



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DEL PENTÓXIDO DE VANADIO SOBRE LA
GAMMA-TUBULINA DE CÉLULAS TESTICULARES EN UN
MODELO MURINO DE EXPOSICIÓN POR INHALACIÓN

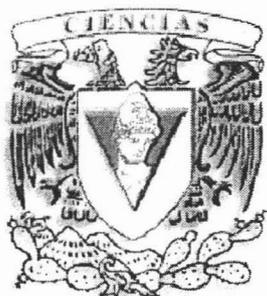
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

VIANEY RODRÍGUEZ LARA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:
BIOL. PATRICIA MUSSALI GALANTE

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m 342456



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Vianey Rodríguez Lara

FECHA: 22 de Septiembre de 2005

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Efecto del pentóxido de vanadio sobre la gamma-tubulina de células testiculares en un modelo murino de exposición por inhalación".

realizado por Vianey Rodríguez Lara

con número de cuenta 09826164-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director a de tesis

Propietario Biol. Patricia Mussali Galante

Propietario Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Propietario Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Suplente Dra. María Rosa Avila Costa

Suplente M. en C. Martha Patricia Bizarro Nevares

[Firmas manuscritas de los miembros del Consejo Departamental de Biología]

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ~~Juan Manuel Rodríguez Chávez~~



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Teresa Fortoul van der Goes, la Dra. María Rosa Avila Costa, la Biól. Patricia Mussali Galante, la M. en C. Patricia Bizarro Nevares y al Dr. Mario Altamirano Lozano: Por su tiempo y valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

A Verónica Rodríguez Mata, María Isabel Guadalupe Vega García, Víctor Delgado, Francisco Pasos y al Biol. Armando Zepeda R: Por sus enseñanzas y valiosa cooperación técnica.

A la Biol. Beatriz Hernández Téllez, Judith Álvarez Pérez, al M. en C. Miguel Herrera y al Dr. Andrés Castell: Por su tiempo y apoyo técnico.

A la unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM: Por su apoyo en el cuidado de los animales y la facilitación de los mismos.

A la UNAM: Por crear un espacio donde puedo aprender, crecer como persona y por albergarme en él.

Esta tesis fue apoyada por el proyecto PAPIIT número 204304

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Por todo su amor y apoyo, por enseñarme tantas cosas, por su paciencia, por alentarme en los tiempos difíciles, por estar conmigo siempre, por lo especiales que son para mí, por ayudarme a cumplir esta una de mis grandes metas y por vivir conmigo este logro que también es de ustedes, de todo corazón ¡¡Gracias!!.
¡¡Los quiero muchísimo!! Les dedico con todo cariño este trabajo.

A mis hermanas: Por su apoyo, cariño y compañía, por todo lo que hemos compartido, lo bueno y lo difícil. ¡Gracias, las quiero mucho mucho! Les dedico este trabajo. ¡¡Les toca a ustedes!! ¡Si se puede!

A mis abuelitos: Por todo su cariño, por siempre estar al pendiente de nosotras, por darme siempre ánimo y por ser parte de mi motor para superarme. Muchas gracias abuelitos. ¡Los quiero Muchísimo! Les dedico con amor este trabajo.

A mis tíos y primos: Por los momentos compartidos y por el cariño que me han brindado. ¡Gracias!

A Tere: Por recibirme con los brazos abiertos y enseñarme tantas tantas cosas, por todito el cariño, amistad y gran apoyo, por el ánimo que siempre me brindas, por impulsarme a ser mejor, por todos los momentos bonitos y por ser una persona maravillosa y muuy especial para mi, por mil cosas más. ¡MIL GRACIAS! ¡Te quiero muchisisimo!

A Rose (Mi Equipo): Gracias equipo por hacer de cada día una aventura y compartirla conmigo, gracias por enseñarme el lado lindo de la vida, por tantas risas y momentos inolvidables. Por estar ahí siempre para mí, por ser la persona increíble que eres y por permitirme conocerte, por tantísimo cariño y por todo tu apoyo. ¡MIL GRACIAS! ¡Te quiero muchísimo siempre!

A Gaby (Lula): Gracias por ser mi compañera y vivir conmigo esta etapa, por todo tu cariño y apoyo incondicional, por defenderme y estar ahí siempre en las buenas y en la malas, por todo el inolvidable tiempo que hemos compartido, por ser parte de este proyecto, pero sobre todo por ser mi gran amiga. ¡Mil Gracias lula, te quiero mucho!

A Marce y Gaby: Por compartir esta etapa conmigo, por su amistad, apoyo, consejos y por estar cerca siempre, en las buenas y en las malas, ¡Gracias chicas!

A Patty Mussali: Por tu tiempo, dedicación y por todas tus enseñanzas. ¡Muchas gracias!

A Efraín: Por el apoyo en bioestadística, por el tiempo y paciencia. ¡Mil gracias!

A Laura: Por tus consejos, por animarme cuando no era un buen día, por todito tu apoyo y cariño, ¡muchas gracias Lauris!

A Patty Bizarro: Por tu cariño, amistad y por los momentos bonitos, ¡Gracias Patito!

A José Luis, Michele, Paty D, Sandra, Sergio, Cris, Anita, Fidencio, Cristian: Por ser mi compañía incondicional, por sus consejos, por su amistad, por los tantos momentos inolvidables en el laboratorio y por todo el ánimo y apoyo que me brindan siempre. ¡Gracias!

A Sandra y Gala: Por lo que compartimos en la carrera y los momentos lindos

A Gaby Saenz: Por tu compañía y consejos, por los momentos bonitos, por todo el ánimo y cariño. ¡Muchas Gracias! ¡Te quiero Mucho! Agradezco también a Marianita y Andrea por su cariño.

Al Dr. Castell, Betty, Judith y Miguel: Por recibirme en su laboratorio, por sus enseñanzas, su tiempo, su amistad y por todo su cariño. ¡Mil Gracias!, ¡los quiero mucho!

A MI FAMILIA Y A TODOS USTEDES POR SER MI FORTALEZA Y ALEGRÍA.

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Contaminación Ambiental	2
2.1.1 Contaminación en las grandes urbes	2
2.1.2 Contaminación del aire	3
2.1.3 Contaminación del aire por metales pesados	4
2.2 Vanadio	4
2.2.1 Propiedades Físicas y Químicas	5
2.2.2 Vías de exposición	6
2.2.3 Toxicocinética y Toxicodinamia	7
2.2.4 Efectos en la salud	10
2.2.5 Efectos a nivel celular	10
2.2.6 Reprotoxicidad	13
2.3 Testículo	14
2.3.1 Células germinales	15
2.3.2 Células de Sertoli	16
2.3.3 Células de Leydig	16
2.4 Centrosoma	18
2.5 Gamma tubulina	20
2.5.1 Localización	20
2.5.2 Funciones	21
3. Justificación	25

4. Objetivos	25
4.1 General	
4.2 Particular	
5. Hipótesis	25
6. Metodología	26
7. Resultados.	29
7.1 Peso de los testículos	29
7.2 Concentración de vanadio en el testículo	29
7.3 Inmunohistoquímica para gamma tubulina	30
8. Discusión	37
9. Conclusiones	46
10. Perspectivas	47
11. Referencias bibliográficas.	48

1. RESUMEN

El vanadio es un metal que ha tomado importancia como contaminante ambiental en las últimas décadas debido al incremento de su concentración en el aire, principalmente en las grandes ciudades. Se emite en forma de vapores y polvos, principalmente como V_2O_5 , el cual es el compuesto más tóxico y abundante en la atmósfera. Actualmente, la infertilidad masculina ha sido asociada con la exposición a contaminantes ambientales, entre ellos los metales. En este contexto, se ha observado que la exposición a sales y óxidos de vanadio produce efectos reprotóxicos, los cuales se han relacionado con alteraciones en el citoesqueleto, sin embargo se desconoce el efecto de éste metal sobre la gamma tubulina, un importante miembro del centrosoma y un elemento clave para el funcionamiento del citoesqueleto. Debido a lo anterior y a que alteraciones estructurales, funcionales y numéricas del centrosoma se asocian con el desarrollo de procesos neoplásicos, es importante estudiar los efectos del V_2O_5 sobre la gamma tubulina, de células testiculares en un modelo murino de exposición por inhalación, ya que esta es la vía más importante de exposición para la población general. Para este estudio se emplearon un grupo de 36 animales control y 36 animales expuestos, los cuales inhalaban V_2O_5 (0.02M) 1 hora 2 veces por semana durante 12 semanas. Se determinó la concentración del metal en el tejido y el peso testicular después de cada tratamiento. Asimismo se realizó la técnica de inmunohistoquímica para determinar el efecto del V_2O_5 sobre la presencia de gamma tubulina en las células testiculares. Nuestros resultados mostraron decremento significativo en el porcentaje de las células germinales, de Sertoli y de Leydig, con gamma tubulina, con respecto al control, resultando en una relación negativa y significativa entre el porcentaje de células testiculares inmunorreactivas a esta proteína y el tiempo de tratamiento, siendo mayor para las células germinales, seguido por las de Sertoli y finalmente las de Leydig, lo cual reflejó diferente sensibilidad al compuesto. Por lo anterior podemos concluir que las características de cada tipo celular influyen en la respuesta al tóxico. Además el vanadio administrado por la vía inhalada es capaz de alterar la presencia de gamma tubulina en las células testiculares, lo cual podría explicar el efecto reprotóxico del vanadio observado en éste y otros modelos experimentales, asimismo podría explicar sus efectos aneuploidogénicos, por lo que nuestros resultados constituyen una evidencia que apoya el carácter neoplásico del vanadio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Las actividades del ser humano desde la Revolución Industrial en el siglo XVIII hasta nuestros días, han provocado severos impactos sobre el ambiente. La contaminación ambiental es uno de ellos y constituye uno de los problemas más importantes a nivel global, que resulta del crecimiento explosivo de la población, del desarrollo industrial, el uso creciente de energía y de la cada vez mayor producción de desechos (Ehrlich y Ceballos 1997).

La contaminación ambiental se define como la presencia de impurezas en el medio, sean estas sustancias químicas o biológicas, en concentraciones tales que alteren la composición del mismo y signifiquen un riesgo para el hombre y demás seres vivos (Ross 1974).

Actualmente, uno de los principales problemas de contaminación ambiental es el del aire, el cual es mayor en las grandes ciudades, donde el desarrollo industrial ha propiciado la emisión de toneladas de contaminantes atmosféricos, los cuales están relacionados con daños severos en la salud y un incremento en las tasas de mortalidad y morbilidad (Vallejo *et al.* 2002).

2.1.1 CONTAMINACIÓN EN LAS GRANDES URBES

En las últimas décadas, la contaminación del aire ha llegado a ser uno de los problemas más importantes de salud pública, principalmente en ciudades como Sao Pablo (Brasil), Santiago (Chile), Bogotá (Colombia) y el área metropolitana de la ciudad de México, donde los límites de calidad del aire establecidos por la organización mundial de la salud (WHO) son frecuentemente sobrepasados (Romieu *et al.* 1990; Molina y Molina 2004; IPCS 2001).

La ciudad de México es una de las más pobladas del mundo, en un área de 1,483 km² habita aproximadamente el 25% de la población mexicana. En ella existen 8 millones de

automóviles y 35,000 industrias que consumen 40 millones de litros de combustible por día y aportan toneladas de contaminantes al aire (INEGI 1997; Molina y Molina 2004).

La principal fuente de contaminación proviene de los automóviles, los cuales contribuyen con el 85% de la emisión total de contaminantes, por otro lado, las industrias y plantas generadoras de energía contribuyen con el 10% de los contaminantes atmosféricos, el menor porcentaje corresponde a las fuentes naturales las cuales aportan 5% de los contaminantes atmosféricos totales (INEGI 1997; INE 1998; INE 2004).

Después del ozono, las partículas suspendidas, son los contaminantes del aire más importantes en esta ciudad, debido a su alta concentración en la atmósfera y a que son la principal causa de enfermedades respiratorias graves (Mugica *et al.* 2002; IPCS 2001). Actualmente su concentración sobrepasa los límites estándar de la calidad del aire, nacionales e internacionales ($260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para partículas suspendidas totales o PST y $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para partículas menores a 10 micras o PM_{10}) (Mugica *et al.* 2002; INE 2004).

2.1.2 CONTAMINACIÓN DEL AIRE

Las actividades que producen la emisión de contaminantes atmosféricos incluyen la quema de combustibles, la industrialización y la urbanización. Los principales contaminantes del aire son: el dióxido de carbono (CO_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de azufre (SO_2), óxidos de Nitrógeno (NO_x), hidrocarburos, clorofluorocarbonos (CFC), ozono (O_3), metales pesados y las partículas suspendidas totales (PST) (Albert 2004a; INE 2004).

Estas últimas están constituidas principalmente por metales, compuestos orgánicos, material de origen biológico, iones, gases y carbón; provienen de la producción de cemento, la extracción de rocas y minerales, emisiones automovilísticas e industriales y de la quema de combustibles fósiles. Las PST, incluyen a las partículas que miden entre 0.1 y 100 micras. Las partículas de entre 2.5 y 10 micras (PM_{10}), y las que miden de 1 a 2.5 micras ($\text{PM}_{2.5}$), forman la fracción respirable de las PST, las primeras, solo se depositan en los pulmones, mientras que la fracción fina o $\text{PM}_{2.5}$ llega a los bronquiolos y a la región alveolar pasando al torrente sanguíneo mediante difusión causando efectos negativos sobre la salud, que se deben principalmente a su componente metálico (Hinds 1982; Lippmann 1989; HEI 2002; Vallejo *et al.* 2002; Flores-Rodríguez 2004; INE 2004).

2.1.3. CONTAMINACIÓN DEL AIRE POR METALES PESADOS

Los metales pesados han tomado importancia como contaminantes ambientales debido al incremento de su concentración en el aire y a los efectos adversos que provocan sobre la salud. Estos se acumulan en los tejidos y causan alteraciones principalmente en el tracto respiratorio y en los sistemas: nervioso, hematopoyético y cardiovascular, además producen daño renal y alteraciones en la fertilidad (Albert 2004b; Del Razo *et al.* 2004; Gutiérrez-Ruiz *et al.* 2004; Saldívar-Osorio *et al.* 2004a; Saldívar-Osorio *et al.* 2004b).

Los metales pesados se emiten a la atmósfera como partículas, excepto el mercurio, el cadmio y el selenio, los cuales son liberados como vapores (Järup 2003; Flores-Rodríguez 2004; Gutiérrez-Ruiz 2004; Saldívar-Osorio *et al.* 2004a). En el aire, se encuentran principalmente en forma de óxidos, los cuales son muy tóxicos (Nriagu 1990).

Los principales metales considerados contaminantes del aire son: plomo, cobre, cromo, cadmio, manganeso, mercurio, zinc, hierro, berilio, talio, aluminio, níquel, entre otros (Järup 2003; Albert 2004b; Del Razo *et al.* 2004; Gutiérrez-Ruiz 2004; Saldívar-Osorio *et al.* 2004a; Saldívar-Osorio *et al.* 2004b). Algunos metales como el plomo y el cadmio han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos tóxicos. Sin embargo, existen en el aire otros metales, cuyos efectos sobre la salud han sido pobremente estudiados. Un ejemplo de ello lo constituye el vanadio, el cual es un metal pesado que en las últimas décadas ha tomado importancia como contaminante ambiental, debido al aumento de su concentración en la atmósfera, principalmente en las grandes urbes, como la ciudad de México (Fortoul *et al.* 2002).

2.2 VANADIO

El vanadio fue descubierto en México en 1801 por el químico Andrés Manuel del Río, quien lo nombró primero pancronium. Sin embargo en 1830, Sefstrom y Swedish, al observar la gama de colores del metal en solución lo llamaron Vanadio, en honor a la diosa griega de la belleza Vanadis (Bhagavan *et al.* 1983; Morinville *et al.* 1998; Mukherjee *et al.* 2004).

Debido a su dureza y capacidad para formar aleaciones, el vanadio se ha empleado en la industria metalúrgica para fabricar aceros de gran calidad y resistentes a la corrosión. Se emplea también en la producción de plásticos, reveladores fotográficos e imanes superconductores. Algunos óxidos de vanadio como el pentóxido (V_2O_5), se emplean en la producción de pigmentos amarillos y como catalizadores en la fabricación de ácido sulfúrico (ATSDR 1992; Barceloux 1999; IPCS 2001).

Por otro lado, algunas sales de vanadio han sido utilizados en el tratamiento de enfermedades como: anemia, tuberculosis, sífilis y diabetes mellitus. Además, el vanadio se ha empleado para disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y azúcar en la sangre (Rehder 1992; Thompson *et al.* 1993; Morinville *et al.* 1998; Nriagu y Pirrone 1998; Poucheret *et al.* 1998; Barceloux 1999; Mukherjee *et al.* 2004;).

2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

El vanadio es un metal de transición blanco grisáceo que generalmente se encuentra en forma de cristales. Es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza y ocupa el sitio 22 en abundancia. Pertenece al grupo Vb de la tabla periódica y ocupa en ella el lugar 25. Sus estados de oxidación son del -1 al +5, siendo +3, +4, +5 las valencias más comunes (ATDSR 1997; Barceloux 1999; Mukherjee *et al.* 2004).

El estado de oxidación más estable en el que se encuentra el vanadio es la forma cuadrivalente o vanadil (VO^{+2}) (Barceloux 1999). En sistemas biológicos, la forma en la cual se encuentre el metal depende del pH, por ejemplo, en soluciones ácidas existe como vanadil (VO^{+2}) mientras que en soluciones básicas se encuentra como ortovanadato (VO_4^{-3}) (Barceloux 1999).

El vanadio forma diferentes compuestos al combinarse con elementos como el cloro, el sodio, el azufre y el oxígeno, por ejemplo, las formas pentavalentes del vanadio que derivan del ion (VO^{3-}) forman compuestos como el metavanadato de sodio ($NaVO_3$), el metavanadato de amonio (NH_4VO_3) y el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4). Otro de los compuestos que forma el vanadio en estado pentavalente al combinarse con el oxígeno, es el pentóxido de vanadio (V_2O_5), el cual existe en forma de cristales rojos, amarillos o verdes,

y constituye la forma más abundante y tóxica de vanadio en el ambiente (Barceloux 1999; IPCS 2000; Baran 2003).

2.2.2 VÍAS DE EXPOSICIÓN

Una de las principales vías de exposición a vanadio es la enteral, dado que el agua de bebida y algunos alimentos contienen este metal en concentraciones menores a 1 µg/L y 1ng/g respectivamente (Barceloux 1999; IPCS 2001; Mukherjee *et al.* 2004). Algunos alimentos ricos en vanadio son: los cereales, ciertos vegetales, frutos y hongos. Particularmente los alimentos que provienen del mar como pescados y mariscos contienen altas concentraciones de vanadio comparado con otros alimentos (Barceloux 1999). Se ha estimado que el total de vanadio ingerido debido a la dieta es de 11-30 µg/día (IPCS 2001).

