



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

¿ES EL PENTÓXIDO DE VANADIO CAPAZ DE INDUCIR  
EFECTOS APOPTÓTICOS EN DIFERENTES 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 :

GABRIELA ARIADNA MARTINEZ LEVY



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. PATRICIA MUSSALI GALANTE

2005



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

m. 349030



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: Gabriele Ariadna Martínez Lev y

FECHA: 10- octubre - 2005

FIRMA: [Signature]

**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:

¿ Es el pentóxido de vanadio capaz de inducir efectos apoptóticos en diferentes células testiculares en un modelo murino de exposición por inhalación ?

realizado por Gabriela Ariadna Martínez Lev y

con número de cuenta 09806253-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director

Propietario Biol . Patricia Mussali Galante

[Signature]

Propietario Dra . Teresa Imelda Fortoul van der Goes

[Signature]

Propietario Dr . Mario Agustín Altamirano Lozano

[Signature]

Suplente M en C. Martha Patricia Bizarro Nevares

[Signature]

Suplente M en C. Sergio Augusto Hernández Escobar

[Signature]

Consejo Departamental de Biología.

[Signature]

M en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
 FACULTAD DE ENSEÑANZA DE BIOLÓGICA

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá por estar siempre cerca y acompañarme en todo momento buscando que todos mis proyectos salgan adelante.

A mi papá por que siempre se ha preocupado por que este contenta y haciendo lo que me guste.

A mi hermano por que siempre ha estado presente cuestionando todas mis acciones, y permitiéndome reflexionar acerca de lo que quiero hacer.

A Gabino y Rosa por que aunque no lo son, lo quiero como a mis abuelitos y siempre han estado presentes y preocupados por mi y mi futuro.

A mi tutora Patricia Mussali Galante por todo el apoyo que me dio y por lo que me enseñó en estos años de trabajo.

A Tere, a quien no hay forma de agradecerle todo el apoyo que me dio y las puertas que me ha permitido abrir para seguir adelante.

A mis sinodales la Dra Teresa Fortoul, el Dr, Mario Altamirano, la M. en C. Patricia Bizarro y al M en C. Sergio Hernández, por haber leído y corregido mi tesis.

A Rose por todo el apoyo que me dio para hacer tan bonitas presentaciones y por estar siempre preocupada por que las cosas vayan bien en el laboratorio.

A Paty Bizarro y a Lauris por que siempre estuvieron presentes y dispuestas a resolver mis dudas.

A Verónica y a Mabel por haberme apoyado con el corte de las muestras y las contraticiones, su apoyo fue fundamental para que este trabajo saliera adelante

Al Dr. Castell, a Beatriz Hernández, a Judith y a Miguel, por todo lo que me enseñaron de inmunohistoquímica y TUNEL.

Al señor Gerardo y a Víctor por todo el apoyo en los sacrificios y en el lavado del material.

A todos mis compañeros del laboratorio Paty Díaz, Chris, Sergio, Michell, Jose Luis,

Marce, Gabito y Vianey sin ustedes este trabajo no hubiera salido adelante.

A mi novio Alvaro, por ser tan paciente y cariñoso conmigo y por apoyarme en todo momento.

A mis queridísimas amigas y compañeras Marce, Gabito y Vianey, gracias por todo su apoyo, paciencia y cariño, sin ustedes este trabajo no sería lo que es.

A mis mejores amigas Yoatzin, Ana Alí y Valeria, por que en su momento me han apoyado a salir adelante y llegar hasta donde estoy

A mis compañeros consejeros Sherezada, Adriana y Sergio, por que hicieron de mi paso por la facultad un evento maravilloso y muy especial.

A todos mis amigos Mauricio, Libertad, Ingrid, Ayami, Clara, Carlitos, Ciuthei, Mari Carmen, Alicia, Jimena, Paulina, Deny, Priscila, Esperanza y Gaby Melo, por estar presentes y ser tan buenos amigos.

Al departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM

A la Facultad de Ciencias, UNAM.

A todos aquellos que hicieron posible este trabajo y que olvido mencionar.

## **INDICE**

Resumen	1
Marco teórico	1
1. Contaminación atmosférica	1
1.2 Contaminación por metales y sus efectos en la salud	3
2. Vanadio	3
2.1 Propiedades físico-químicas del vanadio	4
2.2 Fuentes de exposición a vanadio	4
2.3 Toxicocinética y toxicodinámica del vanadio	5
2.4 Efectos tóxicos del vanadio	6
2.4.1 Efectos del vanadio en la célula	6
2.4.2 Efectos reprotóxicos del vanadio	7
2.4.3 Apoptosis, proliferación y vanadio	8
3.2 Apoptosis y su regulación en el testículo	9
3.2.1 Apoptosis en el testículo	14
3.2.1.1 Células germinales	14
3.2.1.2 Células de Sertoli	16
3.2.1.3 Células de Leydig	17
3.2.2 Regulación de la apoptosis en el testículo	17
Justificación	18
Hipótesis	19

Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Metodología	19
1. Modelo experimental	19
2. Detección de caspasa-3 en células apoptóticas	22
Resultados	23
Discusión	33
Conclusiones	40
Perspectivas	40
Referencias	41

## RESUMEN

El vanadio es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la atmósfera siendo ahí en donde se localizan las mayores concentraciones de este metal, además se ha encontrado que una de las vías de exposición más tóxica es la inhalada. Por otro lado, a este elemento se le han adjudicado tanto efectos apoptóticos como antiapoptóticos y se ha encontrado que es tóxico para el aparato reproductor masculino.

En nuestro modelo, identificamos los efectos apoptóticos que presenta este elemento a través de las técnicas de inmunohistoquímica para caspasa-3 y TUNEL en los diferentes tipos celulares del testículo en una exposición crónica por vía inhalada.

Encontramos que el  $V_2O_5$ , en nuestro modelo, no afecta el proceso apoptótico en espermatogonias, espermatoцитos ni en células de Leydig. Sin embargo, genera un decremento en la presencia de caspasa-3 en las espermátidas, al parecer esta proteína apoptótica está involucrada en la liberación de los cuerpos residuales, por lo que el vanadio, en nuestro modelo, puede estar generando la liberación de espermatozoides aberrantes. Finalmente en las células de Sertoli se produjo un aumento en presencia de caspasa-3, pero no se detectaron cambios con la técnica de TUNEL, por lo que es necesario realizar más experimentos para identificar qué está ocurriendo en este tipo celular.

## MARCO TEÓRICO

### **1. Contaminación atmosférica**

La atmósfera está constituida por un conjunto de gases que cubren la superficie terrestre, y tiene diversas funciones necesarias para el desarrollo de la vida en la Tierra, entre ellas está el ser un reservorio de gases, moderar la temperatura de la Tierra y promover el ciclo del agua (Manhanan 2002; Albert, 2004).

Se les denomina contaminantes atmosféricos, a las sustancias, organismos o formas de energía que se encuentran en ambientes a los que no pertenecen, o en concentraciones superiores a las propias del ecosistema (Albert, 2004). Estos pueden provenir tanto de fuentes antropogénicas (quema de combustibles fósiles, diferentes

industrias, etc.) como de fuentes naturales (erupciones volcánicas, incendios forestales, etc.) (Philp, 2001; Manhanan, 2002; Albert, 2004).

Cuando los contaminantes exceden la capacidad del ambiente para que éste los disperse o los diluya en la atmósfera, generan alteraciones en la misma y con ello en la salud de los seres humanos, promoviendo el desarrollo de diversas enfermedades, así como la disminución en la tasa de reproducción y hasta la muerte (Philp, 2001; Manahan, 2002).

Durante el siglo XIX, la emisión de estas sustancias a la atmósfera (por causas antropogénicas) se incrementó considerablemente debido al rápido y desordenado crecimiento urbano y a la industrialización (Freedman, 1998; Lascaña- Navarro *et al.*, 1999; Mugica *et al.*, 2002). En consecuencia, la contaminación atmosférica se ha convertido en uno de los principales problemas de las grandes ciudades, definidas como áreas metropolitanas con más de 10 millones de habitantes (Molina y Molina, 2004). La zona metropolitana de la Ciudad de México es una de las más representativas pues su población alcanza los 20 millones de habitantes (Molina y Molina, 2004; Mugica *et al.*, 2002).

Esta ciudad presenta graves problemas ambientales provocados por factores relacionados con la industria y el transporte (Télez-Rojo *et al.*, 1997; Molina y Molina, 2004). Éste último es la principal causa de contaminación en el área metropolitana ya que en ella circulan alrededor de 3.5 millones de automóviles (Mugica *et al.*, 2002; Molina y Molina, 2004). Para el año 2000 los contaminantes emitidos por vehículos liberaron a la atmósfera 96% del monóxido de carbono total, 70% de los óxidos de nitrógeno, 31 % de las partículas suspendidas menores a 10 micras (PM<sub>10</sub>) y 45% de las partículas suspendidas menores a 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>) (Molina y Molina, 2004).

Muchos estudios han demostrado que las partículas suspendidas producen efectos adversos en la salud, esto se debe a que por su tamaño son capaces de penetrar hasta los alveolos pulmonares causando diferentes efectos tóxicos (Lascaña- Navarro *et al.*, 1999; Mugica *et al.*, 2002), que derivan en un incremento en la morbilidad y en la mortalidad prematura (Lascaña- Navarro *et al.*, 1999). Estos efectos se han relacionado principalmente con la presencia de metales y metales de transición asociados a estas partículas (Osornio-Vargas *et al.*, 2003).

## 1.2 Contaminación por metales y sus efectos en la salud

Los metales son elementos no biodegradables, por lo que persisten largo tiempo en la atmósfera (Waalkes *et al.*, 2000; Manhanan, 2002) formando compuestos poco solubles con el hidróxido (OH<sup>-</sup>), el carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) y el sulfuro (S<sup>2-</sup>) (Manhanan, 2002).

La concentración de estos compuestos en la atmósfera, se debe principalmente a las erupciones volcánicas y a la combustión del petróleo por la industria y el transporte (Mugica *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2003). Dentro de los metales que se liberan por estas actividades se encuentran el plomo y el vanadio, siendo éste último el principal componente orgánico-metálico del petróleo (Mugica *et al.*, 2002).

Todos estos metales se adhieren a las PM<sub>2.5</sub>, por lo que son de fácil absorción y distribución por la vía inhalada (Lascaña-Navarro *et al.*, 1999; Manhanan, 2002; Mugica *et al.*, 2002). Dentro de los organismos, las formas inorgánicas de estos compuestos tienden a unirse fuertemente con algunas proteínas y en algunos tejidos, lo que promueve la acumulación del tóxico en diferentes órganos blanco como es el caso del hígado, el riñón y los huesos (Manhanan, 2002).

Los metales pueden intervenir en una gran variedad de procesos celulares, permitiendo la activación de diversas reacciones metabólicas (Leonard *et al.*, 2004). Se les han adjudicado efectos neurotóxicos, inmunotóxicos (Waalkes *et al.*, 2000) y cancerígenos (Waalkes *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Chen y Shi, 2002; Leonard *et al.*, 2004). Entre los metales que han sido considerados como promotores de neoplasias, se encuentran el cromo, el cobalto, el cobre, el arsénico, el níquel y el vanadio (Waalkes *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Chen y Shi, 2002; Leonard *et al.*, 2004) Con respecto a este último existe controversia, debido a que otros autores lo consideran antineoplásico (Evangelou, 2002, Mukherjee *et al.*, 2004).

## 2. Vanadio

El vanadio fue descubierto en México en 1813 por Andrés Manuel del Río (Guevara-García, 1996; Barceloux, 1999), quién lo denominó "eritronio", debido a que las sales de este elemento se tornan rojas cuando se tratan con calor y ácidos. Sin embargo, poco tiempo después se concluyó que el nuevo elemento descubierto era sólo una nueva forma de cromo (Guevara-García, 1996).

## 1.2 Contaminación por metales y sus efectos en la salud

Los metales son elementos no biodegradables, por lo que persisten largo tiempo en la atmósfera (Waalkes *et al.*, 2000; Manhanan, 2002) formando compuestos poco solubles con el hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), el carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) y el sulfuro ( $\text{S}^2$ ) (Manhanan, 2002).

La concentración de estos compuestos en la atmósfera, se debe principalmente a las erupciones volcánicas y a la combustión del petróleo por la industria y el transporte (Mugica *et al.*, 2002; Fernández *et al.*, 2003). Dentro de los metales que se liberan por estas actividades se encuentran el plomo y el vanadio, siendo éste último el principal componente orgánico-metálico del petróleo (Mugica *et al.*, 2002).

Todos estos metales se adhieren a las  $\text{PM}_{2.5}$ , por lo que son de fácil absorción y distribución por la vía inhalada (Lascaña- Navarro *et al.*, 1999; Manhanan, 2002; Mugica *et al.*, 2002). Dentro de los organismos, las formas inorgánicas de estos compuestos tienden a unirse fuertemente con algunas proteínas y en algunos tejidos, lo que promueve la acumulación del tóxico en diferentes órganos blanco como es el caso del hígado, el riñón y los huesos (Manhanan, 2002).

Los metales pueden intervenir en una gran variedad de procesos celulares, permitiendo la activación de diversas reacciones metabólicas (Leonard *et al.*, 2004). Se les han adjudicado efectos neurotóxicos, inmunotóxicos (Waalkes *et al.*, 2000) y cancerígenos (Waalkes *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Chen y Shi, 2002; Leonard *et al.*, 2004). Entre los metales que han sido considerados como promotores de neoplasias, se encuentran el cromo, el cobalto, el cobre, el arsénico, el níquel y el vanadio (Waalkes *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Chen y Shi, 2002; Leonard *et al.*, 2004) Con respecto a este último existe controversia, debido a que otros autores lo consideran antineoplásico (Evangelou, 2002, Mukherjee *et al.*, 2004).

## 2. Vanadio

El vanadio fue descubierto en México en 1813 por Andrés Manuel del Río (Guevara-García, 1996; Barceloux, 1999), quién lo denominó "eritronio", debido a que las sales de este elemento se tornan rojas cuando se tratan con calor y ácidos. Sin embargo, poco tiempo después se concluyó que el nuevo elemento descubierto era sólo una nueva forma de cromo (Guevara-García, 1996).

En 1831 Nils Sefstrom redescubrió a este metal de transición, dándole el nombre de Vanadin (Vanadio) en honor a Vanadis, diosa de la belleza y la fertilidad (Mukherjee *et al.*, 2004).

## **2.1. Propiedades físico-químicas del vanadio**

El vanadio es un metal de transición situado en el grupo Vb de la tabla periódica (Léonard y Gerber, 1994; Barceloux, 1999), se caracteriza por su color blanco grisáceo y presenta una masa molecular relativa de 50.9 g/mol (ATSDR, 1992; WHO, 2001). Es altamente reactivo frente al oxígeno, al nitrógeno y al carbono, además de ser capaz de combinarse con casi todos los metales a temperaturas elevadas (arriba de los 300 ° C.) (ATSDR, 1992; Barceloux, 1999).

Este metal de transición existe en diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, siendo las valencias más frecuentes +3, +4, +5 y la más estable +2 (WHO, 2001; Barceloux, 1999; Léonard y Gerber, 1994). El compuesto más usado y tóxico es el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ), el cual se caracteriza por su color amarillo rojizo y por presentar una masa molecular relativa de 181.9 gr/mol (WHO, 2001).

Finalmente, es importante mencionar que la estructura del vanadio se asemeja a la del fósforo y del magnesio, por lo que suele ocupar el lugar de estos compuestos en diferentes procesos celulares (Nechay, 1984; Crans *et al.*, 2004).

## **2.2 Fuentes de exposición a vanadio**

El vanadio es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en nuestro planeta (ASTDR, 1992; WHO, 2001). Lo podemos encontrar en suelo, agua, alimentos y aire (ASTDR, 1992; Barceloux, 1999; WHO, 2001) siendo esta última la fuente por la que estamos expuestos a mayores concentraciones de este metal de transición (Manhanan, 2002).

Las concentraciones de vanadio en la atmósfera pueden ser resultado de procesos naturales como el polvo continental, los aerosoles marinos y las erupciones volcánicas (ATSDR, 1992; Léonard y Gerber, 1994). Sin embargo, la principal fuente de vanadio en el aire se relaciona con algunas actividades como la combustión del petróleo, del carbón y de aceites pesados durante la generación de energía y calor

(ATSDR, 1992; Barceloux, 1999; WHO, 2001; Manhanan, 2002). También lo podemos encontrar en el gas natural o como contaminante emitido por las industrias metalúrgicas (ATSDR, 1992; Barceloux, 1999).

Es importante destacar que un total de 280 toneladas de vanadio son emitidas anualmente a la atmósfera, de las cuales 210 provienen de actividades antropogénicas y solamente 70 resultan de factores naturales (Léonard y Gerber, 1994). Probablemente esta es la causa por la que las concentraciones de vanadio atmosférico son mayores en las áreas urbanas (0.5 – 1230 ng/m<sup>3</sup>), comparadas con las rurales (0.4-500 ng/m<sup>3</sup>) (WHO, 2001).

En consecuencia, la población general se encuentra expuesta a un rango que va de 0.4 a 1230ng V/m<sup>3</sup> (WHO, 2001). Para el personal ocupacionalmente expuesto (POE) el rango es de 1µg a 88.7mg V/m<sup>3</sup> (Barceloux, 1999; WHO, 2001). Es importante destacar que concentraciones mayores a 70mg V/m<sup>3</sup> están consideradas como de peligro inmediato a la salud y la vida humana (Barceloux, 1999). Por lo anterior, la exposición del POE a altas concentraciones vanadio es de gran preocupación (Barceloux, 1999; WHO, 2001), siendo las industrias minera, metalúrgica, cerámica y del acero y en las plantas generadoras de electricidad -por la quema de petróleo- en donde se encuentran mayores concentraciones de este elemento (Huang *et al.*, 2000).

### **2.3 Toxicocinética y toxicodinámica del vanadio**

Debido a que la exposición a vanadio puede ser a través del suelo, los alimentos, el agua y el aire, las principales vías de entrada de este metal al organismo son la oral y la inhalada (ATSDR, 1992; Barceloux, 1999).

El vanadio al ser inhalado es capaz de llegar a los pulmones y traspasar los alvéolos (Manhanan, 2002), en donde alrededor del 90% (Léonard y Gerber, 1994) se transporta por difusión simple al torrente sanguíneo (Manhanan, 2002).

Al llegar a la sangre el vanadio entra a las células a través de canales iónicos no específicos (Stern *et al.*, 1993), alrededor del 90% se mantiene en el citoplasma, mientras que el 10% restante se distribuye principalmente en el núcleo, seguido por los microsomas y la mitocondria (Evangelou, 2002). En la célula se reduce a vanadilo, por la acción del glutatión y del ascorbato (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002; Baran,

2003). Este elemento también puede auto-oxidarse a vanadato en presencia del oxígeno (Baran, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004).

Una vez que el vanadio entra a la célula, los elementos proteicos como la transferrina y la albúmina, se encargan de transportarlo a diferentes tejidos y órganos (Stern *et al.*, 1993; Barceloux, 1999; WHO, 2001; Evangelou, 2002; Baran, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004) como al hígado, al riñón, al cerebro, al bazo, a los músculos, a los huesos y también lo podemos encontrar en los testículos (Barceloux, 1999; WHO, 2001; Baran, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004).

La principal ruta de eliminación es a través de la orina con un comportamiento bifásico, presentándose una primera fase rápida (15-40 horas) y una segunda fase de eliminación lenta (40-50 días) (Ivancsits *et al.*, 2002; WHO, 2001).

