hormone exerts a stimulatory effect on spermatogenesis, testicular size, and serum inhibin levels in the gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated nonhuman primate (*Macaca fascicularis*). *Endocrinology.* 1991, **129**, 1831-9.
- WHO: Environmental health criteria, No. 81. Vanadium. WHO, Genova, 1988.
- Wilson, M. R., T. W. Close y J. E. Trosko: Cell population dynamics (apoptosis, mitosis, and cell-cell communication) during disruption of homeostasis. *Exp Cell Res.* 2000, **254**, 257-268.
- Wyllie, A. H., J. F. R. Kerr y A. R. Curie: Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980, **68**, 251-306.
- Wyrobek, A. J. y W. R. Bruce: Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975, **72**, 4425-4429.
- Xu, C., J. E. Johnson, P. K. Singh, M. M. Jones, H. Yan y C. Carter: In vivo studies of cadmium -induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology.* 1996, **107**, 1-8.
- Yamamoto, Y., K. Yamamoto, T. Hayase, H. Abiru, K. Shiota y C. Mori: Methamphetamine induces apoptosis in seminiferous tubules in male mice testis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002, **178**, 155-160.
- Yossefi, S., Y. Oshry y L. M. Lewin: Chromatin condensation in hamster sperm: a flow cytometric investigation. *Mol Reprod Dev.* 1994, **37**, 93-98.
- Zirkin, B. R.: Spermatogenesis: its regulation by testosterone and FSH. *Sem Cell Biol Dev.* 1998, **9**, 417-421.
- Zirkin, B. R., R. Santulli, C. A. Awoniyi y L. L. Ewing: Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology.* 1989, **124**, 3043-9.



Publicaciones

Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice

Andrés M. Aragón, Mario Altamirano-Lozano*

Laboratorio de Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México

Received 25 May 2000; received in revised form 22 September 2000; accepted 27 October 2000

1. Introduction

A variety of chemical compounds, including metals, are known to alter certain stages of the spermatogenesis process, leading to reproductive dysfunction [1,2]. Because vanadium, as other trace metal atmospheric contaminants, is not biodegradable, vanadium compounds that are redistributed by human activities tend to accumulate in ecosystems at concentrations that may be toxic for living organisms [3]. Significant quantities of vanadium are found in fossil fuels such as petroleum [4,5], and it is estimated that 66,000 tons of vanadium are liberated into the atmosphere every year [6]. Vanadium is widely used for industrial purposes, and has recently been shown to help achieve better physical performance of athletes during training [7], to have anti-tumor properties [8,9], and to have potential as a vaginal contraceptive [10].

It has been estimated that large cities may have average vanadium air levels on the order of 0.25 to 300 ng/m³ [11]; in the US, the highest concentration of atmospheric vanadium ever recorded (on the order of 10,000 ng/m³) was measured in New York City [12]. Exposure to high concentrations of vanadium in the air may occur in occupational settings, and the vanadium concentrations of 50 to 100 mg/m³, sometimes reaching 500 mg/m³, have been observed in boiler cleaning [11].

It is estimated that about 25% of inhaled soluble vanadium compounds are absorbed. Vanadium is poorly absorbed from the gastrointestinal tract, and thus, ingested vanadium compounds are mainly eliminated in the feces. Soon after absorption, a fairly uniform distribution of vanadium is observed in soft tissues; however, long-term storage sites for vanadium are bone and muscle. Urinary

excretion is the predominant route of elimination of absorbed vanadium [13].

Experimentally, vanadium can be administered to animals in the oxidized forms (IV) or (V), but is found exclusively in the (IV) oxidized form in the body [14]. Certain inorganic salts that contain vanadium (IV) have been shown to modulate cellular redox potential and to catalyze the generation of reactive oxygen intermediates [8,15–19]. Vanadium (V) has been reported to induce low sperm counts [20,21], to decrease sperm motility [20], and to increase the frequency of sperm morphology abnormalities [21,22] *in vivo*. However, the effects of the active intracellular form of vanadium (IV) on male reproductive function have not yet been assessed. The purpose of this study was to analyze the effect of vanadium tetroxide on sperm concentration, sperm morphology, viability, and motility, as well as on the histology of testicular tissue in the adult male mouse.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Three-month old male CD-1 mice weighing between 37.5 and 51 g were kept in plastic boxes under controlled light/darkness cycles (light from 5:00 AM to 5:00 PM). Food (Purina chow) and water were available *ad libitum*. The mice were weighed at the beginning of the treatment, then every second day and again when sacrificed.