Por otro lado, la vía inhalada constituye la más importante para la población general, ya que grandes cantidades de este metal, (aproximadamente 64,000 toneladas) se emiten anualmente a la atmósfera (IPCS 2001). El vanadio que se encuentra en el aire se libera desde fuentes naturales como aerosoles marinos, polvos continentales y erupciones volcánicas. Estas fuentes contribuyen con 8.4 toneladas de vanadio al año, que equivale al 10% del vanadio atmosférico, el 90% restante se emite debido a actividades de la industria metalúrgica y la quema de combustible fósil y carbón (ATSDR 1992; Barceloux 1999; IPCS 2001; Fortoul *et al.* 2002) ya que este metal se encuentra en altas concentraciones (> 50%) en muchos tipos de petróleos incluyendo los de Venezuela, Irak, Irán, Kuwait y el Golfo de México. Esta actividad genera 58,500 toneladas de las 64,000 generadas cada año (Barceloux 1999; IPCS 2001; Fortoul *et al.* 2002). El vanadio proveniente de estas fuentes, se libera en forma de vapores y polvos, principalmente V₂O₅ (ATSDR 1992; Barceloux 1999).

Existe una variación en la concentración de vanadio en la atmósfera, en este contexto, las ciudades presentan concentraciones más altas de este metal, con respecto a las zonas rurales (Barceloux 1999). En el caso de la ciudad de México, Riveros-Rosas y cols. (1997) estimaron una concentración de 23±12ng/m³ de vanadio en el aire.

Sin embargo, la mayor exposición a vanadio se produce durante su manejo industrial y en las operaciones de mantenimiento y limpieza de calderas, dada la presencia de vapores y óxidos de vanadio (ATSDR 1992; IPCS 2001). Debido a la toxicidad de éste, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha determinado que los límites de exposición para polvos de V_2O_5 sea de 0.5 mg/m^3 , y para vapores de V_2O_5 0.1 mg/m^3 en una jornada laboral de 8 horas. Asimismo, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomienda que el límite de exposición a vapores y polvos de V_2O_5 sea de 0.05 mg/m^3 por un tiempo de 15 minutos (ATSDR 1992; OSHA 2005). Pese a los límites sugeridos por éstas instituciones para ambientes laborales, principalmente durante la limpieza de calderas, es frecuente encontrar personal expuesto a concentraciones de $50\text{-}100 \text{ mg V/m}^3$ e incluso hasta 500 mg V/m^3 (IPCS 1988; Barceloux 1999)

2.2.3. TOXICOCINÉTICA Y TOXICODINAMIA

La toxicidad de este metal depende de una variedad de factores que incluyen: la vía de administración, el tipo de compuesto, la concentración, el tiempo de exposición y la sensibilidad del órgano donde se encuentre (Mohammad *et al.* 1992; Mukherjee *et al.* 2004). En lo que se refiere a la vía de exposición, los compuestos de vanadio son poco tóxicos cuando se administran por vía oral, debido a que el metal se absorbe poco en el tracto gastrointestinal. En contraste, los compuestos administrados por vía inhalada son más tóxicos debido a que éstos alcanzan rápidamente el torrente sanguíneo (Nriagu 1998; Barceloux 1999). Además, la toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta con las valencias, por lo que los compuestos pentavalentes son los más tóxicos dado que son más reactivos (IPCS 2001; Baran 2003). Así mismo, los óxidos son más tóxicos que las sales de vanadio (García-Guevara 1996). Por lo anterior, el compuesto más tóxico que puede formar este metal es el pentóxido de vanadio (V_2O_5) (Nriagu 1998; Barceloux 1999; IPCS 2000; IPCS 2001; Baran 2003). Éste último al igual que otros compuestos de vanadio, entran en contacto con los organismos mediante las diferentes superficies epiteliales del tracto digestivo, aparato respiratorio o de la piel, dependiendo la vía de exposición. Cuando el vanadio atraviesa los epitelios es absorbido y llega al torrente sanguíneo de donde se distribuye a los diferentes órganos (Gutiérrez-Ruiz y Fortoul 2004).

La absorción de los compuestos de vanadio depende de su solubilidad y de la ruta de entrada (Barceloux 1999), en este contexto, la piel constituye la menor ruta de absorción debido a la baja solubilidad del vanadio metálico (IPCS 2001; Barceloux 1999). Por otro lado, mediante la vía enteral, los compuestos de vanadio como el vanadil o el vanadato contenidos en algunos alimentos y el agua, son pobremente absorbidos por el tracto gastrointestinal, en rangos de 0.1-1% del vanadio ingerido (IPCS 2001). Mediante esta vía, el vanadato se transforma a vanadil en el estomago y permanece en esa forma en el duodeno, donde posteriormente es absorbido (Barceloux 1999; IPCS 2001; Mukherjee *et al.* 2004).

En cuanto a la vía inhalada, esta es la mayor ruta de absorción, dado que los compuestos solubles como el pentóxido de vanadio (V_2O_5) son bien absorbidos por los pulmones, mediante los cuales alcanza rápidamente el torrente sanguíneo (Barceloux 1999). Aunque no se ha determinado un rango de absorción por esta vía, existen diversos estudios en personal ocupacionalmente expuesto y en modelos animales que ofrecen evidencias indirectas de la absorción del vanadio por vía inhalada (Gylseth *et al.* 1979; Kiviluoto 1980; Orris *et al.* 1983; ATSDR 1992; IPCS 2000). Por ejemplo, en personal ocupacionalmente expuesto a concentraciones menores a 1 partícula por millón (ppm) de vanadio, se observó un incremento del metal en la orina y suero (Gylseth *et al.* 1979; Kiviluoto 1980; Orris *et al.* 1983). Asimismo, mediante la administración intratraqueal de compuestos solubles de vanadio a ratas se observó que este elemento se deposita en los pulmones donde es rápidamente absorbido. Lo anterior fue comprobado por otro estudio realizado en ratas a las que se les administró cloruro de vanadil marcado radiactivamente (ATSDR 1992; Conklin *et al.* 1982). Además Edel y Sabbioni (1988) observaron que el 80% y 85% de vanadio tetravalente y pentavalente respectivamente, se absorbió en los pulmones de ratones, 3 horas después de su administración vía intratraqueal. En ratas macho, se apreció que más del 50% de vanadil oxicluro fue absorbido por los pulmones después de 24 horas de exposición (Oberg *et al.* 1978), y en ratas hembra, el 90% del pentóxido de vanadio fue eliminado de los pulmones a los 3 días posteriores a su administración (Conklin *et al.* 1982).

Una vez que el vanadio llega al torrente sanguíneo es reducido a vanadil, la forma más estable del vanadio, la cual predomina también en fluidos intracelulares. Una parte del vanadio en la sangre permanece además como metavanadato debido a que las altas concentraciones de oxígeno en este medio promueven la formación de vanadio

presenta actividad GTPasa análoga a la que se encuentra en las subunidades alfa y beta tubulinas, debido a esta característica podría estabilizar y desestabilizar los microtúbulos al γ -TuRC en el centrosoma (Joshi *et al.* 1992).

En lo que se refiere a la formación de los microtúbulos a partir del γ -TuRC, se han propuesto dos modelos para explicar este proceso. El modelo del protofilamento, planteado por Erickson y Stoffer (1996) sugiere que 16 subunidades de gamma tubulina unidas longitudinalmente forman un filamento corto que constituye el γ -TuRC, el cual actúa como centro desde el cual los protofilamentos de alfa y beta tubulina crecen lateralmente (Moritz *et al.* 1995b; Vinh *et al.* 2002) (Fig. 1). Basados en estudios previos, en los cuales se propone que la alfa y beta tubulinas así como la FtsZ forman anillos laterales a los microtúbulos y debido a la similitud de estas proteínas con la gamma tubulina, los autores han propuesto que ésta última podría formar anillos compuestos por protofilamentos longitudinales similares a los observados para la alfa y beta tubulinas y FtsZ, además se propone que los anillos del complejo γ -TuRC se orientan hacia la pared de los microtúbulos, como se observa en la figura 1. (Erickson y Stoffer 1996; Erickson 2000). Este modelo ha sido sustentado recientemente dado que se ha encontrado que la gamma tubulina puede establecer contacto lateral con la beta tubulina (Leguy *et al.* 2000) Sin embargo, actualmente la evidencia en cuanto a este modelo es limitada.

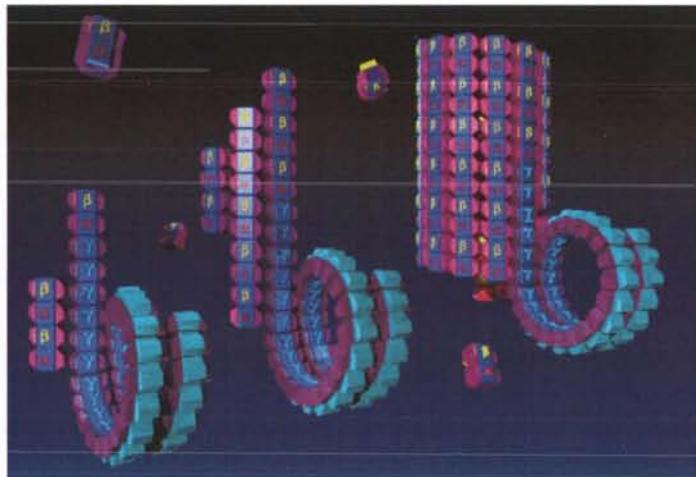


Figura 1. Modelo del protofilamento. El γ TuRC corresponde a un anillo de 16 subunidades de gamma tubulina conectadas longitudinalmente, algunas de las cuales se asocian lateralmente con el dímero de α y β -tubulina (Erickson y Stoffer 1996).

pentavalente. Aproximadamente el 90% del vanadio en la sangre reside en el plasma donde el vanadil y vanadato son transportados por albúmina y transferrina respectivamente (Barceloux 1999; Mukherjee *et al.* 2004).

Seguido al transporte por el plasma, el vanadio se distribuye a los diferentes tejidos y órganos en aproximadamente 1-1 ½ horas (Barceloux 1999), por lo que la concentración del metal en la sangre disminuye rápidamente (Mukherjee *et al.* 2004). Las concentraciones más altas aparecen inicialmente en riñón, hígado, bazo, pulmones, corazón, músculo, tejido adiposo y hueso, siendo este último el principal sitio de almacenamiento para el vanadio absorbido, donde este metal desplaza al fósforo y calcio. El vanadio también se ha encontrado en menor concentración en cerebro, ovarios y testículo (Nechay 1984; ATSDR 1992; Zaporowska y Scibior 1998; Barceloux 1999; IPCS 2001). Se ha reportado que el vanadio atraviesa la barrera placentaria y hematotesticular (Parker *et al.* 1980; ATSDR 1992).

El vanadio que se acumula en el medio extracelular (VO_3^-), en los tejidos o en el plasma, entra a las células mediante canales iónicos inespecíficos o por difusión pasiva, cuando las partículas de vanadio son pequeñas e hidrofóbicas (Nechay 1984; Zaporowska y Scibior 1998).

La mayor parte del vanadio absorbido (40-60%), es eliminado mediante la orina, la cual constituye la principal vía de eliminación del metal. El vanadio restante se elimina vía bilis y heces, las cuales son una ruta secundaria de excreción ya que mediante ellas se eliminan rangos menores al 10% (Mukherjee *et al.* 2004). La excreción de este metal, es rápida, la eliminación sigue un comportamiento bifásico, con una primera fase de eliminación rápida (10-20 horas) y una fase lenta (40-50 días), la cual probablemente refleje la eliminación gradual del vanadio en los órganos (Barceloux 1999; IPCS 2001).

2.2.4 EFECTOS DEL VANADIO EN LA SALUD

Los efectos en la salud humana producidos por la exposición a vanadio, se han observado principalmente en personal ocupacionalmente expuesto. Debido a que la principal vía de entrada de este metal en el ambiente laboral es la inhalada, los efectos en las vías respiratorias han sido ampliamente documentados. A este respecto, se ha reportado que la exposición crónica a óxidos de vanadio (principalmente trióxido o pentóxido) produce, irritación del epitelio nasal y tracto respiratorio, hemorragia nasal y pulmonar, además produce rinitis, bronquitis, broncoespasmo, disnea, dolor de garganta y pecho, asma bronquial y neumonía (Baghavan 1983; Mohammad *et al.* 1992; ATSDR 1995; IPCS 2001; Baran 2003).

Otros efectos del vanadio se observan a nivel del tracto gastrointestinal. La intoxicación mediante la ingesta de vanadio produce dolor. Es característico que la ingestión de vanadio produzca una coloración negra verdosa en la lengua (Bhagavan 1983; Mohammad *et al.* 1992).

Por otro lado, la intoxicación crónica por vanadio produce alteraciones en el sistema cardiovascular, como arritmia sinusal, bradicardia y espasmo coronario (IPCS 2000). Además se ha reportado que este metal produce daños a nivel de sistema nervioso manifestados por temblores y depresión del sistema nervioso central (Done 1979).

2.2.5. EFECTOS DEL VANADIO A NIVEL CELULAR

Debido a su gran similitud química con el fosfato, el vanadio puede interferir con diversos sistemas enzimáticos como la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, la H-K-ATPasa y $\text{Ca}^+\text{-Mg}^+\text{-ATPasas}$, las cuales son inhibidas en presencia de este metal (Baghavan *et al.* 1983; Nechay 1984). El vanadio también inhibe enzimas involucradas en la formación e hidrólisis de ATP, como la adenilato cinasa y la ATP fosfohidrolasa (Nechay 1984). Además puede interferir en procesos metabólicos como la glucólisis, al inhibir a las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato. Otras enzimas que son inhibidas por el vanadio son las ribonucleasas y ADN polimerasas de manera que el metal produce daños a nivel de síntesis de ADN (Barceloux 1999; Nechay 1984). Asimismo, el vanadio inhibe las proteínas

tirosina fosfatasas (PTP) como la cdc25, la cual es necesaria para la progresión del ciclo celular (Morinville 1998).

Por otra parte, se ha reportado que el vanadio altera el balance entre oxidantes y antioxidantes en las células provocando estrés oxidativo. Algunas formas del vanadio como el vanadil y vanadato funcionan como radicales libres y participan en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las principales vías por las cuales se generan ROS son: el transporte de electrones que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial y el complejo NADPH oxidasa. Los electrones transferidos por estas vías al oxígeno molecular (O_2) inducen la producción del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual a su vez genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la dismutación llevada a cabo por la superóxido dismutasa (SOD). Esta especie finalmente genera el radical hidroxil ($\cdot OH$) vía la reacción de Fenton ($V(IV) + H_2O_2 \rightarrow V(V) + \cdot OH + \cdot OH$) (Martínez-Cayuela 1998; Nechay 1984; Zhang *et al.* 2001). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son poco tóxicos, sin embargo generan el radical $\cdot OH$, el cual es una de las especies más tóxicas ya que reacciona rápidamente con cualquier molécula (Martínez-Cayuela 1998).

Los radicales libres y ROS provocan la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, carbohidratos y alteraciones sobre el ADN (Nechay 1984; Zhang *et al.* 2001). El estrés oxidativo causado por el vanadio produce un efecto mayor debido a que este metal además disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH) y la catalasa en varios órganos, principalmente en hígado y riñón (Ruslanov *et al.* 1994).

Por otro lado, el efecto carcinogénico o antineoplásico del vanadio ha sido debatido ampliamente. En este contexto, Thompson y cols. (1984) proponen que el $VOSO_4$ vía oral, reduce la incidencia de cáncer en ratas hembras tratadas con el cancerígeno 1-metil-1-nitrosourea. Sin embargo, otros autores sugieren que el vanadio es un agente carcinogénico, por ejemplo, Chatterjee y Bishavee (1998) reportan un incremento en la incidencia de hepatocarcinomas al administrar vanadato de amonio vía oral. Estudios recientes realizados con pentóxido de vanadio vía inhalada muestran la formación de carcinomas y adenomas tipo A y B en pulmones de ratones expuestos (Ress *et al.* 2003).

El efecto carcinogénico del vanadio se ha atribuido a las alteraciones que produce sobre el ADN y proteínas del citoesqueleto, principalmente las involucradas en la formación

del huso mitótico (Roldan y Altamirano 1990; Migliore 1993; Leonard y Gerber 1994; Zhong *et al.* 1994; Thompson y Perry 1998). En este contexto, se ha reportado que algunas sales de vanadio como el metavanadato, ortovanadato y vanadil (Cande y Wolniak 1978), así como el pentóxido de vanadio (Sun 1987; Migliore 1993; Zhong *et al.* 1994) producen un incremento en la incidencia de micronúcleos e inhiben el movimiento de los cromosomas durante la anafase en las líneas celulares PtK1, V79 y de médula ósea. Otras sales como el metavanadato de amonio producen también aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Owusu-Yaw *et al.* 1990). Así mismo, Roldán y Altamirano (1990), reportaron que el pentóxido de vanadio en linfocitos humanos, incrementa la frecuencia de células poliploides, las asociaciones satelitales y disminuye el índice mitótico, estos resultados son apoyados por Zhong y cols. (1994) quienes reportan que el mismo compuesto produce arresto mitótico. Tales alteraciones han sido atribuidas a daños en el huso mitótico (Owusu-Yaw *et al.* 1990; Roldán y Altamirano 1990; Zhong *et al.* 1994). Asimismo Thompson y Perry (1988) y Zhong y cols. (1994) han sugerido que el efecto aneuploidogénico y carcinogénico del vanadio se debe a daños sobre esta estructura. Además Navara y cols. (2001) observaron en líneas celulares (BT-20 y U373) que el vanadocenodichloro y vanadoceno acetilacetato, producen un incremento en el número de arrestos de la fase G2/M, lo cual se atribuye a daños sobre el huso mitótico, en este mismo estudio reportan husos monopolares, por lo cual sugieren que el vanadio produce daño sobre el centrosoma al interferir con la separación de esta estructura antes de iniciar la división celular.

Por otra parte, los microtúbulos son estructuras sensibles a este elemento, por ejemplo, el tratamiento con V_2O_5 y vanadato altera la polimerización de la α y β -tubulinas, el mecanismo por el cual se produce este daño se desconoce, sin embargo, se ha propuesto que puede provocar un cambio conformacional sobre las tubulinas y alterar su estructura al interactuar con los sitios sulfhidrilos o competir con el fosfato por los sitios de unión de estas proteínas afectando así la cinética de polimerización y la formación de los microtúbulos (Kirazov y Weiss 1986; Ramírez *et al.* 1997).