## **2.4 Efectos tóxicos del vanadio**

El Vanadio es más tóxico por la vía inhalada que por la vía oral, siendo el sistema respiratorio el más afectado (ASTDR, 1992), en donde puede causar rinitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía (Jandhyala y Hom, 1983; RAIS, 1991; ATSDR, 1992; Barceloux, 1999; WHO, 2001), broncoespasmo, faringitis y bronconeumonía (RAIS, 1991; Barceloux, 1999). También se ha encontrado que puede producir conjuntivitis, dermatitis (RAIS, 1991; Barceloux, 1999; WHO, 2001), cefalea, vértigo, depresión y temblor distal (RAIS, 1991; Barceloux, 1999). Además ha sido considerado como tóxico para el tracto gastrointestinal produciendo diarrea, náuseas, vómito y espasmo muscular (RAIS, 1991; ATSDR, 1992).

### **2.4.1 Efectos del Vanadio en la célula**

El vanadato presenta un gran parecido con el fósforo, por lo que es capaz de inhibir la actividad de algunas enzimas (Nechay, 1984; Crans *et al.*, 2004) a concentraciones extracelulares relativamente altas ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ) (Barceloux, 1999), entre las que encontramos a las ATPasas, las fosfatasa ácidas y alcalinas, las fosfodiesterasas, las ribonucleasas, las DNAsas, a la glucosa 6-fosfatasa y la tirosina fosfatasa entre otras (Nechay, 1984; Stern *et al.*, 1993; Léonard y Gerber, 1994; Crans *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2004). Lo anterior puede generar daño al citoesqueleto, afectar la

síntesis y reparación del ácido desoxiribonucleico (ADN), así como activar o inhibir a distintas proteínas relacionadas con el ciclo celular (Stern *et al.*, 1993; Léonard y Gerber, 1994).

Por otro lado, la reducción de vanadato a vanadilo produce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la reacción de Fenton (Ding *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002), lo que puede generar daño al ADN y con ello la activación de diferentes biomoléculas (Zhang *et al.*, 2001) como el factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 8 (IL-8), la proteína activadora 1 (AP1), las proteínas cinasas activadoras de mitógenos (MAPK) y genes como ras, c-raf-1, p53, p21 y Rb, entre otros (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004). Dependiendo de la cascada de señalización afectada, el vanadio activa el proceso de muerte o proliferación celular (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). La liberación de ROS también puede resultar en daño mitocondrial que promueve la liberación del citocromo-c y con ello la promoción de la apoptosis (Evangelou, 2002).

Ya que el vanadio puede promover tanto efectos apoptóticos como antiapoptóticos (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002), su estatus como agente neoplásico o antineoplásico es controversial (Evangelou, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004). Esto también se ha relacionado con la capacidad del vanadio para afectar el aparato reproductor masculino, como a continuación se describe (D`Cruz y Uckun, 2000; Ghosh *et al.*, 2000; Aragón y Altamirano-Lozano, 2001).

#### **2.4.2 Efectos reprotóxicos del vanadio**

En modelos animales, el vanadio es capaz de traspasar la barrera hematotesticular y acumularse en los testículos (Domingo, 1996), donde puede generar una gran variedad de efectos tóxicos como daño en las células que conforman el epitelio testicular, resultando en alteraciones en la espermatogénesis e infertilidad (Domingo, 1996, Nechay, 1984, ASTDR, 1992, Barceloux 1999).

Por ejemplo, Llobet y cols. en 1993 expusieron ratones durante 64 días a 60 y 80mg V/Kg de metavanadato de sodio por vía oral, lo que produjo un decremento en el número de espermátidas y espermatozoides, así como una disminución en el número

de hembras preñadas por los ratones tratados, afectando así la fertilidad de éstos.

Posteriormente Aragón y Altamirano-Lozano en 2001 observaron que la administración intraperitoneal de tetra-óxido de vanadio (18.8 mg V/Kg) cada 2 días durante 2 meses resultó en la disminución del peso testicular, en alteraciones de la viabilidad y en la movilidad de los espermatozoides, así como anomalías en los mismos.

También se ha demostrado que la administración intratesticular de 4 diferentes vanadocenos a una concentración de 7.5 mg./kg./testículo cada 2 días durante 28 días, produjo atrofia de los túbulos seminíferos, inhibición de la espermatogénesis y pérdida de las espermátidas, que se explica por la capacidad del vanadio de producir daño al ADN y apoptosis (D´Cruz y Uckun, 2000).

Además, *in vitro* se ha encontrado que diferentes vanadocenos (12.5 - 250  $\mu$ M) inducen apoptosis en las células transformadas de testículo Tera-2 y Ntera-2, por lo que se le ha considerado un potente antineoplásico (Ghosh *et al.*, 2000).

En conclusión, la infertilidad y los efectos antineoplásicos producidos por el vanadio se han relacionado con la capacidad de este metal de producir apoptosis (Ghosh *et al.*, 2000; D´Cruz y Uckun, 2000).

### **2.4.3. Apoptosis, proliferación y vanadio.**

Se ha observado que el vanadio puede promover tanto efectos apoptóticos como proliferativos, que se han relacionado con la capacidad de este metal de transición de producir ROS e inhibir la fosforilación de las proteínas tirosinas fosfatasa (PTPs) (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002). Estos efectos dependen del tipo celular, el organismo, la especie de vanadio utilizada, la concentración y la vía de exposición (Chen *et al.*, 2001; Evangelou, 2002).

Aunque la información acerca de los efectos proliferativos de este elemento es escasa, existen algunos estudios donde se demuestra la capacidad antiapoptótica del vanadio; uno de éstos es el realizado por Cruz y cols., 1995 en un modelo *in vitro* con condrocitos expuestos a ortovanadato (5-50 $\mu$ M) durante 48 horas, lo que produjo un incremento en la sobrevivencia de las células que no estaban en proliferación.

También se ha observado que el vanadato a concentraciones menores a  $10^{-10}$ M en un modelo *in vitro* fue capaz de estimular la formación de colonias en células neoplásicas de mama y de pulmón (Stern *et al.*, 1993), estos efectos también se observaron en células malignas de glia tratadas con vanadato (250  $\mu$ M) durante 48 horas (Chin *et al.*, 1999) y en células epidérmicas JB6 de ratón tratadas con vanadato (10  $\mu$ M) en 3 intervalos de 10, 30 y 60 minutos (Li *et al.*, 2004).

En contraste dentro de los estudios que señalan al vanadio como un posible agente apoptótico, se encuentran el realizado con monovanadato de amonio (4.27  $\mu$ mol/L) por vía oral durante 40 días, que ocasionó un aumento en el número de células apoptóticas en ratas con cáncer de mama (Sankar *et al.*, 2005).

El incremento en la apoptosis también se observó en células SW620 *in vitro* tratadas con bisperoxovanadio (0.5 -2.5  $\mu$ M) durante 48 horas (Scrivens *et al.*, 2003), así como en células neoplásicas de mama y de pulmón *in vitro* expuestas a vanadato en concentraciones mayores a  $10^{-10}$ M (Stern *et al.*, 1993).

Asimismo se encontró que en un modelo *in vitro* con condrocitos primarios, la exposición a ortovanadato (5-50 $\mu$ M) durante 48 horas produjo un incremento en la apoptosis de las células que estaban en proliferación, lo que al parecer depende de las concentraciones de los factores de crecimiento (Cruz *et al.*, 1995).

En otro trabajo con ratones BALB/cJ a los que se les administro metavanadato de sodio (50  $\mu$ g) vía sublingual (dosis única) provocó un incremento en el número de células apoptóticas (Wang *et al.*, 2003).

Finalmente con células epidérmicas JB6 *in vitro* tratadas con metavanadato de sodio (50-400  $\mu$ M) durante 24 horas se encontraron los mismos efectos proapoptóticos (Huang, 2000), esto también se observó en un modelo *in vitro* con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a diferentes vanadocenos (0.01-1 mM) durante 17 horas (Aubrecht *et al.*, 1999).

### **3.2 Apoptosis y su regulación en el testículo**

La apoptosis es un proceso vital en el desarrollo de los organismos pluricelulares (Hale *et al.*, 1996; Cryns y Yuan, 1998; Gilbert, 2000; Lewin, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003), ya que a través de ella mueren las células que no son

También se ha observado que el vanadato a concentraciones menores a  $10^{-10}$ M en un modelo *in vitro* fue capaz de estimular la formación de colonias en células neoplásicas de mama y de pulmón (Stern *et al.*, 1993), estos efectos también se observaron en células malignas de glia tratadas con vanadato (250  $\mu$ M) durante 48 horas (Chin *et al.*, 1999) y en células epidérmicas JB6 de ratón tratadas con vanadato (10  $\mu$ M) en 3 intervalos de 10, 30 y 60 minutos (Li *et al.*, 2004).

En contraste dentro de los estudios que señalan al vanadio como un posible agente apoptótico, se encuentran el realizado con monovanadato de amonio (4.27  $\mu$ mol/L) por vía oral durante 40 días, que ocasionó un aumento en el número de células apoptóticas en ratas con cáncer de mama (Sankar *et al.*, 2005).

El incremento en la apoptosis también se observó en células SW620 *in vitro* tratadas con bisperoxovanadio (0.5 -2.5  $\mu$ M) durante 48 horas (Scrivens *et al.*, 2003), así como en células neoplásicas de mama y de pulmón *in vitro* expuestas a vanadato en concentraciones mayores a  $10^{-10}$ M (Stern *et al.*, 1993).

Asimismo se encontró que en un modelo *in vitro* con condrocitos primarios, la exposición a ortovanadato (5-50 $\mu$ M) durante 48 horas produjo un incremento en la apoptosis de las células que estaban en proliferación, lo que al parecer depende de las concentraciones de los factores de crecimiento (Cruz *et al.*, 1995).

En otro trabajo con ratones BALB/cJ a los que se les administro metavanadato de sodio (50  $\mu$ g) vía sublingual (dosis única) provocó un incremento en el número de células apoptóticas (Wang *et al.*, 2003).

Finalmente con células epidérmicas JB6 *in vitro* tratadas con metavanadato de sodio (50-400  $\mu$ M) durante 24 horas se encontraron los mismos efectos proapoptóticos (Huang, 2000), esto también se observó en un modelo *in vitro* con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* expuestas a diferentes vanadocenos (0.01-1 mM) durante 17 horas (Aubrecht *et al.*, 1999).

### **3.2 Apoptosis y su regulación en el testículo**

La apoptosis es un proceso vital en el desarrollo de los organismos pluricelulares (Hale *et al.*, 1996; Cryns y Yuan, 1998; Gilbert, 2000; Lewin, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003), ya que a través de ella mueren las células que no son

necesarias o que se encuentran dañadas, así mismo se mantiene el equilibrio entre las células que nacen y mueren, se promueve una adecuada respuesta inmune y permite el desarrollo de órganos y tejidos (Duke *et al.*, 1997; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003), además de regular el número de células en un tejido particular (Blanco-Rodríguez, 1998) (Tabla 1).

Tabla 1: Funciones importantes de la apoptosis en los organismos vivos

Función	Ejemplo
Promueve la desaparición de células que ya no son necesarias	Las células de la pared uterina mueren por apoptosis, al perderse durante la menstruación. (Duke <i>et al.</i> , 1997, Laux <i>et al.</i> , 2003)
Regula el número de células en un tejido particular	Para el desarrollo satisfactorio de los espermatozoides, la apoptosis regula el número de células que van madurando. (Blanco-Rodríguez, 1998)
Permite esculpir órganos y tejidos	En el desarrollo del humano la apoptosis es necesaria para remover las membranas que se forman entre los dedos del feto (Duke <i>et al.</i> , 1997, Jordán, 2003)
Permite una buena respuesta inmune	Los linfocitos T que no maduraron satisfactoriamente, mueren en el Timo. (Duke <i>et al.</i> , 1997, Jordán, 2003, Laux <i>et al.</i> , 2003)
Elimina células dañadas	Elimina células infectadas por virus o con mutaciones (Duke <i>et al.</i> , 1997, Laux <i>et al.</i> , 2003)

Algunas alteraciones en el proceso apoptótico están relacionadas con diversas condiciones patológicas, como desordenes neuro-degenerativos entre los que encontramos al Alzheimer, infecciones virales como el SIDA y enfermedades auto-inmunes como el Lupus y el cáncer. (Hale *et al.*, 1996; Duke *et al.*, 1997; Waalkes *et al.*, 2000; Desagher y Martinou, 2000; Adams, 2003; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

Por todo lo anterior ha sido importante detectar a las células apoptóticas, y para ello es necesario conocer tanto sus características bioquímicas como morfológicas, dentro de las cuales se encuentran (Cryns y Yuan, 1998; Alberts *et al.*, 2002; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003):

- Compactación celular, por lo que se pierde contacto con las células vecinas.
- Externalización de residuos de fosfatidilserina, que van a permitir que la célula sea fagocitada.

- Condensación celular, presentándose un núcleo pequeño y fragmentado (Heteropicnosis).
- Cambio de permeabilidad en la membrana mitocondrial.
- Condensación de la cromatina.
- Colapso del citoesqueleto.
- Fragmentación del ADN.
- Producción de ROS.
- Acidificación del espacio intracelular.
- Desintegración de la envoltura nuclear.
- Formación de vesículas rodeadas de membrana citoplasmática que contienen parte de la cromatina y algunos organelos (cuerpos apoptóticos).
- No se produce inflamación.
- Es regulado por una serie de enzimas, denominadas caspasas, que se activan específicamente durante este proceso.

La muerte celular por apoptosis puede desencadenarse a través de dos vías: Una regulada por receptores de muerte (Adams, 2003; Jordán, 2003; Laux *et al.*, 2003; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003) que se localizan en la membrana celular como Fas y el receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1). Para que estos receptores promuevan la apoptosis necesitan ser activados por FasL y TNF $\alpha$  respectivamente (Hale *et al.*, 1996; Arch *et al.*, 1998; Penttiakäinen, 2002; Jordán, 2003).

La otra vía es originada por estrés celular como por ejemplo el daño al ADN (Cryns y Yuan, 1998; Adams, 2003; Riedl y Shi, 2004), alteración en la función de las citosinas (Adams, 2003), activación de oncogenes (Riedl y Shi, 2004) o disminución de contactos con las células que los rodean (Jordán, 2003).

Ambos casos culminan en la activación de las caspasas 8 ó 10. Estas últimas pueden disminuir el potencial de membrana de la mitocondria liberando al citocromo-c, lo que culminará en la activación de la caspasa 3, las caspasas 8 y 10 también pueden activar directamente a la caspasa-3 (Fig. 1). (Cryns y Yuan, 1998; Desagher y Martinou, 2000; Wang, 2001; Adams, 2003; Riedl y Shi, 2004).

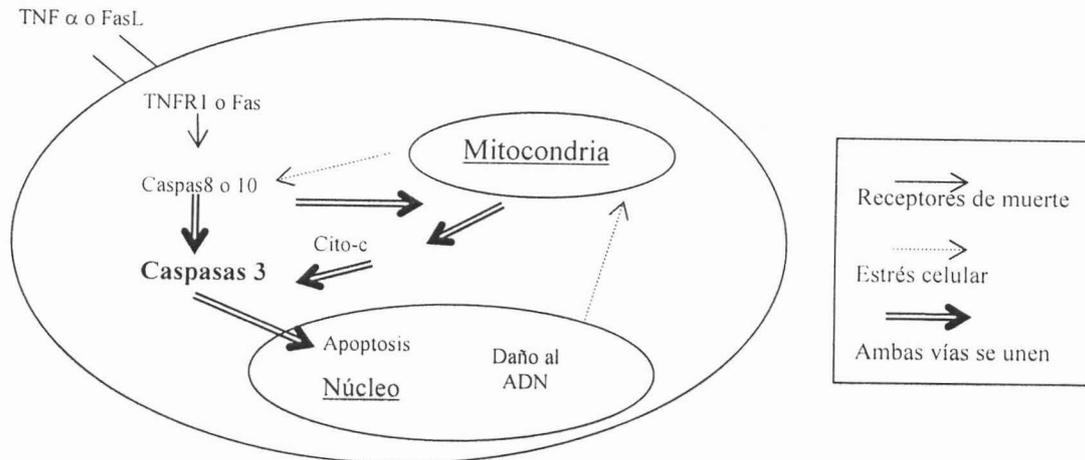


Figura 1. Proceso apoptótico

La muerte celular programada es un proceso que está regulado por diferentes proteínas que se encuentran en el espacio intracelular, como lo son:

a) **Caspasas:** Estas proteínas son unas de las principales reguladoras del proceso apoptótico; son proteasas con un residuo de cisteína (Cryns y Yuan, 1998, Riedl y Shi, 2004) que se sintetizan en la célula como precursores inactivos denominados pro-caspasas (Cryns y Yuan, 1998; Alberts *et al.*, 2002; Laux *et al.*, 2003; Abraham y Shaham, 2004; Riedl y Shi, 2004).

Se clasifican en activadoras y ejecutoras, dentro de las caspasas activadoras encontramos a la 8 y a la 10 encargadas de activar a las caspasas ejecutoras. De éstas, la principal es la caspasa-3 que se localiza en el citoplasma (Cryns y Yuan, 1998; Wang, 2001; Deng *et al.*, 2002) y la mayoría de las vías apoptóticas convergen en su activación (Cryns y Yuan, 1998; Desagher y Martinou, 2000; Didenko *et al.*, 2002; Richburg *et al.*, 2002; Adams, 2003; Jordán, 2003; Said *et al.*, 2004). Debido a lo anterior la caspasa-3 ha sido ampliamente utilizada como marcador temprano de la apoptosis (Alfaro *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000; Kumi-Diaka y Butler, 2000; Shiraishi *et al.*, 2000; Iida *et al.*, 2003; Omezzine *et al.*, 2003).

La caspasa-3 activa a las caspasas 6 y 7 (otras caspasas ejecutoras), estas en conjunto son responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de las células. Una de sus principales funciones es la activación

de la enzima DNasa activada por caspasas (CAD), quien se encarga de fragmentar al ADN en los espacios internucleosomales (Cryns y Yuan, 1998; Wang, 2001; Jordán, 2003; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003). Este último proceso es característico de la muerte por apoptosis y es por ello que también ha sido ampliamente utilizado como marcador apoptótico (Alfaro *et al.*, 2000; Koji, 2001; Laux *et al.*, 2003; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

**b) Proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs):** Son capaces de inhibir la apoptosis uniéndose a las pro-caspasas para no permitir su activación, o bien uniéndose a las caspasas bloqueando así su actividad. Entre sus miembros destacan XIAP, c-IAP y c-IAP2 las cuáles inhiben a las caspasas 3, 7 y 9 (Sánchez-Torres y Diosdado, 2003; Riedl y Shi, 2004).

Es necesario recalcar que las IAPs no pueden ser activadas después de la liberación del citocromo-c, ya que con ello se liberan las segundas proteínas mitocondriales activadoras de caspasas (Smac) y las proteínas de unión directa a las IAP con bajo punto isoeléctrico (DIABLO). Las Smac y DIABLO se unen a las IAP bloqueando su actividad y así permiten que el proceso apoptótico se lleve a cabo. (Wang, 2001; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003; Alberts *et al.*, 2002; Gilbert, 2000; Lewin, 2000; Riedl y Shi, 2004).

**c) Proteínas de la familia Bcl:** Algunas son promotoras de la apoptosis, como Bad, Bax, Bak y BID, quienes se encuentran generalmente en el citoplasma y se transportan a la mitocondria después de recibir la señal de muerte, donde promueven la liberación del citocromo-c. Otras inhiben a la apoptosis, como Bcl-2 y Bcl-xl. Estas se encuentran en la membrana externa de la mitocondria y su función es inhibir la liberación del citocromo-c (Hale *et al.*, 1996; Gilbert, 2000; Alberts *et al.*, 2002; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

La apoptosis también puede ser activada por un mecanismo independiente de caspasas, en donde las proteínas efectoras podrían ser el Factor Inductor de Apoptosis (AIF), que es una oxidoreductasa que se transporta al núcleo para degradar al ADN

(Leist y Jäättelä, 2001; Zhang et al., 2003; Abraham y Shaham, 2004) y la endonucleasa G (EndoG), la cual es capaz de romper la cromatina en fragmentos nucleosomales (Lu et al., 2003; Zhang et al., 2003). Ambas se liberan al citoplasma al disminuir la permeabilidad de la mitocondria (Leist y Jäättelä, 2001; Lu et al., 2003; Abraham y Shaham, 2004). Otras proteasas como las calpainas y catepsinas también pueden activar la apoptosis independiente de caspasas (Johnson, 2000; Shiraishi *et al.*, 2000; Leist y Jäättelä, 2001, Abraham y Shaham, 2004).

Es importante destacar que las caspasas, calpainas, la EndoG y el AIF se expresan en el testículo (Taylor *et al.*, 1998; Kumi-Diaka y Butler, 2000; Shiraishi *et al.*, 2000; Narisawa *et al.*, 2002; Omezzine *et al.*, 2003).

### **3.2.1 Apoptosis en el Testículo**

El testículo es el órgano del sistema reproductor masculino, en donde se producen los espermatozoides y la testosterona. (García *et al.*, 2001; Gartner y Hiatt, 2002). Dentro de este órgano encontramos a las espermatogonias, los espermatocitos, las espermátidas, las células de Sertoli y las células de Leydig (Woolveridge y Morris, 2001).

#### **3.2.1.1 Células germinales:**

La producción de los espermatozoides se da a través de un proceso continuo y ordenado de maduración de las células germinales denominado espermatogénesis, que incluye la proliferación mitótica de las espermatogonias, la meiosis que permite la recombinación y división reduccional de los espermatocitos, la diferenciación de las espermátidas haploides, elongación y la liberación de los espermatozoides ( Fig. 2) (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1997; Kon y Endo, 2000; Tanaka *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2003; Shina Ilikim *et al.*, 2003; Nakanishi y Shiratsishi, 2004).

Para que la espermatogénesis se lleve a cabo con éxito y se mantenga la homeostasis del testículo es necesaria la apoptosis de las células germinales (Blanco-Rodríguez y Martínez García, 1997; Kierszenbaum, 2001; Salazar *et al.*, 2003; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005). Entre el 25 y el 75% de los espermatozoides potencialmente maduros mueren a través de la apoptosis, la cual ocurre en todos los

tipos de células germinales (Blanco-Rodríguez, 1998; Woolveridge y Morris, 2001; Tanaka *et al.*, 2002).

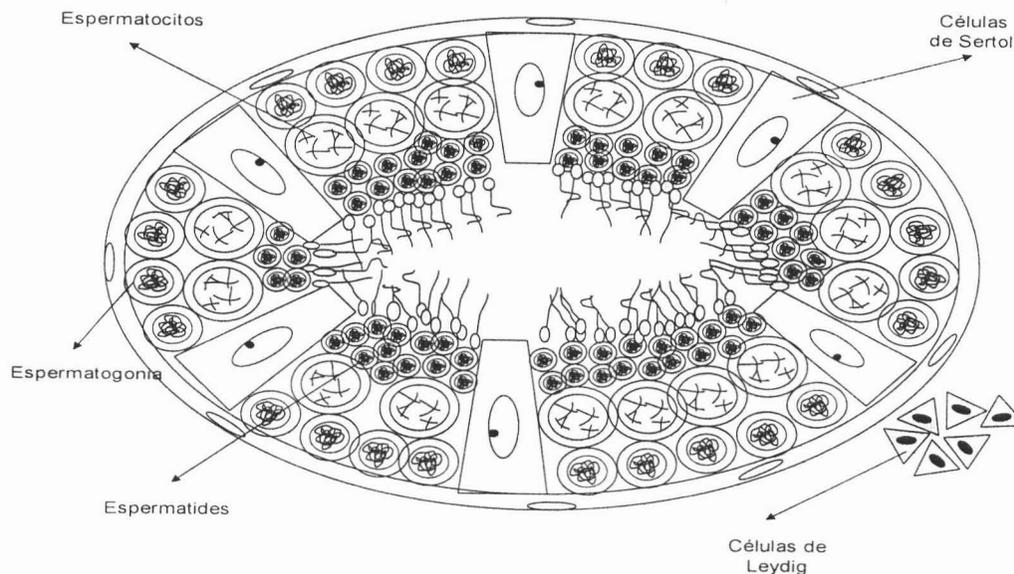


Figura 2: Representación de los diferentes tipos celulares en el epitelio testicular

Se ha observado que la sobreproducción de éstas, resulta en la pérdida de espermatozoides maduros (Koji, 2001), produciendo infertilidad (Koji, 2001; Penttiäinen, 2002; Cagan, 2003; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005). A través de la apoptosis también se regula la pérdida de aquellas células que se encuentran defectuosas o genéticamente anormales (Koji, 2001; Penttiäinen, 2002; Cagan, 2003; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005), lo que impide la transmisión de cualquier anomalía genética a la descendencia (Koji, 2001; Cagan, 2003)

Por otro lado se ha observado que la activación de las caspasas está relacionada con la degeneración selectiva de las porciones citoplasmáticas de las espermátidas (Blanco-Rodríguez y Martínez García, 1999; Print y Loveland, 2000; Arama *et al.*, 2003; Cagan, 2003; Huang *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2004) denominadas cuerpos residuales. Este proceso es sumamente importante en la formación de los espermatozoides debido a que a través de este mecanismo, las espermátidas, que se encontraban unidas mediante un simplasto, se separan para diferenciarse en espermatozoides (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1999; Arama *et al.*, 2003; Cagan, 2003; Huang *et al.*, 2004).

Finalmente, para la progresión satisfactoria de la espermatogénesis es necesario que tanto los cuerpos residuales (Maueresse-Battistoni *et al.*, 1998; Gartner y Hiatt, 2002; Grover *et al.*, 2004; Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1999) como las células apoptóticas del túbulo seminífero sean fagocitadas rápidamente por las células de Sertoli (Lee *et al.*, 1999; Print y Loveland, 2000; Pentiakäinen, 2002; Nakanishi y Shiratsishi, 2004; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005).

### **3.2.1.2. Células de Sertoli:**

Están esparcidas a lo largo del túbulo seminífero comprimidas entre las células germinales (Leeson *et al.*, 1990). Sus bases descansan sobre la lámina basal del túbulo y por su longitud llegan hasta la luz del mismo; el núcleo -oval y claro- se localiza cerca de la base de la célula y su nucleolo -grande y bien definido- se encuentra en el centro del núcleo (Fig. 2) (Leeson *et al.*, 1990; Gartner y Hiatt, 2002).

Éstas prácticamente no se dividen en los organismos adultos (Woolveridge y Morris, 2001; Grover *et al.*, 2004) y se ha observado que entran en apoptosis por la exposición a radiación (Woolveridge y Morris, 2001).

Las células de Sertoli son de suma importancia ya que de ellas depende el desarrollo adecuado de la espermatogénesis, y dentro de sus funciones se encuentran:

- Dar apoyo físico y nutrir a las células germinales en desarrollo (Maueresse-Battistoni *et al.*, 1998; Gartner y Hiatt, 2002; Sharpe *et al.*, 2003; Grover *et al.*, 2004).
- Establecer de la barrera hematotesticular, evitando la formación de anticuerpos por la presencia de células haploides (espermaticitos secundarios, espermátidas y espermatozoides) (Maueresse-Battistoni *et al.*, 1998; Gartner y Hiatt, 2002; Sharpe *et al.*, 2003; Grover *et al.*, 2004).
- Proveer de las señales paracrinas necesarias para establecer la masculinidad del embrión y el desarrollo eficiente de la espermatogénesis. (Maueresse-Battistoni *et al.*, 1998 ; Gartner y Hiatt, 2002 ; Sharpe *et al.*, 2003; Grover *et al.*, 2004).
- Fagocitar el cuerpo residual, proceso importante en la formación de los espermatozoides (Maueresse-Battistoni *et al.*, 1998,; Gartner y Hiatt, 2002; Grover *et al.*, 2004; Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1999)

- Regular la apoptosis de las células germinales (Lee *et al.*, 1999; Print y Loveland, 2000; Penttiakäinen, 2002; Nakanishi y Shiratsishi, 2004; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005).

- Fagocitar a las células germinales apoptóticas (Lee *et al.*, 1999; Print y Loveland, 2000; Penttiakäinen, 2002; Nakanishi y Shiratsishi, 2004; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005).

### **3.2.1.3. Células de Leydig:**

Se encuentran fuera del túbulo seminífero, en el espacio intersticial. Son células poliédricas grandes, con un núcleo prominente (Leeson *et al.*, 1990; García *et al.*, 2001) y muchas de ellas son binucleadas (Fig. 2) (García *et al.*, 2001; Gartner y Hiatt, 2002).

Las células de Leydig constituyen la parte endocrina del testículo ya que en ellas se producen y secretan hormonas como la testosterona (Leeson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000; García *et al.*, 2001; Gartner y Hiatt, 2002).

Estas células prácticamente no se dividen y no se ha reportado apoptosis en condiciones normales (Woolveridge y Morris, 2001), esto se puede deber a que presentan una gran cantidad de factores de sobrevivencia pertenecientes a la familia Bcl (Taylor *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000).

### **3.2.2 Regulación de la apoptosis en testículo.**

Con respecto a la regulación fisiológica de la apoptosis en el testículo se sabe que ocurre a través de la activación del sistema FasL/Fas, donde FasL se expresa principalmente en las células de Sertoli (Lee *et al.*, 1999; Print y Loveland, 2000; Kierszenbaum, 2001; Woolveridge y Morris, 2001; Grataroli *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002; Penttiakäinen, 2002; Richburg *et al.*, 2002; Said *et al.*, 2004), aunque también lo podemos encontrar en las espermátidas (Woolveridge y Morris, 2001; Grataroli *et al.*, 2002; Penttiakäinen, 2002). Fas se expresa en las espermátidas (Lee *et al.*, 1999; Print y Loveland, 2000; Kierszenbaum, 2001; Woolveridge y Morris, 2001; Grataroli *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002; Penttiakäinen, 2002; Richburg *et al.*, 2002; Said *et al.*, 2004), aunque también la podemos encontrar en las células de Sertoli (Woolveridge y Morris,

2001; Grataroli *et al.*, 2002; Penttiakäinen, 2002). Al unirse FasL y Fas activan a las caspasas, lo que culminará en la apoptosis de las células germinales (Kirszenbaum, 2001; Woolveridge y Morris, 2001; Tanaka *et al.*, 2002; Richburg *et al.*, 2002; Salazar *et al.*, 2003; Said *et al.*, 2004).

También se ha visto que el receptor de muerte TNFR1 -localizado en las células de Leydig y Sertoli- puede ser activado por TNF $\alpha$  -que se encuentra en las espermátidas redondas- y promover la apoptosis en las células de Sertoli (Penttiakäinen, 2002; Lysiak, 2004; Said *et al.*, 2004). Se ha observado que la expresión de TNF $\alpha$  incrementa la expresión de Fas en las células de Sertoli y con ello su apoptosis (Lysiak, 2004; Starace *et al.*, 2005), así mismo disminuye la expresión FasL en estas células y con ello la incidencia de apoptosis en las células germinales (Lysiak, 2004; Said *et al.*, 2004).

Otro importante regulador de la apoptosis en el testículo es NF $\kappa$ B que se localiza en las células de Sertoli, espermatoцитos y espermátidas (Penttiakäinen, 2002). Puede ser activado por TNF $\alpha$  y transportarse al núcleo donde activa la transcripción de IAPs que inhiben la expresión de la caspasa-3 y con ello la apoptosis (Penttiakäinen, 2002; Lysiak, 2004; Said *et al.*, 2004).

Finalmente el aumento o disminución en la incidencia de apoptosis en las células del testículo se puede deber a: exposición a xenobioticos, daño al ADN y estrés oxidativo (Blanco-Rodriguez, 1998; Grataroli *et al.*, 2002; Penttiakäinen, 2002), traducido principalmente, en problemas de fertilidad (Koji, 2001; Penttiakäinen, 2002; Cagan, 2003; Said *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005).

### **JUSTIFICACIÓN**

La incidencia de infertilidad y cáncer testicular se ha incrementado en las grandes ciudades, lo que se ha adjudicado a los graves problemas de contaminación ambiental que existen en las mismas.

Estudios recientes han demostrado que las concentraciones de Vanadio en el ambiente de la ciudad de México han aumentado en las últimas décadas, y se ha observado que este metal es capaz de producir una gran variedad de efectos tóxicos en la salud.

Al  $V_2O_5$  se le ha propuesto como un agente mitógeno y reprotóxico además de como un posible antineoplásico y en otros casos como carcinógeno, todo esto se ha relacionado con sus efectos tanto apoptóticos como antiapoptóticos.

Debido a lo anterior y a que no existen datos de sus efectos por vía inhalada en las diferentes células testiculares se decidió evaluarlos en un modelo murino.

### **HIPOTESIS**

Si el  $V_2O_5$  es capaz de traspasar la barrera hematotesticular e intervenir en el funcionamiento de varias proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, entonces puede estar interviniendo en el proceso apoptótico del testículo.

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar marcadores de apoptosis en las diferentes células que conforman el epitelio seminífero (espermatogonia, espermatocitos, espermátidas, células de Sertoli) y las células de Leydig producida por la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$  (0.02M) en un modelo murino.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Cuantificar las células marcadas con caspasa-3 en los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero a través de la técnica de Inmunohistoquímica, posterior a la inhalación de  $V_2O_5$ .
2. Cuantificar las células que presentaron muerte celular por apoptosis en los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero a través de la técnica de TUNEL, posterior a la inhalación de  $V_2O_5$ .

### **METODOLOGÍA**

#### **1. Modelo experimental:**

Se utilizaron 55 ratones macho CD1 con un peso promedio de 30-35 gr., de los cuales 33 fueron sometidos por una hora a la inhalación de  $V_2O_5$  dos veces por semana

Al  $V_2O_5$  se le ha propuesto como un agente mitógeno y reprotóxico además de como un posible antineoplásico y en otros casos como carcinógeno, todo esto se ha relacionado con sus efectos tanto apoptóticos como antiapoptóticos.

Debido a lo anterior y a que no existen datos de sus efectos por vía inhalada en las diferentes células testiculares se decidió evaluarlos en un modelo murino.

### **HIPOTESIS**

Si el  $V_2O_5$  es capaz de traspasar la barrera hematotesticular e intervenir en el funcionamiento de varias proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular, entonces puede estar interviniendo en el proceso apoptótico del testículo.

### **OBJETIVO GENERAL**

Identificar marcadores de apoptosis en las diferentes células que conforman el epitelio seminífero (espermatogonia, espermatocitos, espermátidas, células de Sertoli) y las células de Leydig producida por la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$  (0.02M) en un modelo murino.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Cuantificar las células marcadas con caspasa-3 en los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero a través de la técnica de Inmunohistoquímica, posterior a la inhalación de  $V_2O_5$ .
2. Cuantificar las células que presentaron muerte celular por apoptosis en los diferentes tipos celulares del epitelio seminífero a través de la técnica de TUNEL, posterior a la inhalación de  $V_2O_5$ .

### **METODOLOGÍA**

#### **1. Modelo experimental:**

Se utilizaron 55 ratones macho CD1 con un peso promedio de 30-35 gr., de los cuales 33 fueron sometidos por una hora a la inhalación de  $V_2O_5$  dos veces por semana

durante tres meses, y 22 fueron expuestos al vehículo (agua desionizada) en las mismas condiciones.

La inhalación se llevo a cabo en una caja de acrílico transparente de 45 cm. de largo por 35 cm. de ancho y 21 cm. de alto (Fig. 3), a la que se conecto un ultra-nebulizador con un flujo de 10 litros/min.

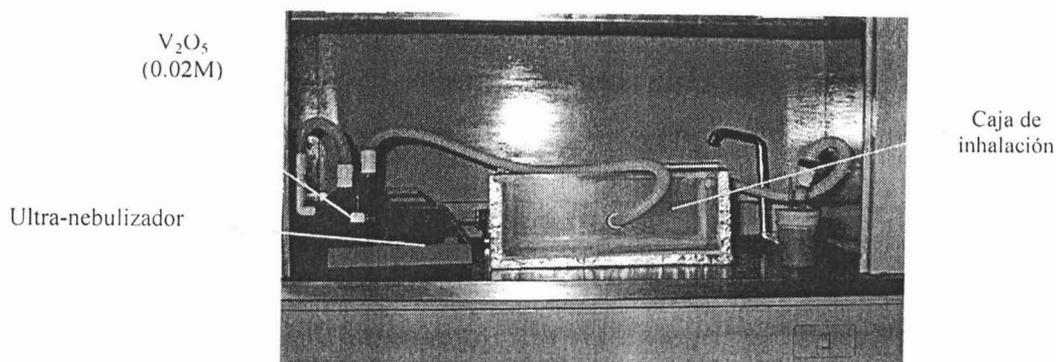


Figura 3: Caja de inhalación y ultra-nebulizador

Cada semana fueron sacrificados cinco ratones, de los cuales tres fueron expuestos a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0.02M), y dos testigos que inhalaban el vehículo (fig. 4).

Posteriormente, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico y profundizados vía intracardiaca con solución salina, finalmente se fijaron con glutaraldehído-paraformaldehído al 2% (Fig. 4).

Los testículos se extrajeron y pesaron, posteriormente fueron colocados en formol al 10%. Uno de los testículos se utilizó para detectar la concentración de vanadio en el órgano por la técnica de espectrofotometría de absorción atómica, como reporta Fortoul y cols. (2002) y el otro fue incluido en parafina (Fig. 4).

De los testículos incluidos en parafina se hicieron cortes de 5 μm de grosor que fueron montados en laminillas previamente tratadas con poly-L lisina, y se llevo acabo la técnica de Inmunohistoquímica para caspasa-3 (fig.s 4 y 5) y la de TUNEL (fig.s 4 y 6).

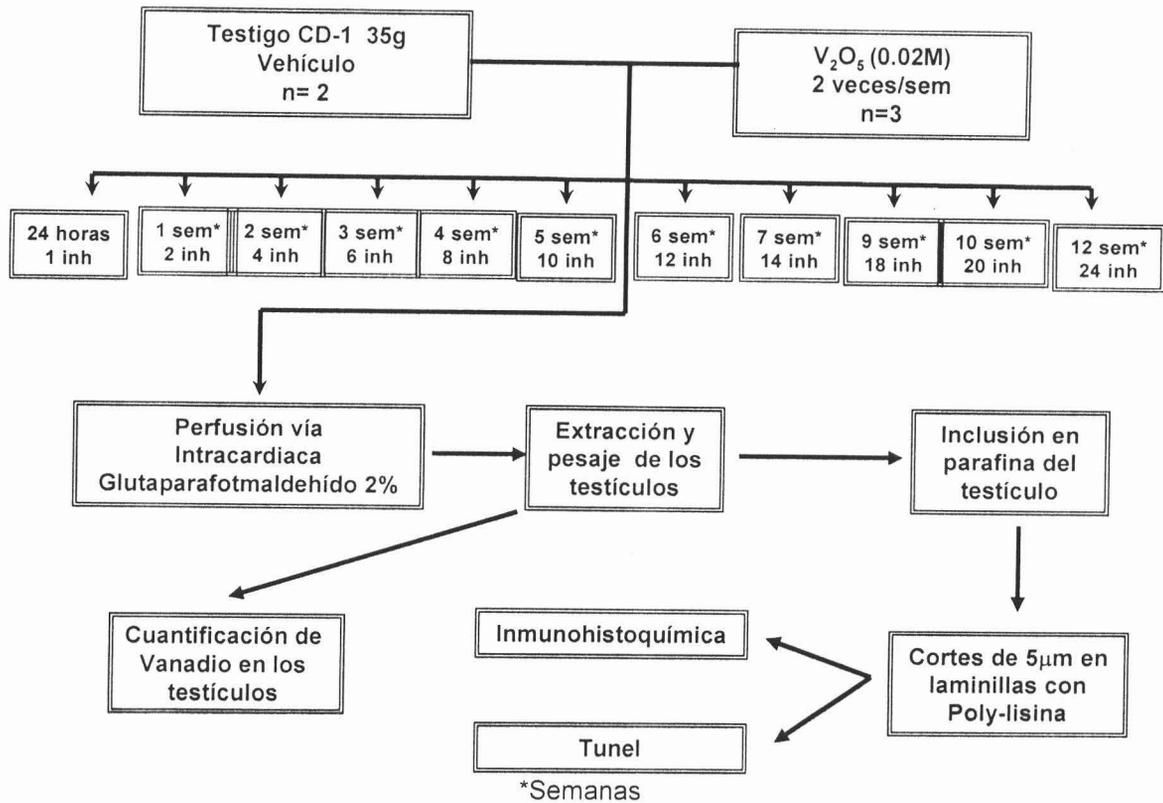


Figura 4: Esquema de Inhalación y procesamiento de tejidos

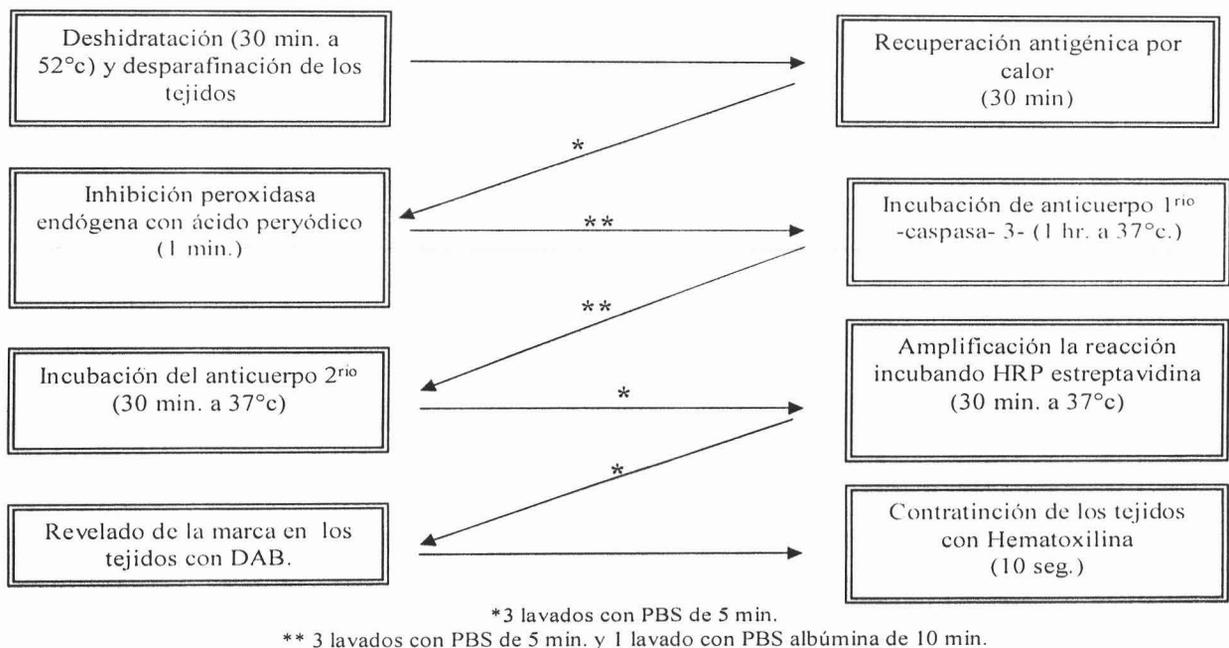


Figura 5: Representación de la metodología utilizada para tratar a los tejidos con la técnica de Inmunohistoquímica para caspasa-3.

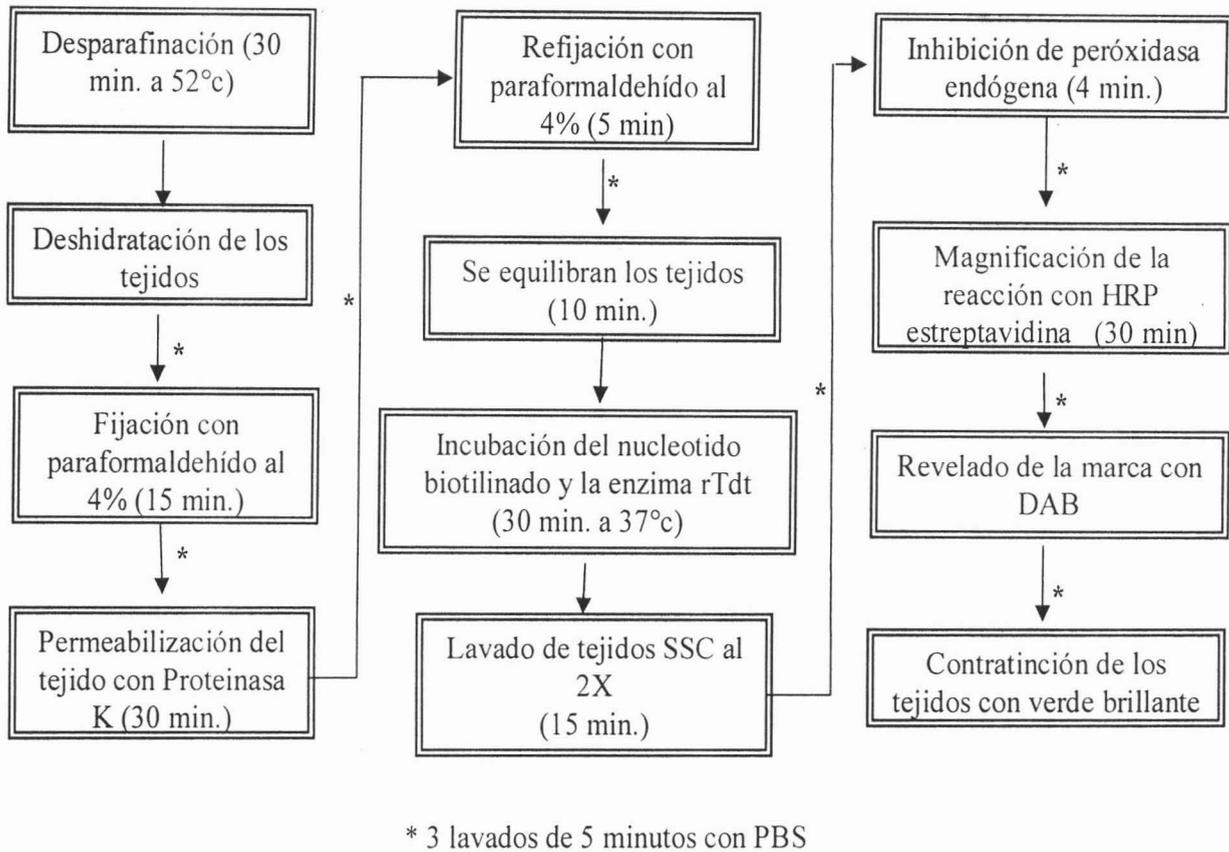


Figura 6: Representación de la metodología utilizada para tratar a los tejidos con la técnica de TUNEL

## **2. Detección de caspasa-3 y células apoptóticas:**

Cada laminilla se observó al microscopio del luz con un objetivo de 40X y se escogieron 3 campos al azar de 237.6 mm<sup>2</sup>, en los cuales se contó el número total de células por tipo celular (espermatozonias, espermatozonitos, espermátidas, células de Sertoli, y de Leydig) y en total se analizaron alrededor de 2500 células por ratón (fig. 7).

Posteriormente se contó el número de células marcadas con caspasa-3 y con la técnica de TUNEL, se determinó el porcentaje de células inmunoreactivas con respecto al total. Los datos se transformaron de acuerdo a Zar (1999) y fueron analizados en el programa Statistica 4.0, se les aplicó la prueba de ANOVA y posteriormente la prueba de Tuckey para saber si existía diferencia significativa con respecto al testigo (fig. 7).

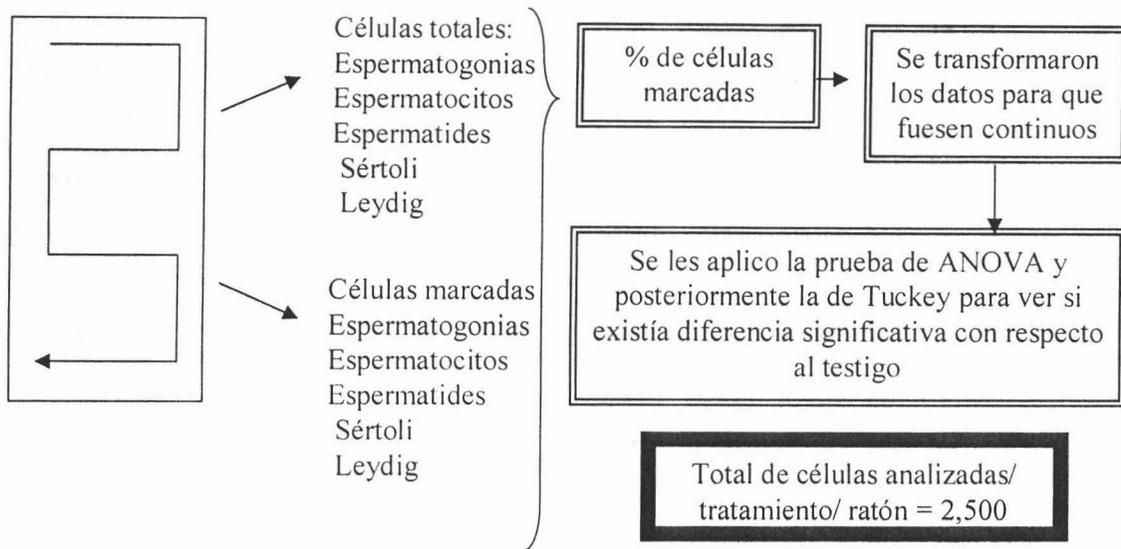


Figura 7: Representación de la metodología utilizada para el conteo de células y el análisis estadístico.

## RESULTADOS

Se observó un aumento significativo en la concentración de Vanadio en los testículos de ratones expuestos desde las 24 horas de inhalación hasta el final del tratamiento con respecto al testigo (Fig. 8).

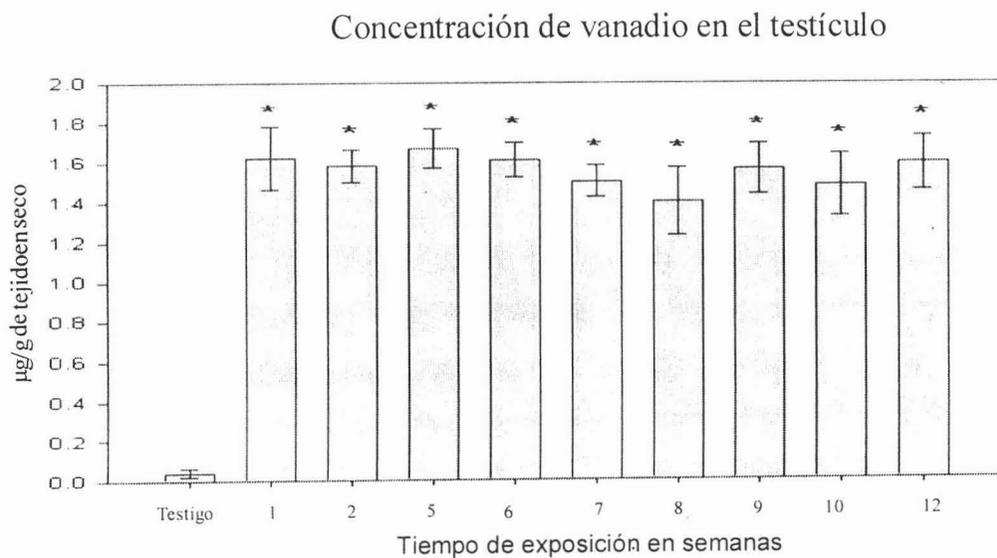


Figura 8: Concentración de vanadio en el testículo después de la inhalación aguda, subaguda y crónica a  $V_2O_5$  \*  $p < 0.001$

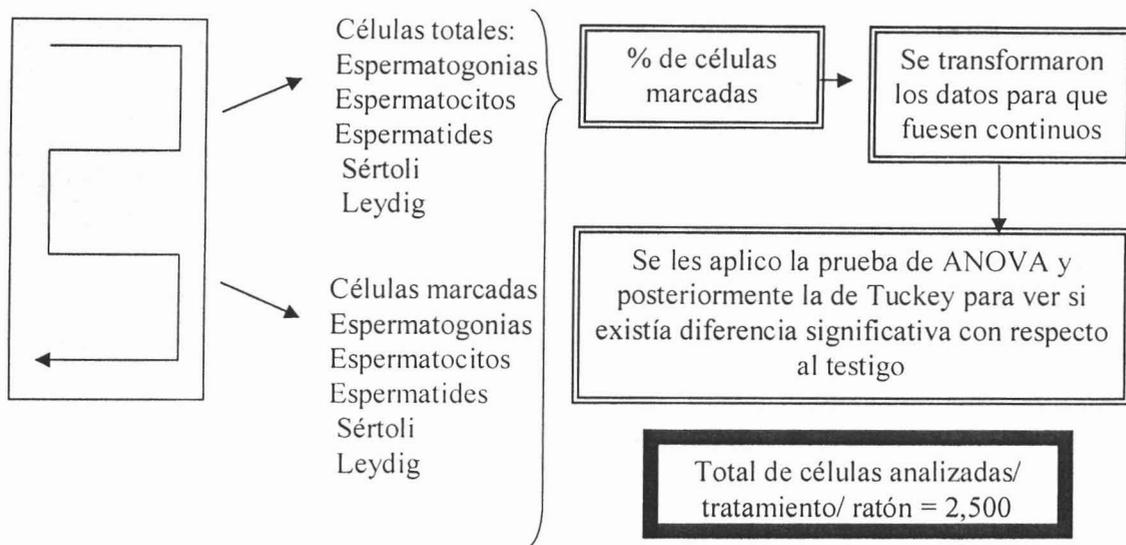


Figura 7: Representación de la metodología utilizada para el conteo de células y el análisis estadístico.

## RESULTADOS

Se observó un aumento significativo en la concentración de Vanadio en los testículos de ratones expuestos desde las 24 horas de inhalación hasta el final del tratamiento con respecto al testigo (Fig. 8).

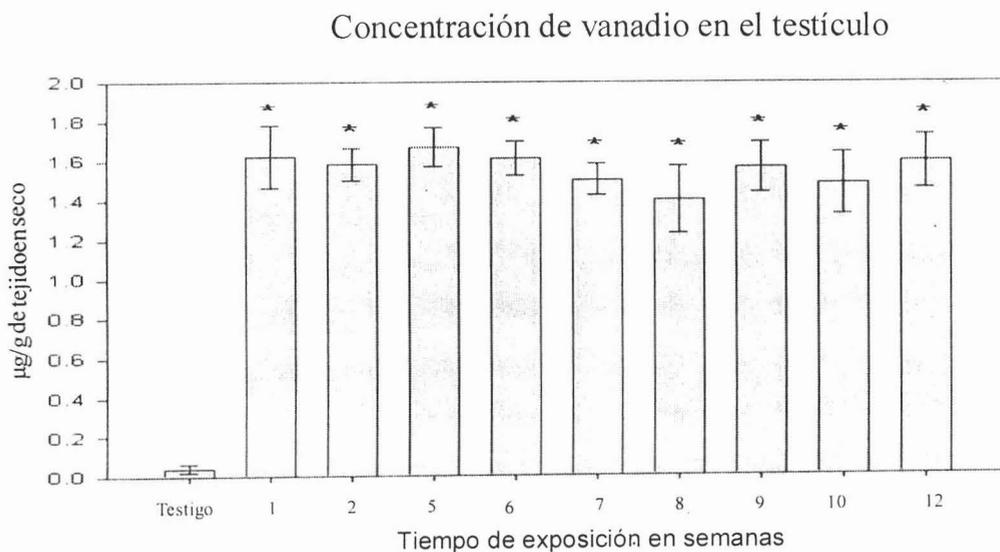


Figura 8: Concentración de vanadio en el testículo después de la inhalación aguda, subaguda y crónica a  $V_2O_5$  \*  $p < 0.001$

Al analizar el peso de los testículos no se observó ningún cambio significativo a lo largo del tratamiento con respecto al testigo (Tabla 2).

Tiempo de exposición a V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Peso gr. ( $\bar{X} \pm e. e. $ )	Efectos significativos
Testigo	0.148 $\pm$ 0.007	-
24 horas	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 2: Peso de los testículos después de la inhalación aguda, subaguda y crónica a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Con la técnica de inmunohistoquímica para caspasa-3 se encontró que no hubo un efecto significativo en la presencia de caspasa-3 producido por el V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en las espermatogonias, espermatocitos y células de Leydig de los ratones expuestos con respecto a los testigos (Figs. 9, 10 y 13, 19 y 20), es de destacarse que la marca en las células de Leydig se localizó en el citoplasma.

En las espermátidas se observó un aumento significativo en la presencia de caspasa-3 después de las 24 horas de inhalación (Fig. 19b), no obstante, a partir de la primera semana y hasta el final del tratamiento (Figs. 19c-f y 20a-f), la presencia de esta proteína disminuyó significativamente con respecto al testigo (Fig. 11), en este caso la marca se localizó en la periferia del citoplasma celular.

En las células de Sertoli, se encontró que la presencia de caspasa-3 aumentó significativamente desde la segunda hasta la sexta semana de inhalación (Figs. 12, 19 d-f y 20 a-b).

Por medio de la técnica de TUNEL no se observó cambio significativo en el porcentaje de células marcadas con respecto al testigo en ninguno de los tipos celulares analizados (Figs. 14-18 y 21).

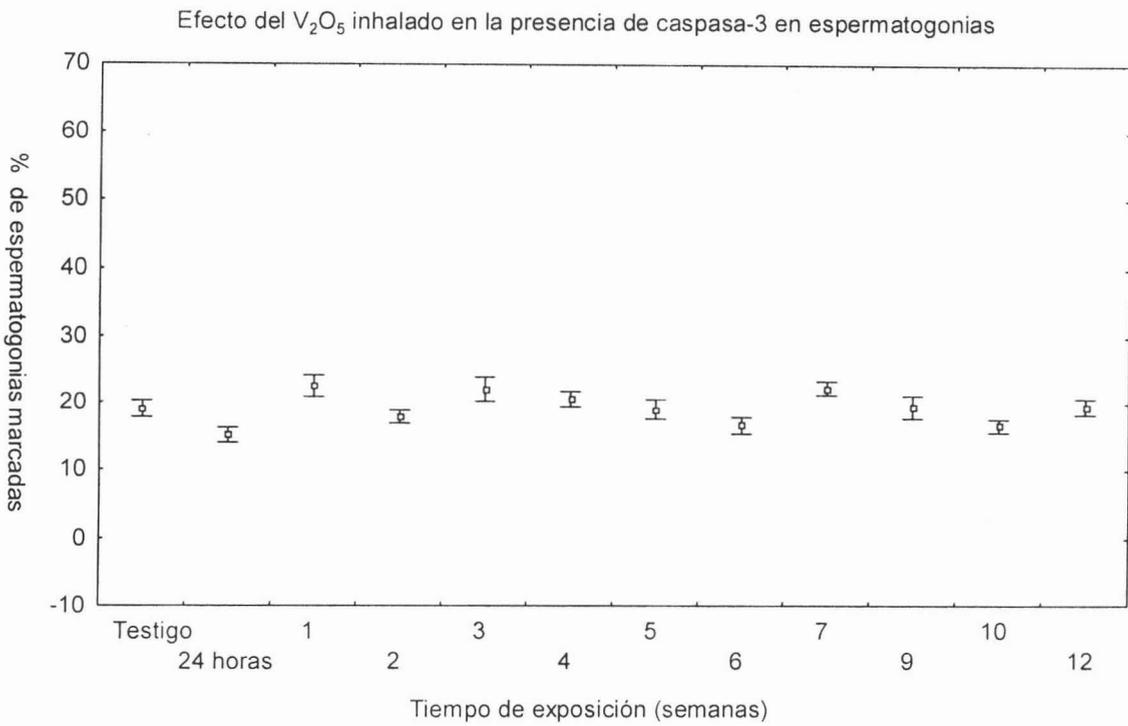


Figura 9: Porcentaje de espermatozonias marcadas con caspasa-3 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

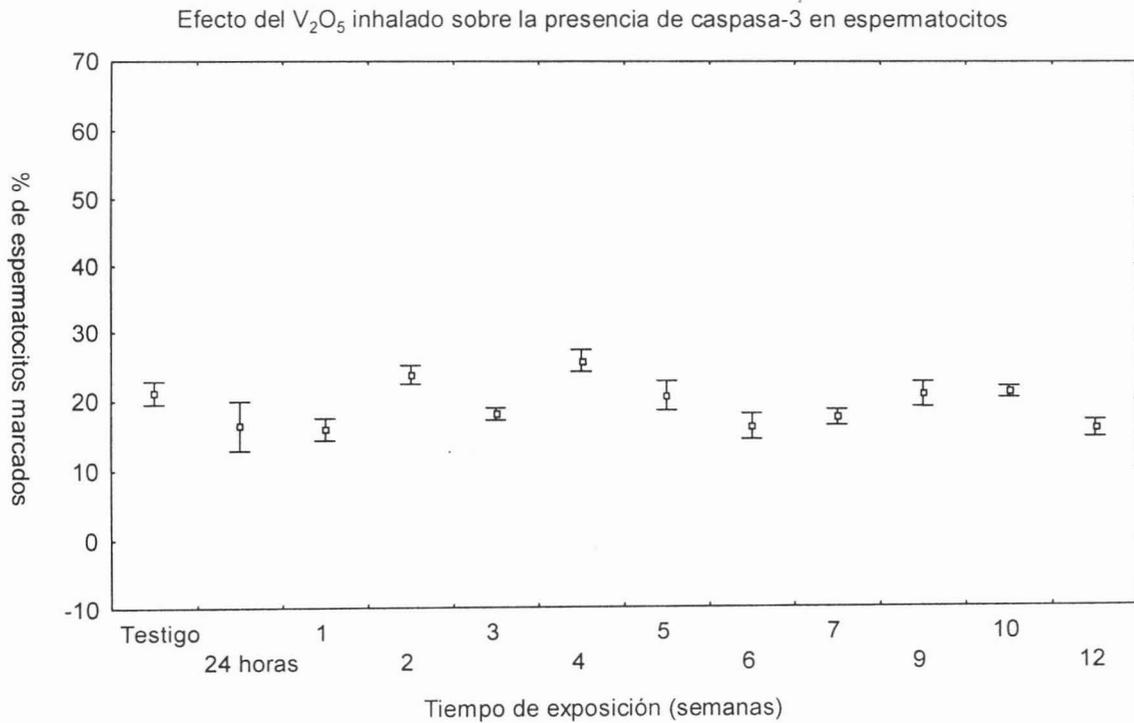


Figura 10: Porcentaje de espermatozonios marcados con caspasa-3 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado en la presencia de caspasa-3 en espermátidas

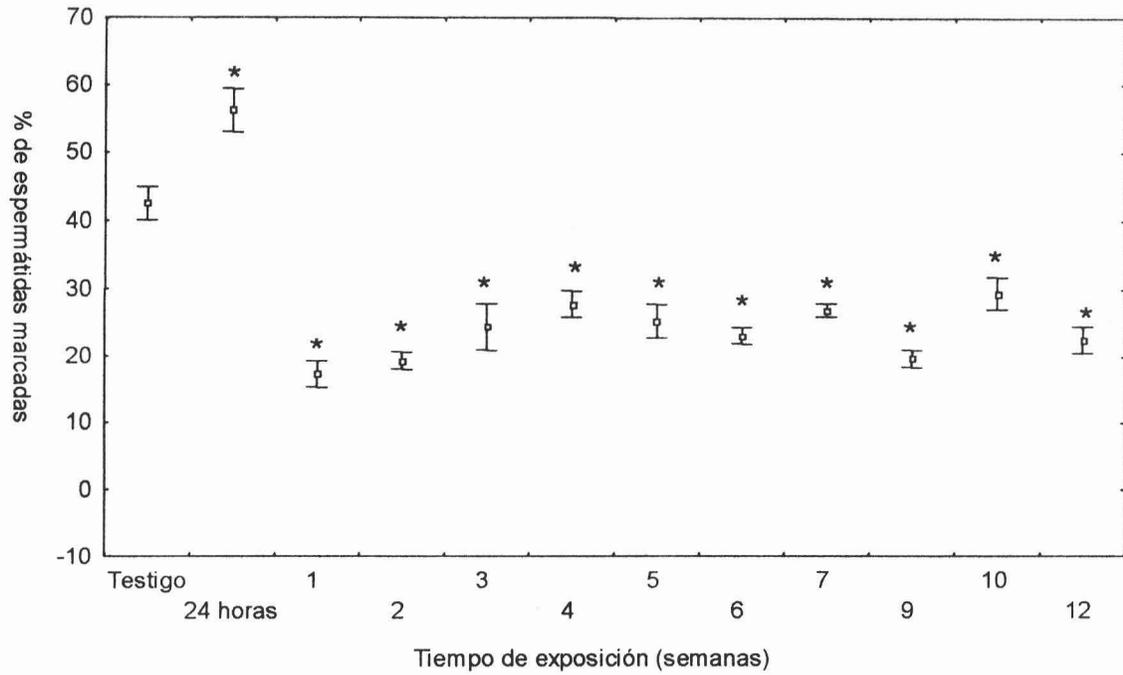


Figura 11: Porcentaje de espermátidas marcadas con caspasa-3 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado en la presencia de caspasa-3 en células de sertoli

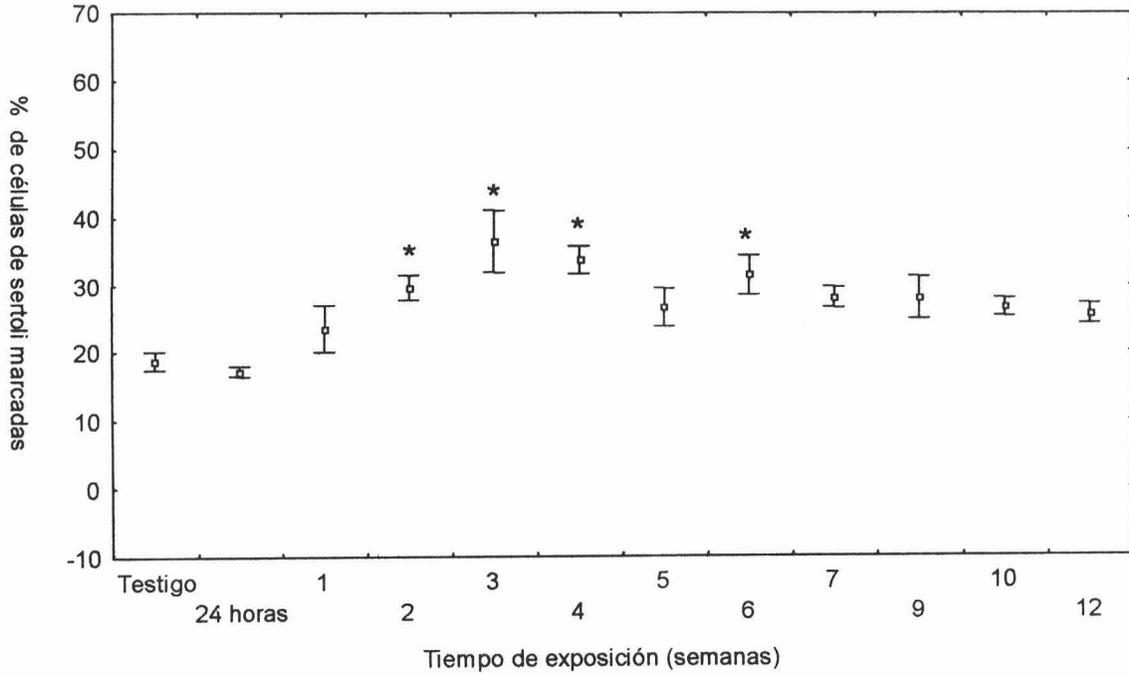


Figura 12: Porcentaje de células de Sertoli marcadas con caspasa-3 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado en la presencia de caspasa-3 en células de Leydig

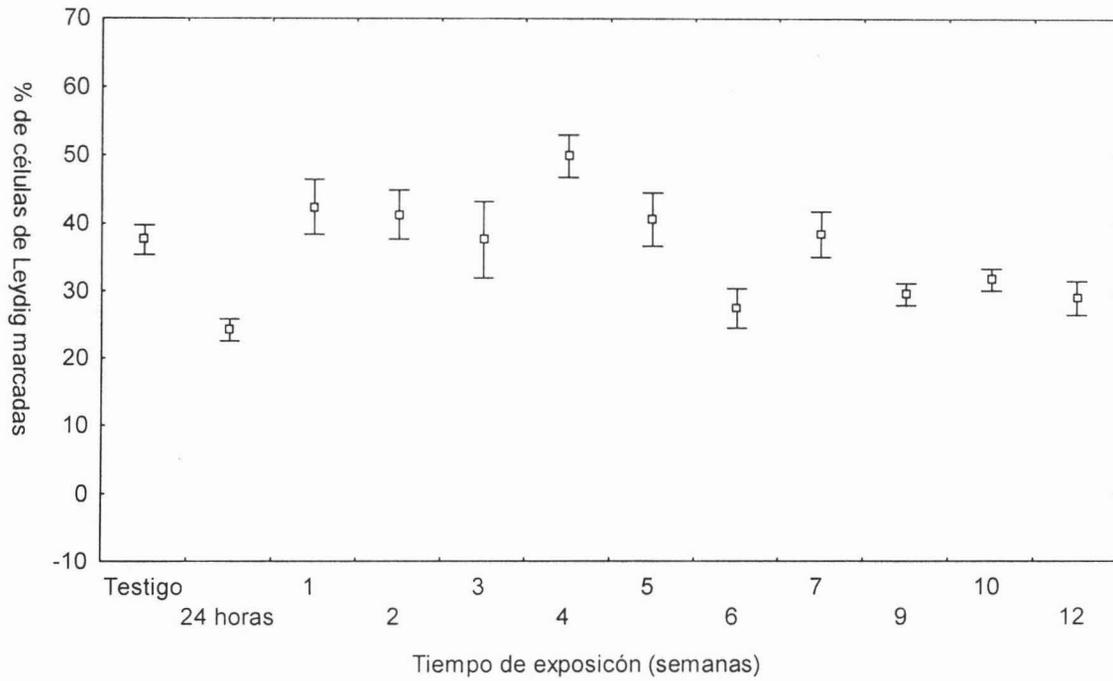


Figura 13: Porcentaje de células de Leydig marcadas con caspasa-3 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado en la apoptosis de las espermatozonias

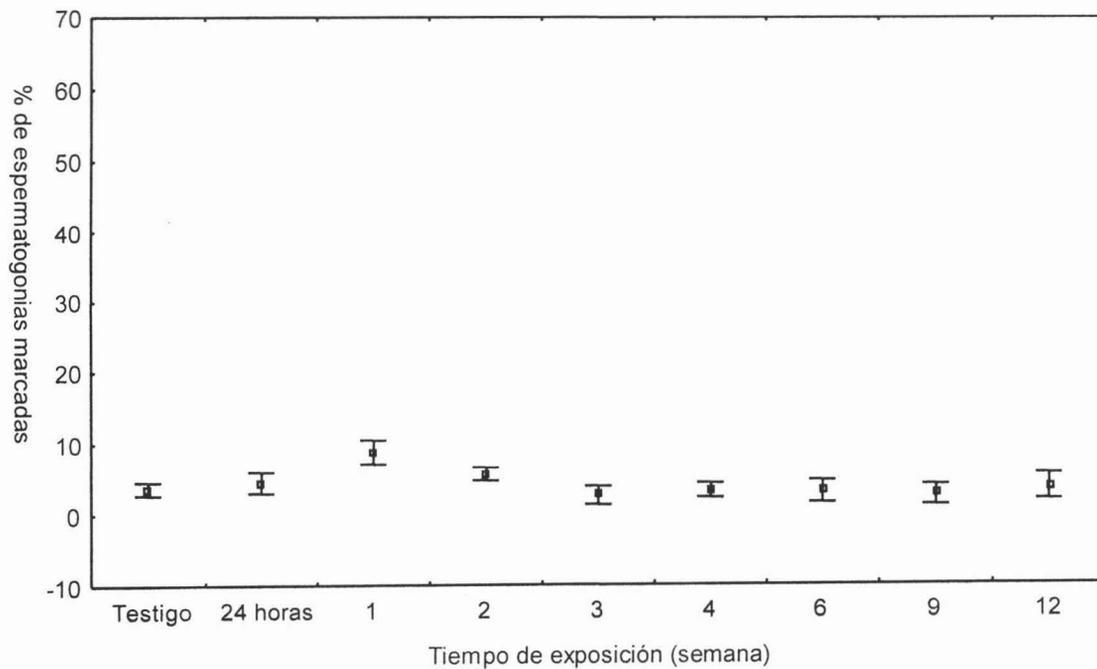


Figura 14: Porcentaje de espermatozonias marcadas con TUNEL después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado sobre la apoptosis de los espermatoцитos

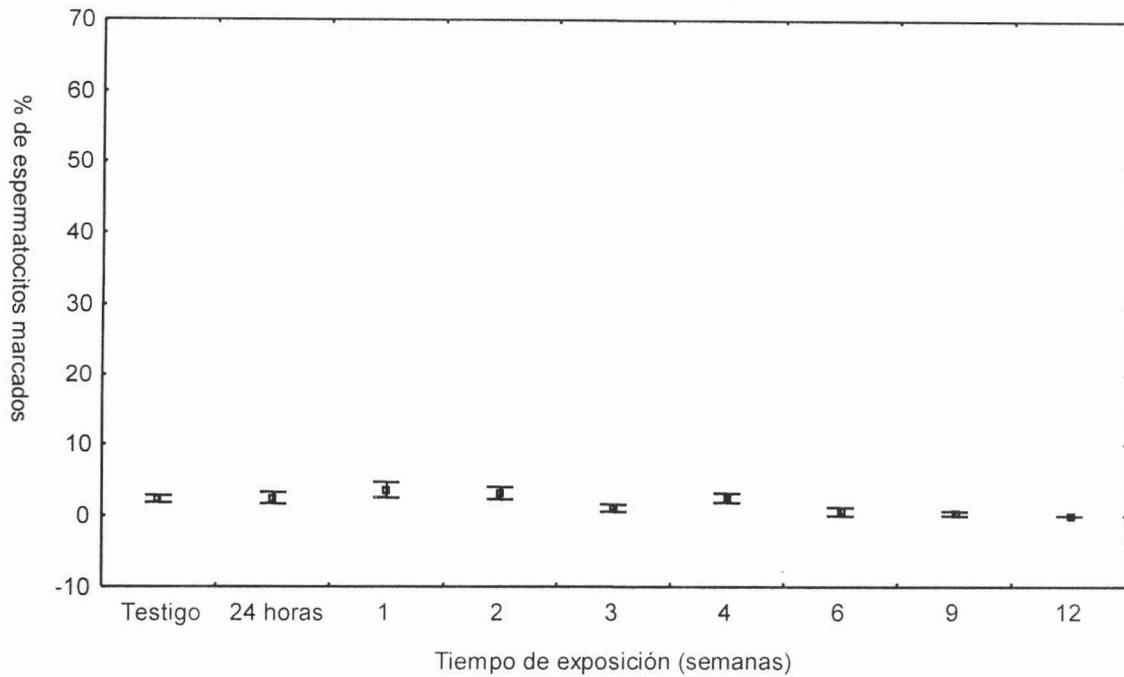


Figura 15: Porcentaje de espermatoцитos marcados con TUNEL después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado sobre la apoptosis de las espermátides

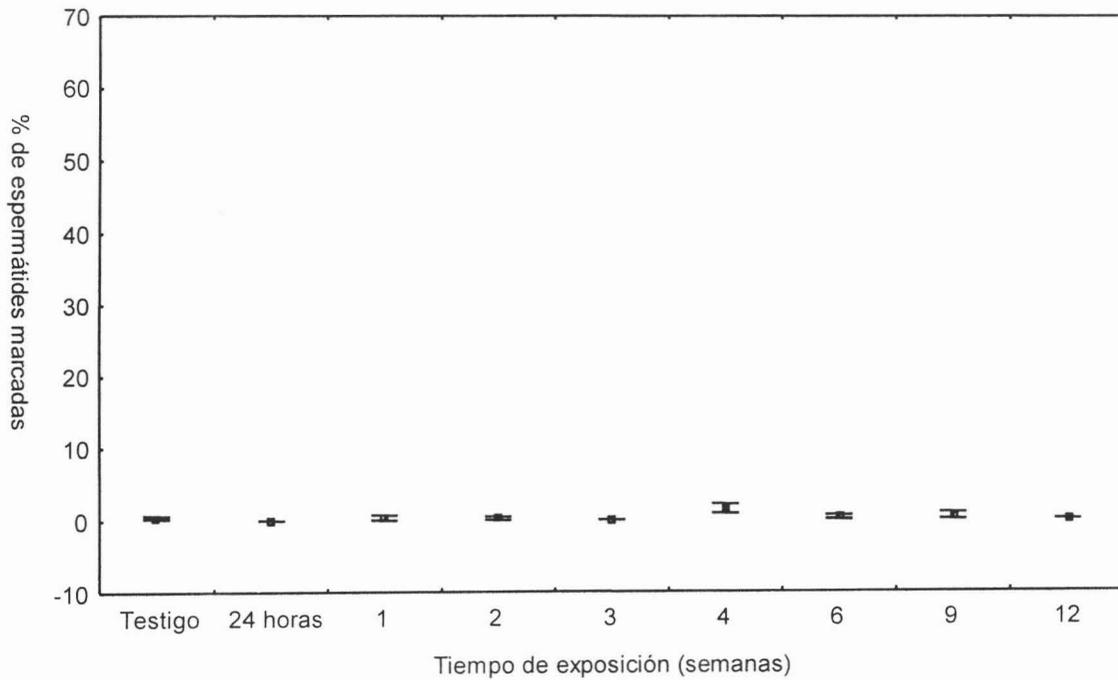


Figura 16: Porcentaje de espermátides marcadas con TUNEL después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado sobre la apoptosis en las células de Sertoli

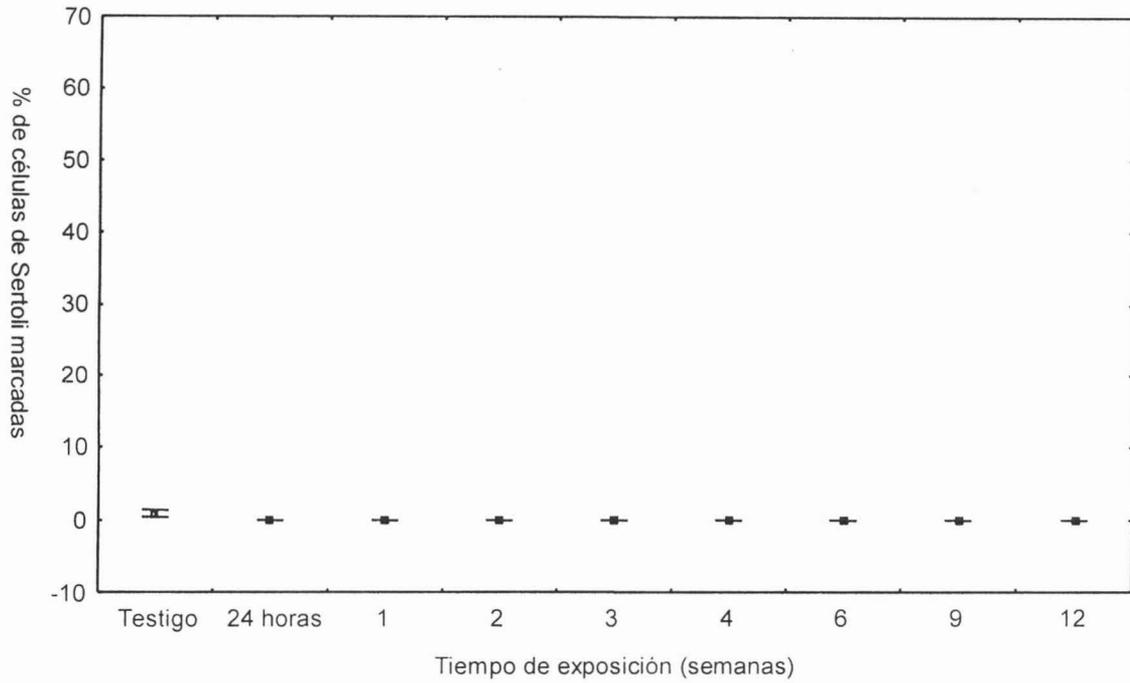


Figura 17: Porcentaje de células de Sertoli marcadas con TUNEL después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

Efecto del  $V_2O_5$  inhalado sobre la apoptosis en las células de Leydig

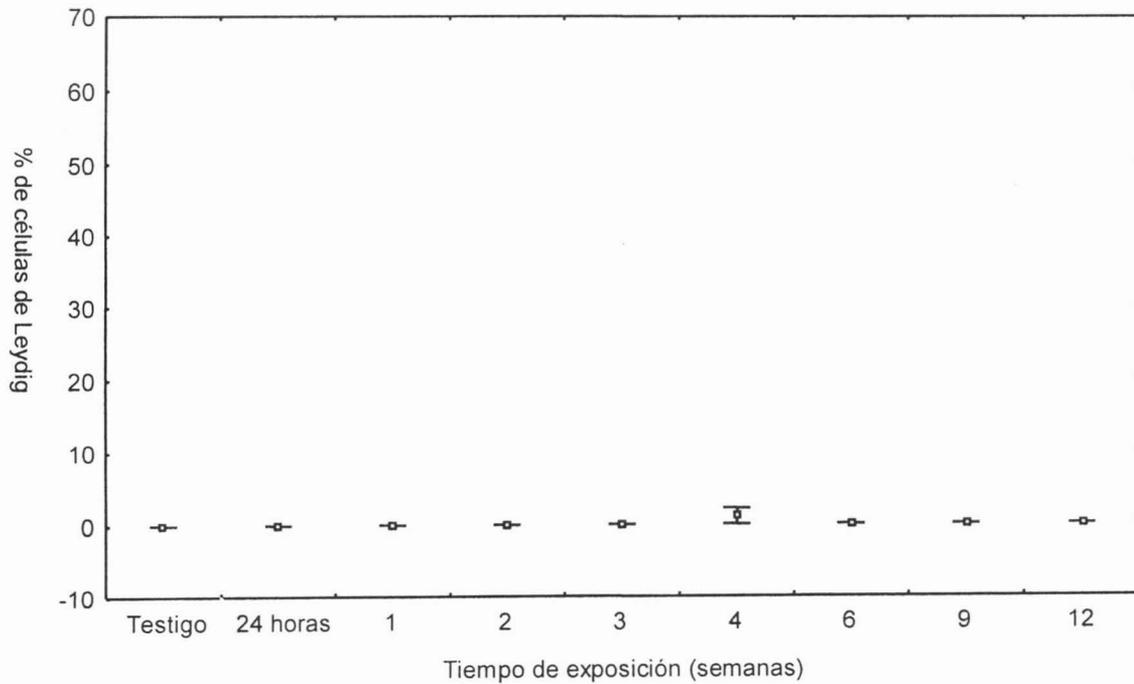


Figura 18: Porcentaje de células de Leydig marcadas con TUNEL después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$

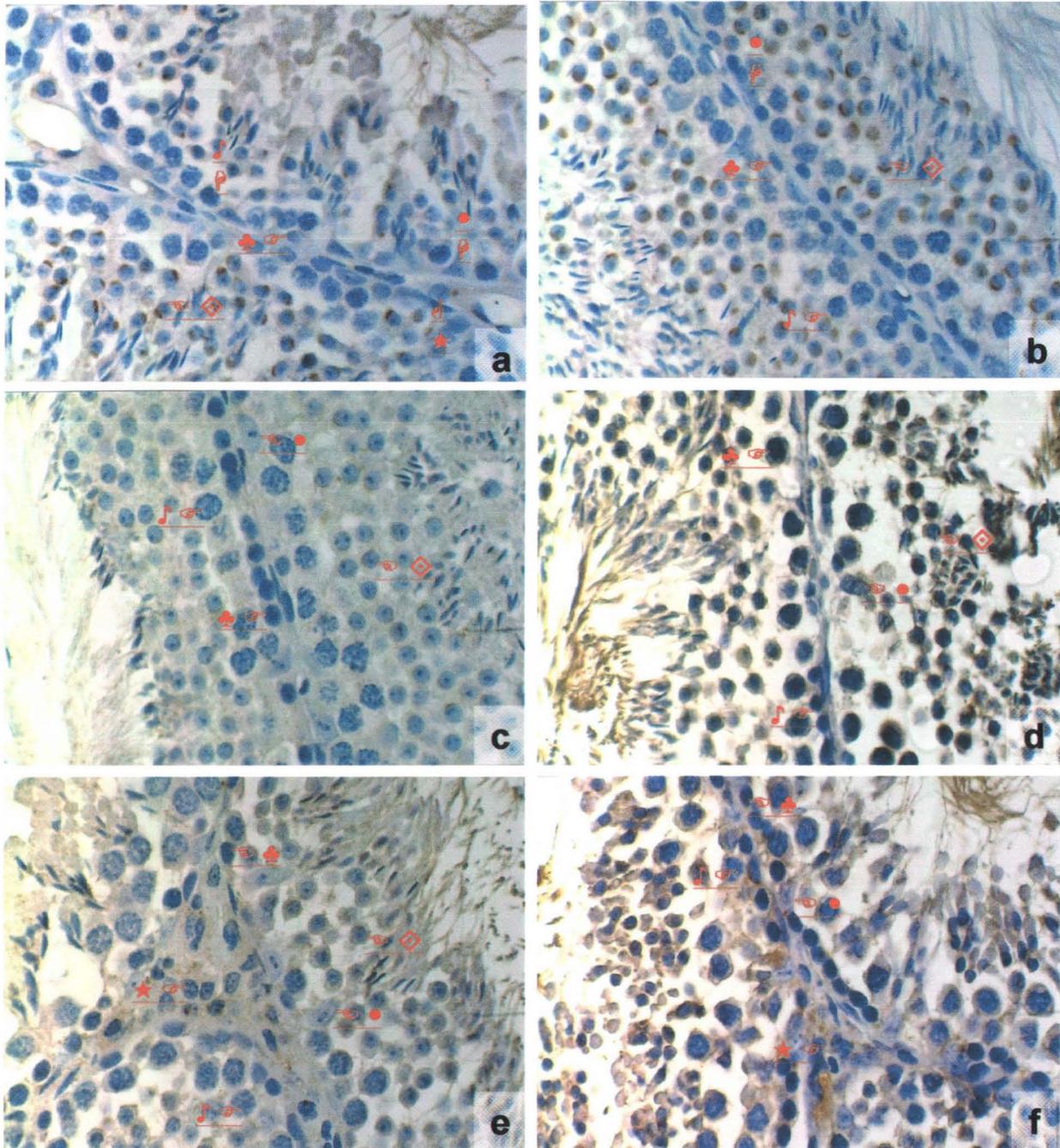


Figura 19: Presencia de la caspasa-3 posterior a la exposición a  $V_2O_5$ . a) testigo, espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli, no presentan marca, en las espermatidas la marca se localiza en la periferia de la célula y en las células de Leydig en el citoplasma b) 24 horas, incrementa el número de espermatidas marcadas c) 1<sup>ra</sup> semana, disminuye el número de espermatidas marcadas d) 2<sup>nda</sup> semana, aumenta la marca en las células de Sertoli y se mantiene la disminución de marca en las espermatidas, se observa que la marca de las células de Leydig se localiza en el citoplasma e) 3<sup>ra</sup> semana, mismo patrón que en la 2<sup>nda</sup> semana f) 4<sup>ta</sup> semana, mismo patrón que en la 2<sup>nda</sup> y 3<sup>ra</sup> semanas (★) Leydig, (●) Sertoli, (♣) Espermatogonias, (↔) Espermatocitos, (◇) Espermatidas.

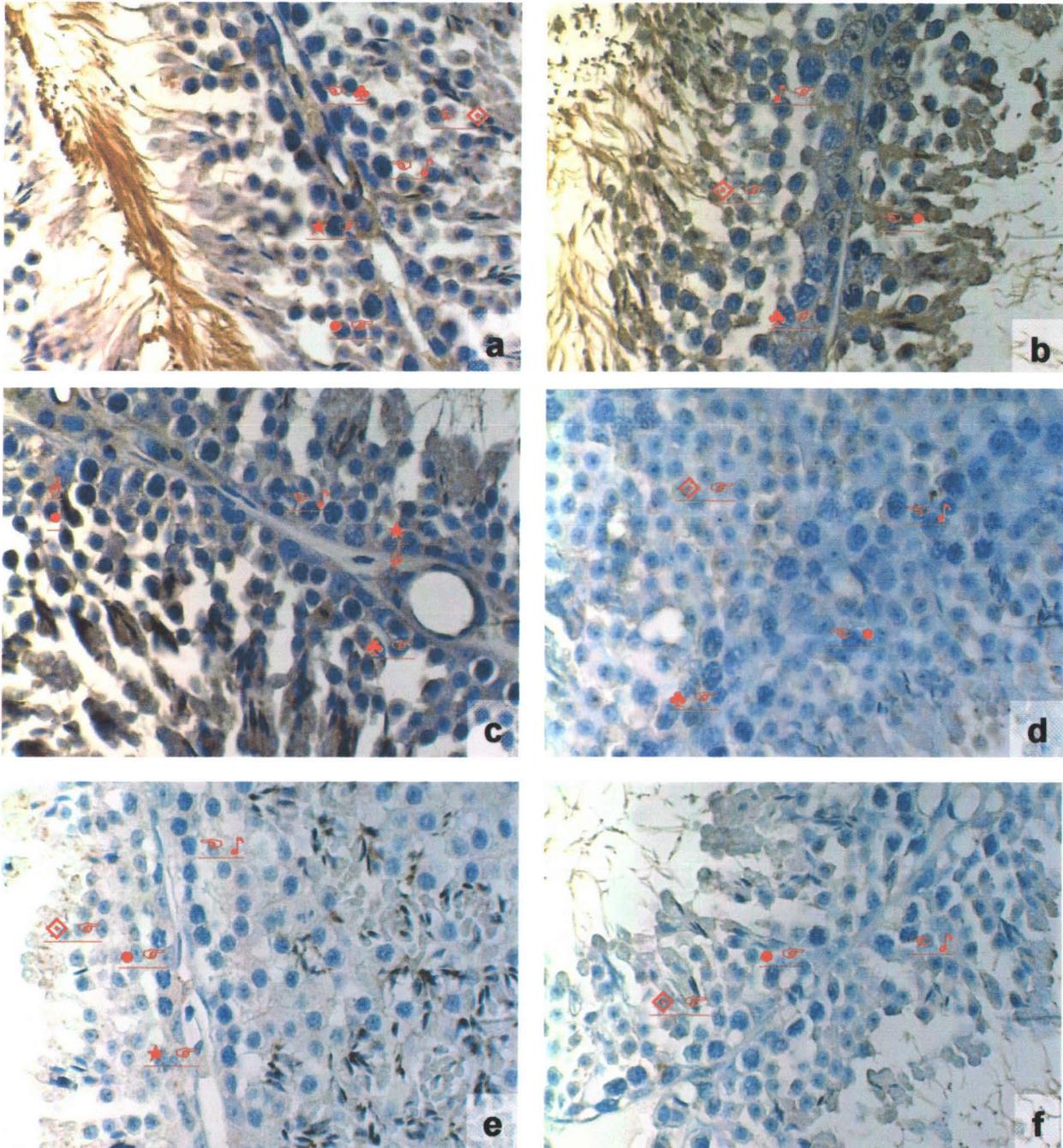


Figura 20: Presencia de la caspasa-3 posterior a la exposición a  $V_2O_5$ . a) 5<sup>ta</sup> semana, aumenta la marca en las células de Sertoli y se mantiene la disminución de marca en las espermatidas, se observa que la marca de las células de Leydig se localiza en el citoplasma b) 6<sup>ta</sup> semana, mismo patrón que en la 5<sup>ta</sup> semana c) 7<sup>ma</sup> semana, disminuye la marca en las células de Sertoli y se mantiene la disminución en la marca de las espermatidas d) 9<sup>na</sup> semana, mismo patrón que en la 7<sup>ma</sup> semana e) 10<sup>ma</sup> semana, mismo patrón que en la 7<sup>ma</sup> y 9<sup>na</sup> semanas f) 12<sup>va</sup> semana, mismo patrón que en la 7<sup>ma</sup>, 9<sup>na</sup> y 10<sup>ma</sup> semanas. (★) Leydig, (●) Sertoli, (★) Espermatogonias, (♯) Espermatocitos, (◇) Espermatidas.

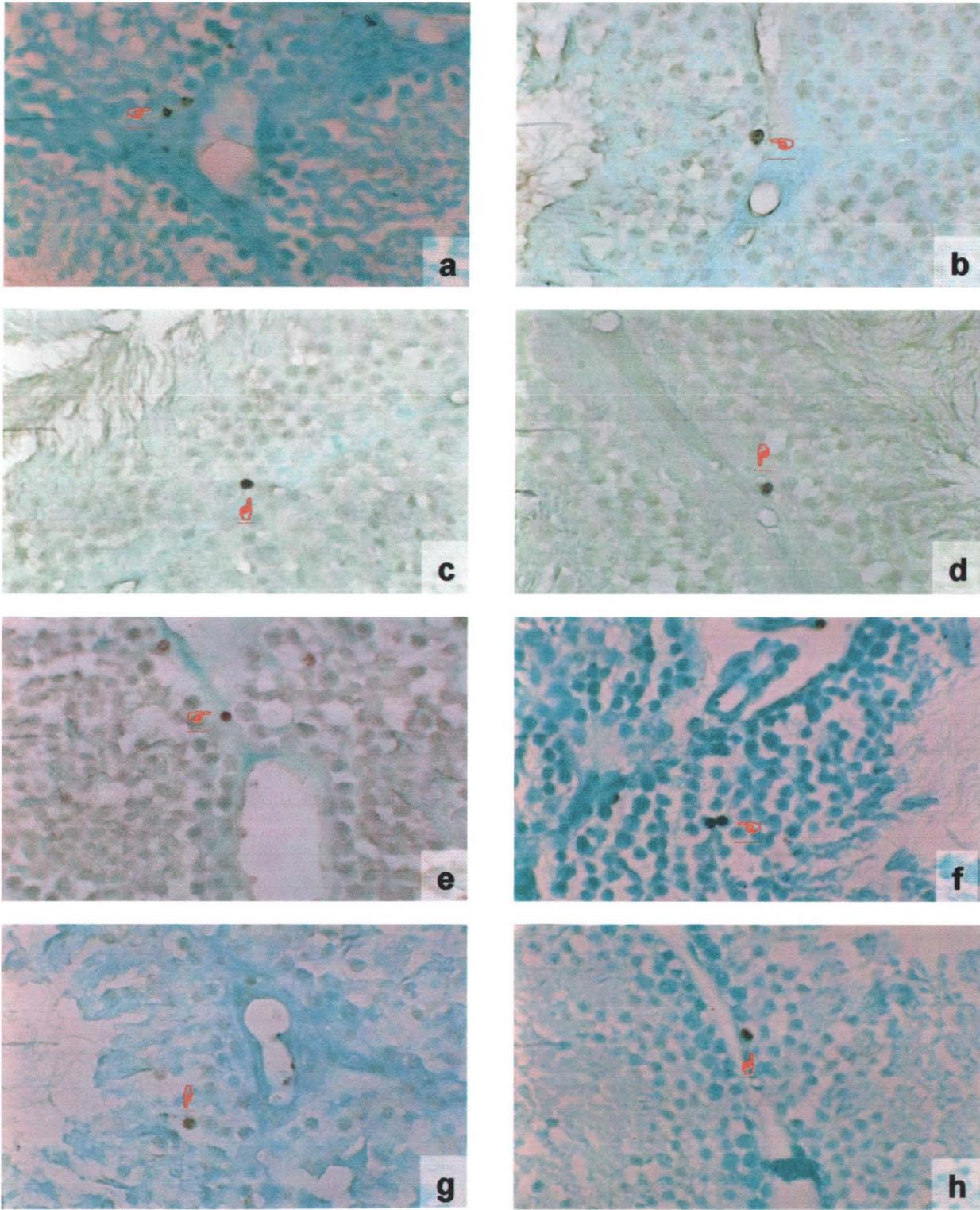


Figura 21: Presencia de células marcadas con nucleótido biotinilado después de la exposición a  $V_2O_5$ . Las  $\rightarrow$  señalan a las células marcadas a) testigo, b) 24 horas, c) 1 semana, d) 2 semanas, e) 4 semanas, f) 6 semanas, g) 10 semanas, h) 12 semanas. En ninguno de los tiempos de exposición se nota diferencia en el número de células marcadas con respecto al testigo.

## DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que la exposición a  $V_2O_5$  por vía inhalada promueve la acumulación de este elemento en los testículos, lo que concuerda con estudios previos (Domingo, 1996; WHO, 2001; Evangelou, 2002).

El transporte del vanadio a los testículos se puede deber a que cuando es inhalado llega a los alvéolos pulmonares (Manhanan, 2002), en donde aproximadamente el 90% (Léonard y Gerber, 1994) entra por difusión simple al torrente sanguíneo (Manhanan, 2002) y de ahí a la circulación general y al testículo. En la sangre, el vanadio ingresa a los eritrocitos a través de un sistema de intercambio aniónico (Evangelou, 2002) o a través de canales de fosfato dependientes de sodio (Ballatori, 2002). Posteriormente la transferrina y la albúmina se encargan de transportarlo a los diferentes tejidos del organismo (Stern *et al.*, 1993; Barceloux, 1999; WHO, 2001; Evangelou, 2002; Baran, 2003; Mukherjee *et al.*, 2004). Llega al testículo a través de la arteria espermática que irriga a los lobulillos testiculares y al espacio intersticial (Leeson *et al.*, 1990).

La acumulación de vanadio en los testículos indica que este elemento es capaz de atravesar la barrera hematotesticular, lo que se ha reportado en otros estudios (Domingo, 1996). Esto se puede deber a que como se mencionó anteriormente un porcentaje importante de vanadio es transportado por la transferrina (Ballatori, 2002); estudios anteriores han demostrado que esta proteína media la entrada de diferentes metales, como es el caso del hierro y el indio, a través de la barrera hematotesticular (Morales *et al.*, 1987; Hoyes *et al.*, 1996).

Otra posible explicación se relaciona con la capacidad del vanadio para inhibir la fosforilación de las proteínas tirosina-cinasas, proceso que está sumamente relacionado con la apertura de las uniones estrechas (Collares-Buzato *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Cheng y Murk, 2002; Avila-Costa *et al.*, 2005) que constituyen la barrera hematotesticular (Li *et al.*, 2000; Cheng y Murk, 2002), lo que permite el paso del metal a través de la misma. Esto ha sido previamente reportado en nuestro laboratorio pero para la barrera hematoencefálica (Avila-Costa *et al.*, 2005) y con otros modelos para la barrera hematotesticular (Li *et al.*, 2000; Cheng y Murk, 2002).

También se comprobó que la concentración de este metal de transición en el testículo se mantuvo constante a lo largo del tratamiento, lo que nos indica que los cambios observados en éste tejido se deben a la exposición al  $V_2O_5$ .

Al analizar si el tratamiento produce cambios en el peso de los testículos, encontramos que no existe diferencia significativa con respecto al testigo, esto ha sido previamente referido en varios estudios (Llobet *et al.*, 1993; Domingo, 1996), sin embargo también existen datos que indican que el vanadio puede promover el decremento en el peso del testículo, lo que se ha relacionado con los efectos apoptóticos de este metal de transición (Domingo, 1996; D´Cruz y Uckun, 2000; Aragón y Altamirano-Lozano, 2001). Al parecer esto depende mucho de la concentración, la vía y el compuesto de vanadio estudiado.

Al realizar las pruebas para detectar apoptosis encontramos que la inmunohistoquímica para caspasa-3 y la técnica de TUNEL mostraban resultados sin relación aparente, por lo que el primer punto a discutir es lo que se observó en los ratones testigo.

Al analizar a las espermatogonias y a los espermatoцитos de los ratones testigo encontramos que la caspasa-3 se localizó en el 20% de ellas, sin embargo con la técnica de TUNEL el porcentaje de células marcadas fue de alrededor del 4%. Esto se puede explicar gracias a que una de las características que presenta la apoptosis, es que las células que entran en este proceso, son fagocitadas rápidamente (Alfaro *et al.*, 2000) Esto ha sido previamente reportado en el testículo (Nakagawa *et al.*, 2005; Nakanishi y Shiratsishi, 2004), por lo que la presencia de caspasa-3 (marcador temprano de la apoptosis) en las espermatogonias y en los espermatoцитos indica que estas células presentan muerte celular programada, sin embargo son fagocitadas antes de que se lleven a cabo los últimos pasos de este proceso, como son los rompimientos de ADN característicos de la apoptosis. Es por esto que es sumamente importante utilizar más de una técnica para detectar apoptosis, debido a que con una sola, probablemente no se identifique el proceso, como otros autores lo han mencionado (Alfaro *et al.*, 2000; Sánchez-Torres y Diosdado, 2003).

En el caso de las espermátidas de los ratones testigo la presencia de caspasa -3 fue muy evidente, en alrededor del 40%, y se restringió principalmente a las regiones

perinucleares (correspondientes a los cuerpos residuales) de estas células lo que concuerda con reportes anteriores (Kim *et al.*, 2001; Tesarik, 2004). Al realizar la técnica de TUNEL encontramos que prácticamente no se produjo muerte celular programada. Esto probablemente se debe a que la presencia de la caspasa-3 en las espermátidas no produce muerte de la célula completa, sino solamente la degeneración de los cuerpos residuales, lo que se ha descrito en otros estudios con diversas proteínas apoptóticas como la caspasa-1 y el citocromo c (Blanco-Rodríguez y Martínez-García, 1999; Print y Loveland, 2000; Arama *et al.*, 2003; Cagan, 2003; Said *et al.*, 2004; Huh *et al.*, 2004). En este caso el empleo de más de una técnica para detectar apoptosis nos permitió diferenciar la apoptosis dependiente del núcleo de aquella independiente del mismo.

Con respecto a las células somáticas, observamos que las de Sertoli de los ratones testigo, presentaron un marcaje de alrededor del 20% para caspasa-3 y con la técnica de TUNEL no se observaron efectos apoptóticos. Estudios anteriores indican que las células de Sertoli no mueren por apoptosis en condiciones normales (Woolveridge y Morris, 2001), lo que concuerda con los resultados encontrados con la técnica de TUNEL. La presencia de caspasa-3 puede explicarse debido a que las células de Sertoli fagocitan a los cuerpos residuales y a las células germinales apoptóticas que presentan esta proteína, esto provoca que la caspasa-3 se exprese en las células de Sertoli lo que ya se ha reportado en estudios anteriores (Tres *et al.*, 2004).

Finalmente en las células de Leydig de los ratones testigo se observó un alto porcentaje de células marcadas con caspasa-3 (alrededor del 40%) y no se observó marca con la técnica de TUNEL. Lo obtenido con la última técnica concuerda con reportes anteriores que indican que dichas células no mueren por apoptosis en condiciones normales (Taylor *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2000; Woolveridge y Morris, 2001). Se ha descrito que la presencia de caspasa-3 en las células de Leydig es normal, sin embargo para que la célula inicie apoptosis es necesario que la proteína se encuentre en el núcleo (Kim *et al.*, 2000). En nuestro estudio la caspasa-3 se localizó en el citoplasma de las células de Leydig por lo que no desencadenó el proceso apoptótico, esto concuerda con los resultado obtenidos con la técnica de TUNEL.

Posterior a la exposición a  $V_2O_5$  se observó un decremento de espermátidas marcadas con caspasa-3 desde la primera semana de exposición hasta el final del tratamiento, y un incremento de células de Sertoli marcadas con esta proteína a partir de la segunda semana de exposición y hasta la sexta.

Los resultados obtenidos con esta técnica nos indican que el  $V_2O_5$  en las espermátidas, puede estar promoviendo procesos anti-apoptóticos, estos efectos ya se han reportado en otros tipos celulares (Stern *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1995; Chin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004).

En las células de Sertoli no se puede concluir si la presencia de caspasa-3 es consecuencia de que estas células están fagocitando a los cuerpos residuales que presentan caspasa-3 como ya se ha visto en otros estudios (Tres *et al.*, 2004) o si entran en apoptosis, este último efecto también se ha reportado como consecuencia de la exposición a vanadio en diferentes tipos celulares (Stern *et al.*, 1993; Cruz *et al.*, 1995; Aubrecht *et al.*, 1999; Huang, 2000; Wang *et al.*, 2003; Sankar *et al.*, 2005).

Los resultados observados en las espermátidas y en las células de Sertoli se explican debido a que este metal de transición se puede acumular en los cuerpos residuales de las espermátidas y en las células de Sertoli, como se ha observado con el Indio (Hoyes *et al.*, 1996), y ahí interactuar con diversas moléculas, para producir los efectos observados en este trabajo, entre los cuáles encontramos los siguientes (Figura 22):

1) En diferentes modelos se ha demostrado que el vanadio es capaz de promover la fosforilación de las proteínas tirosin-cinasas (Stern *et al.*, 1993; Léonard y Gerber, 1994; Chin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2004), algunas de éstas se han localizado en las células germinales y se ha visto que promueven la proliferación celular (Shin *et al.*, 1998; Salazar *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2005; DiVizzio *et al.*, 2005). Probablemente la activación de estas proteínas por la exposición a  $V_2O_5$  inhibió la expresión de la caspasa-3 en los cuerpos residuales de las espermátidas.

2) Asimismo el vanadio puede activar a  $TNF\alpha$  (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004) en las espermátidas (Pentikäinen, 2002; Lysiak, 2004; Said *et al.*, 2004), esta molécula al unirse a sus receptores en las células de Sertoli puede producir diversos efectos, tales como:

a) Promover la producción de las interleucinas en las células de Sertoli (Pentikäinen, 2002; Lysiak, 2004; Starace *et al.*, 2005), y con ello inhibir la expresión de la caspasa-3 (Hale *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 2002) (Gomez *et al.*, 1997) en las espermatidas. Es de destacar que el vanadio puede interactuar directamente con la producción de interleucinas (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004) en las células de Sertoli y producir el efecto antes mencionado.

b) Activar a Fas en las células de Sertoli y con ello el proceso apoptótico en las mismas, lo que ya se ha observado en un modelo *in vitro* (Riccioli *et al.*, 2000), por lo que el aumento en la presencia de caspasa-3 en las células de Sertoli puede no sólo deberse a que éstas fagociten a los cuerpos residuales que expresan esta proteína, sino también a que el vanadio puede estar activando el proceso apoptótico en este tipo celular a través de la activación de TNF $\alpha$  en las espermatidas.

c) Generar la activación de NF $\kappa$ B y con ello la de los receptores de andrógenos en las células de Sertoli. Al parecer este proceso es sumamente importante para la progresión de la espermatogénesis (Delfino y Walker, 1998; Pentikäinen, 2002; Delfino *et al.*, 2003; Lysiak, 2004). El incremento en la expresión de TNF $\alpha$  como consecuencia de la exposición a vanadio podría estar generando una aceleración de la espermatogénesis y con ello la fagocitosis de los cuerpos residuales por las células de Sertoli, lo que explicaría no sólo el decremento de espermatidas marcadas, sino también el aumento de células de Sertoli que expresan caspasa -3.

En este punto es de subrayarse que el vanadio también puede activar directamente a NF $\kappa$ B (Stern *et al.*, 1993; Evangelou, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2004) en las células de Sertoli y producir el efecto antes mencionado.

3) NF $\kappa$ B también se localiza en las espermatidas, aunque en menores concentraciones que en las células de Sertoli, (Delfino y Walker, 1998; Pentikäinen, 2002) y se ha visto que esta molécula puede inhibir la expresión de las caspasas

(Pentikäinen, 2000; Chen y Shi, 2002; Evangelou, 2002), por lo que esta sería otra explicación para entender la disminución de la marca de caspasa-3 en las espermatidas.

4) Asimismo se ha encontrado que el vanadio promueve la liberación de ROS y con ello daño al ADN, lo que culmina en la activación de la apoptosis (Aubrecht *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003), proceso que puede estar ocurriendo en las células de Sertoli. La inactivación de la caspasa-3 en las células de Sertoli, a partir de la sexta inhalación, se puede deber a que el daño sea tan grave que las células entren en necrosis, lo que ya se ha observado ultraestructuralmente en nuestro modelo (Bizarro *et al.*, 2005).

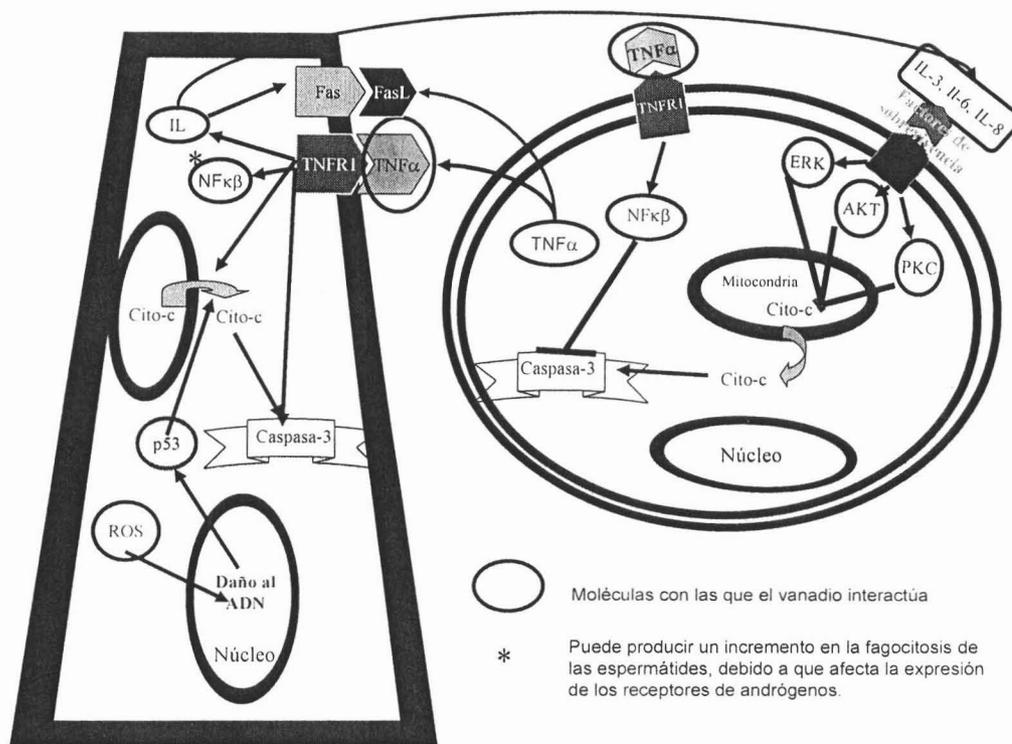


Figura 22: Representación de los efectos producido por el vanadio en la presencia de caspasa-3 en las células de Sertoli y en las espermatidas.

Con la técnica de TUNEL no se encontraron efectos secundarios a la exposición a  $V_2O_5$ , esto concuerda con los resultados obtenidos con caspasa-3 en las espermatogonias, espermatocitos y en las células de Leydig. Por lo tanto en estos 3 tipos celulares no se produjo apoptosis secundaria al tratamiento con vanadio, sin embargo, esto no quiere decir que en estos tipos celulares no se este produciendo

daño alguno, debido a que se puede estar generando muerte celular por necrosis u otro tipo de daño celular. La presencia de necrosis en las mismas condiciones experimentales, se hizo evidente ultraestructuralmente en estas células (Bizarro et al., 2005).

En el caso de las espermátidas, no se encontraron efectos significativos con respecto al testigo con la técnica de TUNEL, sin embargo sí se presentó una disminución en la presencia de caspasa-3 desde la primera semana de tratamiento, esto indica que la apoptosis en las espermátidas fue independiente del núcleo y que por lo tanto los efectos anti-apopticos que produjo el vanadio en este tipo celular, están relacionados con la liberación de los cuerpos residuales. Se ha visto que una desregulación en la liberación de los cuerpos residuales puede producir la liberación inadecuada de los espermatozoides y por lo tanto generar infertilidad (Sharpe *et al.*, 1995; Domingo, 1996; Huh *et al.*, 2004), efecto que se ha reportado en varios estudios por la exposición a vanadio (Nechay, 1984; ASTDR, 1992; Llobet *et al.*, 1993; Domingo, 1996; Barceloux 1999; Aragón y Altamirano-Lozano, 2001).

Con relación a las células de Sertoli tampoco se presentaron efectos significativos con la técnica de TUNEL, y si con la presencia de caspasa-3. En este caso es necesario utilizar otras técnicas debido a que, como se mencionó anteriormente, no podemos concluir si la presencia de caspasa-3 es consecuencia de que estas células están fagocitando a los cuerpos residuales que presentan caspasa-3, lo que concuerda con los resultados obtenidos con la técnica de TUNEL, que indican que estas células no presentan apoptosis; o que las células de Sertoli sí entran en apoptosis, pero no se marcaron con la técnica de TUNEL debido a que fueron fagocitadas antes de presentar los rompimientos de ADN característicos de esta muerte celular.

Finalmente es de destacarse que con los resultados obtenidos en este trabajo no se puede concluir si el vanadio es un elemento carcinogénico, debido a que en ningún tipo celular estudiado está inhibiendo el proceso apoptótico de la célula completa. Sin embargo sí es muy probable que el vanadio este generando un efecto en la fertilidad de los organismos expuestos, debido a que está interviniendo en el proceso de liberación de los cuerpos residuales.

## CONCLUSIONES

- El Vanadio se acumula en los testículos y es capaz de atravesar la barrera hematotesticular, ahí puede interactuar con diversas proteínas para afectar los procesos apoptóticos que ocurren en los diferentes tipos celulares del testículo.
- El vanadio no produjo efectos apoptóticos en las espermatogonias, espermatoцитos y células de Leydig.
- En las espermátidas el vanadio produjo efectos anti-apoptóticos independientes de núcleo, por lo que puede estar afectando el proceso de liberación de los cuerpos residuales y con ello generando infertilidad.
- Con respecto a las células de Sertoli no se puede concluir si produjo o no efectos apoptóticos, por lo que es necesario utilizar otras técnicas para entender mejor el efecto de vanadio sobre este tipo celular.
- Finalmente el  $V_2O_5$  en nuestro modelo puede estar produciendo infertilidad en los organismos tratados.

## PERSPECTIVAS

- Identificar el mecanismo de acción mediante el cual el vanadio esta produciendo los efectos observados en este trabajo.
- Investigar si el aumento en la presencia de caspasa-3 en las células de Sertoli se debe a que estas células entran en apoptosis, o a algún otro proceso.
- Corroborar si el vanadio en nuestro modelo esta generando la producción de espermatozoides aberrantes.
- identificar si el vanadio está generando otro tipo de daño citotóxico en los diferentes tipos celulares del testículo.
- Identificar si el vanadio esta produciendo efectos proliferativos en los diferentes tipos celulares estudiados.

## REFERENCIAS

- Abraham M. C., Shaham S., **Death without caspases, caspases without death**, *Trends in Cell Biology*, 2004; 14 (4): 184- 193.
- Adams J. M., **Ways of dying: multiple pathways to apoptosis**, *Genes and Development*, 2003; 17:2481-2495.
- Alfaro M. E., García C. C., Dueñas G. A., **Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones**, *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*, 2000; 46 (4): 275-280.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., **Molecular biology of the cell**, USA, Garland Sciences Taylor and Francis Group, 2002, 1462 p.
- Albert L. A., **Toxicología ambiental**, México, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, 2004, 453pp.
- Aragón A. M., Altamirano-Lozano M., **Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice**, *Reproductive Toxicology*, 2001; 15: 145-151.
- Arama L., Agapite J., Steller H., **Caspase Activity and a Specific Cytochrome C Are Required for Sperm Differentiation in *Drosophila***, *Developmental Cell*, 2003; 4: 687-697.
- Arch R. H., Gedrich R. W, Thompson C. B., **Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)- a family of adapter proteins that regulates life and death**, *Genes and Development*, 1998; 12: 2821-2830.
- **ASTDR** (Agency of Toxic Substances and Disease Registry), **Toxicological profiles of vanadium compounds**, U.S. Public Health Services, 1992.
- Aubrecht J., Narla R. K., Ghosh P., Stanek., Uckun F. M., **Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes**, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999; 154:228-235.
- Avila-Costa M. R., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez A., Antuna A. B., Saldivar O. L., Espejel-Maya G., Mussali-Galante P., Avila-Casado M. C., Reyes-Olivera A., Anaya-Martínez V., Fortoul T. I., **Ependymal epithelium disruption**

- after vanadium pentoxide inhalation a mice experimental model, *Neurosciences Letters*, 2005; 381: 21-25.
- Ballatori N., **Transport of Toxic Metals by Molecular Mimicry**, *Environmental Health Perspectives*, 2002; 110 (5): 689-694.
  - Baran E. J., **Model studies related to vanadium biochemistry: Recent advances and prespectives**, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2003; 14(6): 878-888.
  - Barceloux D. G., **Vanadium**, *Clinical Toxicology*, 1999; 37 (2): 265-278.
  - Bizarro-Nevarés P., Fortoul T. I., Ávila-Costa M. R., Acevedo-Nava S., Niño-Cabrera G., Piñón-Zárate G., González-Villalva A., Zepeda-Rodríguez A., Saldivar-Osorio L., **Ultrastructural findings in mice seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. Artículo enviado.**
  - Blanco-Rodríguez J., Martínez-García C., **In vivo analysis of germ cell apoptosis reveals the existence of stage-specific "social" control of germ cell death in the seminiferous epithelium**, *International Journal of Andrology*, 1997; 20: 373-379.
  - Blanco-Rodríguez J., **A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis**, *International Journal of Andrology*, 1998; 21:236-248.
  - Blanco-Rodríguez J., Martínez-García C., **Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids**, *Biology of Reproduction*, 1999; 61:1541-1547.
  - Cagan R. L., **Spermatogenesis: Borrowing the apoptotic machinery**, *Current Biology*, 2003; 13:600-602.
  - Collares - Buzato C. B., Jepson M. A., Simmons N. L., Hirst B. H., **Increased tyrosine phosphorylation causes redistribution of adherens junction and tight junction proteins and perturbs paracellular barrier function in MDCK epithelia**, *European Journal of Cell Biology*, 1998; 76 (2): 85-92.

- Crans C. D., Smee J. J., Gaidamauska E., Yang L., **The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds**, *Chemical reviews*, 2004; 104(2): 849-902.
- Cruz T. F., Morgan A., Min W., **In vitro and in vivo antineoplastic effects of ortrovanadate**, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1995;153:161-166
- Cryns V., Yuan J., **Proteases to die for**, *Genes and development*, 1998; 12: 1551-1570.
- Chen F., Vallyathan V., Castranova V., Shi X., **Cell apoptosis induced by carcinogenic metals**, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001; 222:183-188.
- Chen F., Shi X., **Signaling from Toxic Metals to NF- $\kappa$ B and Beyond: Not just a matter of Reactive Oxygen Species**, *Environmental Health Perspectives*, 2002; 110:807-811.
- Cheng C. Y., Murk D. D., **Cell Junctions dynamics n the testis: Sertoli-Germ Cell interactions and male contraceptive development**, *Physiological reviews*, 2002; 82: 825-874.
- Chin L. S., Murray S. F., Harter D. H., Doherty P. F., Singh S. K., **Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role of Akt/PKB**, *Journal of Biomedical Sciences*, 1999; 6: 213-218.
- D'Cruz O. J., Uckun F. M., **Vanadocene-Mediated *in Vivo* Male Germ Cell Apoptosis**, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000; 166: 186-195.
- Delfino, F.J., Walker, W.H., **Stage-specific nuclear expression of NF- $\kappa$ B in mammalian testis**, *Molecular Endocrinology*, 1998; 12: 1696-1707.
- Delfino F. J., Boustead J. N., Fix Ch., Walker W. H., **NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells**, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2003; 201: 1-12.
- Deng Y., Lin Y., Wu X., **TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIALO**, *Genes and Development*, 2002; 16:33-45.
- Desagher S., Martinou J., **Mitochondria as the central control point of apoptosis**, *Trends in Cell Biology*, 2000; 260-277.

- Di Vizio D., Cito L., Boccia A., Chieffi P., Insabato L., Pettinato G., Motti M. L., Schepis F., D'Amico W., Fabiani F., Tavernise B., Venuta S., Fusco A., Vigglietto G., **Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasia (ITGCN) to invasive germ cell tumor**, *Oncogene*, 2005; 24: 1882-1894.
- Didenko V. V., Ngo H., Mibchew C. L., Broudreux D. J., Widmayer M. A., Baskin D. S., **Caspase-3-Dependent and -Independent Apoptosis in Focal Brain Ischemia**, *Molecular Medicine*, 2002; 8 (7):347-352.
- Ding M., Li J., Leonard S. S., Ye J., Shi X., Colburn N. H., Castranova V., Vallyathan V., **Vanadate-induce activation of activator protein 1: role of reactive oxygen species**, *Carcinogenesis*, 1999; 20(4): 663-668.
- Domingo J. L., Vanadium: **A review of the reproductive and developmental toxicity**, *Reproductive Toxicology*, 1996; 10(3): 175-182.
- Duke R. C., Ojcius D. M., Young J. D., **Suicidio celular, en la salud y en la enfermedad**, *Investigación y Ciencia*, 1997; febrero: 44-52.
- Evangelou A. M., **Vanadium in Cancer treatments**, *Critical reviews in Oncology /Hematology*, 2002; 42:249-265.
- Fernandez A., Wendt J. O. L., Wolski N., Hein K. R. G., Wang S., Witten M. L., **Inhalation health effects of fine particles from co-combustion of coal and refuse derived fuel**, *Chemosphere*, 2003; 51: 1129-1137.
- Fortoul T. I., Quan-Torres A., Sánchez I., Lopez I. E., Bizarro P., Mendoza M. L., Saldivar O. L., Espejel-Maya G., Avila-Casado M., Avila-Costa M. R., Colin-Barenque L., Navarri D., Olaiz-Fernández G., **Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of México City residents in the1960s and 1990s**, *Archives of Environmental Health*, 2002, 57: 446-449.
- Freedman B., **Environmental Ecology, the ecological effects of pollution, disturbance and other stresses**, New York, Academic Press, 1998, 606pp.
- García L. M., Tarrago C. M. R., López W. R., Uribe A. M. C., **“Tendencias en el estudio del testículo y epidídimo de roedores silvestres”**, *Nuevos retos de la docencia y la investigación en histología*, México, Sociedad Mexicana de Histología, 2001, 171-192.

- Gartner L. P., Hiatt J. L., *Texto Atlas de Histología*, México, Mc-Graw-Hill Interamericana, 2002, 539 pp.
- Ghosh P., D'Cruz O. J., Narla R. K., Uckun F. M., **Apoptosis-inducing Vanadocene compounds against Human Testicular Cancer**, *Clinical Cancer Research*, 2000; 6: 1536-1545.
- Gilbert S. F., *Developmental Biology*, Massachusetts, Sinauer associates Inc. Publishers, 2000, 749pp.
- Gomez E., Morel G., Cavalier A., Liénard M., Haour F., Courtens J., Jégou B., **Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes**, *Biology of reproduction*, 1997; 56: 1513-1526.
- Grataroli R., Vindrieux D., Gougeon A., Benahmed M., **Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -related apoptosis-inducing ligand and its receptors in rat testis during development**, *Biology of Reproduction*, 2002; 66: 1707-1715.
- Grover A., Sairam M. R., Smith Ch. E., Hermo L., **Structural and functional modifications of Sertoli cells in the testis of adult follicle-stimulating hormone receptor knockout mice**, *Biology of Reproduction*, 2004; 71: 117-129.
- Guevara- García J. A., **Una semblanza de la química bioinorgánica del Vanadio**, *Profesores al día, Educación química*, 1996; 7 (4): 186-189.
- Hale A. J., Smith C. A., Sutherland L. C., Stoneman V. E. A., Longthorne V. L., Culhane A. C., Williams G. T., **Apoptosis: molecular regulation of cell death**, *European Journal of Biochemistry*, 1996; 236: 1-26.
- Hoyes K. P., Morris I. D., Hendry J. H., Sharma H. L., **Transferrin-mediated uptake of radionuclides by the testis**, *The Journal of nuclear medicine*, 1996; 37 (2): 336-340.
- Huang Ch., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S. S., Shen H., Butterworth L., Lu Y., Costat M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Shi X., **Vanadate induce p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis**, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275(20): 32516-32522.

- Huh J. R., Vernooy S Y., Yu H., Yan N., Shi Y., Guo M., Hay B. A., **Multiple Apoptotic Caspase Cascades Are Required in Nonapoptotic Roles for Drosophila Spermatid Individualization**, *PLoS Biology*, 2004; 2(1): 0043-0053.
- Iida H., Maehara K., Doiguchi M., Mori T., Yamada F., **Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat sertoli cells**, *Reproductive Toxicology*, 2003; 17: 457-464.
- Ivancsits S., Pigler A., Diem E., Schaffer A., Rüdiger H. W., **Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure**, *Mutation Research*, 2002; 519:25-35.
- Jandhyala B. S., Hom G. J., **Physiological and pharmacological properties of Vanadium**, *Life Sciences*, 1983; 33(14):1325-1340.
- Johnson D., **Non caspase proteases in apoptosis**, *Leukemia*, 2000; 14: 1695-1703.
- Jordán J., **Apoptosis: muerte celular programada**, *Bioquímica*, 2003; 22 (6):100-106.
- Kierszenbaum A. L., **Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being a life**, *Molecular Reproduction and Development*, 2001; 58: 1-3.
- Kim J., Luo L., Zirkin B. R., **Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate**, *Endocrinology*, 2000; 141 (5): 1846-1853.
- Kim J., Ghosh S. R., Weil A. C. P., Zirkin B. R., **Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intratesticular testosterone**, *Endocrinology*, 2001; 142(9): 3809-3816.
- Koji T., **Male germ cell death in mouse testes: possible involvement of Fas and Fas ligand**, *Medical Electron Microscopy*, 2001; 34:213-222.
- Kon Y., Endo D., **Morphological study of metaphase-specific apoptosis in MRL mouse testis**, *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 2000; 29 (5): 313-319.

- Kumi-Diaka J., Butler A., **Caspase-3 protease activation during the process of genistein-induced apoptosis in TM4 testicular cells**, *Biology of the Cell*, 2000; 92: 115-124.
- Lascaña-Navarro M., Aguilar, Garduño C., Romieu I., **Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en 3 megaciudades de América Latina**, *Salud Pública Mexicana*, 1999; 41: 203-215.
- Laux M. T., Boerner E., Podbielska H., Jelen M., **Apoptosis A Review**, *Journal of Medical Sciences*, 2003; 3 (2): 180-191.
- Lee J., Richburg J. H., Shipp E. B., Meistrich M. L., Boekelheide K., **The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of testis**, *Endocrinology*, 1999; 140(2): 552-558.
- Leeson T. S., Leeson C. R., Paparo A. A., **Texto/Atlas de Histología**, México Interamericana McGraw-Hill, 1990, 741 pp.
- Leist M., Jäätelä M., **Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanism**, *Molecular Cell Biology*, 2001; 2: 1-10.
- Léonard A., Gerber G. B., **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds**, *Mutation Research*, 1994; 317: 81-88.
- Leonard S. S., Bower J. J., Shi X., **Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses**, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004; 255: 3-10.
- Lewin B., **Genes VII**, USA, Oxford University Press, 2000, 990pp.
- Li J. C. H., Samy E. T., Grima J., Chung S. S. W., Mruk D., Lee W. M., Silvestrini B., Cheng C. Y., **Rat testicular myotubularin, a protein tyrosine phosphatase expressed by Sertoli and Germ Cells, is a potential marker for studying Cell-Cell interactions in the rat testis**, *Journal of cellular physiology*, 2000; 185: 366-385.

- Li J., Dokka S., Wang L., Shi X., Castranova V., Yan Y., Costa M., Huang Ch., **Activation of aPKC is required for vanadate-induced phosphorylation of protein kinase B (Akt), but not p70<sup>S6k</sup> in mouse epidermal JB6 cells**, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004; 255: 217-225.
- Llobet J. M., Colomina M. T., Sirvent J. J., Domingo J. L., Corbella J., **Reproductive toxicology evaluation of vanadium in male mice**, *Toxicology*, 1993; 80: 199-206.
- Lu S., Hoestje S. H., Choo E., Epner D. E., **Induction of caspase –dependent and –independent apoptosis in response to methionine restriction**, *International Journal of Oncology*, 2003; 22: 415-420.
- Lysiak J. J., **The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis**, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004; 2:1-10.
- Manhanan S. E., **Toxicological Chemistry and Biochemistry**, USA, Lewis Publishers, 2002, 448 pp.
- Maueresse-Battistoni B. L., Pernod G., Sigillo F., Kolodié L., Benahmed M., **Plasminogen activator inhibitor-1 is expressed in cultured rat Sertoli cells**, *Biology of Reproduction*, 1998; 59: 591-598.
- Molina M. J., Molina L. T., **Megacities and Atmospheric Pollution**, *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2004; 54: 644-680.
- Morales C. Sylvester S. R., Griswold M. D., **Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat *in vivo***, *Biology of Reproduction*, 1987; 37: 99-1005.
- Mugica V., Maubert M., Torres M., Muñoz J., Rico E., **Temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico City during 1996–1998**, *Journal of Aerosol Science*, 2002; 33(1): 91-102.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M., **Vanadium- an element of atypical significance**, *Toxicology Letters*, 2004; 150: 135-143.

- Nakagawa A., Shiratsuchi A., Tsuda K., Nakanishi Y., **In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells**, *Molecular Reproduction and Development*, 2005; 71: 166-177.
- Nakanishi Y., Shiratsuchi A., **Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: Mechanism and Consequences**, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2004; 27(1):13-16.
- Narisawa S., Hecht N. B., Goldberg E., Boatright K. M., Reed J. C., Millán J. L., **Testis-Specific Cytochrome c-Null Mice Produce Functional Sperm but Undergo Early Testicular Atrophy**, *Molecular and Cellular Biology*, 2002; 22 (15): 5554-5562.
- Nechay B. R., **Mechanisms of action of vanadium**, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1984; 24: 501-524.
- Omezzine A., Chater S., Mauduit C., Florin A., Tabone E., Chuzel F., Bars R., Benahmed M., **Long-term apoptotic cell death process with increase expression and activation of caspase- 3 and -6 in adult germ cell exposed in utero to flutamide**, *Endocrinology*, 2003; 144 (2): 648-661.
- Osornio-Vargas A. R., Bonner J. C., Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Ponce-de-Leon S. R., Miranda J., Rosas I., **Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico City Air Pollution Particulate Matter in Vitro Are Dependent on Particle Size and Composition**, *Environmental Health Perspectives*, 2003, 111 (10):1289-1296.
- Pentikäinen V., **Regulation of male germ cell apoptosis Roles of sex steroids and the cellular death receptor Fas and TNFR1**, *Helsinki University Biomedical Dissertation*, 2002, 13: 1-69.
- Philp R. B., **Ecosystem and Human Health**, Toxicology and environmental Hazard, USA, CRC Press, 2001, 352 pp.
- Print C. G., Loveland K. L., **Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis**, *BioEssays*, 2000; 22: 423-430.
- **RAIS** (The Risk Assessment Information System), **Toxicity Summary for VANADIUM**, Oak Ridge, Tennessee, 1991.

- Riccioli A., Starace D., D'Alessio A., Starace G., Padula F., De Cesaris P., Filippini A., Ziparo E., **TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium**, *The Journal of immunology*, 2000; 165: 753-749.
- Richburg J. H., Johnson K J., Schoenfeld H. A., Meistrich M L., Dix D. J., **Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis**, *Toxicology Letters*, 2002; 135: 167-183.
- Riedl S. J., Shi Y., **Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis**, *Molecular Cell Biology*, 2004; 5: 897- 907
- Russo M., Troncone G., Guarino F. M., Angelini F., Chieffi P., **Estrogen-induced Akt-1 activity in the lizard ( *Podarcis s. sicula*) testis**, *Molecular reproduction and development*, 2005; 71: 52-57.
- Said T. M., Paasch U., Glander H., Agarwal A., **Role of caspases in male infertility**, *Human reproduction update*; 2004; 10(1):39-51.
- Salazar G., Liu D., Liao Ch., Batkiewicz L., Arbing R., Chung S. S. W., Lele K., Wolgemuth D. J., **Apoptosis in male germ cells in response to cyclin A1-deficiency and cell cycle arrest**, *Biochemical Pharmacology*, 2003; 66:1571-1579.
- Sánchez-Torres L. E., Diosdado V. F., **Apoptosis: el fenómeno y su determinación**, *Técnica Pecuaria en México*, 2003; 41(1): 49-62.
- Sankar R. R., Roy S., Samanta Sh., Maitra D., Chatterjee M., **Protective role of vanadium on the early process of rat mammary carcinogenesis by influencing expression of metallothionein, GGT-positive foci and DNA fragmentation**, *Cell Biochemistry and Function*, 2005; 23(3):151-155.
- Scrivens P. J., Alaoui-Jamali M. A., Giannini G., Wang T., Loignon M., Batist G., Sandor V. A., **Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues**, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2003; 2: 1053-1059.

- Sharpe R. M., Maguire S. M., Saunders P.T.K., Millar M. R., Russel L. D., Ganten D., Bachmann S., Mullins L., Mullins J. J., **Infertility in a transgenic rat due to impairment of cytoplasmic elimination and sperm release from the Sertoli cells**, *Biology of reproduction*, 1995; 53: 214-226.
- Sharpe R. M., Mckinnell Ch., Kivlin C., Fisher J. S., **Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood**, *Reproduction*, 2003; 125: 769-784.
- Shin T., Jin J., Kim J., Kim H., Lee Ch., **Inmunohistochemical study of protein kinase C in the testes of Cattle and Pigs**, *Journal of veterinary and Medical Science*, 1998; 60 (5): 631-633
- Shina Ilikim A. P., Luc Y., Diaz-Romero M., Yen P. II., Wang Ch., Swerdloff R. S., **Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis**, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2003; 85: 175-182.
- Shiraishi K., Naito K., Yoshida K., **Inhibition of calpain but not caspase protects the testis against injury after experimental testicular torsion**, *Biology of Reproduction*, 2000; 63: 1538-1548.
- Starace D., Riccioli A., D'Alessio A., Giampietri C., Petrunaro S., Galli R., Filippini A., Ziparo E., De Cesaris P., **Characterization of signaling pathways leading to Fas expression induced by TNF- $\alpha$ : pivotal role of NF- $\kappa\beta$** , *The FASEB Journal*, 2005; 19: 473-475.
- Stern A., Yin X., Tsang S. Davidson A., Moon J., **Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogen expression**, *Biochemistry and Cell Biology.*, 1993; 71: 103-112.
- Tanaka H., Fujisawa M., Tanaka H., Okada H., Kamidono S., **Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele**, *British Journal of Urology International*, 2002; 89: 905-909.
- Taylor M. F., Woolveridge I., Metcalfe A. D., Steruli C. H., Hikman J. A., Morris I. D., **Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethanesulphonate: role of the Bcl-2 family members**, *Journal of Endocrinology*, 1998; 157: 317-326.

- Téllez-Rojo M. M., Romieu I., Polo-Peña, M., Ruiz-Velasco S., Meneses-González F., Hernández-Ávila M., **Efecto de la contaminación ambiental sobre las consultas por infecciones respiratorias en niños de la ciudad de México**, *Salud Pública Mexicana*, 1997; 39:513-522.
- Tesarik J., Ubaldi F., Rienzi L., Martínez F., Iacobelli M., Mendoza C., Greco E., **Caspase-dependent and -independent DNA fragmentation in Sertoli and germ cell from men with primary testicular failure: relationship with histological diagnosis**, *Human reproduction*, 2004; 19(2): 254-261.
- Tres L. L., Rosselot C., Kierszenbaum A. L., **Caspase activity inhibition delays programmed spermatogenic cell death *in vitro***, *Archives of Histology and Cytology*, 2004; 67(4): 315-324.
- Waalkes M. P., Fox D. A., States J. Ch., Patierno S. R., McCabe M. J., **Metals and disorder of cell accumulation: Modulation of apoptosis and cell proliferation**, *Toxicological Sciences*, 2000; 56: 255-261.
- Wang X., **The expanding role of mitochondria in apoptosis**, *Genes and Development*, 2001; 15: 2922-2933.
- Wang L., Medan D., Mercer R., Overmiller D., Leonard S., Castranova V., Shi X., Ding M., Huang Ch., Rojanasakul Y., **Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: role of reactive oxygen species**, *Journal of Cell Physiology*, 2003; 195:99-107.
- WHO (World Health Organization), **Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds**, Geneva, 2001.
- Woolveridge I., Morris I. D., **“Apoptosis in male reproductive toxicology”**, *Apoptosis in Toxicology*, USA, Taylor and Francis, 2001, 71-93.
- Zar J., **Biostatistical analysis**, Prentice-Hall, Engelwood Cliffs, 1999, 931 p.
- Zhang A., Huang Ch., Li J., Leonard S. S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X., **Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species**, *Archives of biochemistry and biophysics*, 2001; 392 (2): 311-320.
- Zhang Z., Huang Ch., Li J., Shi X., **Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells**, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002; 89: 142-148.

- Zhang J., Dong M., Li L., Fan Y., Pathre P., Dong J., Lou D., Wells J., Olivares-Villagómez D., Kaer L. V., Wnag J., Xu M., **Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003; 100 (26): 15782-15787.