2.2. Treatments

Vanadium tetroxide (Sigma Chemical Co. St. Louis MO) was prepared in saline and injected intraperitoneally (ip) in appropriate volumes containing either 4.7 mg/kg (1/32 LD₅₀), 9.4 mg/kg (1/16 LD₅₀), or 18.8 mg/kg (1/8 LD₅₀). Mice were injected every second day for 60 d to

* Corresponding author.
E-mail address: maal@servidor.unam.mx (M. Altamirano-Lozano).

Table 1
 Effect of vanadium tetroxide on testis and body weight of mice after treatment every second day for 60 d (mean \pm SE)

	Dose (mg/kg/treatment)			
	0	4.7	9.4	18.8
Total dose/mouse (mg)	0	141	282	564
N	6	6	6	5
Initial body weight (g)	41.83 \pm 0.99	43.73 \pm 1.52	45.55 \pm 1.92	41.60 \pm 0.23
Final body weight (g)	43.25 \pm 0.72	43.91 \pm 1.64	47.93 \pm 1.79	43.34 \pm 3.12
Testis weight (g)	0.34 \pm 0.01	0.37 \pm 0.02	0.36 \pm 0.02	0.27 \pm 0.03*

* Significantly decreased vs. control. $P < 0.05$, Student's *t* test.

prevent the severe vanadium toxicity seen with more frequent injection. The LD₅₀ (150 mg/kg bw) was determined and doses used in this study were selected based on preliminary experiments in our laboratory using subchronic treatment with vanadium tetroxide.

2.3. Sperm and testis analysis

After vanadium tetroxide treatment, the animals were sacrificed by cervical dislocation, and the testes were extracted and weighed. The vas deferens and its contents were obtained and placed in 2 mL Tyrode's solution (Sigma Chemical, ST. Louis, Mo., USA) at 37°C and mixed to homogenize the suspension. A drop of the sperm suspension was placed on a slide for observation. Two hundred spermatozoa were analyzed for each animal [23,24] at 400 \times using a phase contrast microscope (Nikon). The percentage of motile sperm was defined as the ratio of cells showing movement to the total number of cells \times 100 [24].

Sperm viability was determined with the 1% trypan blue technique (Sigma Chemical, Co. St Louis Mo. USA), and 200 cells were analyzed for each animal.

Sperm concentration was determined in a Neubauer chamber (PROPER Lumycite 1/100 mm depth). Giemsa (1:16 in tap water for 30 min) stained air-dried slides were used to analyze sperm morphology according to the criteria described by Wyrobek and Bruce [25] with some modifications, to report the percentage of abnormal forms and the relative percentage of each type of abnormal form found.

The right testes of each animal were fixed in Bouin's fixative and embedded in paraffin wax. Serial transversal 10 μ m cuts were obtained and stained with hematoxylin-eosin. The maximum diameter and the diameter perpendicular to the maximum were measured in 50 seminiferous tubules of each testis analyzed. Seminiferous tubule areas were estimated as follows: $a = \pi r^2$, where $r = (\text{diameter one} + \text{diameter two})/4$. Results were expressed as $\mu\text{m}^2 \times 10^3$. Histologic alterations were evaluated in all slides prepared.

2.4. Statistical analysis

Body and testis weights, sperm concentrations, and seminiferous tubule areas were compared between the control and experimental groups using Student's *t* test. Sperm via-

bility, motility, and morphology were compared using the Mann-Whitney *U* test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Body and organ weights

Body weight measured throughout the 60-d treatment period was similar in both groups. There were no significant differences between pre- and post-treatment body weights in the vanadium-treated groups, nor were there differences compared to the controls. Regarding the testes, only the highest V₂O₅ dosage tested (18.8 mg/kg) caused a significant weight decrease as compared to the control group (Table 1).

3.2. Sperm concentration, viability, and motility

Although vanadium tetroxide appeared graphically to decrease sperm counts in a dose dependent manner (Fig. 1), differences between control and experimental groups were not significant. However, sperm motility decreased significantly in mice treated with the highest vanadium tetroxide dose compared to the control group ($P < 0.05$; Fig. 2A).