Por otro lado, algunos compuestos del vanadio como el vanadato, son capaces de inhibir la actividad de proteínas motoras como la dineína y miosina a concentraciones de 1-10 μ M (Kirazov y Weiss 1986). Por ejemplo, se ha reportado en diversos estudios realizados en cultivos de células epiteliales, de traquea, en organismos ciliados y células flageladas, que el vanadato y el metavanadato alteran la función y cinética de la dineína ATPasa, así

como su unión con las proteínas de los microtúbulos, lo cual resulta en la inhibición del movimiento de cilios y flagelos. (Cande y Wolniak 1978; Gibbons *et al.* 1978; Sale y Gibbons 1979; Okuno 1980; Anderson y Purich 1982; Shimizu y Johnson 1983; Nechay 1984; Gibbons *et al.* 1987). Se ha sugerido que debido a la similitud química del vanadio con el fosfato, el metal puede formar un complejo enzima-ADP-Vanadato, que induce la disociación de la unión dineína-microtúbulos (Shimizu y Johnson 1983), así mismo se ha sugerido que el vanadio interactúa con las cadenas alfa y beta de la enzima, alterando su estructura y función (Gibbons *et al.* 1987). Las alteraciones producidas por el vanadio sobre las proteínas del citoesqueleto se han sugerido como probables causas de la reprotoxicidad de este metal, por lo que resulta de gran importancia estudiar sus efectos a nivel reproductivo.

2.2.6. REPROTOXICIDAD

Los efectos del vanadio sobre el testículo son diversos y dependen de la concentración, del tipo de compuesto, del tiempo y la vía de exposición (Domingo 1996). Por ejemplo, el tratamiento con sulfato de vanadio administrado por la vía intraperitoneal produce decremento en el peso testicular y necrosis en células germinales, mientras que por la vía subcutánea produce pérdida de peso testicular pero no muerte celular por necrosis (Kamboj y Kar 1964). En cuanto a la vía de exposición, se ha reportado que el vanadio es más tóxico para el testículo cuando se administra vía intraperitoneal o intratesticular que cuando se administra vía oral, mediante ésta última vía se requieren dosis más altas a las que una persona está expuesta mediante la dieta para producir efectos reprotóxicos (Domingo 1996). En cuanto a los efectos de este metal vía inhalada, no existen datos al respecto.

El efecto reprotóxico del vanadio se ha reportado en modelos animales, en los cuales se ha observado que compuestos como el metavanadato de sodio y amonio, así como el pentóxido y tetraóxido de vanadio administrados vía oral e intraperitoneal respectivamente, producen decremento en el peso testicular y alteraciones en la espermatogénesis tales como decremento en el conteo espermático. Además estos compuestos, disminuyen la fertilidad y fecundidad, ya que provocan decremento en el número de implantaciones e incremento en la frecuencia de reabsorciones y de fetos con bajo peso en hembras preñadas por machos expuestos al metal (Llobet *et al.* 1993; Altamirano-Lozano *et al.* 1996; Aragón y Altamirano-Lozano 2001; Morgan y El-Tawil 2003). El tratamiento con pentóxido de

vanadio, produce asimismo, alteraciones morfológicas en la cabeza de los espermatozoides y decremento en la movilidad de los mismos (Altamirano-Lozano *et al.* 1996).

Otros compuestos orgánicos del vanadio como los vanadocenos, administrados vía intratesticular, producen atrofia y alteraciones a nivel del epitelio seminífero, como la pérdida de espermátides maduras, vacuolización, multinúcleos y apoptosis en células germinales, lo cual se atribuye a alteraciones en los puentes citoplásmicos que existen entre estas células y a daños en las células de Sertoli. Se ha sugerido además, que estas alteraciones son el resultado de daño sobre el citoesqueleto, y los procesos que de él dependen (D'Cruz y Uckun 2000).

Por otro lado, el vanadio produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan la membranas celulares mediante peroxidación lipídica. Particularmente, los espermatozoides son susceptibles al daño oxidativo debido a que presentan gran cantidad de ácidos grasos y una reducida cantidad de enzimas antioxidantes citoplásmicas (Álvarez *et al.* 1987; Sheriff 1991; D'Cruz *et al.* 1998). El daño oxidativo sobre la membrana de los espermatozoides es un mecanismo patofisiológico que conduce al desarrollo de infertilidad masculina (Aitken y Fisher 1994).

2.3 TESTÍCULO.

El testículo es un órgano par responsable de la producción de espermatozoides y andrógenos. Cada testículo está formado por un epitelio seminífero compuesto por dos poblaciones básicas de células: las germinales y las de Sertoli. Así mismo, los túbulos seminíferos se encuentran rodeados por tejido intersticial laxo y altamente vascularizado e innervado, el cual se deriva de la túnica vascular. En este sitio se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos, elementos del tejido conectivo y grupos de células endocrinas o de Leydig (Ross *et al.* 1998; Holstein *et al.* 2003).

2.3.1 CÉLULAS GERMINALES

Se encuentran dentro de los túbulos seminíferos en diferentes estados de maduración, durante la espermatogénesis se dividen y diferencian a espermatozoides. Este proceso se divide en tres fases, la fase de espermatogonias, en la cual las células precursoras (espermatogonias tipo A oscuras), se dividen para formar una célula precursora de reemplazo y para formar una población de espermatogonias (espermatogonias tipo A claras) que sufren numerosas divisiones mitóticas para incrementar su población. El proceso de división de estas células es sumamente ordenado, cada célula hija permanece conectada a través de un puente citoplasmático que se mantiene hasta los últimos estadios de maduración de las espermátides, estas conexiones son esenciales para el desarrollo sincrónico de cada clon de espermatogonias A claras. Después de varias divisiones estas células se diferencian a tipo B las cuales representan el último paso de la fase de espermatogonias. Posteriormente, las espermatogonias tipo B sufren una división mitótica que origina la producción de espermátocitos primarios ($2n$), a continuación se produce la reducción de juegos cromosómicos mediante la primera división meiótica por la cual se forman los espermátocitos secundarios, los cuales experimentan la segunda división meiótica para convertirse en espermátides haploides (n). Durante la fase de espermátides, éstas se diferencian a espermatozoides, mediante la eliminación de gran parte de su citoplasma, el reordenamiento de sus organelos y la formación del flagelo (Ross 1998; Zhang 1999; Holstein *et al.* 2003).

En estas células en particular, el centrosoma y los componentes del citoesqueleto principalmente los microtúbulos, son importantes, debido a que forman los polos y el huso meiótico y mitótico (Duensing y Münger 2001; Meraldi y Nigg 2002; Alsop y Zhang 2003; Shcoley *et al.* 2003). Además, los microtúbulos permiten los cambios de forma durante la diferenciación y junto con elementos del centrosoma como los centriolos y la gamma tubulina, forman el flagelo de los espermatozoides (Lewis y Cowan 1988; Rieder *et al.* 2001; McKean *et al.* 2003). Asimismo la gamma tubulina permanece en el espermatozoide en algunas especies no roedoras como la humana y la bovina y podría contribuir con la formación del centrosoma durante la fecundación (Félix *et al.* 1994; Simerly *et al.* 1999; Manandhar *et al.* 2005).

2.3.2 CÉLULAS DE SERTOLI

Son células somáticas del testículo que se extienden desde la membrana basal hasta la luz de los túbulos seminíferos. Rodean y sostienen a las células germinales y mantienen un ambiente adecuado para su desarrollo. Las uniones ocluyentes entre células de Sertoli adyacentes, forman la barrera hematotesticular, la cual divide el espacio basal del adluminal, protegiendo de esta manera a las células germinales haploides de la respuesta del sistema inmune y evitando el paso de xenobióticos al interior de los túbulos (Steinberger y Klinefelter 1993).

Estas células además, mantienen la organización estructural dentro de los túbulos seminíferos, son el soporte físico, paracrino y nutricional de las células germinales (Vogl 1988; Ross 1998; Zhang 1999).

El movimiento de organelos y moléculas al interior de las células de Sertoli, la secreción polarizada de metabolitos, proteínas, factores paracrinos y moléculas de adhesión asociadas a las células germinales, así como el soporte estructural, el movimiento de las células espermatógenas dentro del epitelio seminífero y el desarrollo y formación simétrica de las espermátides y los núcleos de los espermatozoides son funciones dependientes de microtúbulos (Fleming *et al.* 2003a), por lo que la integridad de esta red de filamentos es necesaria para que se lleve a cabo la espermatogénesis normal (Russell *et al.* 1981; Vogl *et al.* 1983; Lewis y Cowan 1988; Allard *et al.* 1993).

2.3.3 CÉLULAS DE LEYDIG

Las células de Leydig se localizan agrupadas en el tejido intersticial fuera de los túbulos seminíferos. Al igual que las células de Sertoli, se unen entre si por uniones GAP las cuales están involucradas en el control del crecimiento celular, diferenciación y cooperación metabólica ya que permiten el intercambio de moléculas de bajo peso molecular, segundos mensajeros como AMPc, y iones Ca⁺ que pasan a través de canales permeables que crean estas uniones (Saez 1994). Las células de Leydig se dividen o diferencian en respuesta al estímulo de la hormona luteinizante (LH). En animales sexualmente maduros, existe un equilibrio en su número por lo que estas células no se ven en división. Sin embargo, el

recambio normal o provocado por un daño induce la formación de nuevas células de Leydig a partir de la diferenciación de células precursoras como las mesenquimales y peritubulares. En estudios realizados en ratas se ha observado que la renovación de células de Leydig en adultos es más frecuentemente dependiente de la diferenciación de células precursoras que de la división de células de Leydig preexistentes (Christensen 1975; Christensen y Peacock 1980; Chemes *et al.* 1985; Saez 1994).

Las células de Leydig son el principal sitio de producción de testosterona, hormona que regula el comportamiento en el hombre, promueve la aparición de las características sexuales secundarias y por retroalimentación negativa inhibe la secreción de gonadotropinas hipofisarias, además estimula la espermatogénesis y la diferenciación de los espermatoцитos a espermátides (Saenz 1994; Holdcraft y Braun 2004). La liberación de LH por la hipófisis, estimula la producción de testosterona, la cual se sintetiza a partir del colesterol almacenado en el citoplasma de las células de Leydig, éste se transporta al interior de las mitocondrias, donde sirve de sustrato a enzimas como la P450, la adrenoxina y la adrenoxina reductasa que transfieren electrones para reducir el colesterol a pregnenolona, 17-hidroxipregnenolona, dehidroepiandrosterona y para formar finalmente testosterona (Saez 1994; Hall 1995). El grado de síntesis de testosterona está regulado por el transporte de colesterol a la mitocondria, el cual está controlado por elementos del citoesqueleto principalmente, microfilamentos y filamentos intermedios (Rainey *et al.* 1985; Saez 1994), bajo un estímulo dado por la Ca^{+} /calmodulina; ATP y AMPc, (Hall 1995; Bilinska *et al.* 1997). Sin embargo ha sugerido que los microtúbulos pueden desempeñar un papel importante en la esteroidogénesis, ya que se ha reportado que estas estructuras se encuentran asociados al colesterol y que su disociación estimula el transporte de colesterol a la mitocondria (Rainey *et al.* 1985).

Muchas de las funciones de las células testiculares tanto somáticas como germinales dependen de los microtúbulos, los cuales se forman a partir del centrosoma, por lo cual la integridad de ésta estructura es necesaria para que se lleve a cabo una espermatogénesis normal (Russell *et al.* 1981; Vogl *et al.* 1983; Lewis y Cowan 1988; Allard *et al.* 1993; Fleming *et al.* 2003a).

2.4. CENTROSOMA

El centrosoma es un organelo citoplásmico sin membrana, formado por un par de centriolos y la matriz pericentriolar (PCM) (Duensing y Münger 2001; Meraldi y Nigg 2002; Blagden y Glover 2003). En células animales, los microtúbulos crecen a partir de un centro organizador de microtúbulos (MTOC) que se encuentra inmerso en la matriz pericentriolar, de manera que el centrosoma mediante el MTOC, determina el origen de crecimiento de los microtúbulos en interfase y durante la división celular y participa en las funciones que estos desempeñan (Schnackenberg *et al.* 1998; Meraldi y Nigg 2002; Nédélec *et al.* 2003).

La duplicación y segregación de este organelo es un proceso altamente controlado y sincronizado con la duplicación del genoma y el ciclo celular. En interfase, el centrosoma se localiza en la proximidad del núcleo, muy cerca de la superficie externa de la envoltura nuclear, donde regula las funciones de los microtúbulos durante esta fase. Al inicio de la fase S la cinasa cdc-2 asegura que la duplicación del centrosoma y la síntesis del ADN se efectúen de forma sincrónica, además en esta fase se forma uno de los centriolos, dado que el restante ya se ha sintetizado en la fase G1. Posteriormente durante la fase de maduración, las proteínas que forman la matriz pericentriolar se sintetizan y agrupan en ella, principalmente las que componen el complejo anular de gamma-tubulina (γ -TuRC), asimismo la gamma tubulina incrementa su concentración hasta 5 veces y aumenta la formación de microtúbulos. La separación de los centrosomas duplicados requiere la participación de los microtúbulos y proteínas motoras. Los centrosomas duplicados migran a cada extremo de la célula en división y forman los dos polos del huso así como los microtúbulos del aparato mitótico, además dirigen la segregación de los cromosomas y los movimientos que se realizan durante la división celular. Posteriormente a la citocinesis, cada célula hija permanece con un centrosoma para iniciar un nuevo ciclo de división celular (Duensing y Münger 2001; Meraldi y Nigg 2002).

Además de formar los microtúbulos, se ha reportado que el centrosoma participa en la citocinesis. A este respecto, Piel y cols. (2001) observaron que un 50% de células BSC-1 acentrosomales presentaron defectos en la citocinesis, ya que se observaron células conectadas por puentes citoplásmicos que posteriormente se fusionaron formando células binucleadas. Estos resultados se corroboran con los encontrados por Khodjakov y Rieder (2001) quienes en células PtKG-23 acentrosomales observaron células binucleadas, lo cual

ha sido atribuido a la pérdida de microtúbulos astrales que resulta de la falta de centrosoma el cual organiza y mantiene el arreglo de estos filamentos y asegura la citocinesis normal.

Por otro lado, se ha observado que este organelo es necesario para la progresión del ciclo celular, ya que células CVG acentrosomales se arrestan durante la interfase, antes de iniciar la fase S (Khodjakov y Rieder 2001). Estos resultados son apoyados por lo reportado por Maniotis y Schliwa (1991) y Hinchcliffe y cols. (2001) quienes observaron, que las células BSC-1 sin centrosoma no entran en mitosis, sin embargo, cuando se elimina el centrosoma antes de terminar la fase S, entran y completan la mitosis, no obstante las células postmitóticas se arrestan antes de la fase S. Por lo anterior se ha sugerido que el centrosoma es necesario para la progresión en el ciclo celular de la fase G_1 a S (Khodjakov y Rieder 2001), pero no es necesario para la transición G_2/M (Hinchcliffe *et al.* 2001).

Asimismo, el centrosoma participa en el mecanismo de respuesta de daño al ADN, lo cual resulta en la inactivación del organelo y consecuentemente en el bloqueo de la segregación cromosómica y la citocinesis. Además puede integrar una red de señales que monitorean la división celular, ya que en el se localizan proteínas sensoras de daño al ADN, supresoras de tumores y otros componentes que regulan el ciclo celular y la apoptosis (Duensing y Mürger 2001).

Aunque el centrosoma es necesario para la formación de un huso bipolar, se ha descrito una vía independiente de este organelo, sin embargo parece ser un mecanismo menos regulado que puede resultar en alteraciones en la citocinesis (Duensing y Mürger 2001). Para que la célula pueda entrar en mitosis, se requiere un centrosoma intacto (Hinchcliffe *et al.* 2001). Cualquier alteración numérica estructural o funcional del centrosoma puede interferir con la formación de un huso bipolar, y producir daños en la segregación cromosómica y aneuploidías asociadas con el desarrollo de procesos neoplásicos (Duensing y Mürger 2001; Mayer *et al.* 2003; Meraldi y Nigg 2002). A este respecto se ha observado que el daño en los componentes de la matriz pericentriolar es suficiente para causar dichas alteraciones (Duensing y Mürger 2001).

Uno de los principales componentes del centrosoma es la gamma tubulina, la cual ha tomado importancia en los últimos años, ya que es un elemento clave para el funcionamiento de éste organelo.

2.5 GAMMA TUBULINA

La gamma tubulina, es una proteína constitutiva que pertenece a la familia de las tubulinas y comparte aproximadamente entre el 30% y el 35% de identidad con la alfa y beta tubulinas, lo cual sugiere que estas proteínas derivan de un ancestro común (Wise *et al.* 2000). Fue descubierta por Oakley en 1989, en *Aspergillus nidulans*. Actualmente, se considera una proteína universal y altamente conservada, ya que se ha detectado en una gran variedad de organismos, desde levaduras hasta el hombre (Oakley 1992; Joshi *et al.* 1992; Moritz *et al.* 1995a; Dutcher 2001; Vinh *et al.* 2002). Así mismo, se descubrió una probable forma ancestral de esta proteína en bacterias, la cual se denominó FtsZ (Penisi 1998).

Se han identificado dos genes funcionales de la gamma tubulina, *TUBG1* y *TUBG2* en células humanas (HeLA). Las proteínas codificadas por estos genes comparten el 97.3% de identidad y difieren en su secuencia por 12 aminoácidos. La presencia de dos genes que codifican para la misma proteína sugiere la importancia de la misma para la viabilidad celular y por otro lado, constituye una ventaja para las alteraciones producidas por mutaciones (Oakley y Akkari 1999; Wise *et al.* 2000).

2.5.1 LOCALIZACIÓN

La gamma tubulina se encuentra principalmente en los centros organizadores de microtúbulos (MTOC) en los diferentes grupos de organismos. En las células animales, se localiza en el centrosoma, aunque se ha reportado en células somáticas de vertebrados, que solo el 20% de la proteína se localiza en este organelo y que el 80% restante se encuentra en complejos solubles en el citoplasma celular (Oakley y Akkari 1999; Schiebel 2000; Sulimenko *et al.* 2002).

Dentro del centrosoma, en la matriz pericentriolar, la gamma tubulina forma complejos anulares denominados γ -TuRC. En mamíferos, la principal subunidad de este complejo se denomina complejo pequeño de gamma tubulina (γ -TuSC) y es un tetrámero que comprende dos unidades de gamma tubulina y las proteínas GCP2 y GCP3. La estructura del anillo γ -TuRC observada por microscopía electrónica comprende 6 o 7 tetrámeros. Las proteínas

GCP2 y GCP3 estabilizan el complejo al centrosoma al asociarse con la pericentrina A y una isoforma de la pericentrina B mediante su extremo amino (Fig. 2) (Schiebel 2000; Sulimenko *et al.* 2002; Blagden y Glover 2003).