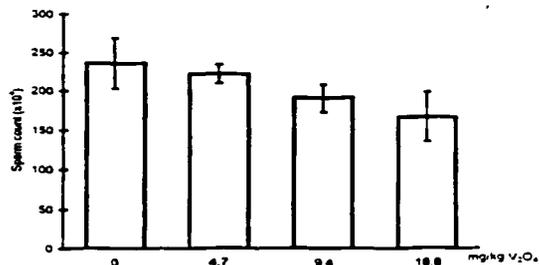


Fig. 1. Effect of vanadium tetroxide on sperm concentration in the male mouse. Data are expressed as means \pm SE.

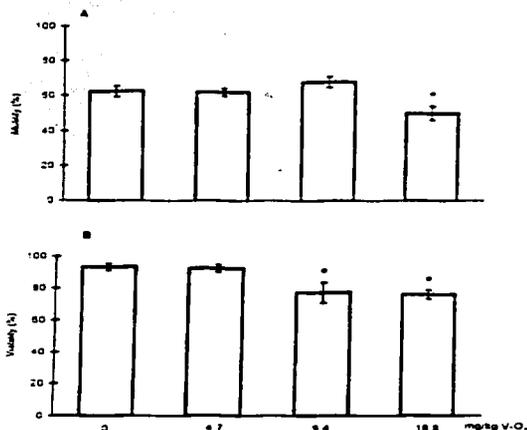


Fig. 2. Changes in the percent motile (A) and viable (B) in spermatozoa from male mice treated with vanadium tetroxide. Data are expressed as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to control. Mann-Whitney U test.

Sperm viability also decreased significantly at the 9.4 and 18.8 mg/kg vanadium tetroxide doses (77.40 ± 2.06 and $76.28 \pm 2.74\%$ respectively) as compared to the control group ($93.39 \pm 1.96\%$; $P < 0.05$; Fig. 2B).

3.3. Sperm morphology abnormalities

The mean percentage of abnormal sperm forms appeared to increase in a dose-dependent manner; however, only the 9.4 mg/kg group showed a statistically significant difference from the control, perhaps due to the degree of variability in the high-dose group (Table 2). The most common anomalies observed were abnormal hook, amorphous head, and folded.

Table 2
Incidence and type of sperm abnormalities in mice after 60 d treatment with vanadium tetroxide

Dose (mg/kg)	0	4.7	9.4	18.8
n	6	6	6	5
% Abnormal sperm ^a	7.08 \pm 1.80	9.03 \pm 1.48	11.94 \pm 1.20*	16.13 \pm 5.66
Type of sperm abnormalities ^b				
Abnormal hook	45.91	28.15	25.16	33.33
Banana head	2.27	1.04	0.94	2.54
Amorphous	30.68	30.91	41.72	44.97
Folded	16.59	35.26	27.19	12.73
Bicaudate	1.36	0.52	0.67	0.97
Other	3.19	4.14	4.31	5.68

^a Based on scoring 1000 sperm per animal (mean \pm SE).

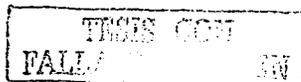
^b Relative percentage.

* Significantly increased vs. control, $P < 0.05$, Mann-Whitney U test.

Fig. 3A shows a typical spermatozoan of the control group, with the characteristic hook and a single tail. We observed the vanadium tetroxide-induced sperm abnormalities described by Wyrobek and Bruce [24]: unusual hook, banana-shaped head, amorphous head (Fig. 3B), folded, and bicaudate sperm (Fig. 3E). However, we also observed other abnormal forms such as microcephaly, macrocephaly, bicephaly (Fig. 3F), divided middle piece (Fig. 3C), fused body (Fig. 3D), coiled flagellar end, tricephaly, and thin tight head. Spermatozoa were considered microcephalic or macrocephalic when the head was decreased or increased by 1/3 of its normal area. The cells with divided middle piece apparently represent displacement of the mitochondrial sheath, exposing the axoneme, with the rest of the flagellum remaining connected. The middle piece division may occur more than once in the same spermatozoan. Wyrobek and Bruce [25] considered bicephalic spermatozoa in the bicaudate category, however in this paper we considered both categories as separate. Sperm with two heads and two flagella showing a fused midpiece were considered as fused body sperm.

3.4. Seminiferous tubule area and testicular morphology

Although the seminiferous tubule areas were not significantly different in the vanadium-exposed groups as compared to controls, certain seminiferous epithelium modifications were observed. In the control group, the germinal epithelium was intact in the different spermatogenesis cycle stages showing few G cells [26]. These cells show a defined contour, a size similar to that of a pachytene phase spermatocyte with eosinophilic cytoplasm, a big central nucleus (positive to ethidium bromide and acridine orange staining), and chromatin forming coarse clusters lacking a characteristic arrangement. Normally, these cell types are scarce in the basal region, and are frequently part of cell associations in the tubular lumen related to spermatozoa that are to be released, although they may be found surrounded by spermatocytes. However, in mice treated with 9.4 and 18.8 mg/kg vanadium tetroxide, G cells were found more frequently (Fig. 4B). In some tubules, seminiferous epithelial



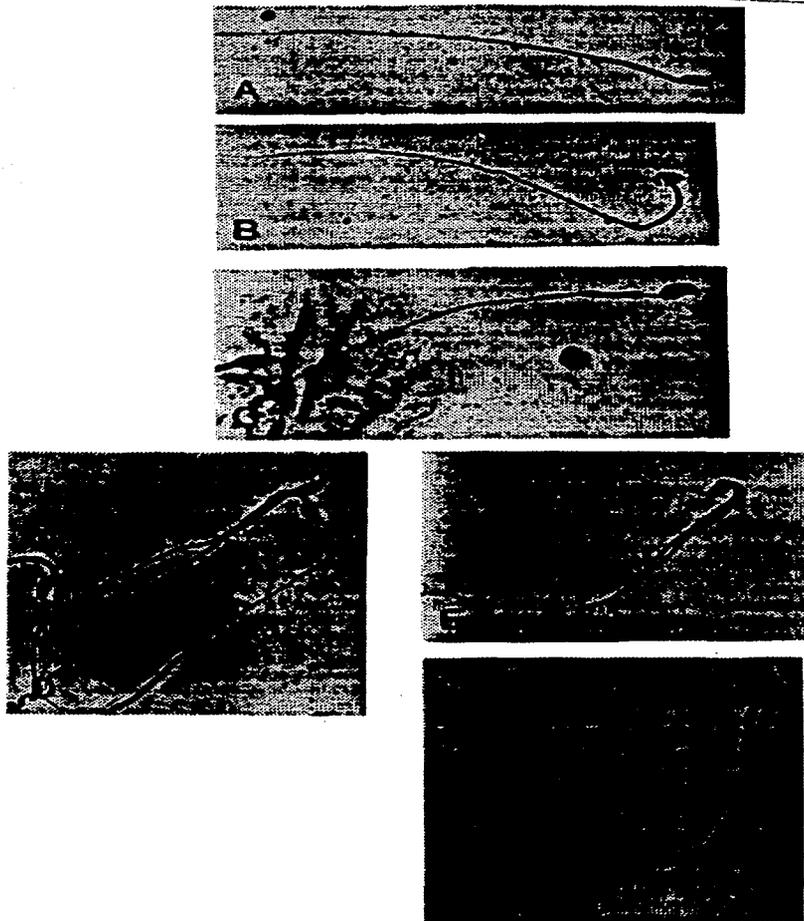


Fig. 3. Abnormalities found in normal and vanadium tetroxide-treated mice. (A) Normal sperm with the characteristic hook and a single tail. Abnormal sperm as follows: amorphous head (B), divided middle piece (C), fused body (D), bicaudate (E), and bicephaly (F).

cell loss and increased numbers of G cells was observed (Fig. 4A), while others completely lacked germinal cells (Fig. 4B). Large optically empty vacuoles were observed in both.