La localización de la gamma tubulina en células animales es altamente regulada a través del ciclo celular. Durante la interfase, se encuentra en la matriz pericentriolar del centrosoma. Al iniciar la mitosis y durante ella, se localiza en los polos del huso, donde dirige la morfogénesis de los microtúbulos del aparato mitótico. Además ha sido identificada en la superficie de los microtúbulos que forman el huso mitótico, predominando en los microtúbulos cinetocóricos (Lajoie-Mazenc *et al.* 1994; Oakley y Akkari 1999). La gamma tubulina aparece en el huso mitótico desde la profase y disminuye su concentración hacia la telofase. En la metafase aproximadamente el 75-85% la proteína se concentra en el huso y solo el 15-25% se localiza en los polos del huso mitótico (Lajoie-Mazenc *et al.* 1994).

2.5.2 FUNCIONES

La gamma tubulina participa en la maduración y activación del centrosoma al inicio de la mitosis, ya que estos procesos corresponden al reclutamiento de la proteína en el centrosoma (Khodjakov y Rieder 2001). Además se ha observado tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, que es necesaria para la formación, estabilización y polarización de los microtúbulos (Joshi *et al.* 1992; Klotz *et al.* 2003). Esta proteína forma los dos polos del huso, los microtúbulos que forman el aparato mitótico y los que dirigirán el movimiento de organelos y proteínas al interior de la célula (Oakley 1992; Lajoie-Mazenc *et al.* 1994).

Además se ha observado que la gamma tubulina participa en la citocinesis ya que se asocia transitoriamente con el cuerpo medio durante la telofase, de manera que colabora además en la regulación de la transición M/G1 (Shu *et al.* 1995). Asimismo, se ha propuesto que esta proteína puede estar involucrada en el punto de control del huso mitótico evitando la segregación de los cromosomas y la citocinesis cuando hay daños a nivel de esta estructura (Hendrickson *et al.* 2001). Por otro lado, estabiliza a los centriolos y sirve como molde durante su replicación (Fuller *et al.* 1995). Asimismo está involucrada en el ensamblaje de los cuerpos basales y axonemas de los flagelos (Joshi *et al.* 1992; Oakley 1992; Moritz *et al.* 1995a; Klotz *et al.* 2003; McKean *et al.* 2003). La gamma tubulina,

En contraste, el modelo del molde o templado propuesto por Zheng y cols. (1995), determina que 13 unidades de gamma tubulina se unen lateralmente para formar el γ -TuRC, el cual funciona como un molde, a partir del cual, se estabilizan, forman y crecen longitudinalmente los 13 protofilamentos que constituyen cada microtúbulo como se observa en la figura 2. Este modelo a diferencia del modelo del protofilamento, ha sido ampliamente documentado (Meads y Schroer 1995; Moritz *et al.* 1995a; Moritz *et al.* 1995b; Zheng *et al.*, 1995; Wiese y Zheng 1999; Moritz *et al.* 2000). A este respecto, Zheng y cols. (1995), localizaron por primera vez mediante microscopía electrónica en extractos de ovocitos de *Xenopus* el complejo γ -TuRC, estructura que forma *in vitro* los microtúbulos desde su extremo negativo. Esto fue corroborado por pruebas de inmunoelectromicroscopía realizadas en centrosomas aislados de embriones de *Drosophila*, mediante lo cual se mostró que la gamma tubulina se localiza en anillos dentro de la matriz pericentriolar (PCM); además, se observó que el diámetro y forma del γ -TuRC es similar a la de los microtúbulos, asimismo se detectó la presencia de gamma tubulina en el extremo negativo de estos filamentos (Moritz *et al.* 1995b; Moritz *et al.* 2000). Se ha sugerido que la gamma tubulina puede interactuar longitudinalmente tanto con la alfa como con la beta tubulina, sin embargo diversos estudios genéticos muestran que la gamma tubulina interactúa con la beta tubulina de los microtúbulos (Oakley *et al.* 1990; Oakley 1992; Fuller *et al.* 1995).

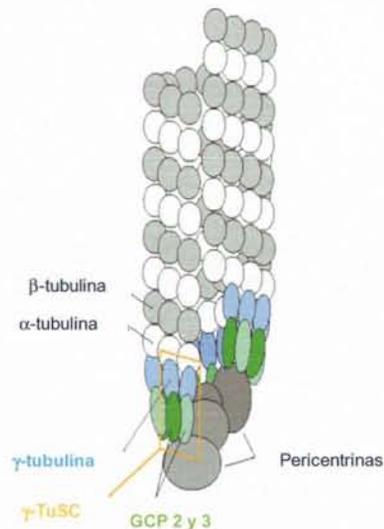


Figura 2. Modelo del molde (Templado). Los microtúbulos se originan y estabilizan a partir del γ -TuRC formado por γ -TuSC, donde las unidades de γ -tubulina se asocian longitudinalmente con el dímero de α y β -tubulina y determinan el arreglo de 13 protofilamentos que forman un microtúbulo (Moritz *et al.* 2000).

Como se mencionó anteriormente, la gamma tubulina es un miembro importante del centrosoma, de manera que el daño a nivel de esta proteína puede resultar en alteraciones sobre éste organelo, así como en la estructura y función del sistema de microtúbulos y en la división celular. A este respecto se ha observado que la supresión del gen que la codifica en *Schizosaccharomyces* y *Aspergillus*, produce la reducción en el número y tamaño de los microtúbulos, la ausencia del huso y arresto mitótico (Joshi *et al.* 1992). Lo cual se corrobora con lo reportado por Oakley (1990) y Lajoie-Manzecz y cols. (1994) quienes al alterar la proteína con anticuerpos específicos observaron la interrupción del crecimiento de los microtúbulos durante la interfase y la formación de un huso no funcional durante la mitosis. Por otro lado, Oakley (1992) observó que la alteración del gen de la gamma tubulina en *Aspergillus*, inhibe la división nuclear, pero no la división celular resultando núcleos poliploides. En contraste Shu y cols. (1995) reportaron que la supresión de esta proteína produce la ausencia del cuerpo medio y células binucleadas al alterar la citocinesis. Asimismo la supresión de esta proteína produce defectos en la formación de cilios y flagelos ya que se altera el arreglo de microtúbulos 9+2 de los axonemas, lo cual produce discinesia en células ciliadas y flageladas (McKean *et al.* 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El vanadio es un elemento que ha tomado importancia como contaminante ambiental en las últimas décadas principalmente en las grandes ciudades. A este respecto, Fortoul y cols. (2002) reportaron un incremento del 23% de vanadio en tejido pulmonar de residentes de la Ciudad de México al hacer la comparación entre la década de los 60's y los 90's. Se ha reportado en animales de laboratorio que la exposición a vanadio, produce efectos reprotóxicos los cuales se asocian con alteraciones en el citoesqueleto. Además, la exposición a este elemento en modelos *in vitro* produce daños a nivel del huso mitótico y consecuencias en la segregación cromosómica. Sin embargo, se desconoce su efecto sobre la gamma tubulina, una proteína clave para el funcionamiento adecuado del centrosoma y el citoesqueleto. Debido a lo anterior y a que alteraciones estructurales, funcionales o numéricas del centrosoma se asocian con el desarrollo de procesos neoplásicos, es importante estudiar los efectos del V_2O_5 , sobre la gamma tubulina mediante un modelo experimental *in vivo* de exposición por inhalación, la cual es la vía de exposición más importante para la población general y sobre la que no existen datos.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Analizar los posibles efectos del V_2O_5 [0.02M], sobre la gamma tubulina de las células del epitelio seminífero y las células de Leydig en un modelo murino de exposición por inhalación.

4.2 PARTICULAR

Determinar las modificaciones sobre la presencia de gamma tubulina en las células germinales, de Sertoli y de Leydig, en un modelo crónico de inhalación, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

5. HIPÓTESIS

Si el V_2O_5 administrado por la vía inhalada produce alteraciones sobre la gamma tubulina de las células testiculares, entonces se observaran variaciones con respecto al control en el porcentaje de células inmunorreactivas a esta proteína.

6. METODOLOGÍA

Para este estudio, se utilizaron ratones macho CD1 de 35 gramos de peso, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Se establecieron dos grupos de 36 ratones cada uno, un grupo control, el cual fue expuesto a vehículo (agua desionizada) y un grupo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02 M, para ello los ratones fueron colocados en una caja de acrílico cerrada y conectada a un ultranebulizador. El tiempo de exposición para ambos grupos fue de 1 hora dos veces por semana, durante 3 meses (Fortoul *et al.* 1999; Avila-Costa *et al.* 2004). Posteriormente a la primera inhalación, un grupo de 3 ratones expuestos y 3 controles se sacrificaron, para observar alteraciones por exposición aguda. Después se sacrificaron cada semana, bajo anestesia con pentobarbital sódico, dosis letal. Los ratones se perfundieron vía intracardiaca con solución salina y posteriormente con fijador de glutaraldehido y paraformaldehido al 2% en buffer de carcodilatos (pH 7.4). A continuación se tomó uno de los testículos se pesó y se colocó en formol al 10% durante 2 horas (Fig. 3). La concentración de vanadio en el testículo se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica, para ello los órganos se trataron como lo describe Fortoul y cols. (2002).

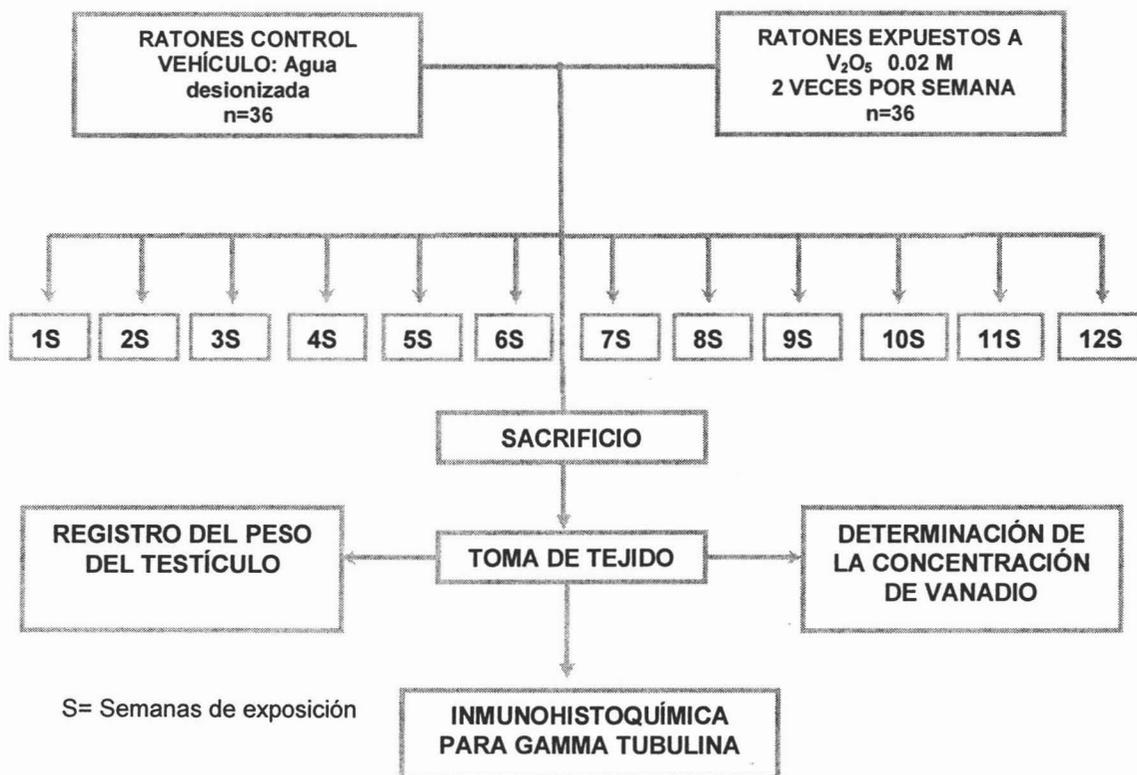


Figura 3. Procedimiento para la obtención del tejido en animales expuestos y controles (n=3 ratones por grupo).

Por otro lado, se realizó la técnica de inmunohistoquímica para determinar el efecto del V_2O_5 sobre la gamma tubulina de células testiculares, para lo cual, los órganos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 3-5 micras, los cuales fueron colocados en laminillas con Poly-L-lisina. Posteriormente, los tejidos se desparafinaron a 56 °C y se colocaron en xilol por 5 minutos, después se hidrataron pasándolos por alcohol absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. A continuación se realizó la técnica de inmunohistoquímica, como se describe en la figura 4.

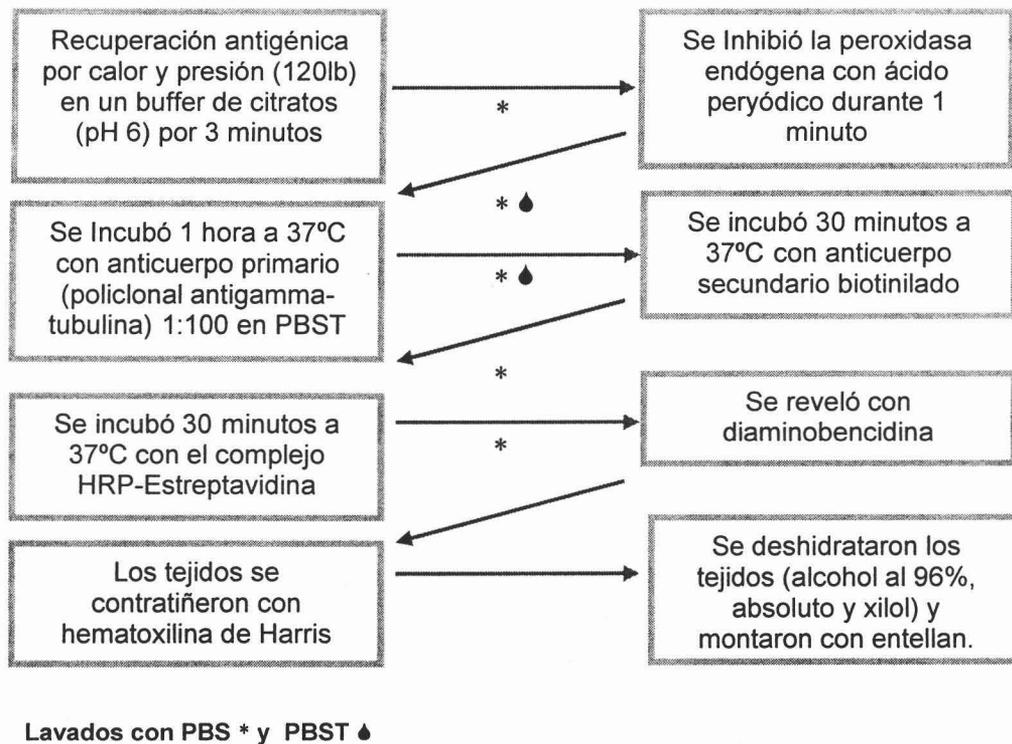


Figura 4. Procedimiento para la inmunohistoquímica de gamma tubulina.

Los tejidos se observaron al microscopio a 400 aumentos. En cada caso se eligieron 5 campos al azar cada uno de $50,625 \mu^2$, en los cuales se contó, mediante una cámara lúcida, el número total de células germinales, de Sertoli y Leydig y de ellas el número de células inmunorreactivas a gamma tubulina para obtener un porcentaje de células positivas. El promedio de células analizadas por campo fue de 283.44 ± 4.69 . Las células inmunorreactivas o positivas a la proteína analizada presentan una marca citoplásmica café.

Por otra parte, para determinar si la concentración de vanadio en el testículo de los animales expuestos difiere significativamente del control se realizó la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la de Tukey, de la misma forma se emplearon estas pruebas para determinar si existe diferencia significativa en el peso del testículo de los ratones expuestos con respecto al control.

Por otro lado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las inhalaciones a V_2O_5 sobre el porcentaje de células testiculares inmunorreactivas a gamma tubulina. Debido a que estos datos no presentaron una distribución normal ni homocedasticidad, se transformaron como $X = \arcseno \sqrt{\%}$ (Zar 1999). Además, se realizó un análisis de Tukey para determinar si el grupo control difería significativamente de los grupos tratados con V_2O_5 en los diferentes tiempos de exposición y posteriormente un análisis de regresión para conocer la relación entre el porcentaje de células inmunorreactivas a gamma tubulina y la exposición a V_2O_5 durante el tratamiento.

7. RESULTADOS

7.1 Peso de los testículos

El análisis estadístico mediante las pruebas ANOVA y Tukey ($P < 0.05$) no mostró diferencia significativa entre el peso testicular de los animales expuestos con respecto al grupo control como se muestra en la tabla 1.

Tiempo de exposición a V_2O_5	Peso del testículo g ($\bar{x} \pm e.e$)
Control	0.148 \pm 0.007
24 hrs	0.115 \pm 0.009
1 semana	0.127 \pm 0.008
2 semanas	0.151 \pm 0.005
3 semanas	0.143 \pm 0.005
4 semanas	0.124 \pm 0.015
5 semanas	0.163 \pm 0.008
6 semanas	0.141 \pm 0.007
7 semanas	0.144 \pm 0.008
8 semanas	0.128 \pm 0.005
9 semanas	0.157 \pm 0.007
10 semanas	0.146 \pm 0.008
12 semanas	0.146 \pm 0.015

Tabla 1. Peso del testículo de individuos expuestos a V_2O_5 .

7.2 Concentración de Vanadio en el testículo

La concentración de vanadio ($\mu\text{g/g}$ de tejido seco) en el testículo incrementó de manera significativa con respecto al control desde la primera hasta la última semana de exposición ($P < 0.05$) y permaneció constante durante el tratamiento como se observa en la figura 5.

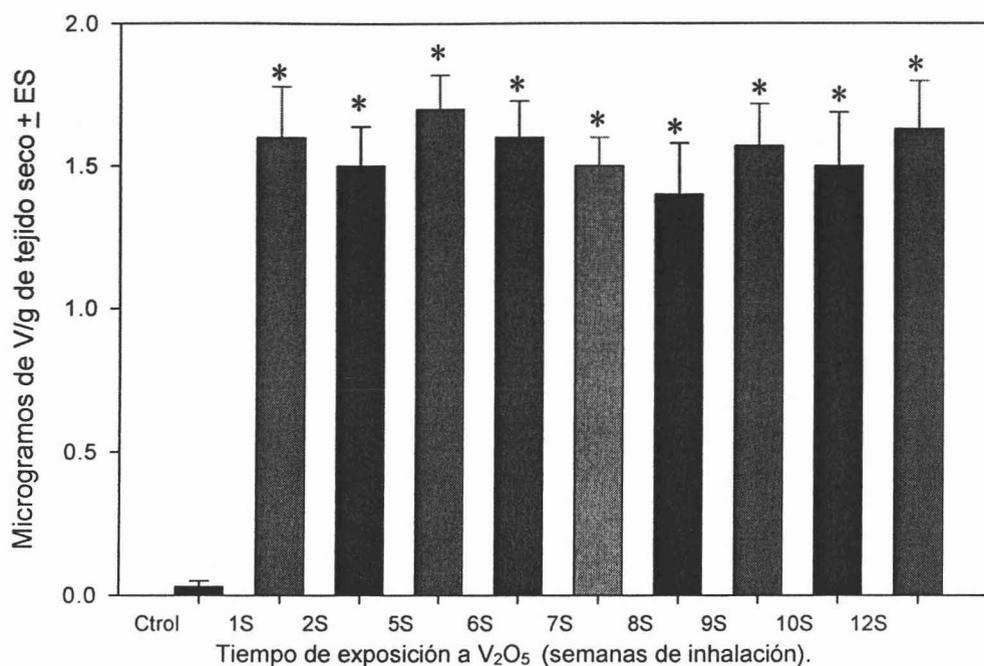


Figura 5. Concentración de vanadio en el testículo de ratones CD1, posterior a la inhalación de V₂O₅.
 *= P<0.05 ANOVA (Tukey)

7.3 Inmunohistoquímica para gamma-tubulina de células testiculares

El efecto del V₂O₅ sobre la gamma tubulina de las células testiculares se determinó mediante inmunohistoquímica. Se realizó un conteo de células totales y de células positivas a gamma tubulina, para obtener un porcentaje de células inmunorreactivas en los animales controles y expuestos.

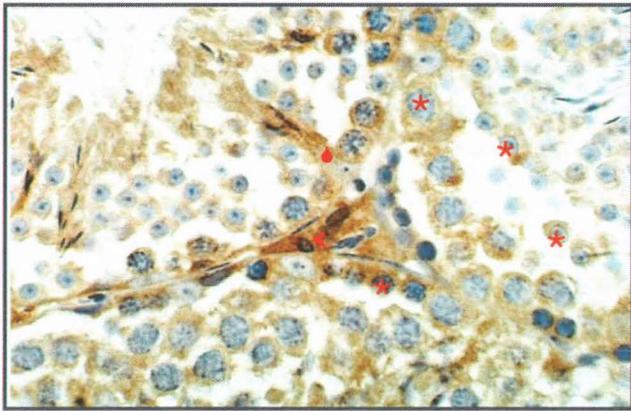
Los resultados mostraron un menor porcentaje de células germinales, de Sertoli y de Leydig positivas a gamma tubulina en los animales expuestos comparados con el control, conforme el tiempo de exposición al elemento, como se observa en las figuras 6 a 8.

Además, el análisis de los datos mostró que el grupo control en todos los tipos celulares analizados presentó el mayor porcentaje de células positivas a gamma tubulina (células germinales 88.36±1.85 (x ± e.e); Sertoli 86.87±2.39 y Leydig 87.75±2.63) (Fig. 6 y 9), mientras que el menor porcentaje de células germinales, Sertoli y Leydig inmunorreactivas se encontró al final del tratamiento (células germinales 1.29±0.55; Sertoli 1.61±0.67; Leydig 10.33±1.96) (Fig. 8 y 9).

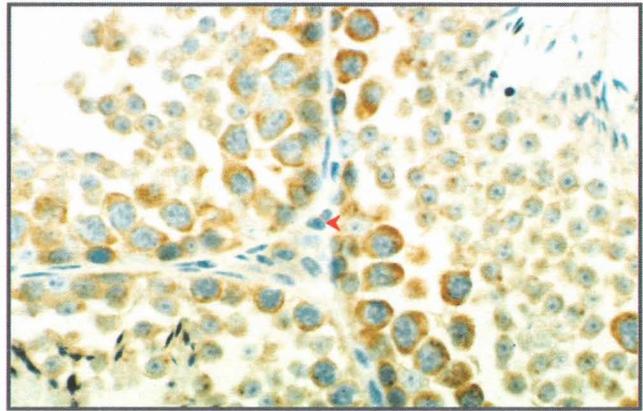
Por otro lado, el análisis de varianza (ANOVA) mostró que el porcentaje de células testiculares inmunorreactivas a gamma tubulina difiere significativamente entre los tratamientos en todos los casos (células germinales $F_{11,158}=204.39$, $P<0.001$; Sertoli $F_{11,158}=58.74$, $P<0.001$ y Leydig $F_{11,158}=33.24$, $P<0.001$). Asimismo, el análisis de Tukey mostró para todos los tipos celulares analizados que el control difiere significativamente de todos los grupos expuestos a V_2O_5 excepto a las 24 horas de exposición, en las células germinales y de Sertoli (Fig. 9).

En lo que se refiere a las células germinales, éstas mostraron mayor decremento en el número de células positivas a gamma tubulina desde la primera semana de exposición hasta el final del tratamiento con respecto al control y a los otros tipos celulares analizados (Fig. 6-9). Por otro lado, el porcentaje de células de Sertoli positivas disminuyó de igual forma desde la primera semana de inhalación, sin embargo, este tipo celular presentó fluctuación en el porcentaje de células con gamma tubulina en los grupos tratados (Fig. 6-9). En contraste, en el caso de las células de Leydig se observó desde las 24 horas de exposición un decremento significativo en el porcentaje de células positivas (Fig. 6), el cual permaneció constante hasta la quinta semana (Fig. 6 y 9), posteriormente el mayor decremento se observó a partir de la sexta semana de exposición (Fig. 7-9). Este tipo celular presentó un mayor porcentaje de células positivas a gamma tubulina al final del tratamiento con respecto a las células germinales y a las de Sertoli (Fig. 9).

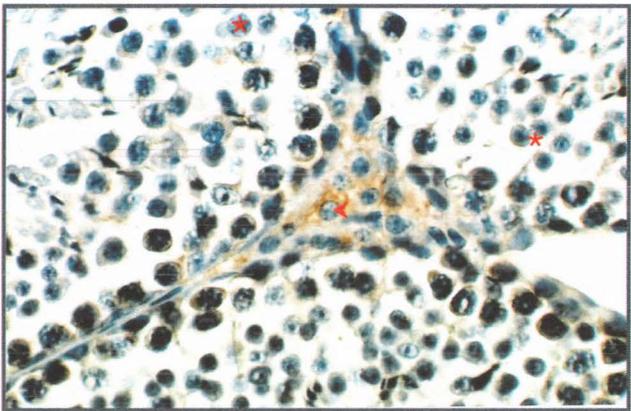
Finalmente como se observa en la figura 10, mediante el análisis de regresión se observó en todos los tipos celulares analizados un efecto dependiente del tiempo de exposición, y una relación negativa y significativa entre el porcentaje de células positivas a gamma tubulina y el tiempo de exposición a V_2O_5 . Además se observó que los tres tipos celulares presentaron diferente sensibilidad, siendo más susceptibles las células germinales, seguidas por las de Sertoli y finalmente las de Leydig. De igual forma, este análisis mostró el mayor índice de correlación para las células germinales, seguido por las células de Sertoli y finalmente las células de Leydig.



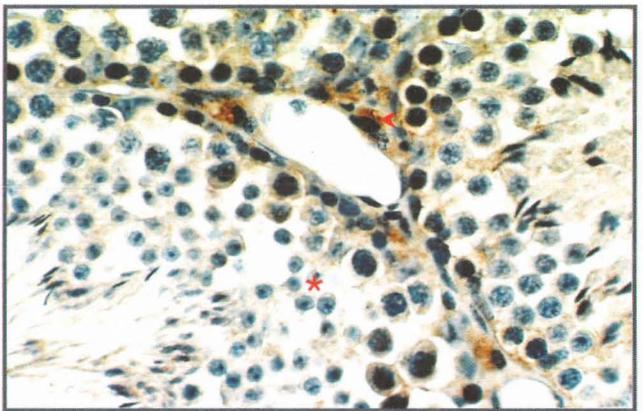
a) Control



b) 24 hrs. de exposición



c) 1 semana de exposición

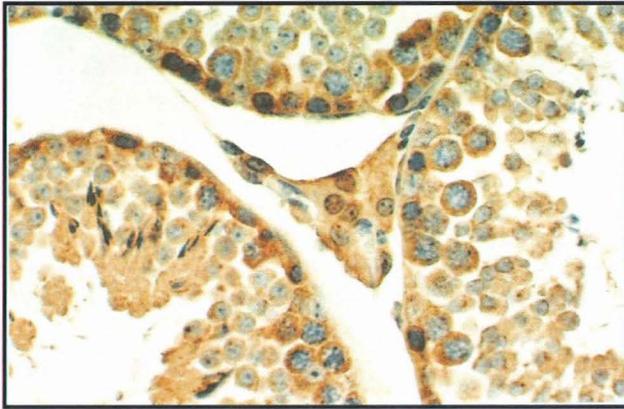


d) 2 semanas de exposición

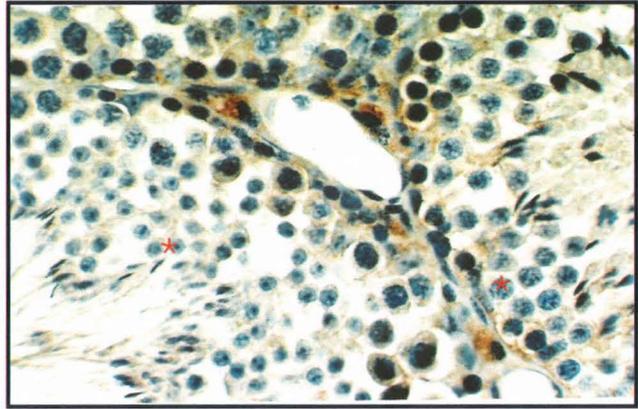
400 X

Figura 6. Células testiculares positivas a gamma tubulina después del tratamiento con V_2O_5 . **(a)** Control. Se observó el mayor número de células germinales, Sertoli y Leydig positivas a gamma tubulina, lo cual se aprecia como una marca citoplásmica café. **(b)** 24 horas de exposición. No se observó decremento significativo en el número de células germinales y Sertoli inmunorreactivas, en contraste se apreció menor número de células de Leydig positivas con respecto al control **(a)**. Posteriormente a la primera **(c)** y segunda semanas **(d)** de tratamiento se observó un decremento con respecto al control en todos los tipos celulares siendo más evidente en las células germinales. Además el número de células de Leydig positivas se mantuvo constante durante las primeras semanas de tratamiento.

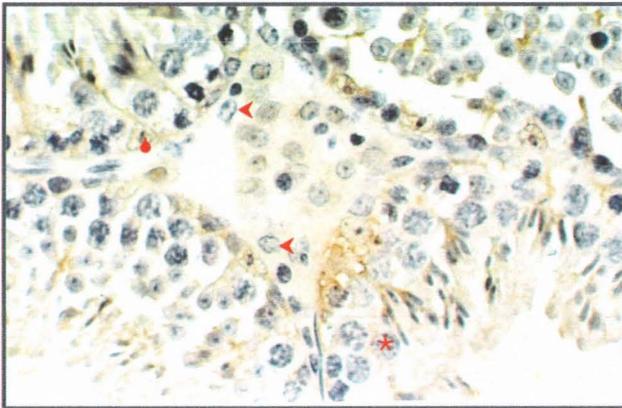
- ★ = Germinales
- ◆ = Sertoli
- ◄ = Leydig



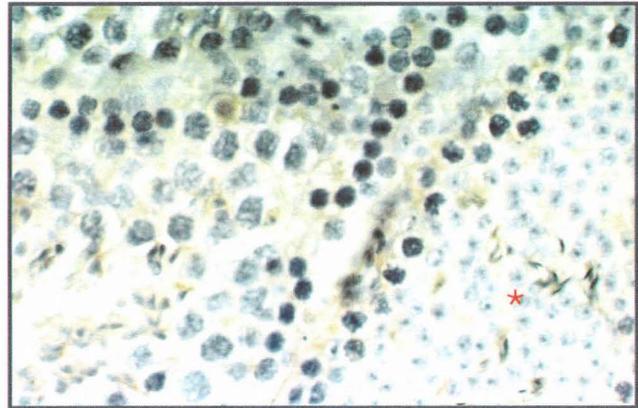
a) Control



b) 4 semanas de exposición



c) 6 semanas de exposición

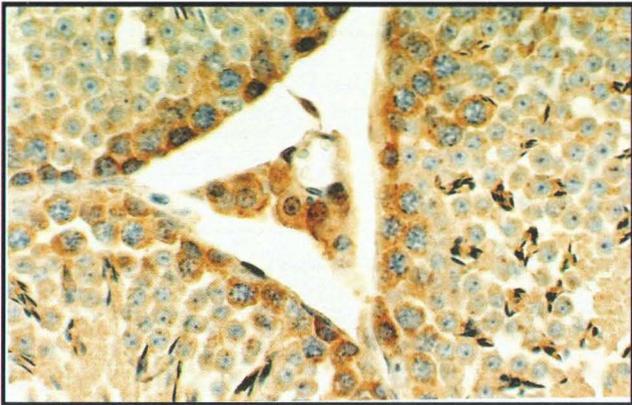


d) 7 semanas de exposición

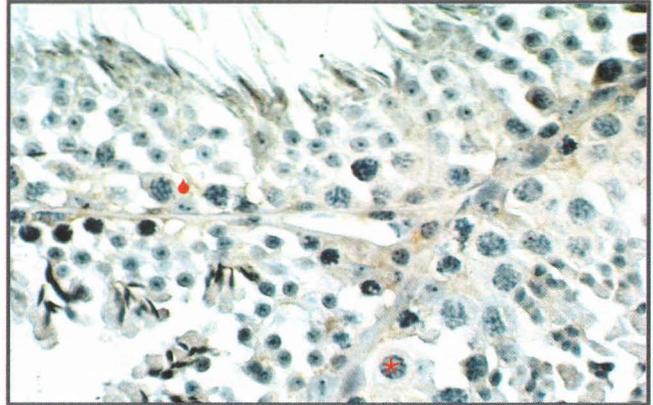
400 X

Figura 7. Células testiculares con gamma tubulina después del tratamiento con V_2O_5 . Se observa que en la semana 4 (b), 6 (c) y 7 (d) de exposición continúa el decremento de gamma tubulina en todos los tipos celulares analizados. Además se aprecia que a partir de la semana 6 el decremento en las células de Leydig se hace más evidente (c).

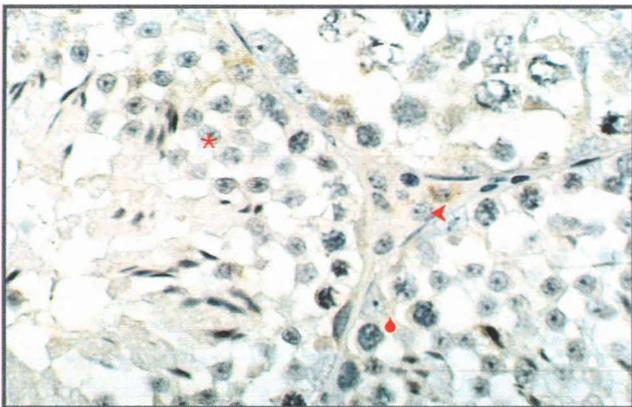
- ★ = Germinales
- ◆ = Sertoli
- ◄ = Leydig



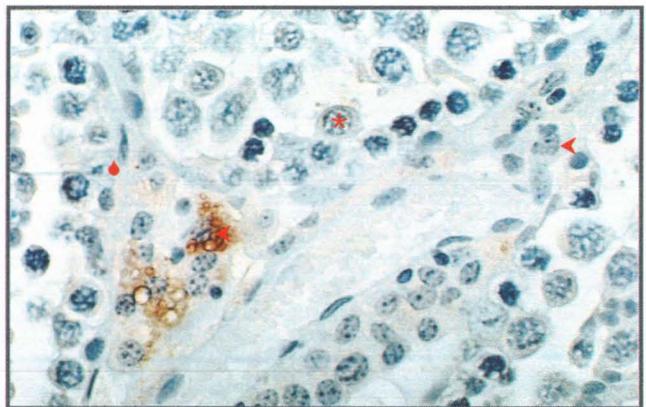
a) Control



b) 9 semanas de exposición



c) 10 semanas de exposición



d) 12 semanas de exposición

400 X

Figura 8. Células testiculares con gamma tubulina después del tratamiento con V_2O_5 . Al comparar con el control (a), se observó un decremento progresivo en el número de células positivas a la proteína, el cual se aprecia claramente después de 9 (b), 10 (c) y 12 (d) semanas de exposición. Además, al final del tratamiento (d) se observó el mayor decremento de células inmunorreactivas en todos los casos, correspondiendo el menor número a las células germinales, posteriormente las de Sertoli y finalmente las de Leydig.

- * = Germinales
- ◆ = Sertoli
- ◀ = Leydig

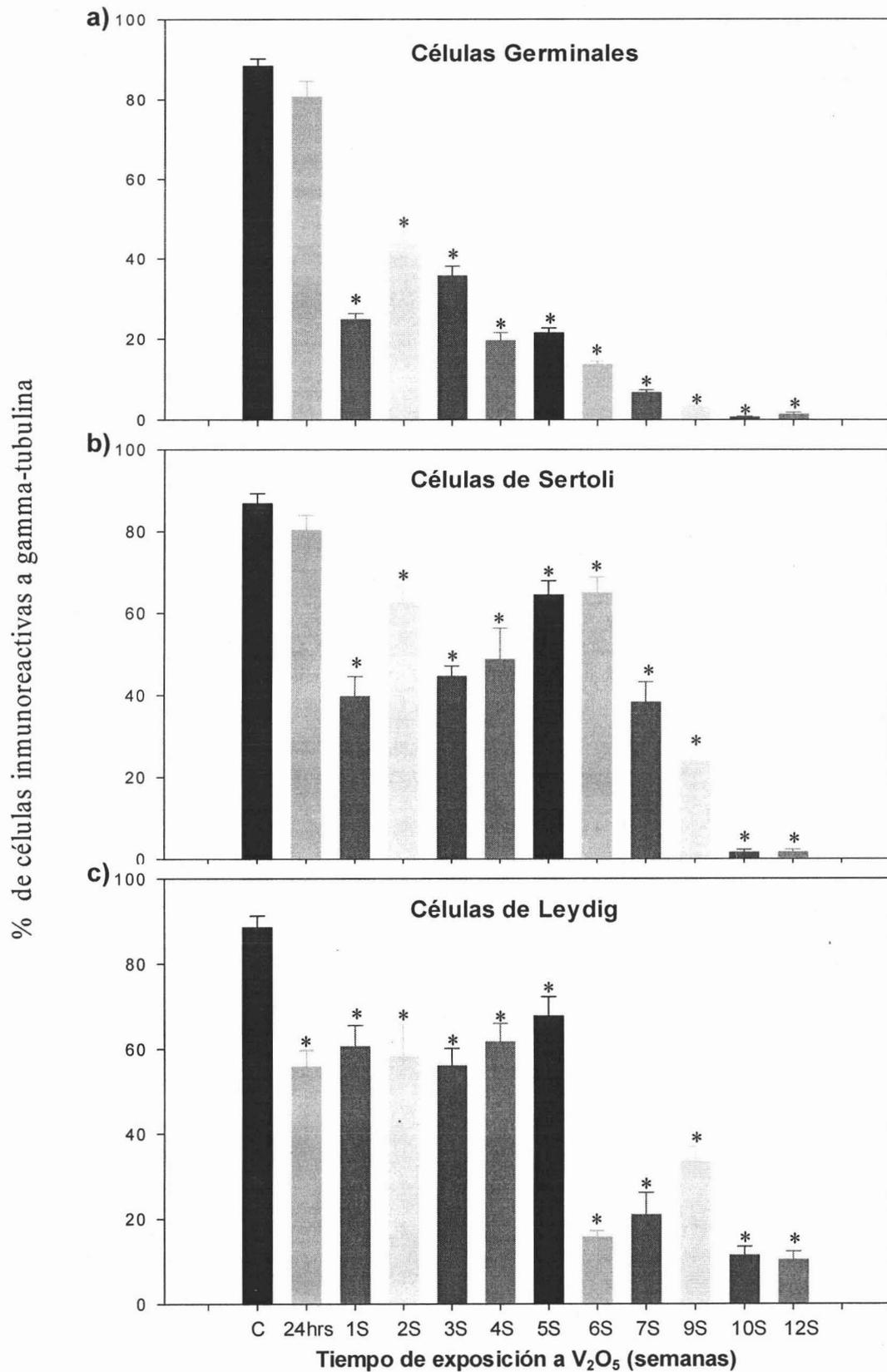


Figura 9. Porcentaje de células testiculares con gamma-tubulina durante el tratamiento con V₂O₅. Se muestra un decremento significativo con respecto al control, en el porcentaje de células germinales (a), Sertoli (b) y Leydig (c) conforme el tiempo de exposición. * = $P < 0.001$ ANOVA (TUKEY).

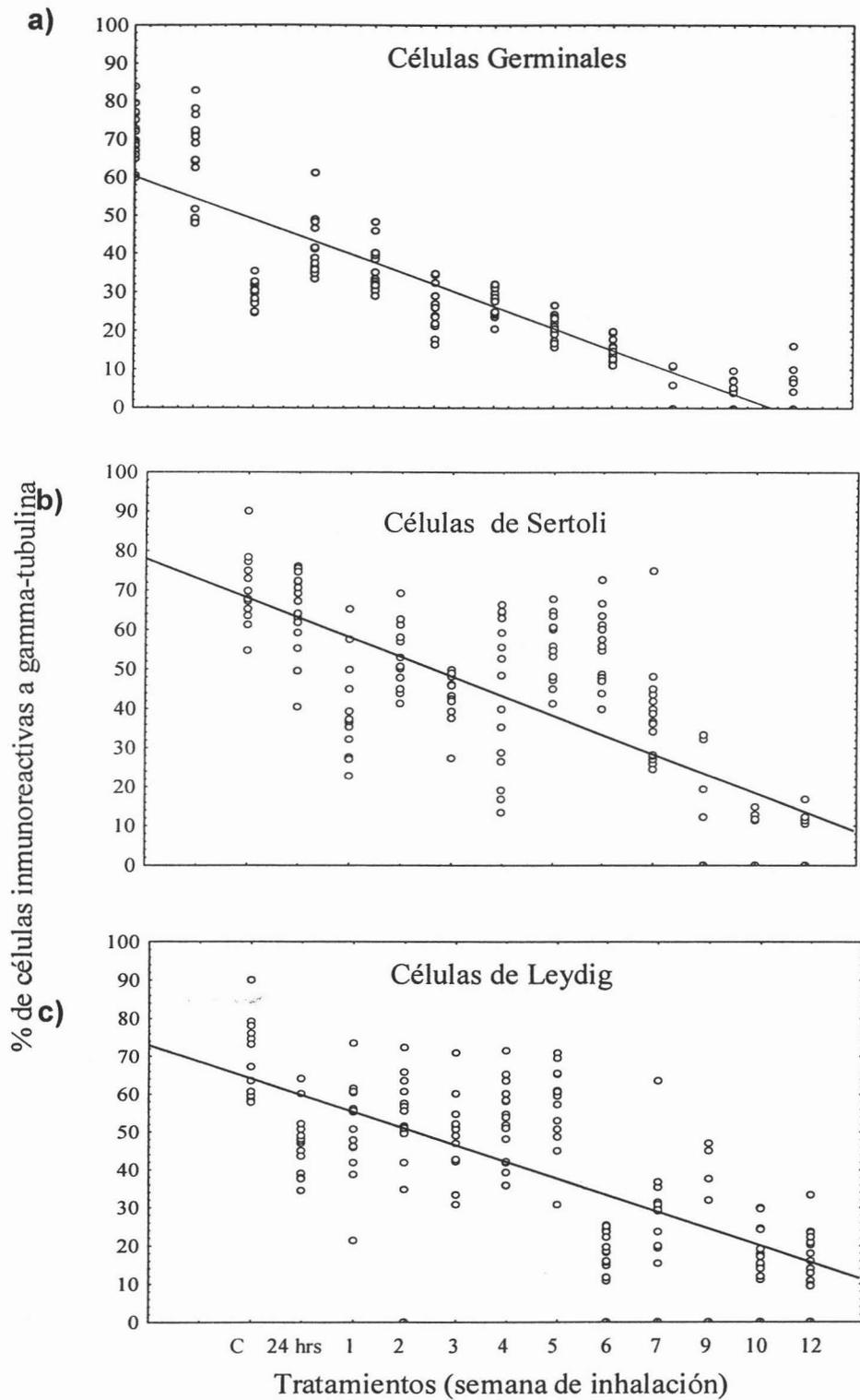


Figura 10. Análisis de Regresión. Se muestra en los tres tipos celulares una relación negativa y significativa principalmente en las células germinales ($r = -0.90$, $r^2 = 0.80$, $F_{1,168} = 696.82$, $P < 0.001$) (a) seguido por las células de Sertoli ($r = -0.74$, $r^2 = 0.55$, $F_{1,168} = 208.75$, $P < 0.001$) (b) y finalmente las células de Leydig ($r = -0.71$, $r^2 = 0.50$, $F_{1,168} = 170.86$, $P < 0.001$) (c).

7. Discusión.

El efecto de diferentes tóxicos sobre las proteínas del citoesqueleto ha sido ampliamente estudiado, ya que la integridad de esta red protéica es necesaria para mantener las funciones celulares durante la interfase y la división celular. Actualmente el desarrollo industrial ha propiciado la liberación al ambiente de una gran variedad de metales que dañan a estas proteínas (Nechay 1984; Li *et al.* 1996; Ramírez *et al.* 1997; Stoiber *et al.* 2004), sin embargo, no existe información del efecto de éstos sobre la gamma tubulina, siendo esta última una proteína clave para las funciones del citoesqueleto y un importante miembro del centrosoma.

Nuestros resultados mostraron que el peso testicular del grupo tratado, no presentó diferencia significativa con respecto al grupo control, lo cual coincide con lo observado por Llobet y cols. (1993), quienes administraron metavanadato de sodio a ratones por vía oral. En contraste, en otros trabajos realizados con tetraóxido y pentóxido de vanadio vía intraperitoneal, se observó un decremento significativo en el peso testicular (Altamirano-Lozano 1996; Aragón *et al.* 2001). Las diferencias encontradas en cuanto al efecto del vanadio sobre el peso testicular en los diferentes modelos pueden deberse a la vía de administración, la dosis, el compuesto y el tiempo de exposición.

Por otro lado, observamos que la concentración de vanadio en el testículo incrementó significativamente con respecto al control desde la primera semana de exposición y se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, lo cual resulta de seguir el protocolo de exposición descrito por Fortoul y cols. (1999). Asimismo, la presencia de vanadio en el testículo se ha reportado en otros modelos lo cual apoya nuestros resultados (Nechay 1984; ATSDR 1992; IPCS 2000; IPCS 2001). Sin embargo, en éste órgano se ha detectado una menor concentración del metal con respecto a otros como el hígado, el riñón o el bazo, debido a que éstos a diferencia del testículo, están involucrados en la detoxificación, la excreción y la filtración sanguínea (Nechay 1984; ATSDR 1992; Barceloux 1999; IPCS 2000; IPCS 2001). Asimismo el testículo presenta una barrera que impide el paso de tóxicos de la circulación al interior de los túbulos seminíferos (Steinberger y Klinefelter 1993), lo cual evita que el vanadio se concentre de manera importante en este órgano. No obstante, el vanadio puede llegar al testículo debido a que se une a la albúmina, la cual es la principal

transportadora de testosterona en el plasma y el fluido intersticial, donde se concentra significativamente. Además esta proteína se ha detectado cerca de la base del epitelio seminífero y en el compartimiento basal entre las células de Sertoli, las espermatogonias y los espermatoцитos primarios (Christensen *et al.* 1985). Otra posible explicación a la presencia de vanadio en el testículo puede ser la gran afinidad de este metal por el hierro que se transporta por la transferrina de la sangre a los túbulos seminíferos, y el cual es necesario para la espermatogénesis (Sitprija y Eiam-Ong 1998; Zhang 1999; Mukherjee *et al.* 2004). Asimismo, ha descrito que el vanadio puede atravesar la barrera hematotesticular (Parker *et al.* 1980). El mecanismo para ello, puede ser similar al descrito para el caso de la barrera hematoencefálica. A este respecto, Avila-Costa y cols. observaron que el V_2O_5 administrado por vía inhalada altera las uniones estrechas entre las células endoteliales haciendo más permeable la barrera (Avila-Costa *et al.* 2005). Dado que las uniones estrechas entre las células de Sertoli son similares a las referidas para el epitelio endotelial, el vanadio podría alterar la barrera hematotesticular y entrar en contacto con las células germinales.

Una vez que el vanadio entra en contacto con las células testiculares, ingresa a ellas mediante canales aniónicos inespecíficos generalmente como vanadato. (Bhagavan 1983; Nechay 1984; Zaporowska y Scibior 1998; Barceloux 1999; Baran 2003; Mukherjee *et al.* 2004). Asimismo se ha propuesto que debido a la similitud química de éste con el fosfato, el vanadio puede entrar a las células a través de un mecanismo de transporte de fosfatos (Baran 2003).

Dentro de las células este metal puede alterar proteínas importantes del centrosoma como la gamma tubulina. En este estudio, se observó que el V_2O_5 administrado por vía inhalada, provocó un decremento en el porcentaje de células con gamma tubulina en todos los tipos celulares analizados y que tal decremento fue dependiente del tiempo de exposición. Uno de los mecanismos por el cual el vanadio puede modificar a esta proteína debe ser similar al que se reporta para otras tubulinas (Wise *et al.* 2000). En este contexto, se ha descrito que este metal puede interactuar con las tubulinas alfa y beta, y causar daños en los microtúbulos; por ejemplo, se ha observado en modelos *in vitro*, que el V_2O_5 y el ortovanadato inhiben la polimerización de estas proteínas (Kirazov y Weiss 1986; Ramírez *et al.* 1997). Estos estudios sugieren que el mecanismo por el cual el vanadio las altera, es mediante la interacción con los múltiples sitios de unión a iones metálicos divalentes que

presentan las tubulinas, tales como: los grupos sulfhidrilo, extremos carboxilo, los sitios de alta afinidad a Mg^{2+} y el de unión a GTP (Li *et al.* 1996; Ramírez *et al.* 1997; Stoiber *et al.* 2004).

Debido a que las tubulinas presentan estos sitios de alta afinidad por los metales, es probable que el vanadio se una a la gamma tubulina y forme agregados con ella o provoque un cambio alostérico alterando su estructura y consecuentemente su función, tal como se ha observado al exponer la α y β -tubulinas a cloruro de mercurio y a ortovanadato de sodio (Kirazov y Weiss 1986; Stoiber *et al.* 2004).

Otro de los mecanismos por los cuales el vanadio puede alterar a esta proteína se debe a que algunos compuestos como el vanadato pueden competir por el sitio de unión a fosfato que presenta la gamma tubulina y alterar la interacción tubulina-GTP de manera similar a lo que se ha reportado para la alfa y beta tubulinas (Kirazov y Weiss 1986), por lo que podría formar un complejo tubulina-GTPV, y modificar la estructura de la proteína y su actividad de GTPasa, lo cual resultaría en daños en la formación y estabilización de los microtúbulos al centrosoma .

Por otra parte, algunas formas del vanadio como el vanadil y vanadato funcionan como radicales libres y participan en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxil ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Nechay 1984; Martínez-Cayuela 1998; Zhang *et al.* 2001). Las proteínas del citoesqueleto son particularmente un blanco para las ROS, en este contexto, Miller y cols. (2000), observaron alteraciones en la cinética de polimerización de los microfilamentos y microtúbulos de la línea celular Caco-2 después de la exposición a ROS, lo cual fue resultado de la despolimerización y oxidación de actinas y tubulinas (Banan *et al.* 2002a; Banan *et al.* 2002b). De la misma forma, el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina) produjo estrés oxidativo en células indiferenciadas PC-12 ocasionando la despolimerización de la tubulina y posteriormente la muerte celular (Hinshaw *et al.* 1993; Cappelletti *et al.* 1999). Asimismo, en otros tipos celulares como las neuronas, se ha mostrado que las ROS provocan la disrupción de la actina y la tubulina siendo esta última más sensible al daño por estrés oxidativo (Allani *et al.* 2004). La sensibilidad de las tubulinas al estrés oxidativo se debe a que presentan una gran cantidad de sitios de alta afinidad para los radicales libres, como sitios ricos en cisteína. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos

dan lugar a alteraciones estructurales en las proteínas, provocando entrecruzamientos y agregación debido a la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Martínez-Cayuela 1998). Asimismo, los daños producidos por el radical $\cdot\text{OH}$, el cual es la especie más reactiva, son irreversibles ya que al oxidar a las proteínas, éstas son ubiquitinizadas y posteriormente degradadas (Cea-Bonilla *et al.* 2002).

Por otra parte, el vanadio puede alterar a la gamma tubulina de manera indirecta ya que se ha reportado que este metal y las ROS producidas por él alteran algunas moléculas que participan en el ciclo y la división celular. Por ejemplo, en células de la línea A549, expuestas a vanadato y en la cuales se detectaron ROS, se observó un incremento en los niveles de p21, una proteína que se activa cuando hay daños en el ADN y produce un paro en su síntesis (Zhang *et al.* 2001; Boonstra y Post 2004). El centrosoma ha sido implicado en el mecanismo de respuesta de daño al material genético, lo cual resulta en la inhibición de la duplicación de este organelo (Duensing y Münger 2001). Por lo anterior el daño en el ADN podría modificar la expresión de algunas proteínas del centrosoma. Asimismo la exposición a vanadio produce decremento en los niveles de la fosfatasa cdc25c, la cual activa al complejo ciclina B1/cdc2 y permite el inicio de la mitosis, la inhibición de este complejo resulta en la inhibición de la mitosis y un paro en la fase G2/M (Morinville *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2001; Boonstra y Post 2004). El efecto producido por el vanadio en la división y progresión del ciclo celular, podría resultar indirectamente en alteraciones sobre la gamma tubulina ya que la concentración de esta proteína se incrementa considerablemente antes de iniciar la mitosis. Además se ha reportado que el vanadio inhibe la cinasa cdc-2 (Boonstra y Post 2004), la cual es requerida para la síntesis del ADN y la duplicación del centrosoma, por lo que la inactivación de esta cinasa podría ocasionar daños en las proteínas de este organelo.

Es importante mencionar que nuestros resultados muestran por primera vez el efecto del vanadio sobre la gamma tubulina en un modelo *in vivo*. Asimismo, nuestros resultados se correlacionan con lo observado previamente en modelos *in vitro* para otras tubulinas, por lo que el modelo experimental podría ser independiente del efecto del vanadio sobre estas proteínas (Kirazov y Weiss 1986; Ramírez *et al.* 1997).

Por otro lado, nuestros resultados mostraron que la gamma tubulina en cada tipo celular analizado presenta una sensibilidad diferente al V_2O_5 , siendo las más sensibles las

células germinales, seguido por las de Sertoli y finalmente las de Leydig, dado que presentaron un coeficiente de correlación (r^2) de 0.80, 0.55 y 0.50 respectivamente que explica en cada caso que el 80, 55 y 50% del daño sobre la proteína se debe al metal.

En lo que respecta a las células germinales, la gran susceptibilidad que muestran al vanadio puede deberse a que éste puede alterar la barrera hematotesticular, tal como lo han visto con otras barreras (Avila-Costa *et al.* 2005), y entrar en contacto directo con las células germinales. Además, éstas células presentan un alto índice mitótico y una reducida cantidad de enzimas antioxidantes citoplásmicas (Álvarez *et al.* 1987; Sheriff 1991; Russanov *et al.* 1994; D'Cruz *et al.* 1998; Pineau *et al.* 1999). Debido a esto último, el daño por estrés oxidativo es una de las principales alteraciones que conducen a la infertilidad masculina ya que provoca la peroxidación de lípidos de membrana y afecta la movilidad de los espermatozoides (Jones *et al.* 1979; Aitken *et al.* 1989; Sikka 2001).

La integridad de la gamma tubulina en estas células es muy importante dada la gran actividad del centrosoma y del citoesqueleto durante la espermatogénesis. Las modificaciones sobre esta proteína pueden resultar en daños en la división celular (Duensing y Münger 2001; Alsop y Zhang 2003), alteraciones en los cambios de forma que se realizan durante la diferenciación celular (Lewis *et al.* 1985; Lewis y Cowan 1988), así como en modificaciones en el arreglo 9+2 del axonema del flagelo de los espermatozoides, lo cual se ha asociado con discinesia flagelar en los gametos (Mckean *et al.* 2003). Debido a lo anterior nuestros resultados podrían explicar los efectos reprotóxicos observados en este y otros modelos experimentales, donde se reporta que la exposición a diferentes compuestos de vanadio (metavanadato de sodio y amonio y tetraóxido y pentóxido de vanadio) administrados por vía oral e intraperitoneal producen decremento en el conteo y en la movilidad espermática, así como alteraciones morfológicas en los gametos (Llobet *et al.* 1993; Altamirano-Lozano *et al.* 1996; Aragón y Altamirano-Lozano 2001).

Por otro lado, las alteraciones sobre la gamma tubulina de los espermatozoides podrían conducir a daños en la fecundación, dado que esta proteína participa de manera importante en la formación del centrosoma durante este proceso y forma los microtúbulos astrales que permiten el movimiento del núcleo del espermatozoide hacia el centro del ovocito (Félix *et al.* 1994; Simerly *et al.* 1999; Manandhar *et al.* 2005).

Además, se ha observado que la supresión de esta proteína provoca la inhibición de la cariocinesis y la citocinesis (Oakley 1992; Shu *et al.* 1995). Asimismo conduce a alteraciones o a la ausencia del huso mitótico que resultan en aneuploidias provocadas por daños en la segregación cromosómica (Joshi *et al.* 1992), como se observa en otros modelos en los cuales se atribuye el efecto a daños sobre los microtúbulos (Roldan y Altamirano 1990; Migliore 1993; Leonard y Gerber 1994; Zhong *et al.* 1994; Thompson y Perry 1988), por lo que nuestros resultados podrían explicar los efectos aneuploidogénicos del metal referidos en otros estudios.

Por otra parte, la gamma tubulina es requerida para la maduración, activación y separación del centrosoma (Schnackenberg *et al.* 1998; Khodjakov y Rieder 2001). Como observamos en el presente estudio, el vanadio puede alterar esta proteína y probablemente producir alteraciones en el centrosoma, como lo reporta Navara y cols. (2001) en estudios realizados con vanadocenodichloro y vanadoceno acetilacetato en líneas celulares (BT-20 y U373), donde observan husos monopolares que sugieren daño sobre el centrosoma al interferir con la separación de esta estructura antes de iniciar la división celular. A este respecto, se ha reportado ampliamente que alteraciones estructurales, funcionales o numéricas del centrosoma, principalmente en células con un alto índice mitótico, como las germinales, provocan daños en la división celular y aneuploidías que pueden conllevar al desarrollo de neoplasias testiculares (Duensing y Munger 2001; Khodjakov y Rieder 2001; Hinchcliffe *et al.* 2001; Maÿer *et al.* 2003). En este contexto, el daño en la gamma tubulina de las células germinales provocado por el vanadio, podría ser un factor determinante en el desarrollo del cáncer testicular.

En lo que se refiere a las células de Sertoli, éstas presentaron de igual forma decremento significativo en el porcentaje de células con gamma tubulina, el cual fue dependiente del tiempo de exposición. Sin embargo con respecto a las células germinales, éstas mostraron menor sensibilidad al vanadio y menor índice de correlación ($r^2= 0.55$). Lo cual podría deberse a que las células de Sertoli presentan mayor resistencia a tóxicos y al estrés oxidativo producido por la presencia de metales como el vanadio, comparado con las células germinales, que cuentan con sólo una tercera parte de las enzimas antioxidantes que presentan las células de Sertoli (Mruk *et al.* 2002). Además en animales sexualmente maduros, estas células presentan un índice mitótico bajo y entran en división celular en respuesta a la muerte de células adyacentes (Means *et al.* 1980; Pineau *et al.* 1999). Por lo

anterior podrían exhibir una menor sensibilidad a daños sobre el ADN y estructuras involucradas en la división celular como el centrosoma (Alberts *et al.* 1998; Duensing y Münger 2001).

La integridad de la gamma tubulina en las células de Sertoli es sumamente importante ya que muchas de sus funciones dependen de su red de microtúbulos. En este contexto, las alteraciones en la gamma tubulina de éstas células podría causar efectos similares a los observados con drogas disruptoras de microtúbulos. Por ejemplo se ha reportado que la colchicina, el nocodazol y el carbendazim, al alterar los microtúbulos de estas células comprometen la estructura del epitelio testicular y producen daños en la espermatogénesis, tales como alteraciones en la formación de las espermátides, que resultan en núcleos irregulares con invaginaciones y células binucleadas que sugieren daños en la citocinesis mientras progresa la cariocinesis; asimismo se han observado aneuploidias en espermatoцитos y células germinales diploides (Hess y Nakai 2000; Correa *et al.* 2002). Otra de las posibles modificaciones producidas por daños en el sistema de microtúbulos de estas células se presenta en la organización y movimiento de las células espermatógenas dentro del epitelio seminífero, así como en la eliminación del cuerpo residual y en el transporte polarizado de proteínas y organelos (Fleming *et al.* 2003a). Por otro lado, Fleming y cols. (2003b) reportaron que la sobreexpresión de la gamma tubulina en células de Sertoli de rata modifica la forma de las espermátides y su transporte provocando su retención en los túbulos seminíferos, así mismo se observa la retención del cuerpo residual. Lo anterior sugiere que las alteraciones sobre la gamma tubulina como la sobreexpresión o el decremento pueden causar daños sobre la espermatogénesis y consecuencias sobre la fertilidad.

En lo que respecta a las células de Leydig, estas mostraron menor sensibilidad a la exposición a V_2O_5 con respecto a las células germinales y a las de Sertoli, como lo muestra su índice de correlación ($r^2= 0.50$). En animales sexualmente maduros, estas células presentan un equilibrio en su número por lo que presentan un índice mitótico sumamente bajo. El recambio normal o producido por algún daño induce la formación de nuevas células a partir de la diferenciación de células precursoras mesenquimatosas o peritubulares (Christensen 1975; Christensen y Peacock 1980; Chemes *et al.* 1985; Saez 1994). Debido a lo anterior este tipo celular podría mostrar menor sensibilidad al vanadio con respecto a las células del epitelio seminífero. A este respecto, Aragón y cols. (2005) reportaron que la

inyección de tetraóxido de vanadio a ratones macho, produjo alteraciones en las células germinales y de Sertoli tales como apoptosis y vacuolización respectivamente, sin embargo, no observaron alteraciones en las células de Leydig ni en los niveles de testosterona, por lo que los autores han sugerido que este último tipo celular presenta menor sensibilidad al vanadio con respecto a las células germinales y de Sertoli, lo cual apoya lo que observamos en el presente estudio.

Pese a que las células de Leydig presentaron mayor resistencia a la exposición a V_2O_5 comparada con los otros tipos celulares, se observó que este compuesto disminuye el porcentaje de éstas células con gamma tubulina, conforme el tiempo de exposición. Las alteraciones sobre esta proteína podrían resultar en daños en la diferenciación de las células mesenquimales a células de Leydig. Además se ha reportado que los microtúbulos de las células intersticiales participan en la esteroidogénesis, lo cual se ha observado en estudios en los cuales se exponen células de Leydig I-10 a colchicina y vinblastina, induciendo de esta manera la despolimerización de los microtúbulos y la esteroidogénesis, al provocar la liberación y el transporte del colesterol almacenado hacia la mitocondria (Rainey et al. 1985). El daño sobre la gamma tubulina disminuye la capacidad del centrosoma para formar microtúbulos (Shnackenberg *et al.* 1998), por lo cual probablemente la exposición a este metal provoque alteraciones en la esteroidogénesis.

Cabe destacar que existen pocos reportes en la literatura sobre la reprotoxicidad del vanadio y el mecanismo por el cual éste afecta a las células testiculares, por lo que para abundar en la explicación sobre la sensibilidad de cada tipo celular al vanadio se requiere de mayor investigación.

Finalmente, es importante mencionar que el vanadio ha incrementado su concentración en el aire en las últimas décadas principalmente en ciudades industrializadas como la de México, en las cuales la infertilidad masculina podría estar asociada a la exposición a diversos contaminantes como los metales. Con relación a este punto, éste es el primer estudio en el que se muestra en un modelo *in vivo* el efecto del vanadio vía inhalada sobre la gamma tubulina, la cual es la vía de exposición más importante para la población en general. El hecho de que este metal provoque daños sobre la gamma tubulina en las células testiculares podría conducir a alteraciones en el citoesqueleto y el centrosoma que resulten en daños en la espermatogénesis y probablemente conlleven al desarrollo de neoplasias

testiculares. Por lo anterior, entender el mecanismo involucrado en el daño a la gamma tubulina es sumamente importante y podría contribuir a comprender de mejor manera las alteraciones producidas por el vanadio y a prevenir sus efectos tóxicos. Asimismo el daño a la gamma tubulina constituye una evidencia que apoya la capacidad neoplásica de este metal.

8. Conclusiones.

- El vanadio fue capaz de interactuar con la gamma tubulina, ya que la exposición de ratones a V_2O_5 vía inhalada produjo un decremento significativo en el porcentaje de células germinales, Sertoli y Leydig inmunorreactivas a esta proteína, lo cual se correlacionó con el tiempo de exposición.
- Los tipos celulares analizados presentaron diferente sensibilidad al vanadio siendo las células germinales las más susceptibles, seguidas de las células de Sertoli y finalmente las células de Leydig, por lo que las características particulares de cada tipo celular influyen en el efecto del tóxico.
- Las alteraciones producidas por el vanadio sobre la gamma tubulina podrían ser independientes del modelo experimental, dado que se ha observado el mismo efecto en modelos *in vitro* para otras tubulinas.
- El daño sobre la gamma tubulina podría explicar el efecto reprotóxico del vanadio observado en este y otros modelos experimentales. Asimismo podría explicar las alteraciones sobre el citoesqueleto y el efecto aneuploidogénico del metal reportado en otros modelos, por lo que nuestros resultados constituyen una evidencia que apoya el carácter neoplásico del vanadio.

9. Perspectivas.

- Evaluar en este modelo, los daños estructurales, funcionales y numéricos sobre el centrosoma, así como detectar las posibles aberraciones cromosómicas, principalmente en las células germinales.
- Analizar, las posibles alteraciones sobre el ciclo celular tales como: arrestos mitóticos y muerte celular, derivadas del daño a la gamma tubulina y al centrosoma.
- Detectar si el daño que causa el vanadio sobre la gamma tubulina produce alteraciones en la organización del epitelio testicular y cambios en la concentración hormonal (testosterona, LH o FSH) que resulten en alteraciones en el ciclo hipotálamo-hipófisis- testículo.
- Determinar si el vanadio provoca daño sobre la gamma tubulina de los espermatozoides y si éste se asocia con las alteraciones en el desarrollo embrionario observadas en otros modelos.

10. Referencias Bibliográficas.

- Agency for toxic substances and diseases registry. (ATSDR) (1992). Toxicological Profile for Vanadium and Compounds. Atlanta, GA: U.S. Departamento de salud y servicios humanos. Servicio de Salud Pública.
- Agency for toxic substances and diseases registry. (ATSDR) (1995). Vanadio. Atlanta, GA: U.S. Departamento de salud y servicios humanos. Servicio de Salud Pública. CAS # 7440-62-2.
- Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction* 40: 183-197.
- Aitken R.J., Fisher H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.
- Albert L.A. (2004a). Contaminantes ambientales y criterios de evaluación. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de la Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 147-164.
- Albert L.A. (2004b). Contaminantes inorgánicos: Cromo. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de la Ciudad Juárez. Chihuahua México, pp 277-294.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1998). Biología molecular de la célula. (3ª ed). Ediciones Omega, Barcelona, pp 843-977.
- Alsop G.B., Zhang D. (2003). Microtubule are the only structural constituent of the spindle apparatus required for induction of cell cleavage. *The Journal of Cell Biology* 162(3): 383-390.
- Altamirano-Lozano M., Álvarez Barrera L., Basurto-Alcántara F., Valverde M., Rojas E. (1996). Reprotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 16: 7-17.
- Álvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., Storey B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 8:338-348.
- Allani P.K., Sum T., Bhansali S.G., Mukherjee S.K., Sonee M. (2004). A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196: 29-36.
- Allard E.K., Johnson K.J., Boekelheide K. (1993). Colchicine disrupts the cytoskeleton of rat testis seminiferous epithelium in a stage-dependent manner. *Biology of Reproduction* 48:143-153.
- Anderson S.A., Purich D.L. (1982). A reinvestigation of dynein ATPase kinetics and

the inhibitory action of vanadate. *Journal of Biology Chemistry* 25; 257(12): 6656-6658.

- Aragón A.M., Altamirano-Lozano M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology* 15(2):145-51.
- Avila-Costa M.R, Montiel-Flores E., Colín-Barenque L., Ordoñez J.L., Gutiérrez A.L., Niño-Cabrera H.G., Mussali-Galante P., Fortoul T.I. (2004). Nigrostriatal modifications after vanadium (V₂O₅) inhalation. An immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research* 29(7): 1365-1369.
- Avila-Costa M.R., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez A., Antuna B.S., Saldivar O.L. Espejel-Maya G., Mussali-Galante P., Avila-Casado M.C., Reyes-Olivera A., Anaya-Martínez V., Fortoul T.I. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: A mice experimental model. *Neuroscience Letters* 381: 21-25.
- Banan A., Zhang Y., Losurdo J., Keshavarzian A. (2002a). Carbonylation and disassembly of the F-actine cytoskeleton in oxidant induced barrier dysfunction and its prevention by ephidermal growth factor and transforming growth factor in human colonic cells line. *Gut* 46: 830-837.
- Banan A., Choudhary S., Zhang Y., Fields J.Z., Keshavarzian A. (2002b). Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cells line: role of microtubule cytoskeleton. *Free Radical Biology and Medicine* 28(5): 727-738.
- Barceloux G. D. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*. 37: 265-278.
- Baran E.J. (2003). Model studies related to Vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal Brazilian Chemistry Society* 14(6): 878-888.
- Bhagavan S., Jandhyala G., Hom J. (1983). Phyological and Pharmaceutical propiedades of vanadium. *Life of Science* 33: 1325-1340.
- Bilinska B., Genissel C., Carreua S. (1997). Paracrine effect of seminiferous tubule factors on rat Leydig cell testosterone production: Role of cytoskeleton. *Biology of the Cell* 89: 435-442.
- Blagden P.S. y Glover M.D. (2003). Polar expeditions-provisioning the centrosome for mitosis. *Nature Cell Biology* 5 (6): 505-511.
- Boonstra J., Post A.J. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progresion in mammalian cells. *Gene* 337: 1-13.
- Campbell E.M., y Hope T.J. (2003). Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:761-771.
- Cande W.Z. y Wolniak S.M. (1978). Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate. *Journal of Cell Biology* 79:573-580.

- Cappelletti G., Maggioni M.G., Maci R. (1999). Influence of MPP⁺ on the state of tubulin polymerization in NGF-differentiated PC 12 cells. *Journal of Neuroscience Research* 56: 28-35.
- Cea-Bonilla A., Del Arrenal-Mena I.P., Riveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E (2002). Biología de las especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico* 25: 19-54.
- Chatterje M., Bishayee A. (1998). Vanadium – A new tool for cancer prevention. En: Nriagu. *Vanadium in the Environment. Parte II: Health effects.* 347-383. John Wiley & Sons. New York, pp. 347-385.
- Chemes H.E, Gottlieb S.E., Pasqualini T., Domenici E., Rivarola M.A. Bergada C., (1985). Response to acute hCG stimulation and androgenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. *Journal Andrology* 6: 102-112.
- Christensen A.K. (1975). Leydig cells. En: Greep R.O., Astwood E.B., Hamilton D.W., Geiger S. *Handbook of Physiology. American Physiological Society, Washington DC* 5:57-94.
- Christensen A.K., Komorowski T.E., Wilson B., Ma S.F., Stevens R.W. (1985). The distribution of serum albumin in rat testis, studied by electron microscope immunocytochemistry on ultrathin frozen section. *Endocrinology* 116 (5): 1983-96.
- Christensen A.K. y Peacock K.C. (1980). Increased in Leydig cell number in testis of adult rats treated chronologically with and excess of hCG. *Biology of Reproduction* 22: 383-391.
- Conklin A.W., Skinner C.S., Felten T.L. (1982). Clearance and distribution of intratracheally instilled vanadium-48 compounds in the rat. *Toxicology Letters* 11:199-203.
- Correa L.M., Nakai M., Strandgaard C.S., Hess R.A., Miller M.G. (2002) Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors carbendazim and colchicine. *Toxicological Sciences* 69: 175-182.
- D'Cruz O.J., Ghosh P., Uckun M.F. (1998). Spermicidal activity of metallocene complex containing vanadium (IV) in humans. *Biology of Reproduction* 58:1515-1526.
- D'Cruz J.O., Uckun M.F. (2000). Vanadocene-Mediated *in vivo* male germ cell apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 166: 186-195.
- Del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Albores A. (2004). Contaminantes Inorgánicos: Arsénico. En: Albert L.A. *Toxicología Ambiental.* (1^a ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 295-308.
- Domingo L.J. (1996). Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology* 10(3):175-182.

- Done A.K. (1979). Of metals and chelation. *Emerg. Medical* 11:186-218
- Duensing S., Münger K. (2001). Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochemica et Biophysica Acta* 1471: M81-M88
- Dutcher S.K. (2001). The tubulin fraternity; alpha to eta. *Current Opinion in Cell Biology* 13: 49-54.
- Edel J, Sabbioni E. (1988). Retention of intratracheally instilled and ingested tetravalent and pentavalent vanadium in the rat. *Journal Trace Elements Electrolytes Health Disease* 2:23-30.
- Ehrlich R.P., Ceballos G. (1997). Población y medio ambiente: ¿qué nos espera? *Ciencia* 48 (4): 19-30.
- Erickson H.P., Stoffler D. (1996). Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to α/β and γ -Tubulin. *Journal of Cell Biology* 135: 5-8.
- Erickson H.P. (2000). γ -tubulin nucleation: template or protofilament?. *Nature Cell Biology* 2: E93-E96.
- Félix M.A., Antony C., Wrigth M., Maro B. (1994). Centrosome assembly *in vitro*: Role of γ -tubulin in *Xenopus* sperm aster formation. *Journal of Cell Biology* 124: 19-31.
- Fleming S.I., Shank P.R., Boekelheide K. (2003a). Gamma-Tubulin overexpression in Sertoli cells in vivo: I. Localization to sites of spermatid head attachment and alterations in Sertoli cell microtubule distribution. *Biology of Reproduction* 69(1): 310-321.
- Fleming S.I., Shank P.R., Boekelheide K. (2003b). Gamma-Tubulin overexpression in Sertoli cells in vivo. II: Retention of spermatids, residual bodies, and germ cell apoptosis. *Biology of Reproduction* 69(1): 322-330.
- Flores-Rodríguez J. (2004). Causas y efectos de la contaminación atmosférica. En: Albert A.L. (1ª ed). *Toxicología Ambiental*. 167-189. Universidad Autónoma de la Ciudad Juárez, Chihuahua México.
- Fortoul T.I., Salgado R.C., Moncada S.G., Sánchez I., López I.E., Espejel G., Calderón N.L., Saldivar L. (1999). Ultrastructural findings in the murine non ciliated bronchiolar cells (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. *Acta Veterinaria Brno*. 68 (1): 51-56.
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López E. I., Bizarro P., Mendoza M., Saldivar O., Espejel G. (2002). Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of environmental health*. 57: 446-449.
- Fuller S.D., Gowen B.E., Reinsch S., Sawyer A., Buendia B. Wepf R., Karsenti E. (1995). The core of the mammalian centriole contains gamma-tubulin. *Current Biology* 5: 1384-1393.

- García-Guevara JA. (1996). Una semblanza de la química del vanadio. *Profesores al día*. Octubre: 185- 189.
- Gibbons B.H, Gibbons I.R. (1987). Vanadate-sensitized cleavage of dynein heavy chains by 365-nm irradiation of demembranated sperm flagella and its effect on the flagellar motility. *Biology Chemistry*. 15; 262(17): 8354-
- Gibbons I.R., Cosson M.P., Evans J.A., Gibbons B.H., Houck B., Martinson K.H., Sale W.S., Tang W.J. (1978). Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. *Proceedings National Academic Science* 75(5): 2220-4.
- Gutiérrez-Ruiz M.C., Bucio-Ortiz L., Souza Arroyo V. (2004). Contaminantes Inorgánicos: Mercurio. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 241-258.
- Gutiérrez-Ruiz M.C., Fortoul van der Goes (2004). Conceptos básicos de toxicología. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la ciudad de Juárez, Chihuahua México, 75-98.
- Gylseth B., Leira H.L., Steinnes E. (1979). Vanadium in the blood and urine of workers in a ferroalloy plant. *Scandinavian Journal Work and Environmental Health* 5:188-194.
- Hall F.P. (1995). The roles of microfilaments and intermediate filaments in the regulation of steroid sintesis. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology* 55(5/6): 601-605.
- Hendrickson T.W., Yao J., Bhadury S., Corbett A.H., Joshi H.C. (2001). Condicional mutations in γ -tubulin reveal its involvement in chromosome segregation and cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* 12: 2469:2481.
- Hess R.A., Nakai M. (2000). Histopathology of male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histology and Hystopathology* 15: 207-224.
- Hinchcliffe H.E., Miller J.F., Cham M., Khodjakov A., Sluder G. (2001). Requeriment of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase. *Science* 291: 1547-1550.
- Hinds W. (1982). Aerosol Technology. Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles. John Wiley & Sons, EUA.
- Hinshaw D.B., Miller M.T., Omann G.M., Beals T.F., Hyslop P.A. (1993) A cellular model of oxidant mediated neuronal injury. *Brain Research* 615: 13-26.
- Holdcraft W.R., Braun E.R. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *International Journal of Andrology* 27: 335-342.

- Holstein A.F., Shulze W., Davidoff M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1(1): 107-123.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). (1997) Estadísticas del Medio Ambiente. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y protección al Ambiente 1995-1996. [Environmental statistics. General information about environmental protection and equilibrium, 1995-1996.] México. pp. 461.
- International Program on Chemical Safety (IPCS). (1988). Vanadium. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 81), pp. 170.
- International Program on Chemical Safety (IPCS). (2000). Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Geneva: World Health Organization. (Concise International Chemical Assessment Document), pp. 52.
- International Program on Chemical Safety. (IPCS). (2001). Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Geneva: World Health Organization. (Concise International Chemical Assessment Document 29), pp. 36.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) (1997). Estadísticas del Medio Ambiente. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (1995-1996). México, pp 461.
- Järup L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1): 167-182.
- Jones R., Mann T., Sherins R.T. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.
- Joshi C.H., Palacios J.M., McNamara L., Cleveland W.D. (1992). γ -Tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature* 356: 80-83.
- Kamboj V.P., Kar A.B. (1964). Antitesticular effect of metallic and rare earth salts. *Journal of Reproduction Fertil* 7: 21-28.
- Kirazov E.P., Weiss D.G. (1986). Effects of vanadate on assembly and disassembly of purified tubulin. *Cell Motility and Cytoskeleton* 6: 314-323.
- Khodjakov A., Rieder C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *The Journal of Cell Biology* 153: 237-242.
- Kiviluoto M. (1980). Observations on the lungs of vanadium workers. *British Journal Industrial Medicine* 37: 363-366.
- Klotz C., Ruiz F., Laubresse G. N., Wright M., Dupuis-Williams P., Beisson J. (2003). Gamma- Tubulin and MTCOs in Paramecium. *Protist* 154:193-209.

- Lajoie-Mazenc I., Tollon Y., Detraves C., Julian M., Moisand A., Gueth-Hallonet C., Debec A., Salles-Passador I., Puget A., Mazarguil H. Raynaud-Messina B. y Wright M. (1994.) Recruitment of Antigenic Gamma-Tubulin During Mitosis in Animal Cells: Presence of Gamma-Tubulin in the Mitotic Spindle. *Journal of Cell Science* 107: 2825-2837.
- Leguy R., Melki R., Pantaloni D., Carliers M.F. (2000). Monomeric γ -Tubulin nucleates microtubules. *The Journal of Biological Chemistry* 275(29): 21975-21980.
- Leonard A. y Gerber G.B. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research* 317:81-88.
- Lewis S.A. y Cowan N.J. (1988). Complex regulation and functional versatility of mammalian α - and β -tubulin isotypes during the differentiation of testis and muscle cells. *The Journal of Cell Biology* 106: 2023-2033.
- Lewis S.A., Gwo-Shu Lee M., Cowan N.J. (1985). Five mouse tubulin isotypes and their regulated expression during development. *The Journal of Cell Biology* 101:852-861.
- Li W., Zhao Y., Chou I. (1996). Mg^{2+} antagonism on Ni^{2+} induced changes in microtubules assembly and cellular thiol homeostasis. *Toxicology and applied pharmacology* 136: 101-111.
- Lippmann, M. (1989). Size-Selective Health Hazard Sampling, En: Hering S.V. Air Sampling Instruments for Evaluation of Atmospheric Contaminants. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Seventh Edition, Ohio, U.S.A., pp.163-198.
- Llobet M.J., Colomina T.M., Sirvent J.J., Domingo L.J., Corbella. (1993). Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Journal Toxicology* 80: 199-206.
- Manandhar G., Schatten H., Sutovsky P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biology of reproduction* 72: 2-13.
- Maniotis A., Schliwa M. (1991). Microsurgical removal of centrosomes blocks cell reproduction and centriolo generation in BSC-1 cells. *Cell* 67: 495-504.
- Martínez-Cayuela M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 39(1): 5-18.
- Mayer F., Stoop H., Sen S., Bokemeyer C., Oosterhuis J.W., Looijenga L.H.J. (2003). Aneuploidy of human testicular germ cell tumor is associated with amplification of centrosomes. *Oncogen* 22: 3859-3866.
- McKean P.G., Baines A., Vaughan S., Keith G. (2003). γ -Tubulin functions in the nucleation of a discrete subset of microtubules in the eukaryotic flagellum. *Current Biology* 13: 598-602.

- Meads T., Schroer T.A. (1995). Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motility Cytoskeleton* 32: 273-288.
- Means A.R., Dedman J.R., Tash J., S., Tindall D., J., M, Sickle Van, Welsh M., J. (1980). Regulation of the Testes Sertoli Cell by Follicle Stimulating Hormone. *Annual Review of Physiology* 42: 59-70.
- Meraldi P., Nigg A.E. (2002). The centrosome cycle. *Febs Letters* 521: 9-13.
- Migliore L, Bocciardi R, Macri C, Lo Jacono F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research* 319(3): 205-13.
- Miller T.A., Smith G.S., Banan A., Kokosca E.R. (2000). Cytoskeleton as a target for injury and damage intestinal epithelium. *Microscience Research Teach* 51(2): 149-155.
- Mohammad A. Al-Bayati, M. Roger Cubertson, Jay P. Shreinder, Leon S. Rosenblatt y Otto G. Raabe. (1992). The Lymphotoxic Action of Vanadate. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 11 (2): 19-27.
- Molina M.J., Molina L.T., (2004). Megacities and atmospheric pollution. *Air & Waste Management Associated* 54: 644-680.
- Morinville, A., Maysinger, D., Shaver, A. (1998). From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends in Pharmacology Science* 19: 452-460.
- Moritz M., Braunfled M.B., Sedat J.W., Alberts B.M., Agard D.A. (1995a). Microtubule nucleation by γ -tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378: 638-640.
- Moritz M., Braunfled M.B., Fung J.C. Sedat J.W., Alberts B.M., Agard D.A. (1995b). Three dimensional structural characterization of centrosomes from Drosophila embryos. *Journal of Cell Biology* 130: 1149-1159.
- Moritz M., Braunfled B.M., Guénebaut V., Heuser J., Agard D. A. (2000). Structure of the γ -tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation. *Nature Cell Biology* 2: 365-370.
- Morgan M.A., El-Tawil S.O. (2003). Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacological Research* 47: 75-85.
- Mruk D.D., Silvestrini B., Mo Men-yun, Cheng C.Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase- a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 65: 305-311.
- Mugica V., Maubert M., Torres M., Muñoz J., Rico E. (2002). Temporal and spatial variations of metals content in TPS and PM10 in Mexico City during 1996-1998. *Aerosol Science* 33: 91-102.

- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters* 150: 135–143.
- Navara C.S., Benyumov A., Vassilev A., Naria R.K., Ghosh P., Uckun F.M. (2001). Vanadocenes as potent anti-proliferativ agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*12: 369-376.
- Nechay B. R. (1984). Mechanisms of action of vanadium. *Annual Review Pharmacology and Toxicology* 24: 501-524.
- Nédélec F., Surrey T., Karsenti E. (2003). Self-organization and forces in microtubule cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology* 15:118-124.
- Nriagu J.O. (1990). Global metal pollution. Poisoning the biosphere?. *Environment* 32(7): 7-32.
- Nriagu J.O., Pirrone N. (1998). Emission of vanadium into atmosphere. En: Nriagu. Vanadium in the environment. Parte I. Health effects. John Wiley & Sons. New York. pp. 25-36.
- Oakley B.R., Oakley C.E., Yoon Y., Jung M.K. (1990). γ -Tubulin is a component of the spindle-pole that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61: 1289-1301.
- Oakley B.R. (1992). γ -Tubulin: the microtubule organizer?. *Trends in Cell Biology*. 2: 1-5.
- Oakley, B.R. y Akkari, Y.N. (1999). γ -Tubulin At Ten: Progress and Prospects. *Cell Structure and Function* 24: 365-372.
- Oberg S.G, Parker D.R., Sharma R.P. (1978). Distribution and elimination of an intratracheally administered vanadium compound in the rat. *Toxicology* 11: 315-323.
- Okuno M. (1980). Inhibition and relaxation of sea urchin sperm flagella by vanadate. *Journal of Cell Biology* 85(3): 712-25.
- Orris P, Cone J, McQuilkin S. (1983). Health hazard evaluation report. Eureka Company, Bloomington Il. Washington, D.C. National Institute of Occupational Safety and Health. U.S. Department of Health and Human Services. (NTIS-PB85-163574).
- Owusu-Yaw J., Cohen M.D., Fernando S.Y. Wei C.I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicology Letters* 50: 327-336.
- Parker R.D., Sharma R.P., Oberg S.G. (1980). Distribution and accumulation of vanadium in mice tissues. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 9(4): 393-403.
- Piel M., Nordberg J., Euteneuer U., Bornens M. (2001). Centrosome-Dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 23; 291(5508): 1550-1553.

- Pennisi E. (1998). Structure of Key Cytoskeletal Protein Tubulin Revealed. *Science Cell Biology* 279:176-17.
- Pineau C., Dupaix A., Jégou B. (1999). Session 1: Recent Advances and Techniques in *In Vitro* Toxicology. The Co-culture of Sertoli cells and germ cell: Applications in Toxicology. *Toxicology in Vitro* 13: 513-520.
- Poucheret, P., Verma, S., Grynepas, M.D., McNeill, J.H. (1998). Vanadium and diabetes. *Molecular Cell Biochemistry* 188, 73–80.
- Rainey W.E., Kramer R.E., Manson J.I., Shay J.W. (1985). The effects of taxol, a microtubule-stabilizing drug, on steroidogenic cells. *Journal of cellular Physiology* 123:7-24.
- Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky–Wegman P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenic and vanadium pentoxide. *Mutation Research* 386: 291-298.
- Rieder C.I., Faruki S., Khodjakov A. (2001). The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. *Trends Cell Biology* 11: 413-419.
- Riveros-Rosas H., Pfeifer G.D., Lyman D.R., Pedroza J.L., Julián-Sánchez A., Canales O., Garfias J. (1997). Personal exposure to elements in Mexico city air. *The Science of the Total Environment* 198: 79-96.
- Rehder, D. (1992). Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals* 5: 3–12.
- Ress N.B., Chou B.J., Renne R.A., Dill J.A., Miller R.A., Roycroft J.H., Hailey J.R., Haseman J.K., Bucher R.B. (2003). Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F mice. *Toxicological Sciences* 74: 287-296.
- Roldán R.E., Altamirano L.M.A., (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 245:61-65.
- Romieu I., Weitzenfeld h., Finkelman J. (1990). Urban air pollution in latin America and Caribbean: Health perspectives. *World Health Statistics Query* 43 (3): 153-67.
- Ross R.D. (1974). La industria y la contaminación del aire. (1ª ed). Editorial Diana, México, pp 19-27.
- Ross H.M., Romrell J.L., Kaye I.G., (1998) Histología. Editorial Médica panamericana. 3a. ed., Madrid. pp. 817.
- Russanov E, Zaporowska H, Ivancheva E, Kirkova M y Konstantiniva S. (1994). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107(3): 415-421.

- Russell L.P., Malone J.P., MacCurdy D.S. (1981). Effect of the microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in rat. *Tissue Cell* 13:349-367.
- Saez M.J. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 15(5): 574-626.
- Sale S.W. y Gibbons R.I. (1979). Study of the mechanism of vanadate inhibition of the dynein cross-bridge cycle in sea urchin sperm flagella. *Journal of Cell Biology* 82: 291-300.
- Saldívar-Osorio L., Tovar Tovar A., Fortoul van der Goes Teresa. (2004a). Contaminantes inorgánicos: Cadmio. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 259-276.
- Saldívar-Osorio L., Tovar Tovar A., Guerrero-Namihira D. (2004b). Contaminantes inorgánicos: Plomo. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 217-39.
- Schiebel E. (2000). γ -Tubulin complexes: binding to centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 113-118.
- Schnackenberg B.J., Khodjakov A., Rieder C.L., Palazzo R.E. (1998). The disassembly and reassembly of functional centrosomes *in vitro*. *Proceedings National Academic Science* 95: 9295-9300.
- Scholey J.M. Brust-Mascher I., Mogilner A. (2003). Cell division. *Nature* 422; 746-752.
- Sheriff S.D. (1991). Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reproductive toxicology* 5: 513-515.
- Shimizu T, Johnson KA. (1983). Presteady state kinetic analysis of vanadate-induced inhibition of the dynein ATPase. *Journal Biology Chemistry* 25; 258 (22):13833-40.
- Shu H.B., Li Z., Palacios M.J., Li Q., Joshi H.C. (1995). A transient association of γ -Tubulin at the midbody is required for the completion of cytokinesis during the mammalian cell division. *Journal of Cell Science* 108: 2955-2962.
- Sikka S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medical Chemistry* 8: 851-862.
- Simerly C., Zoran S.S., Payne C., Dominko T., Sutovsky p., Navara C.S., Salisbury J.L., Schatten G. (1999). Biparental inheritance of γ -tubulin during human fertilization: Molecular reconstruction of functional zygotic centrosomes in inseminated human oocytes and in cell-free extracts nucleated by human sperm. *Molecular Biology of the cell* 10: 2955-2969.
- Sitprija V., Eiam-Ong S. (1998). Vanadium and metabolic problems. En: Nriagu. Vanadium in the Enviroment. Parte II. Jonh Wiley & sons, New York, pp 91-119.

- Steinberger A. y Klinefelter G.R. (1993) Sensitivity of Sertoli and Leydig cell to xenobiotics in vitro models. *Reproductive Toxicology*. 7 (1): 23-37.
- Stoiber T., Bonacker D., Böhm K.J., Bolt H.M., Thies R., Degen G.H., Unger E. (2004). Disturber microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutation Research* 563: 97-106.
- Sulimenko V., Sulimenko T., Poznanovic S., Nechiporuk-Zloy V., Böhm K.J., Macurek L., Unger E., Dráber P. (2002). Association of brain gamma-tubulins with alpha-beta-tubulin dimers. *Biochemistry Journal* 365: 889-895.
- Sun M. (1987). Toxicity of vanadium and its environmental health standar. Universidad de Ciencias Médicas. Changdu China.
- Thompson E.J. y Perry P.E. (1988). The identification of micronucleated chromosomes: A possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3: 415-418.
- Thompson, K.H., Leichter, J., McNeil, J.H. (1993). Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ diabetic rats. *Biochemistry Biophysics Research Community* 97: 1549-1555.
- Thompson H., Chasteen N.D., Meeker L.D. (1984). Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 5: 849-852.
- Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermosillo A.G., Márquez M.F., Cárdenas M. (2002). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana* 139(1): 57-63.
- Vinh N.B., Kern W. J., Hancock O.W., Howard J., Davis N.T. (2002) Reconstruction and characterization of budding Yeast γ -Tubulin complex. *Molecular Biology of the Cell*. 13: 1144-1157
- Vogl A.W., Linck R.W., Dym M. (1983). Colchicine-induced changes in the cytoskeleton of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) Sertoli cells. *American Journal Anatomy* 168: 99-108.
- Vogl A.W. (1988). Changes in the distribution of microtubules in rat Sertoli cells during spermatogenesis. *The anatomical record* 222: 34-41.
- Wiese C., Zheng Y. (1999). γ -Tubulin ring complexes and their interaction with microtubule-organizing center. *Current Opinion Structural Biology* 9:250-259.
- Wise O`N. D., Krahe R., Oakley R.B. (2000). The γ -Tubulin Gene Family in Humans. *Genomics* 67: 164-170.
- Zaporowska H., Scibior A. (1998). Vanadium and its significance in animal cell metabolism. En: Nriagu. Vanadium in the Environment. Parte II. Jonh Wiley & sons, New York , pp 121-133.
- Zar JH. 1999: Biostatistical analysis, (4^a ed). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA. pp 718.

- Zhang S. (1999). An atlas of histology. (1^a ed). Springer. New York, pp. 426.
- Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterwortg L., Shi X. (2001). Vanadate-Induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392(2): 311-320.
- Zheng Y., Wong M.L., Alberts B.M., Mitchison T.J. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -Tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578-583.
- Zhong B.Z., Gu Z.W., Wallace W.E., Whong W.Z., Ong T. (1994) Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research* 321: 35-42.

11. Páginas WEB.

- Health Effects Institute (HEI) (2002). Understanding the Health Effects of Components of the Particulate Matter Mix: Progress and Next Steps. *HEI Perspectivas*. En línea en: <http://www.healtheffects.org/Pubs/Perspectives-2.pdf>
- Instituto Nacional de Ecología (INE) (1998). Tercer informe sobre la calidad del aire en ciudades mexicanas. En línea en: <http://www.ine.gob.mx>
- Instituto Nacional de Ecología (INE) (2004). <http://www.ine.gob.mx>
- Occupational Safety and Health (OSHA) (2005). Guideline for vanadium pentoxide. En línea en: <http://www.osha.gv/SLTC/healthguidelines/vanadiumpentoxidedust/recognition.html>