4. Discussion

Flagellum motility is an expression of male germinal cell viability [27]. Capability of motion is acquired during the

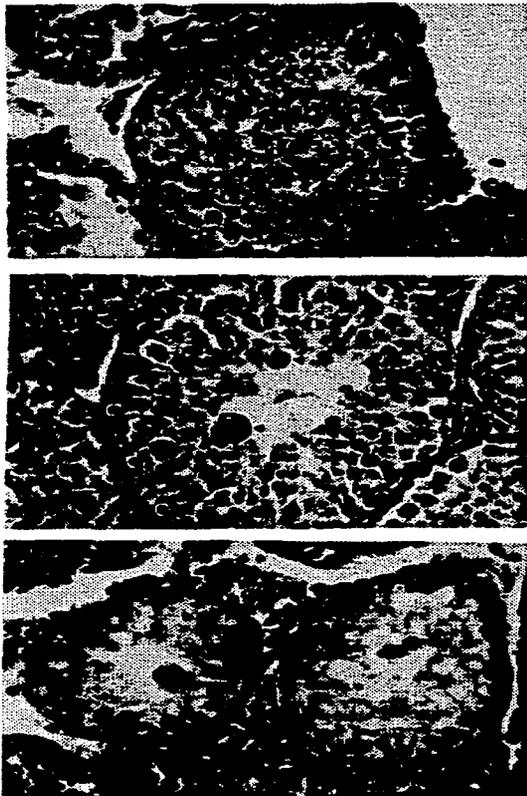


Fig. 4. Testicular histology of mice treated with vanadium tetroxide for 60 d. (A) Tubule with absent lumen and presence of cells with chromatin margination (arrows). (B) Tubule with several G cells in the lumen (arrows) and degenerate cell (arrow head). (C) Seminiferous tubule severely affected, most cells within the tubule being Sertoli cells (arrows) and some degenerate cells (arrow heads).

transit of the spermatozoa through the epididymis [28,29] and requires functional integrity of the mitochondria [27]. Reactive oxygen species decrease ATP concentrations [30] and cause lipid peroxidation in spermatozoa [31–34]. Certain vanadium (IV)-containing inorganic salts act as redox potential modulators in different biologic systems and catalyze the generation of reactive oxygen species [8,15–18].

In the testis, vanadium increases lipid peroxidation and reduces glutathione concentrations [35], so that the vanadium accumulated in the testis and epididymis would be expected to cause imbalance between the generation of reactive oxygen species and oxygen systems protectors, mainly those that use glutathione. This mechanism would explain the decreased percentages of motility and viability observed after the administration of the highest doses of vanadium tetroxide.

Spontaneous sperm cell death is a constant feature of the normal spermatogenesis process in a variety of mammalian species [36–38]. It is currently known that while almost all degenerating sperm cells in intact animals undergo spontaneous apoptotic death [39,40], different hormone stimuli [40–45] and toxic compounds [39,46–47] can induce this type of cell death. Vanadium (IV) has been reported to induce apoptosis *in vitro* [48,49]. The characteristics described for apoptotic cell death are different between somatic and germinal cells lines [39]. The G cells described in the present work show characteristic features of cell death [26,50], however, with a different appearance of the apoptotic cells. The presence of these cells and clonal developmental alterations of germinal cells may explain the decreased sperm concentrations that appeared to occur with increasing doses of vanadium and the lower testicular weight found in the group of mice treated with 18.8 mg/kg vanadium tetroxide.

The presence of abnormal sperm forms indicates that the spermatogenesis process may have been affected [51]. Several genetic factors [25,52] and cytoskeleton elements [52–54] play a role in sperm head morphogenesis. Since both vanadium (IV) and (V) inhibit microtubule polymerization [55,56], the accumulation of vanadium (IV) in germinal epithelial cells could affect structures such as the manchette, which provides mechanical force during morphogenesis of the sperm nucleus [52,53]. Vanadium (IV) compounds have been reported to induce 2'-deoxyguanosine hydroxylation and to cause DNA breaks by means of free-radical mediated reactions [8,15,19]; while vanadium (V) has been reported to induce single-strand breaks [21]. Thus, DNA damage may also be responsible for the increased percentage of abnormal sperm forms.

In summary, the intraperitoneal administration of vanadium tetroxide during spermatogenesis affects some sperm analysis parameters in the mouse, and induces testicular damage characterized by the presence of degenerating cells and germinal epithelium disruption in the seminiferous tubules.

Acknowledgment

This study was partially supported by DGAPA grant IN-214597, and CONACYT grant 25417-M.

References

- [1] Xu B, Chia SE, Tsakok M, Ong ChN. Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod Toxicol* 1993;7:613-8.
- [2] Domingo JL. Metal-induced developmental toxicity in mammals: a review. *J Toxicol Environ Health* 1994;42:123-41.
- [3] Eckardt RE. Petroleum fuel and airborne metals. *Arch Environ Health* 1971;23:166-70.
- [4] Sokolov SM. Methodological aspects of assessing atmospheric contamination with metal aerosols in the vicinity of thermal power complexes. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1986;30:249-54.
- [5] Byczkowski JZ, Kulkarni AP. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In: Nriagu JO, editor. *Vanadium in the environment, part 2: health effects*. John Wiley & Sons, Inc., 1998. p. 235-64.
- [6] Nriagu JO, Pacyna JM. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soil by trace metals. *Nature (London)* 1988;333:134-9.
- [7] Fawcett JP, Farquhar SJ, Thou T, Shand BI. Oral vanadium sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 1997;80:202-6.
- [8] Sakurai H, Nakai M, Miki T, Tsuchiya K, Takada J, Matsuchia R. DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in a vanadyl ion-hydrogen peroxide system. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:1090-5.
- [9] Jackson JK, Min W, Cruz TF, Cindric S, Arsenault L, Von-Hoff DD, Degan D, Hunter WL, and Burr HM. A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(maleato) oxovanadium in mice. *Br J Cancer* 1997;75(7):1014-20.
- [10] D'Cruz OD, Ghosh P, Uckum FM. Spermicidal activity of metallo-cene complexes containing vanadium (IV) in humans. *Biol Reprod* 1998;58:1515-26.
- [11] WHO. *Environmental Health Criteria vol. 81, Vanadium*. 1988. WHO, Geneva.
- [12] Mamane Y and Pirrone N. Vanadium in the atmosphere. In: Nriagu JO, editor. *Vanadium in the environment, part 2: health effects*. John Wiley & Sons, Inc. 1998. p. 37-71.
- [13] Alessio L, Maroni M, and Dell'Orto A. Biological monitoring of vanadium. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, and Sager R, editors. *Biological monitoring of toxic metals*. New York: Plenum Press, 1988. p. 427-36.
- [14] Sakurai H. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect* 1994;102(Suppl 3):35-6.
- [15] Shi X, Wang P, Jiang H, Mao Y, Ahmed N, Dalal N. Vanadium (IV) causes 2'-deoxyguanosine hydroxylation and deoxyribonucleic acid damage via free radical reactions. *Ann Clin Lab Sci* 1996;26:39-49.
- [16] Ozawa T, Hanaki A. ESR evidence for the formation of hydroxy radicals during the reaction of vanadyl ions with hydrogen peroxide. *1989;37:1407-9*.
- [17] Carmichael AJ. Vanadyl induced Fenton like reaction in RNA: an ESR and spin trapping study. *FEBS Lett* 1990;261:165-70.
- [18] Jounes M, Strobel O. Vanadate-induced toxicity towards isolated perfused rat livers: the role of lipid peroxidation. *Toxicology* 1991;61:63-74.
- [19] Sakurai H, Tamura H, Okatani K. Mechanisms for a new antitumor vanadium complex hydroxyl-radical-dependent DNA cleavage by 1-10-phenanthroline vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:133-7.
- [20] Llobet JM, Colomina MT, Sireu J, Domingo JL, Corbella J. Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Toxicology* 1993;80:199-206.
- [21] Altamirano-Lozano ML, Alvarez-Barrera L, Basurto-Alcantara M, Valverde Rojas E. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogen Carcinog Mutag* 1996;16:7-17.
- [22] Rosechin AV, Ordzhonikidze EK, Shaiganova IV. Vanadium toxicity metabolism, carrier state. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1980;24:77-383.
- [23] Linder RE, Strader LF, Slott VL, Suarez JD. Endpoints of spermatoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod Toxicol* 1992;6:491-505.
- [24] Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DNR, Wise LD. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod Toxicol* 1996;10:237-44.
- [25] Wyrobek AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:4425-9.
- [26] Grifó E, Saa J, Dominguez R, Benedetti L. Aspectos histopatológicos de la espermátogenesis en la rata después de lesiones hipotalámicas. *Rev Argent Endocrinol Metab* 1963;13:3-13.
- [27] Katz DF. Characteristics of sperm motility. In: Robaire B, editor. *The Male germ cell, spermatogenesis to fertilization*. Ann New York Acad Sci 1991;637:175-202.
- [28] Comhaire FH. Methods to evaluate reproductive health of the human male. *Reprod Toxicol* 1993;7:39-46.
- [29] Eddy EM, O'Brien DA. 1994. The spermatozoon. In: Koobit E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd., 1994. p. 30-77.
- [30] De Lamarque E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368-78.
- [31] Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992;57:409-16.
- [32] Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993;97:441-50.
- [33] Aitken RJ, Clarkson JS, Fihel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;40:183-97.
- [34] Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995;103:17-26.
- [35] Sheriff DS. Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reprod Toxicol* 1991;5:513-5.
- [36] Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 1956;99:391-413.
- [37] Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS, editor. *Perspectives on mammalian cell death*. Oxford: Ed. Oxford Science Publications, 1987. p. 229-58.
- [38] Russell LD, Edlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED, editors. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida: Caché river Press, 1990.
- [39] Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlan S, Nieschlag E. Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 1995;105:25-33.
- [40] Sinha Hikim AP, Rajavashisth TB, Sinha Hikim I, Lue Y, Bonavera JJ, Leung A, Wang C, Swerdloff RS. Significance of apoptosis in the temporal and stage-specific loss of germ cells in the adult rat after gonadotropin deprivation. *Biol Reprod* 1997;57:1193-1201.
- [41] Billig H, Furuta Y, Rivier C, Tapanabhai J, Parvinen M, Huseuh AJW. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995;136:5-12.
- [42] Henriksson K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner. *In situ* quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology* 1995;136:3285-91.
- [43] Russell LD, Corbin TJ, Berg KE, De Franca LR, Grasso P, Barke A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of ex-

- ering a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 1993;133:2062-70.
- [44] Sherry J, Marathe GK, Dighe RR. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 1996;137:2179-2182.
- [45] Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995;136:2770-5.
- [46] Nakagawa S, Nakamura N, Fujioka M, Mori C. Spermatogenic cell apoptosis induced by mitomycin C in the mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;147:204-13.
- [47] Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;137:42-50.
- [48] Sit KH, Paramanathan R, Bay BH, Chan HL, Wong Kp, Thong P, Watt F. Sequestration of mitotic (M-phase) chromosomes in autophagosomes: mitotic programmed cell death in human Chang liver cells induced by an OH[•] burst from vanadyl(4). *Anal Rec* 1996;245:1-8.
- [49] Sit KH, Paramanathan R, Bay BH, Wong Kp, Thong P, Watt F. Induction of vanadium accumulation and nuclear sequestration causing cell suicide in human Chang liver cells. *Experientia* 1996;52:778-785.
- [50] Chapin RE. Morphologic evaluation of seminiferous epithelium of the testis. In: Lamb IV JC, Foster PMD, editors. *Physiology and toxicology of male reproduction*. San Diego: Academic Press, Inc., 1988. p. 155-77.
- [51] Krzanowska H, Stryna J, Wabik-Sliż B. Analysis of sperm quality in recombinant mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space. *J Reprod Fertil* 1995;104:347-54.
- [52] Meistrich ML, Cole A, Cherry ML, Trostle-Weige PK. Nuclear and manchette development during spermiogenesis of normal and *α2h* mutant mice. In: Orgebin MC, Danzo BJ, editors. *Cell biology of the testis and epididymis*. Ann New York Acad Sci 1987;513:304-7.
- [53] Cole A, Meistrich M, Cherry L, Trostle-Weige PK. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *α2h/α2h* mutant mice. *Biol Reprod* 1988;38:385-401.
- [54] Meistrich ML. Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. In: De Kretser D, editor. *Molecular biology of the male reproductive system*. New York: Academic press, Inc., 1993. p. 67-97.
- [55] Hantson Ph, Saint-Georges L, Mahieu P, Leonard ED, Crutzen-Fayt MC, Leonard A. Evaluation of the ability of paracetamol to produce chromosome aberration in man. *Mutat Res* 1996;368:293-300.
- [56] Ramirez P, Eastmond DA, Laclate 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. *Mutat Res* 1997;386:291-8.

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION