



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del ácido ascórbico sobre las alteraciones
morfofisiológicas del ovario inducidas por la inhalación de
vanadio en un modelo murino.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

FÁTIMA ABIGAIL GARCÍA IBARRA



**DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. MARTHA PATRICIA BIZARRO
NEVARES
2014**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de la alumna

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de Cuenta

1. Datos de la alumna

García
Ibarra
Fátima Abigail
044 (55) 40 68 65 87
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30718035-5

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor

M. en. C.
Martha Patricia
Bizarro
Nevares

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Mario Agustín
Altamirano
Lozano

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Laura
Colín
Barenque

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Marcela
Rojas
Lemus

7. Datos del trabajo escrito

Título

Subtítulo

Número de páginas

Año

7. Datos del trabajo escrito

Efecto del ácido ascórbico sobre las alteraciones morfofisiológicas del ovario inducidas por la inhalación de vanadio en un modelo murino.

71

2014

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Norma y Miguel, por ser desde siempre los primeros en creer en mí, por impulsarme a seguir mis sueños y porque gracias a ustedes he llegado hasta aquí. No solo esta tesis, sino cada uno de mis triunfos deben sentirlos como propios, porque lo son.

A mis hermanos Abraham, Aarón y Ana por ser compañeros de vida, por darme su alegría, apoyo y comprensión todos los días desde que nací. Porque llevo en mí un pedacito de cada uno y en este trabajo también están ustedes. Los quiero mucho.

A mis abuelos Martha y Maximino, por ser pilares en mi educación, por apoyarme siempre en cada decisión y por llenar mi vida de cariño, alegrías y buenos recuerdos.

A mis sobrinos Lucio y Demian, por llegar inesperadamente a mi vida y corazón y llenarme de risas y amor cada día. Espero que un día pequeños, encuentren algo que los apasione tanto como a mí la Biología.

A mi Felipe, por ser como eres, por apoyarme siempre, por creer en las cosas que puedo lograr, por enseñarme a soñar en grande sin despegar los pies de la tierra, por amarme y aceptarme tal y como soy, pero sobre todo por querer compartir tu vida conmigo. TE AMO MUCHISIMO.

A mis cuñadas Jimena y Erika por apoyarme no sólo para realizar la tesis, sino con muchas otras cosas y por aguantar mis malos ratos, que por suerte son poquitos.

A Nayeli por aguantar mis locuras y distracciones, por ser la mejor compañera y por brindarme tu amistad tan valiosa y apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio. No sé qué hubiera hecho sin ti.

A Paty, por ser más que una tutora o maestra los últimos años. Por darme tu amistad y apoyo, por ser la persona más paciente conmigo y por creer, más que en el proyecto, en mí. Te quiero.

A mi amiga Montserrat, por tantas aventuras, risas, llantos, preocupaciones y éxitos vividos a lo largo de los años. Espero mantenerte en mi vida siempre.

A Leslie y Erika por ser desde hace más de una década, más que amigas, como hermanas para mí. Saben cuánto las quiero y cuánto agradezco poder compartir esto con ustedes.

A Daniel por ser tan buen amigo después de todo lo vivido, por apoyarme en todo y por mostrarme que cuento contigo incluso para robar un banco.

A mis amigos de la facultad Alejandra, Sandra, Toño, Sebastián, Ana Carla, Gaby, José, Bere, Lalo, Tania, Ana Karen, por los cuatro años más felices que he tenido y por estar ahí siempre con una sonrisa.

A mis amigos del lab Juanito, Fany y Maribel, por apoyarme en todo y por los momentos tan agradables que pasé junto a ustedes, incluso cuando las cosas no iban bien. Los voy a extrañar.

A mis amigos del Museo Universum Lola, Ale, Paco, Claris, Alicia, Roma, Nancy, Vero, Brenda, Jess, Steff, Ari, Janis, Mayra, Haydeé, Martha, Lula, Luis A. y Luis Meza, por hacerme reír todos los días desde mi llegada y por hacerme sentir rápidamente en casa.

A Marce, Laura, Adriana, Paco, Armando, Sofía y Carlos por ayudarme siempre y enseñarme todo lo que sé (del laboratorio) con una sonrisa en el rostro y la mejor disposición. ¡Muchas gracias!

A Tere por darme la oportunidad de realizar el trabajo que yo quise y por siempre poner de tu parte para que fuera posible. Por brindarme el apoyo que necesitaba y creer en mis capacidades.

AGRADECIMIENTOS

A los biólogos Francisco Pazos Nájera y Armando Zepeda Rodríguez por el apoyo técnico en la parte de microscopía y microfotografía brindado durante la realización de este proyecto.

Al M. en C. Francisco García Sánchez y al Instituto Nacional de Pediatría por su asesoría en técnicas de Inmunohistoquímica.

A las Técnicas Académicas Raquel Guerrero Alquicira y Verónica Rodríguez Mata por el apoyo en la parte de técnica histológica y procesamiento de muestras.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su apoyo en la determinación de hormonas séricas mediante la técnica de Radioinmunoensayo.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña bioterio de la Facultad de Medicina por el apoyo en la obtención, cuidado y mantenimiento de los animales de investigación.

Al Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT por brindarme la beca de Ayudante de Investigador en el periodo de marzo de 2012 a la fecha.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxinonenal o 4-hidroxi-2-nonenal
4-HHE	4-hidroxi-2-hexenal
AA	Ácido ascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
cAMP	Adenosin monofosfato cíclico
CMYK	Cian Magenta Amarillo Negro
DAB	Diaminobencidina
DHA	Dehidroascorbato
ER α	Receptor de estrógenos α
ER β	Receptor de estrógenos β
FSH	Hormona folículo estimulante
GLUT	Transportador de glucosa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HRP	Horse raddish peroxidase
IL-6	Interleucina 6
LD ₅₀	Dosis letal 50
LH	Hormona luteinizante
LPO	Peroxidación lipídica o lipoperoxidación
MAPKs	MAP cinasas
MDA	Malonaldehído
MMPs	Metaloproteinasas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NOM	Norma Oficial Mexicana
NO _x	Óxidos de nitrógeno
PBS	Buffer de fosfatos

PCBs	Polifenilos policlorados
PM _{2.5}	Partículas suspendidas con diámetro menor o igual a 2.5µm
PM ₁₀	Partículas suspendidas con diámetro menor o igual a 10µm
ppm	Partículas por millón
PR-A	Receptor de progesterona tipo A
PR-B	Receptor de progesterona tipo B
PST	Partículas Suspendidas Totales
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SMA	Secretaría de Medio Ambiente
TBARS	Thiobarbituric Acide Reactive Substances
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
V	Vanadio
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México
ZP	Zona pelúcida

1. ÍNDICE

1. ÍNDICE	9
2. RESUMEN	11
3. INTRODUCCIÓN	12
3.1. Contaminación ambiental	12
3.2. Vanadio. Generalidades y exposición	14
3.3. Estrés oxidante	19
3.4. Antioxidantes	22
3.5. Sistema reproductor femenino de ratón	26
3.6. Ciclo estral	32
3.7. Regulación hormonal de la reproducción en hembras	33
3.8. Reprotoxicidad en hembras por vanadio	35
4. JUSTIFICACIÓN	37
5. HIPÓTESIS	37
6. OBJETIVOS	37
6.1. Objetivos generales	37
6.2. Objetivos particulares	38
7. MÉTODO	39
8. RESULTADOS	45
8.1. Peso	45
8.2. Radioinmunoensayo	45
8.3. Citología exfoliativa	49
8.4. Morfometría del ovario	50
8.5. Inmunohistoquímica para 4-hidroxinonenal	52
9. DISCUSIÓN	57

9.1. Peso	57
9.2. Concentraciones séricas de 17- β estradiol y progesterona	57
9.3. Ciclo estral	60
9.4. Morfometría ovárica	61
9.5. Estrés oxidante	62
10. CONCLUSIONES	64
11. BIBLIOGRAFÍA	65

2. RESUMEN

Las PM_{10} (de diámetro menor o igual a $10 \mu m$); y $PM_{2.5}$ (menor o igual a $2.5 \mu m$), son componentes importantes de la contaminación ambiental debido a que a ellas se adosan materiales como metales y penetran más profundo en el tracto respiratorio.

Entre los metales que son adosados se encuentra el vanadio, metal de transición que es liberado al ambiente por la quema de algunos combustibles derivados de éste. El vanadio, al ser un metal tiene como principal mecanismo de acción el estrés oxidante. Por la vía inhalada, se han descrito afecciones en distintos órganos y estructuras como cerebro, pulmones, hígado, testículos, entre otros. Se ha descrito, que una exposición subaguda a la inhalación de vanadio provoca en el ovario aumento en la cantidad de atresia folicular, disminución en la presencia de $ER\alpha$ y ausencia de ciclo estral en ratones hembra, sin embargo los mecanismos que causan estas afecciones no son claros.

El objetivo del presente estudio fue indagar sobre los efectos de la inhalación de vanadio en el ovario y hormonas producidas por él, y el papel del estrés oxidante en el desarrollo de estas alteraciones. Para lograr lo anterior, fueron utilizados cuatro grupos experimentales: controles, ratones que inhalaron vanadio, ratones que inhalaron y además se les administró vitamina C por vía oral, y ratones a los que sólo se les administró vitamina. Se realizó citología exfoliativa vaginal por cinco semanas, se tomó el peso, sangre y ovarios y se evaluó la concentración de estrógenos y progesterona, morfometría folicular y marca del marcador de estrés oxidante 4-hidroxinonal. Al final fueron comparados todos estos datos con la etapa del ciclo estral y se realizaron análisis de varianza como prueba estadística.

Los resultados indicaron que la administración oral de vitamina C no alteró el peso a lo largo de todo el experimento. En el caso de las concentraciones séricas de hormonas se encontró que en ambos casos (estrógenos y progesterona) el grupo vanadio presenta una menor concentración con respecto a los controles y que la administración de vitamina C ayuda a evitar esta drástica disminución. En cuanto a la morfometría de los folículos ováricos se encontró que en el grupo de animales expuestos a vanadio disminuye el tamaño de folículos secundarios y preovulatorios comparados con otros grupos, mientras que esto no pasa con la administración simultánea de vitamina e inhalación de vanadio.

Por último, la marca de 4-HNE también se encuentra aumentada en los ovarios de ratones expuestos sólo a vanadio con respecto a los controles, mientras que los grupos con administración de ácido ascórbico no fueron diferentes a los controles.

Los resultados muestran que el estrés oxidante sí es uno de los mecanismos de acción mediante los cuales el vanadio causa alteraciones en el ovario y que la administración simultánea de vitamina C por vía oral evita o disminuye estos cambios.

3) INTRODUCCIÓN

3.1 Contaminación ambiental

Uno de los problemas más grandes a los que nos enfrentamos los humanos actualmente es la contaminación atmosférica que sin duda ha ido en ascenso en las últimas décadas. El término contaminación se refiere a la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico (LGEEPA, 2013). Aunque la contaminación está presente prácticamente en cualquier lugar, son las grandes urbes las que tienen una mayor cantidad de contaminantes, debido principalmente a la gran cantidad de industrias que en ellas operan y los numerosos vehículos automotores que producen contaminantes que se depositan en el aire.

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es un ejemplo de este tipo de ciudades con altos niveles de contaminación, no sólo por la gran cantidad de industrias que hay en ella, sino también por sus características fisiográficas. Por un lado, las cadenas montañosas que la rodean ocasionan que se realice una circulación de aire deficiente, lo que además de producir una mayor cantidad de contaminantes, propicia su estancamiento. Por otro lado, la entrada de viento a la ZMVM se da principalmente por el norte, lo que aunado a la orografía antes mencionada, causa remolinos, líneas de confluencia y zonas de convergencia del viento, que asimismo provoca la acumulación de contaminantes. Por último, las inversiones térmicas, fenómenos bien descritos para la ZMVM provocan estancamientos de aire en ella. Otra serie de condiciones que deben tomarse en cuenta al hablar de contaminación atmosférica, son los de tipo demográfico, es decir para describir las condiciones en esta zona metropolitana, debe considerarse la cantidad masiva de personas que la habitan, lo que conlleva a una cantidad inconmensurable de transportes tanto privados como colectivos que también contribuyen de forma importante a la creciente contaminación (Inventario de Emisiones de la ZMVM, SMA 2010).

PM10 y PM2.5

La contaminación atmosférica tiene varios componentes, entre los que se encuentran gases como el ozono, el monóxido de carbono, los óxidos de nitrógeno, entre otros, además las partículas suspendidas son asimismo muy importantes ya que pueden causar problemas de salud en humanos y poblaciones vegetales (Inventario de Emisiones de la ZMVM, SMA, 2010). Las partículas suspendidas están compuestas de partículas sólidas y líquidas que se encuentran en el aire y entre sus componentes principales se encuentran los sulfatos, los nitratos, el amonio, el carbón y los metales. El principal criterio para su clasificación es el diámetro aerodinámico (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, 2013). De acuerdo a esto, las partículas se clasifican en: PST con diámetro de $100\mu\text{m}$; PM_{10} , que son aquellas con un diámetro de hasta $10\mu\text{m}$; y $\text{PM}_{2.5}$ con un diámetro menor o igual a 2.5 (Inventario de Emisiones de la ZMVM, SMA 2010). Las PM_{10} son generadas principalmente por fenómenos naturales como incendios forestales o emisiones volcánicas, y actividades humanas como labores agrícolas, de construcción, quema de leña, entre otras. Por otro lado, las $\text{PM}_{2.5}$ se forman a partir de reacciones químicas que generan sus precursores como óxidos de nitrógeno (NO_x), dióxido de azufre (SO_2) y amoníaco (NH_3) (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, 2013).

La Norma Oficial Mexicana para PM_{10} (NOM-025-SSA1-1993) establece que la concentración de partículas suspendidas debe ser: $210\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas para PST; $120\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas y $50\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual para PM_{10} ; y $65\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas y $15\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual para $\text{PM}_{2.5}$. En el caso de las $\text{PM}_{2.5}$, se ha excedido este valor máximo en la ZMVM desde el año 2005 y hasta el 2009 (Proaire 2011-2020).

Efectos en la salud ocasionados por PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$

El diámetro de las partículas es un factor determinante en las afecciones que éstas causan en la salud humana ya que las PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ penetran directamente en el aparato respiratorio al pasar por sus filtros (vibrisas nasales y barrera hematoalveolar) y pueden

almacenarse a diferentes profundidades dentro de él. De esta forma, las PM_{10} llegan a la zona traqueobronquial y las $PM_{2.5}$ hasta la zona alveolar (Proaire, 2011-2020).

En general, los efectos en la salud que se han asociado a la contaminación por partículas suspendidas son padecimientos respiratorios como bronquitis, ataques de asma, tos crónica y falla congestiva del corazón (Proaire, 2011-2020).

PST y metales

Dentro de las partículas suspendidas, la fracción de las PM_{10} y $PM_{2.5}$ está compuesta mayormente por partículas de carbón cubiertas de metales y que son producto de la quema de combustibles. A estas partículas y específicamente a los metales que a ellas se adosan se han atribuido efectos tóxicos, principalmente debidos al estrés oxidante (Donaldson, 2003). Se ha comprobado *in vitro*, que los metales presentes en la superficie de las partículas son una fuente potencial de especies reactivas de oxígeno e incluso se ha descrito que los metales de transición generan inflamación crónica al producir estrés oxidante (Wilson, *et.al.*, 2002) a partir de especies reactivas de oxígeno (Gilmour, *et.al.*, 1996).

3.2. Vanadio. Generalidades y exposición

Dentro de los metales que se adosan a las partículas suspendidas se encuentra el vanadio, metal de transición que ocupa el número atómico 23 en la tabla periódica y que presenta varios estados de oxidación que van desde el -1 hasta el +5. Es un elemento abundante en la superficie terrestre que participa en la síntesis de clorofila de algunos organismos fotosintéticos, y es un micronutriente para algunas especies marinas y terrestres (Rodríguez y Altamirano, 2006). Su presencia en el ambiente se debe en gran parte a la emisión de fuentes antropogénicas, ya que este metal es el elemento traza más abundante en algunos combustibles fósiles y al ser estos quemados, representan la principal fuente de emisión de este metal (Domingo, 1996), además existen fuentes naturales de vanadio tales como los minerales vanadinita, descoicita, fernandinita, patronita y carnotita (WHO, 2001). Asimismo, todos los petróleos crudos contienen

residuos de este metal y su concentración depende principalmente de la región de la cual son extraídos siendo particularmente abundante en el petróleo de países como Kuwait, Venezuela, Iran, Irak, y el Golfo de México (Barceloux, 1999).

Se ha reportado que la concentración media de vanadio en las ciudades es de $0.62 \mu\text{g V/m}^3$ comparado con $0.011 \mu\text{g V/m}^3$ en otras zonas urbanas (Harland, 1994; Zoller, 1973), sin embargo en el caso de sitios cercanos a industrias metalúrgicas y otras que liberan residuos de este metal al ambiente el promedio es de $1\mu\text{g V/m}^3$. La mayor exposición ocupacional a vanadio la tienen las personas encargadas de la limpieza de calderas que va de los 50 a $100\mu\text{g V/m}^3$ e incluso puede llegar a los $500\mu\text{g V/m}^3$ (Barceloux, 1999).

Se ha reportado que la cantidad de vanadio acumulada en los pulmones (de necropsias) de habitantes de la Ciudad de México de la década de los 90 aumentó en comparación con las muestras pulmonares de los habitantes del mismo sitio en la década de los 60 (Fortoul, *et. al.*, 2002). Asimismo, está reportado que en la ciudad de México existe, las PM_{10} presentan adosadas a su superficie incluso en mayor cantidad de vanadio en las zonas residenciales (187.3 ng/ml) que en las zonas industriales (135.9 ng/ml) y además se reportó que las PM_{10} presentes en ambas zonas pueden ocasionar daño cromosómico a las células (Roubicek, *et.al.*, 2007).

Usos del vanadio

Dentro de los usos industriales del vanadio se encuentran la producción de acero y otras aleaciones, como catalizador en la producción de ácido sulfúrico, en la producción de colorantes para cerámicos y reveladores fotográficos, entre otros (Barceloux, 1999). Por otro lado, se han propuesto diferentes compuestos orgánicos de vanadio como tratamiento para diferentes afecciones. En el caso de la diabetes mellitus se han realizado diferentes estudios con distintos compuestos tales como bis(maltolato)oxovanadio(IV) y bis(etilmaltolato)oxovanadio(IV) (Wassan, *et.al.*, 2006), debido a que anteriormente se atribuía al vanadio una acción insulinomimética, sin embargo después de algunos años de

estudio se ha concluido que este no es en realidad el mecanismo mediante el cual este metal reduce los niveles de glucosa en sangre, sino que utiliza la insulina que se encuentra en el organismo y potencia selectivamente su acción *in vivo* (Cam, *et.al.*, 2000). Se ha usado también como auxiliar en el tratamiento de la anemia, tuberculosis y sífilis (metavanadato de sodio en una dosis de 1-8mg) (WHO, 2001) e incluso varios compuestos se han probado como agentes contraceptivos por su acción espermicida (Ghosh, *et.al.*, 1999). Asimismo, el vanadio ha sido utilizado en acuicultura como suplemento alimenticio para peces (Shiau y Li, 1993).

Toxicocinética

La distribución del vanadio en el organismo depende de la solubilidad del compuesto y de la vía de entrada. Existen principalmente tres vías de exposición al vanadio: la exposición dérmica, la inhalación y la ingestión, sin embargo la más importante es la inhalada debido a que es la de mayor absorción. Por la vía inhalada, compuestos químicos tales como el pentóxido de vanadio (V_2O_5) se absorben muy bien, aunque el porcentaje no está completamente definido, cerca del 25% de lo que ha sido inhalado pasa al torrente sanguíneo y linfático en el proceso denominado como absorción (Rodríguez y Altamirano, 2006).

Por otra parte, de las sales de vanadio (por ejemplo vanadato de amonio) se absorben poco en el tracto gastrointestinal (Dimond, *et.al.*, 1963), se estima que se absorbe por esta vía un porcentaje aproximado de 10% (Elinder *et al.* 1988). La vía dérmica presenta aún menos absorción debido a la baja solubilidad del vanadio metálico (Barceloux, 1999).

Una vez que el vanadio ha sido absorbido es reducido a V^{IV} por el glutatión de los eritrocitos, el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias presentes en el suero sanguíneo (Rehder 2003). Después es transportado a través del plasma sanguíneo unido a transferrina y albúmina en forma de vanadil (cerca del 90% del vanadio en sangre) (Chasteen, *et. al.*, 1986) y puede entrar a las células en forma de V^V por mecanismos de transporte aniónico, por canales de fosfato donde puede ser nuevamente reducido a V^{IV}

(Rodríguez y Altamirano, 2006). Posteriormente se distribuye hacia los diferentes órganos, así como la biotransformación del metal que invariablemente se acumula como V^{IV} en diferentes órganos como bazo, riñón, pulmón, huesos e hígado y en menor cantidad en testículos y pulmones (Rodríguez y Altamirano, 2006).

Se ha observado en trabajadores expuestos a polvos que contienen vanadio y en modelos animales que el metal absorbido, rápidamente es desechado por los riñones y excretado a través de la orina o heces. La eliminación se da de forma bifásica: la mayor cantidad se da en las primeras 20 horas y lo restante en los siguientes 40 o 50 días (Rodríguez y Altamirano, 2006).

Efectos del Vanadio en la Salud

Los compuestos de vanadio tienen muchos y muy variados efectos en la salud, sin embargo los más comunes suelen ser locales, en los ojos y en las vías respiratorias altas. La exposición crónica por inhalación laboral produce bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis y en ocasiones cambios en el ritmo cardiaco y coloración verde en la lengua de trabajadores que además son fumadores, así como alteraciones en la bioquímica sanguínea por ejemplo disminución en la concentración de albúmina. Mientras, en la exposición aguda se han observado síntomas como tos, irritación en nariz y mucosa oral, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal. En estudios poblacionales se ha encontrado una ligera correlación entre los niveles de vanadio y el aumento en la mortalidad por algunos cánceres, neumonía y bronconeumonía (Rodríguez y Altamirano, 2006). Dentro de los efectos más comunes causados por el pentóxido de vanadio en trabajadores que limpian calderas y que están expuestos a altas concentraciones de humos, se encuentran alteraciones respiratorias rinitis, hemorragia nasal, conjuntivitis, tos y dolor en el pecho, que se presentan principalmente por inhalación de pentóxido de vanadio en la que incluso se presenta bronquitis (Barceloux, 1999).

Con el modelo de inhalación de pentóxido de vanadio [0.02 M] descrito por Ávila-Costa y colaboradores (2005) se han reportado diversas alteraciones en diferentes órganos. En el sistema hematopoyético se ha descrito anemia normocítica normocrómica, trombocitosis (aumento en el conteo de plaquetas), cambios en la morfología y tamaño de las plaquetas, entre otras alteraciones (González-Villalba, *et. al.*, 2006). Con el mismo modelo de inhalación se ha evaluado por TBARS y 4-hidroxinonenal la peroxidación lipídica causada por el vanadio en hígado; cambios en el núcleo de los linfocitos de timo y bazo; aumento en la presencia de citocinas con IL-6 y TNF- α en el epitelio alveolar y engrosamiento de la pared muscular bronquiolar (Fortoul, *et.al.*, 2011). En el sistema nervioso central, el vanadio induce alteraciones citológicas, ultraestructurales y funcionales en diversas estructuras cerebrales (Avila-Costa, *et.al.* 2005, Jiménez-Martínez, 2009).

Está demostrado que el vanadio inhalado causa disminución en la presencia de gamma-tubulina y actina en el testículo de ratón que se ve reflejado en alteraciones en la espermatogénesis, bajo conteo espermático, descenso en la motilidad y aumento en las anomalías de los espermatozoides (Mussali-Galante, *et.al.*, 2005). Todas estos daños producen a su vez alteraciones en la función reproductiva como infertilidad, un efecto asociado a la exposición a vanadio (Domingo, 1996).

En el ovario se ha observado aumento en la atresia de folículos avanzados y disminución en la presencia de receptor de estrógenos β (Martínez-Pedraza, 2009).

Mecanismos de acción del Vanadio

Se ha demostrado en nuestro modelo de inhalación que el vanadio es genotóxico, ya que produce rompimientos de cadena sencilla en el ADN que van en aumento con el tiempo de exposición, además causa aumento en la presencia de micronúcleos, que evidencian eventos aneuploídicos y clastogénicos que derivan en inestabilidad cromosómica, daño genético que puede provocar cáncer. Asimismo se han atribuido al vanadio la activación de tirosina caspasas que participan en la apoptosis y daño al citoesqueleto,

principalmente a α -tubulina que como se había mencionado anteriormente es la proteína de la que está constituida el centro formador de microtúbulos, indispensable para la mitosis (Fortoul, *et.al.*, 2011).

Uno de los principales mecanismos de acción del vanadio es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) que activan proteínas cinasas (MAPKs) que fosforilan proteínas de señalización (como ERK, adenilato ciclasas, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, ribonucleasa) resultando en la activación de diversas vías de señalización. Algunos estudios sugieren que el vanadato es un inhibidor no competitivo de la ATPasa Na-K (Barceloux, 1999).

3.3 Estrés oxidante

Regularmente, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), que es poco reactivo con una velocidad a temperatura fisiológica baja, sin embargo, las reacciones químicas que se dan por acción enzimática o radiación ionizante pueden producir especies químicas prooxidantes que son altamente reactivas y que pueden reaccionar con otras moléculas y producir daño celular (Venereo, 2002).

Un radical libre o especie reactiva de oxígeno es una molécula que tiene en su último orbital un electrón desapareado, lo que la hace inestable. Para la molécula de oxígeno se conocen los radicales anión superóxido (O_2^-); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); radical hidroxilo (OH^-); y oxígeno singulete (1O_2) (Mayor-Oxilia, 2010).

Aunque los radicales se forman de manera normal en las células como producto de ciertos procesos, en exceso pueden ser perjudiciales para la misma, provocando estrés oxidante que es un estado de excesiva exposición a oxidantes o función antioxidante disminuida (González-Mangadoa y Morera, 2001). Este estado en el que existe un desbalance entre los niveles de oxidantes y antioxidantes favorece en el organismo envejecimiento y algunas patologías como arteriosclerosis, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias

crónicas, cáncer, entre otros y es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Mayor-Oxilia, 2010).

El vanadio al entrar a la célula produce ROS mediante la llamada Reacción de Fenton, que se basa en la transferencia de un electrón entre el peróxido de hidrógeno y un metal que actúa como catalizador, produciendo así radical hidroxilo, anión superóxido y peróxido de hidrógeno, lo que puede provocar estrés oxidante en la célula. Como puede observarse en la figura 1, el vanadio en su estado de oxidación +5 (metavanadatos y ortovanadatos) entra a la célula a través de canales aniónicos, mientras que el vanadio en su estado de oxidación +4 (vanadil) entra a través de la membrana por difusión. Una vez dentro de la célula, los compuestos con los dos estados de oxidación antes mencionados sufren modificaciones por los antioxidantes intracelulares, sin embargo predominan dentro los compuestos con estado de oxidación +4, los cuales son oxidados al entrar en contacto con el oxígeno (O_2) produciendo así radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y un compuesto de vanadio con estado de oxidación +5 V(V). Este radical a su vez es reducido por el NAD(P)H, reacción que genera peróxido de hidrógeno, y nuevamente el V^{+4} puede ser oxidado mediante la reacción de tipo Fenton, produciendo esta vez radical hidroxilo y regresando así al estado de oxidación +5 (Korbecki, 2012).

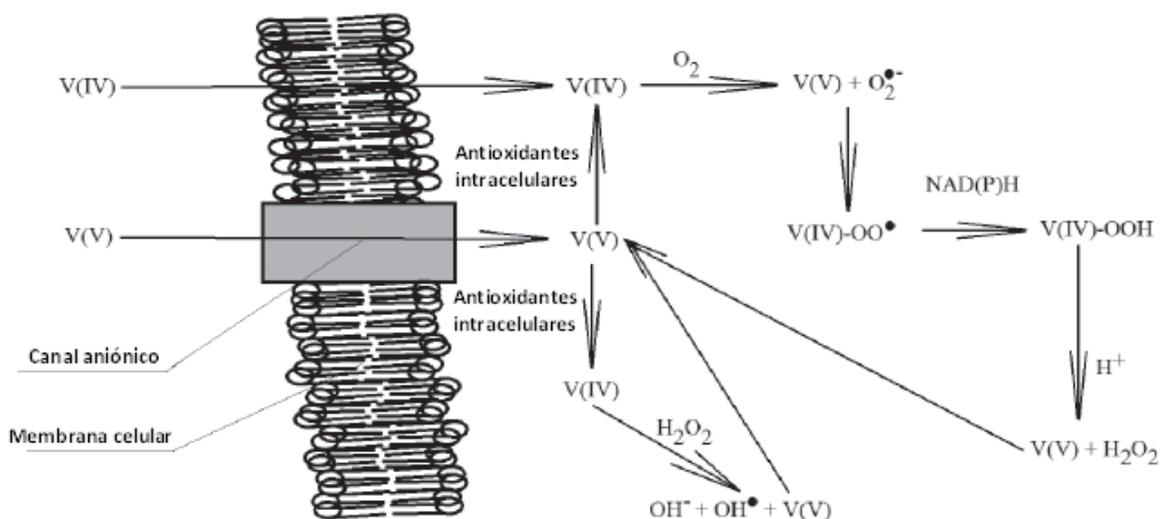


Figura 1. Transformación química de compuestos inorgánicos de vanadio en el citoplasma. Modificado de Korbecki, 2012.

Peroxidación lipídica

Los lípidos son un componente importante de las membranas celulares (aproximadamente del 30 al 80%). Los fosfolípidos son los más abundantes y a los ácidos grasos polinsaturados presentes en ellos se debe la fluidez de la propia membrana, en la que incluso las mínimas alteraciones pueden causar funciones anormales y procesos patológicos (Catalá, 2009).

El estrés oxidante causa daños a los lípidos y otras biomoléculas mediante procesos como la peroxidación, que a su vez provoca que se propaguen las reacciones de oxidación derivadas de radicales libres. La peroxidación lipídica consta de tres fases: inicio, propagación y término (Catalá, 2006). La fase de inicio incluye la sustracción de átomos de hidrógeno, que puede ser llevada a cabo por varios radicales entre los que se encuentra el hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) que, como se ha mencionado es un ejemplo de ROS y causante de estrés oxidante (Gutteridge, 1988).

Los fosfolípidos de las membranas celulares son particularmente susceptibles a la peroxidación debido a que es sustraído un átomo de hidrógeno de un grupo metil ($-\text{CH}_2-$), dejando así un electrón desapareado en el carbono ($-\bullet\text{CH}-$). La presencia de un doble enlace en el ácido graso debilita la unión entre los carbonos e hidrógenos cercanos, facilitando así la sustracción de otros átomos de hidrógeno. Esta primera sustracción dada por el radical hidroxilo, deja al ácido graso como un radical lipídico ($\bullet\text{L}$), que reacciona con oxígeno molecular para formar un radical peroxilo ($\text{LOO}\bullet$) y que a su vez puede sustraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos para producir ahora un radical hidroperóxido (LOOH). Este último puede sufrir una ruptura por metales reducidos produciendo así un radical alcoxilo ($\text{LO}\bullet$), que junto al radical peroxilo pueden activar la peroxidación lipídica en cadena, al sustraer los átomos de hidrógeno adicionales. La peroxidación de fosfolípidos afecta directamente la fluidez de la membrana, además de que altera o inhibe el transporte iónico y otras funciones metabólicas (Catalá, 2009).

La peroxidación lipídica ocurre como respuesta al estrés oxidante, formando una gran variedad de aldehídos cuando los hidroperóxidos sufren ruptura. Algunos de estos aldehídos son altamente reactivos y pueden funcionar como segundos mensajeros que propagan y aumentan los efectos causados por los radicales libres. Es bien sabido que el principal aldehído formado durante la peroxidación de ácidos grasos n-6 poliinsaturados como ácido araquidónico y ácido linoleico es el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), aunque también pueden formarse otros aldehídos tales como 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) y malondialdehído (MDA). Se ha comprobado que estos aldehídos causan daño a las proteínas al reaccionar con grupos lisina aminas, cisteína sulfhidrilos e histidina imidazol, además de pueden causar daño al ADN y citotoxicidad según su concentración (Catalá, 2009).

3.4. Antioxidantes

Las reacciones de oxidación son esenciales para los procesos metabólicos celulares y aunque en ellas se transfieren electrones que producen radicales libres, la célula cuenta con antioxidantes que sirven de defensa ante ellos. Los antioxidantes pueden ser de tipo enzimático (aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con radicales libres) o no enzimático que entre otros mecanismos, suelen colisionar con el radical libre cediéndole un electrón y transformándose en otro débil no tóxico (Mayor-Oxilia, 2010).

Se conoce como antioxidante a una sustancia que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable (moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en las células vivas) retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste (Venereo, 2002). Estas sustancias impiden la oxidación al actuar más rápido con las especies reactivas de oxígeno que con cualquier otra molécula (o biomolécula) del medio. Asimismo, los antioxidantes pueden ser clasificados como endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos son aquellos que son sintetizados por las propias células de un organismo, mientras que los exógenos son los que se adquieren a partir de la dieta.

Dentro de los de tipo endógeno se encuentran el glutatión, coenzima Q, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, entre otras. Por otro lado, los antioxidantes exógenos son muchos y muy variados, sin embargo entre los más conocidos se encuentran las vitaminas C y E, el betacaroteno y los flavonoides por mencionar algunos (Mayor-Oxilia, 2010).

Vitamina C o Ácido ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina soluble en agua que participa en muchas reacciones en los tejidos de la mayoría de los organismos. La mayoría de los mamíferos tienen la capacidad de sintetizarlo en el hígado a partir de la D-glucosa, a excepción de los cobayos, los murciélagos y los primates en los que no está presente la L-gulonolactona oxidasa, que es la enzima encargada de realizar el último paso para la síntesis, por lo que su presencia en el organismo depende de la ingesta en la dieta (Linster y Van Schaftingen, 2006; Elejalde-Guerra, 2001).

El ácido ascórbico reacciona e inactiva radicales libres como anión superóxido, radical hidroxilo, oxígeno singulete; además regenera la forma activa de la vitamina E (α -tocoferol) a partir del radical α -tocoferil presente en las membranas. Asimismo, el ácido ascórbico funciona como cofactor de al menos ocho enzimas que participan en la biosíntesis de colágeno y carnitina, y la conversión de dopamina a noradrenalina, entre otras funciones (Corti, *et.al.*, 2010).

La vitamina C participa en reacciones de óxido reducción, de forma que en la célula el ácido ascórbico puede oxidarse (transferir un electrón) transformándose al radical ascorbil que a su vez puede oxidarse para formar dehidroascorbato (DHA). Ambas formas del ácido ascórbico pueden regresar a su forma original por acción de reductasas (Corti, *et.al.*, 2010) (Figura 2).

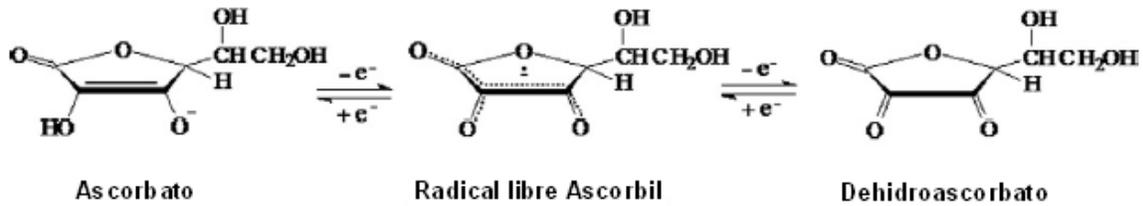


Figura 2. Formas oxidadas y reducidas de la vitamina C. Modificado de Corti, et.al., 2010

El transporte de ácido ascórbico a través de la membrana se da por una gran variedad de mecanismos ya que puede entrar a la célula como ácido ascórbico o como DHA. El ácido ascórbico por una parte es transportado al interior de la célula a través de dos cotransportadores dependientes del ion sodio (SVCT1 y STVC2), mientras que el DHA es transportado por difusión facilitada por las proteínas transportadoras GLUT y rápidamente reducido a ácido ascórbico. Se han propuesto varias vías de salida del ácido ascórbico: a través de canales aniónicos sensibles a volumen; por exocitosis de vesículas cromafines que contienen ascorbato; mediante hemicanales de uniones tipo Gap; por hetero-intercambio glutamato-ascorbato (en cerebro) y homo-intercambio ascorbato-ascorbato en varios tipos celulares (Figura 3) (Corti, *et.al.*, 2010).

El ácido ascórbico en la reproducción juega un papel importante, ya que se requiere para la síntesis de colágeno, así como de hormonas peptídicas y esteroideas. El ovario es un órgano que acumula ácido ascórbico y se han observado cambios en su retención o excreción de acuerdo a la etapa del ciclo estral, lo que sugiere que tiene un papel fundamental en la luteinización de las células de la granulosa, así como en la síntesis de progesterona. Además se asocia su alta concentración en el ovario a la demanda de colágeno para el crecimiento folicular, la reparación después de la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo (Luck, *et.al.*, 1995).

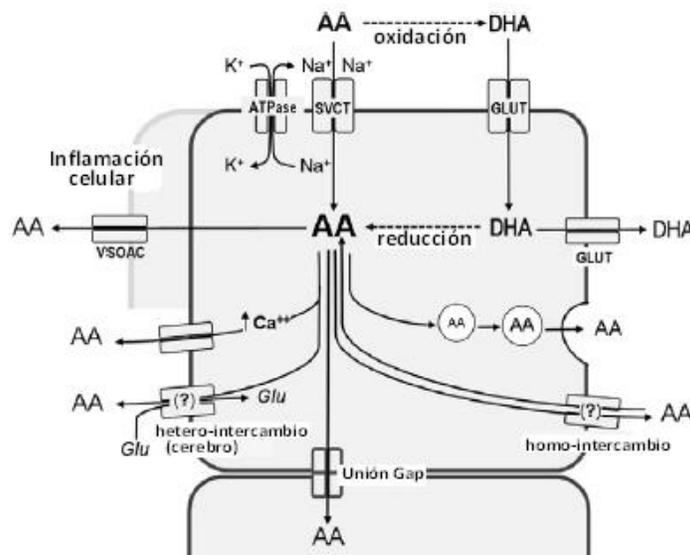


Figura 3. Transporte y flujo de vitamina C a través de la membrana plasmática. Modificado de Corti, *et.al.*, 2010.

Vitamina C y Vanadio

Existen algunos estudios experimentales donde se sugiere que el ácido ascórbico es el mejor antídoto contra la intoxicación con vanadio en exposiciones agudas, ya que como se mencionó anteriormente neutraliza radicales libres como anión superóxido e hidróxido de hidrógeno. Así, Jones y Basinger (1983) al aplicar por vía intraperitoneal a ratones $\text{VOSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (110 mg/kg) y NaVO_4 (50 mg/kg) y administrar ácido ascórbico por vía oral sugieren que es un buen antídoto en exposiciones agudas. Domingo y colaboradores (1986) con una exposición a NaVO_3 (0.3-1.2 mmol kg⁻¹) por vía intraperitoneal y administración de vitamina C en una dosis de un cuarto de la LD₅₀ en ratones VIA reportan que disminuye la excreción de vanadio por la orina y que es el mejor antídoto en exposiciones agudas. Por último, Domingo y colaboradores (1990) con una exposición de VOSO_4 (334 mg/kg) por vía intraperitoneal en ratones, observaron que con la administración de ácido ascórbico disminuye la excreción de vanadio en la orina, pero no disminuyen las concentraciones en hígado, bazo, riñón, cerebro y corazón.

En general, se considera a la vitamina C como un buen antídoto para la intoxicación con vanadio, sin embargo los estudios se han realizado en casos donde éste entra al

organismo por vía intraperitoneal principalmente, por lo que no hay datos del papel de esta vitamina como antioxidante en exposiciones por otras vías, por ejemplo la inhalada.

3.5. Sistema reproductor femenino del ratón

En los ratones, al igual que en los demás mamíferos, el aparato reproductor femenino consiste en órganos internos y externos. Los internos son los ovarios, los oviductos, un útero (formado de dos cuernos), el cérvix y la vagina; los externos son el vestíbulo vaginal, la vulva, los labios vulvares y el clítoris.

Un ratón hembra alcanza la madurez sexual aproximadamente a los 30 a 35 días de edad (Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación, 1998) y es reconocida por el fenómeno de apertura vaginal. Este proceso está mediado por el incremento en la producción de estradiol, que a su vez conlleva a apoptosis en la parte baja de la mucosa vaginal (Rodríguez, *et.al*, 1997) y en ratones hembra puede ocurrir 10 días antes de que ocurra la primera cornificación de la vagina y empiece el ciclo estral (Caligioni, 2009). Aunque los órganos reproductivos tanto internos como externos concluyen su formación durante el desarrollo embrionario, al igual que el proceso de apertura vaginal, existen muchos otros que no son necesariamente visibles, pero que determinan la funcionalidad de estos órganos durante la vida adulta.

El ovario tiene dos funciones principales: la formación de gametas (gametogénesis) y la producción de hormonas de tipo esteroideo (esteroidogénesis). La gametogénesis que se realiza en las hembras es llamada ovogénesis y su producto son las células germinales u ovocitos. Existen dos tipos principales de hormonas esteroideas: los estrógenos y los progestágenos, las cuales desempeñan un papel fundamental en el ciclo reproductivo (Ross y Pawlina, 2007) y de las que se hablará más adelante.

Los oviductos son órganos tubulares pareados que van desde el útero hasta los ovarios y cuya función principal es conducir al ovocito hasta el útero para que ocurra la fecundación, además de proveer las condiciones microambientales necesarias para el cigoto hasta que llega a implantarse (Ross y Pawlina, 2007).

El útero recibe la mórula proveniente de los oviductos y permite la implantación del cigoto para que en lo posterior se realice todo el desarrollo embrionario hasta el momento del alumbramiento. En las ratonas, el útero consta de dos cuernos que se insertan en un cuerpo que conecta con el cérvix que a su vez conecta con la vagina. En este caso, puede ocurrir más de una implantación a la vez por lo que éstas no se dan en el cuerpo del útero, sino a lo largo de ambos cuernos uterinos. El cérvix o cuello del útero es la parte fibromuscular del útero que se inserta en la vagina y que permite el paso de los espermatozoides hacia el útero (Ross y Pawlina, 2007).

La vagina por otro lado, es un órgano tubular compuesto de fibras musculares que va desde el cuello del útero o cérvix hasta el vestíbulo vaginal y cuya función es comunicar los órganos genitales internos con el medio externo (Ross y Pawlina, 2007). En las ratonas, el epitelio vaginal sirve como un indicador de la etapa del ciclo reproductivo, mediante un sencillo procedimiento llamado citología exfoliativa vaginal, que será abordada en detalle más adelante.

Morfología del ovario

El ovario es un órgano pareado y ovalado que se encuentra por detrás de los riñones en la cavidad abdominal, conectado al útero por medio de un oviducto también pareado, y que recordando lo antes mencionado, tiene la función de dar origen a gametas y producir hormonas esteroideas.

La histología del ovario es compleja; se pueden distinguir en un corte dos regiones: una médula y una corteza. La médula se ubica en la región central y está constituida de tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos de gran tamaño, vasos linfáticos y nervios. La corteza se

encuentra a la periferia de la médula, en ella se encuentran los folículos ováricos rodeados de tejido conjuntivo muy celular llamado estroma, en el que además se encuentran dispersas células de músculo liso (Ross y Pawlina, 2007). El ovario está cubierto en la superficie por epitelio cúbico simple que en algunas partes se vuelve casi plano y que es llamado “epitelio superficial”. Por debajo del epitelio superficial del ovario se encuentra una capa de tejido conjuntivo denso llamada túnica albugínea que lo separa de la corteza subyacente (Ross y Pawlina, 2007).

En la corteza, se encuentran los folículos ováricos, que albergan cada uno a un ovocito y le brindan el microambiente necesario para su maduración y posterior ovulación. Las primeras etapas de la ovogénesis se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario, sin embargo, el tamaño y características del folículo pueden indicar el grado de maduración del ovocito. La ovogénesis al momento del nacimiento es detenida en el diploteno de la Meiosis I y así permanecen hasta la pubertad, donde un grupo selecto de ovocitos avanza en el ciclo celular. De todos los ovocitos que hay en el ovario al momento de nacer, sólo una pequeña cantidad llega a ser ovulado, debido a un proceso de apoptosis que ocurre en las células foliculares y que empieza desde la vida fetal llamado atresia (Ross y Pawlina, 2007) (Figura 3).

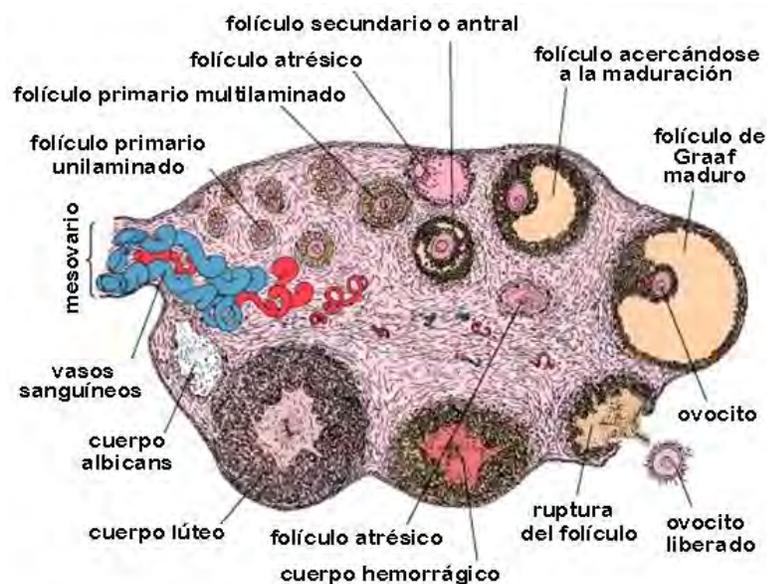


Figura 3. Esquema de la estructura histológica del ovario. Modificado de Ross y Pawlina, 2007.

Histológicamente se pueden distinguir distintos tipos de folículos de acuerdo a su tamaño y características: folículos primordiales, folículos primarios, folículos secundarios y folículos preovulatorios. Los folículos primordiales aparecen desde el desarrollo embrionario, se encuentran en la corteza justo por debajo de la túnica albugínea, están formados por un ovocito rodeado de células foliculares aplanadas que se encuentran muy juntas (Ross y Pawlina, 2007).

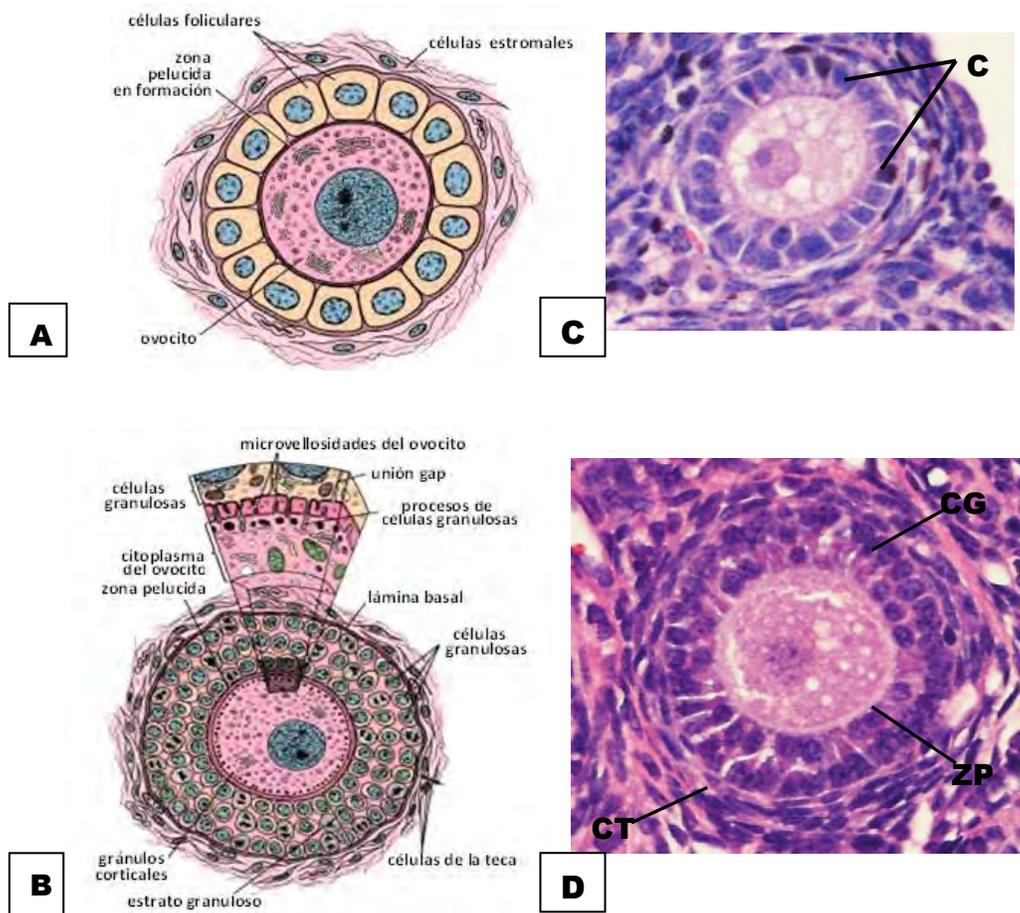


Figura 4. Folículos primarios en el ovario de mamífero. A) Folículo primario unilaminado. B) Folículo primario multilaminado. C) Folículo primario unilaminado de ratón. D) Folículo primario multilaminado de ratón. C=células foliculares; CG=células de la granulosa; CT=células de la teca; ZP=zona pelúcida. Esquema modificado de Ross y Pawlina, 2007. Fotomicrografías de García Ibarra, F.A.,2013.

Los folículos primarios son los primeros que se encuentran en crecimiento, se caracterizan porque las células foliculares crecen y adquieren forma cúbica, el ovocito aumenta su tamaño y se desarrolla entre él y las células foliculares una lámina homogénea llamada

zona pelúcida. Las células foliculares proliferan por mitosis dando origen a un epitelio estratificado que rodea al ovocito y que recibe el nombre de células de la granulosa. Al mismo tiempo que las células de la granulosa, proliferan también células parafoliculares del estroma que forman una capa llamada teca folicular, que se diferencia en dos capas: la teca interna y la teca externa. La teca interna está constituida de células cúbicas con características típicas de las células secretoras de hormonas esteroideas, está muy vascularizada y profunda. Además contiene fibroblastos, haces de colágena y pequeños vasos sanguíneos. La teca externa por otra parte, es la capa más superficial y está constituida de células de tejido conjuntivo, fibras musculares lisas y haces de fibras de colágeno (Figura 4) (Ross y Pawlina, 2007). Los folículos primarios pueden ser unilaminados (Fig. 4-A) o multilaminados (Fig.4-B) según el número de capas de células de la granulosa que presente.

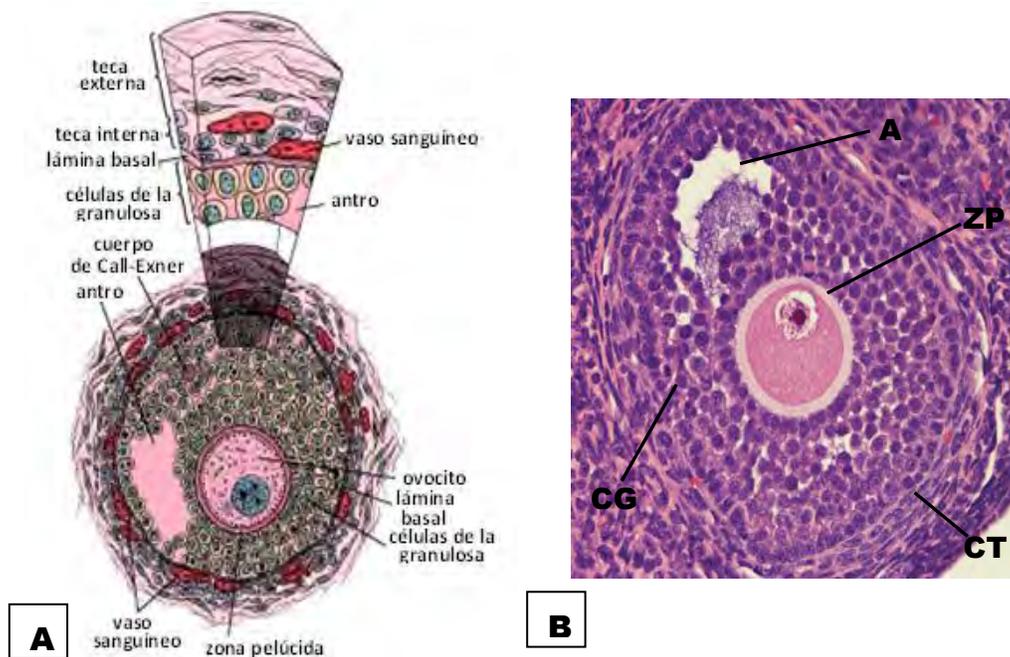


Figura 5. A) Folículo secundario en ovario de mamífero. B) Folículo secundario en ovario de ratón. A=antrum folicular; ZP= Zona pelúcida; CT= células de la teca; CG= células de la granulosa. Esquema modificado de Ross y Pawlina, 2007. Fotomicrografía de García Ibarra, F.A., 2013.

El folículo secundario se caracteriza por tener una capa folicular de 6 a 12 estratos entre los cuales se forman cavidades llenas de líquido folicular abundante en hialuronano que aumentan en tamaño mientras más líquido se acumula, juntándose finalmente para

formar una cavidad mayor con forma de media luna llamada antro (de ahí el nombre de folículo antral con el que también se denomina). El ovocito adquiere a causa del antro una posición excéntrica y en este momento deja de crecer (Figura 5) (Ross y Pawlina, 2007).

El folículo de Graaf o preovulatorio se caracteriza por tener un gran tamaño, además de que ahora el antro se encuentra revestido por algunas capas de células de la granulosa que sólo son diferentes en la región donde se unen al ovocito, donde se acumulan formando un montículo abultado que se proyecta al interior del antro llamado cúmulo óforo y que son seguidas de un conjunto de células de la granulosa que rodean al ovocito y permanecen con él hasta el momento de la ovulación, llamadas células de la corona radiada. Debido a su gran tamaño, este folículo invade prácticamente toda la corteza y se extiende hasta la superficie del propio ovario y ya que está alcanzando su tamaño máximo, las mitosis disminuyen y aumentan los espacios entre las células de la granulosa y del cúmulo óforo, preparándose para la ovulación (Figura 6) (Ross y Pawlina, 2007).

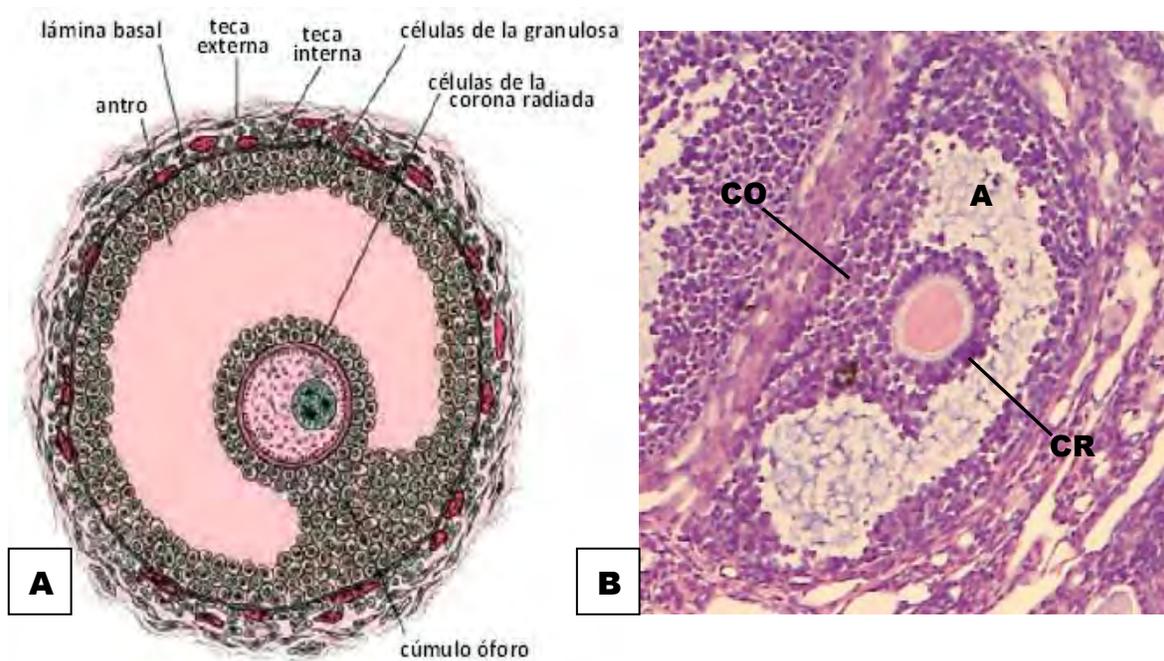


Figura 6. A) Folículo preovulatorio o de Graaf en mamíferos. B) Folículo preovulatorio en ovario de ratón. CO= cúmulo óforo; A= antro folicular; CR=células de la corona radiada. Esquema modificado de Ross y Pawlina, 2007. Fotomicrografía de García Ibarra, F.A.,2013.

3.6. Ciclo estral

El ciclo reproductivo que en humanos dura aproximadamente 28 días y es llamado ciclo menstrual, en roedores es llamado ciclo estral y dura de 4 a 5 días, por lo que es un modelo ideal para investigar cambios en el ciclo reproductivo (Caligioni, 2009).

La regularidad del ciclo estral depende del eje hipotálamo-hipofisis-ovario, de forma que en el hipotálamo, algunas neuronas secretan hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que llegan a la parte anterior de la hipófisis donde los gonadotropos son estimulados para secretar a su vez hormona luteinizante (LH) o bien hormona folículo estimulante (FSH) que se liberan al torrente sanguíneo y llegan así a las células ováricas donde se desencadenan una serie de procesos que permiten el ciclo (Caligioni, 2009).

Citología exfoliativa vaginal

Analizar la citología exfoliativa vaginal permite determinar las fases del ciclo estral en el cual se encuentran los roedores, se basa en el tipo de células que se descaman del epitelio vaginal que pueden ser de tres tipos: células epiteliales nucleadas, células cornificadas y leucocitos (Caligioni, 2009).

Las etapas del ciclo estral son cuatro: proestro, estro, metaestro y diestro y pueden identificarse de acuerdo al tipo y proporción de células observadas en el frotis vaginal. Así, el proestro se caracteriza por la presencia en mayor proporción de células nucleadas que pueden presentarse en cúmulos o aisladas con poca o nula presencia de células cornificadas (Figura 7-A). Esta etapa se da antes de la ovulación cuando el nivel de estrógenos incrementa (regularmente durante la noche) y en consecuencia aumentan también LH y FSH, lo que ocasiona la ovulación al final de esta etapa e inicios del estro (Caligioni, 2009). El nivel de progesterona es bajo al principio debido a que comienza su regresión pero a la mitad de la etapa comienza un pico que concluye al inicio del estro, lo que también influye en la ovulación (Richards y Pangas, 2010).

El estro está caracterizado por la presencia de células epiteliales cornificadas de forma irregular, sin núcleo visible y citoplasma granular, que se presentan en cúmulos (Figura 7-B). En esta etapa se mantiene alto el nivel de estrógenos por la mañana y decae hasta los niveles basales conforme avanza la tarde (Caligioni, 2009). Comienza con niveles altos de progesterona que van disminuyendo hasta llegar al nivel basal al final de la etapa (Richards y Pangas, 2010).

Durante el metaestro se observa en el frotis una combinación de los tres tipos celulares con predominancia de leucocitos y pocas células nucleadas y cornificadas (Caligioni, 2009) (Figura 7-C) y los niveles de estrógenos se mantienen bajos y los de progesterona empiezan a aumentar ya que comienza el desarrollo del cuerpo lúteo (Richards y Pangas, 2010).

En el diestro se observan predominantemente leucocitos con prácticamente nulas células epiteliales nucleadas o cornificadas (Caligioni, 2009) (Figura 7-D). Los niveles de estrógenos son bajos y los de progesterona aumentan un poco debido a que sigue creciendo el cuerpo lúteo (Richards y Pangas, 2010).

3.7 Regulación hormonal de la reproducción en hembras

Las hormonas esteroideas juegan un papel fundamental en la fertilidad y crecimiento de tejido en órganos reproductivos. Estas hormonas son sintetizadas *de novo* a partir del colesterol por las células ováricas, proceso que se explica por el llamado modelo de las dos células, dos gonadotropinas. La célula de la teca, con influencia de la LH, toma el colesterol del medio y lo convierte en pregnenolona y lo metaboliza de forma que sintetiza progesterona y otras progestinas (17-hidroxipregnenolona, 17-hidroxiprogesterona), hasta producir andrógenos como androstenediona y testosterona.

Posteriormente, los andrógenos antes mencionados son transportados hacia la célula de la granulosa que bajo estímulos de FSH los aromatiza para producir estrógenos como la estrona y el principal de ellos, el estradiol (Drummond, 2006).

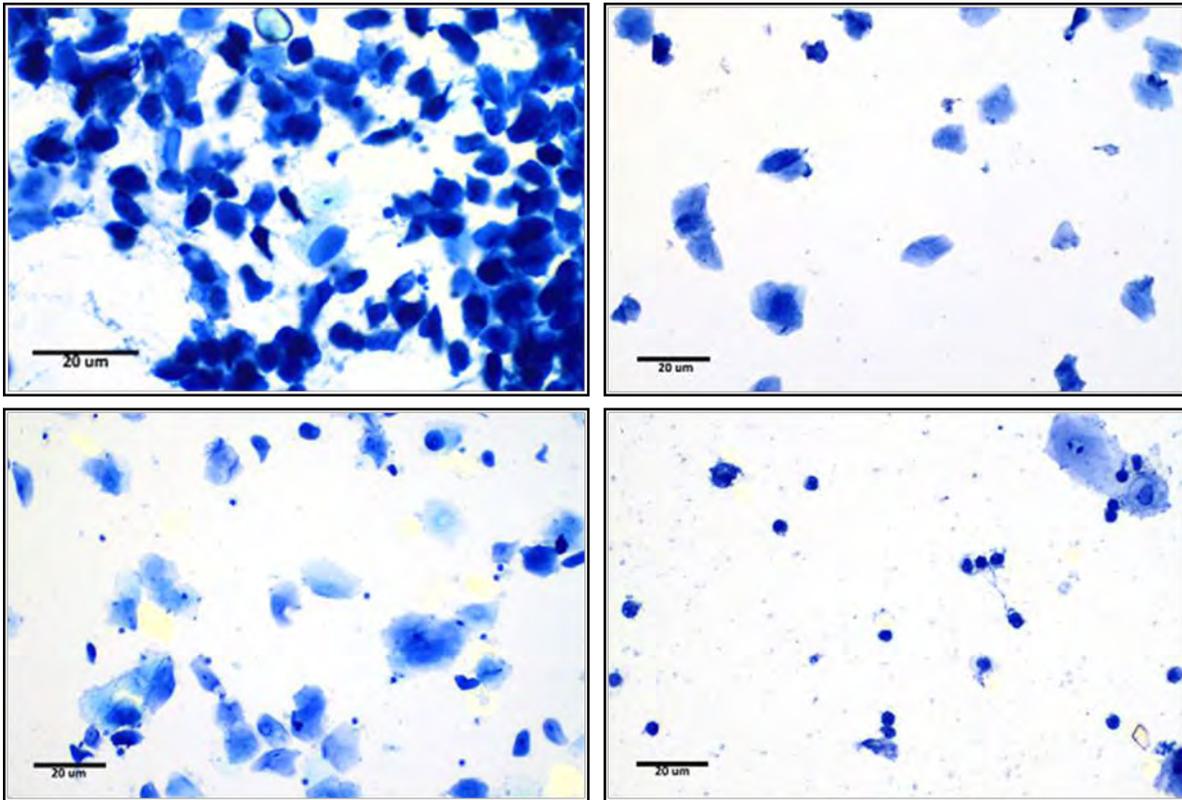


Figura 7. Citología exfoliativa vaginal. A) Proestro; B) Estro; C) Metaestro; D) Diestro. Fotomicrografías de García Ibarra F.A., 2013.

Estrógenos

Los estrógenos juegan un papel fundamental en la modulación intrafolicular, estimulando la proliferación de las células de la granulosa y sensibilizándolas a FSH y LH (induciendo la expresión de sus receptores) para que desencadenen diferentes acciones en cada caso y participan en la diferenciación celular y crecimiento folicular en el ovario (Drummond, 2010).

La producción de estrógenos en el folículo comienza a partir de que el folículo es preantral, ya que cuenta con todos los elementos necesarios para la aromatización de andrógenos, sin embargo la mayor producción de estrógenos se da en los folículos preovulatorios, donde la población de células foliculares es mayor (Drummond, 2006).

La señalización por estrógenos se da por la vía receptores celulares, de los cuales existen dos tipos: receptor de estrógenos alfa (ER α), y receptor de estrógenos beta (ER β), siendo éste último el predominante en el ovario. El papel diferencial de las dos clases de receptores no está definido por completo, pero se ha identificado que el ER α está involucrado en la inhibición de la ovulación por la vía del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y crecimiento del útero, mientras ER β se encarga de estimular el crecimiento de los folículos, disminuir la atresia, inducir la expresión de genes específicos y potenciar el número de ovocitos liberados después de la inducción de la ovulación (Drummond, 2006).

Progesterona

La progesterona es una hormona clave en la modulación de funciones reproductivas como la ovulación y desarrollo de glándulas mamarias y uterinas. Todas estas funciones están mediadas por dos isoformas de receptores: receptor tipo A (PR-A) y tipo B (PR-B). En el ovario se encuentran en las células de la teca de folículos antrales y en células de la granulosa de folículos preovulatorios (Mulac-Jericevic y Coneely, 2004).

Se ha reportado que PR-A es suficiente y necesario para el desarrollo de respuestas dependientes de progesterona indispensables para la fertilidad femenina. Por otro lado, PR-B es requerido para desencadenar respuestas proliferativas normales de la glándula mamaria bajo estímulo de progesterona (Coneely, *et.al.*, 2002).

3.8 Reprotoxicidad en hembras por vanadio

Existen varios estudios en los que se evalúa la toxicidad del vanadio en la reproducción, sin embargo, la mayoría de ellos están enfocados a la viabilidad y desarrollo de los fetos, no en sí a las funciones de los órganos reproductores.

Entre los pocos trabajos en los que se evalúa directamente la función reproductiva, está el de Altamirano y colaboradores (1991) en el que con una exposición por vía intraperitoneal de pentóxido de vanadio en una dosis de 12.5mg/kg, en ratas, se observó la disminución

en la tasa de ovulación. Otro trabajo es el de Morgan y El-Tawil (2003) que en una exposición por vía oral de metavanadato de amonio en una concentración de 200 ppm en ratas, se reportaron afecciones en la regularidad del ciclo estral.

Por último, en el trabajo de Martínez-Pedraza (2007) en el que se administró pentóxido de vanadio en una concentración de 0.02M por vía inhalada a ratones CD-1, se reportó anestro, aumento en folículos atrésicos en estadios avanzados, disminución en la presencia de ER β , así como concentraciones iguales de 17 β -estradiol sérico del grupo control comparado con el grupo expuesto.

4. JUSTIFICACIÓN

En la Zona Metropolitana del Valle de México la alta concentración de partículas suspendidas es un problema significativo ya que está comprobado que pueden causar daño. El efecto de la inhalación de vanadio adosado a las partículas suspendidas es muy variado en los diferentes órganos, sin embargo no existen muchos estudios que describan daño reprotóxico en la función reproductiva femenina o el mecanismo de acción mediante el cual el vanadio afecta el ovario; por lo cual es de gran importancia evaluar el papel del estrés oxidante en estos cambios, por ser la principal forma en la que actúan los metales. Asimismo es fundamental evaluar el uso de vitamina C como agente antioxidante, y determinar si se evita o disminuye el efecto reprotóxico en ovario ocasionado por vanadio.

5. HIPÓTESIS

- ⊙ Si la inhalación de vanadio altera el ciclo estral y la morfofisiología ovárica, entonces se observarán cambios en las concentraciones séricas de estrógenos y progesterona y en la morfometría de los folículos.

- ⊙ Si las alteraciones en la morfofisiología ovárica causadas por la inhalación de vanadio son ocasionadas por estrés oxidante, entonces se observará aumento en la marca de 4-hidroxinonal y la administración de Vitamina C como agente antioxidante reducirá o evitará el daño observado.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivos generales

- ⊙ Cuantificar las concentraciones séricas de 17β estradiol y progesterona ratones hembras con y sin suplementación oral de vitamina C.

- ⊙ Determinar los cambios en el ciclo estral, así como el tamaño de los folículos ováricos de ratones.

- Determinar la generación de estrés oxidante por la inhalación subaguda de vanadio, mediante la presencia de 4-hidroxinonenal, en el ovario de ratones hembra CD-1 con y sin suplementación oral de vitamina C.

6.2 Objetivos particulares

En grupos con y sin suplementación de vitamina C e inhalación de vanadio:

- Relacionar el peso con el tratamiento en cada grupo.
- Cuantificar las concentraciones de estrógenos y progesterona en suero mediante la técnica de Radio Inmuno Ensayo (RIA).
- Establecer los cambios en el ciclo estral mediante citología exfoliativa vaginal diaria.
- Correlacionar las concentraciones de hormonas con las etapas del ciclo estral.
- Relacionar la morfometría de los folículos ováricos con el tratamiento en cada grupo.
- Determinar la presencia de 4-hidroxinonenal como marcador de estrés oxidante mediante inmunohistoquímica.

7. MÉTODO

Fueron utilizadas 80 ratonas hembra de la cepa CD-1 con un peso de 30 a 35g. las cuales fueron aclimatadas por dos semanas a ciclos de luz/oscuridad de 12/12 con agua y alimento *ad libitum*, a las que se les realizó citología exfoliativa vaginal diaria por cinco semanas iniciando a partir de la segunda semana de aclimatación.

El total de ratonas se dividió en cuatro grupos de 20 individuos cada uno:

- a) Grupo control: Ratonas que inhalaron vehículo (solución salina) una hora, dos veces por semana por cuatro semanas.
- b) Grupo vanadio: Ratonas que inhalaron V_5O_2 en una concentración de 0.02M (1436 mg/m³) una hora, dos veces por semana por cuatro semanas.
- c) Grupo vanadio + vitamina C: Ratonas que inhalaron V_5O_2 (J.T. Baker®) en una concentración de 0.02M una hora, dos veces por semana por cuatro semanas; y además se les administró por vía oral una dosis de 50mg x kg x día de vitamina C (Redoxon®, Bayer) diaria por las mismas cuatro semanas de inhalación.
- d) Grupo Vitamina C: Ratonas que inhalaron vehículo (solución salina) una hora, dos veces por semana por cuatro semanas, a la par que se les administró una dosis de 50mg x kg x día de vitamina C diaria por vía por vía oral las mismas cuatro semanas de inhalación.

Citología exfoliativa vaginal

Para la citología se utilizó un buffer de fosfatos (PBS) estéril a un pH de 7.4 y las células se tiñeron con azul de metileno y se observaron en fresco al microscopio fotónico. La citología realizada durante la segunda semana de aclimatación tuvo el objetivo de determinar la regularidad en el ciclo estral en cada organismo de cada grupo y así descartar a aquellos ratones que no presentaran un ciclo regular en ese lapso de tiempo. Se registró la etapa del ciclo estral en la cual se encontraba cada ratona diariamente de

acuerdo a las características de la población celular presente en el frotis, según los parámetros mencionados en la introducción.

Adicionalmente, los animales de todos los grupos fueron pesados diariamente debido a que en dos de ellos se administró vitamina C cuyo excipiente es azúcar. De esta forma se controló la variable de que el peso pudiera influir en la ciclicidad del periodo reproductivo. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) y una post-hoc de tukey con el paquete estadístico GraphPad Prism 5, $p < 0.05$.

Toma de sangre

Después de cuatro semanas de tratamiento y/o inhalación los animales fueron sacrificados con dosis letal de pentobarbital sódico y perfundidos por vía intracardiaca con solución salina [0.9%] a pH 7.4, y fijados con formol amortiguado al 3.4 - 4.0%. Antes de la perfusión, se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca en la aurícula derecha que se centrifugaron dos veces a 4500 rpm por 10 minutos para separar la porción globular de la porción sérica. El suero se almacenó a -70°C . Estas muestras fueron utilizadas para la cuantificación mediante la técnica de Radioinmunoensayo de 17β -estradiol (Coat-A-Count[®] Estradiol, Los Ángeles, CA) y progesterona (Coat-A-Count[®] Progesterone, Los Ángeles, CA).

La técnica de radioinmunoensayo (RIA) consiste en la unión competitiva de una hormona de la muestra contra una hormona sintética marcada con algún isótopo radiactivo a su correspondiente anticuerpo. La concentración de hormonas es inversamente proporcional a la cantidad de radiactividad registrada, de esta forma altos niveles de radiactividad indican que la hormona que se está uniendo al anticuerpo es la marcada y no la de la muestra, es decir se encuentra en pocas cantidades. Por el contrario, si los niveles de radiactividad registrados son bajos, se entiende que las hormonas unidas a los anticuerpos no son las marcadas, sino las presentes en la muestra.

Para la medición de estradiol y progesterona se utilizaron los kits Coat-A-Count® Estradiol y Coat-A-Count® Progesterona (Siemens Medical Solution Diagnostic), respectivamente, que consisten de tubos de propileno marcados con anticuerpo de coneja y hormona marcada ^{125}I progesterona o ^{125}I estradiol.

Para la preparación de las muestras se pipetearon 100 μL de suero problema y 1000 μL de estradiol o progesterona (según el caso) marcados con el isótopo ^{125}I en cada tubo y se agitó en el vortex. Se incubó a temperatura ambiente por 3 horas, se decantó la mayor cantidad de líquido posible y se secaron los tubos con papel absorbente procurando que éste llegara a los primeros 2/3 del tubo. Posteriormente, se contó la radiactividad en un contador gamma por un minuto.

La curva patrón se realizó por duplicado con calibradores de diferentes concentraciones tal como lo indican los siguientes cuadros:

Progesterona	
No. de tubo	Concentración del calibrador en ng/ml
1	0.0
2	0.1
3	0.5
4	2.0
5	10
6	20
7	40
8	80
Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μL de hormona marcada.	
Cuentas totales: contiene 1000 μL de hormona marcada.	

Estradiol		
No. de tubo	Concentración del calibrador en pg./ml	Diluciones para obtener estándares con las siguientes concentraciones:
1	0.0	0.0
2	20	5.0
3	50	10
4	150	20
5	500	50
6	1800	75
7	3600	150
Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μL de hormona marcada.		
Cuentas totales: contiene 1000 μL de hormona marcada.		

Para la obtención de resultados se calculó la media de cada par de tubos corrigiendo con la cantidad de radiactividad de los tubos T (uniones no específicas). Los valores obtenidos fueron representados en una curva logit-log. La media de cada par de tubos fue expresada

como porcentaje del total que corresponde a los tubos A (de máxima unión) y las concentraciones desconocidas fueron extrapoladas a partir de esta curva. Con los valores de las concentraciones de hormonas en los diferentes grupos y etapas se realizó un análisis estadístico (ANOVA-tukey GraphPad Prism 5).

Morfometría del ovario

Una vez realizada la perfusión por vía intracardiaca, los ovarios de tres ratonas fueron inmersos en formol amortiguado al 3.4 – 4.0% por un día, posteriormente lavados, deshidratados e incluidos en bloques de parafina. De un ovario de cada ratona, se realizaron cortes seriados de 3 micrómetros de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Para la morfometría se midieron 10 folículos primarios, 10 secundarios y 10 preovulatorios de cada ratona de la siguiente manera: Utilizando un microscopio fotónico (Olympus CH30), el cual cuenta con una reglilla en el ocular, se observaron los cortes seriados de cada ovario; y para determinar el diámetro mayor de cada folículo, se tomó como condición que se observara el núcleo del ovocito (Figura 8). El diámetro total incluyó al ovocito, a las células de la granulosa y de la teca.

En algunos casos, el núcleo se presentaba en más de un corte, por lo cual se midieron todos aquellos en los que éste fuera visible y fue tomado el valor más alto. Con los valores en micrómetros de los diferentes tipos de folículos se realizó un análisis estadístico (ANOVA-tukey GraphPad Prism 5).

Inmunohistoquímica

Se tomaron los ovarios de tres ratonas de cada grupo (pares de aquellos tomados para morfometría) a los que se realizaron cortes de 3 micrómetros de espesor para la detección por inmunohistoquímica de 4-hidroxinonenal como marcador de estrés oxidante. Posteriormente, las preparaciones fueron observadas con un microscopio de campo claro (Olympus BH-2) equipado con una cámara fotográfica (Cannon T3i de 18 mpx). Se

obtuvieron imágenes a 20X de tres campos al azar por ovario correspondientes a 300 μm por campo.

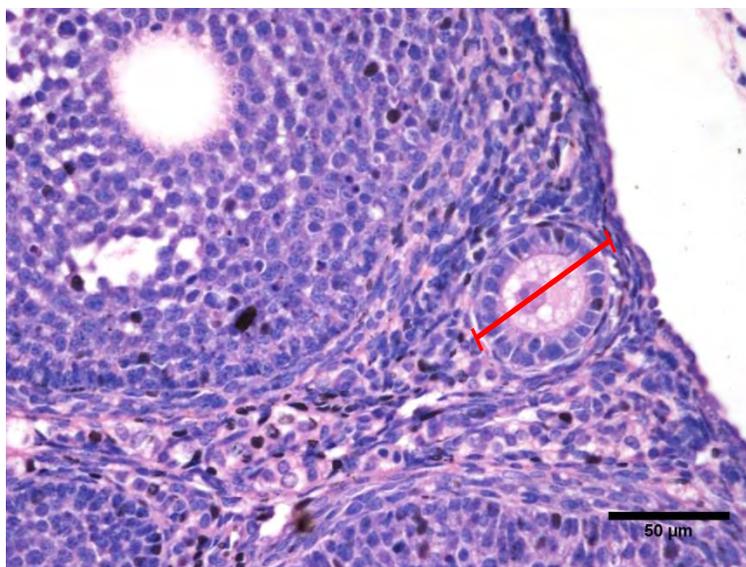


Figura 8. Morfometría de un folículo ovárico. La línea roja indica el diámetro mayor del folículo.

Para la realización de marcaje de proteínas por Inmunohistoquímica, se realizaron cortes de 3 μm de espesor que se desparafinaron por 30 minutos a 70°C para la posterior hidratación del tejido mediante un tren de hidratación comenzando por xilol y seguido de alcohol a diferentes grados (absoluto, 90-50%) y finalmente, agua.

La recuperación antigénica se realizó en DIVA Decloaker 20X (BioCare Medical) en una olla de presión a 25 lb. y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 0.9%. Después para un mejor bloqueo, se incubó en PBS+albúmina (Albúmina Sérica Bovina Fracción V, MP Biomedicals) por 15 minutos. Se realizaron lavados de 30 segundos con PBS-tween (Tween 20, 0.1%).

Se incubó con anticuerpo monoclonal anti-4-hidroxinonanal (R&D Systems) dilución 1:50 a temperatura ambiente por 45 minutos, se lavó con PBS-tween y se incubó con anticuerpo secundario (Biotinylated Link Universal, Dako) por 30 minutos; se realizaron lavados con PBS-tween. Se incubó con HRP (Horseradish peroxidase) por 30 minutos (Dako LSAB +

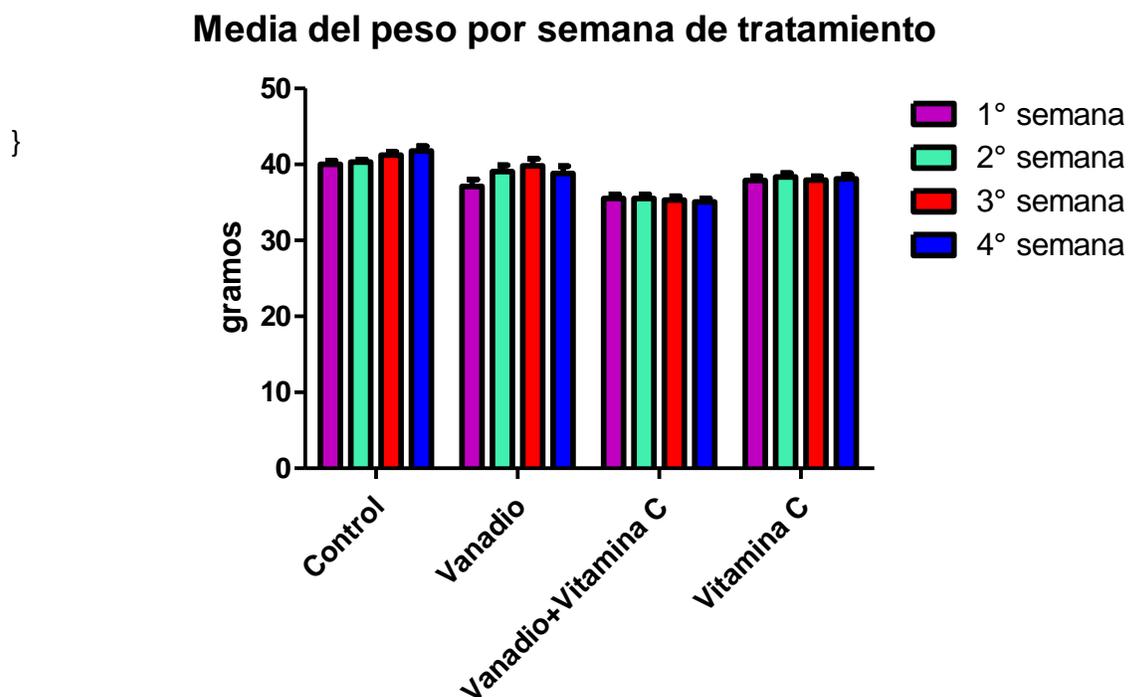
System-HRP; Biotinylated Link Universal; Streptavidin-HRP) y se lavó con PBS-tween. Por último, se reveló con el cromógeno diaminobencidina (Invitrogen DAB-Plus Substrate Kit), se contratiñó con hematoxilina y se montó con resina.

Para la realización de un análisis densitométrico las imágenes en el canal CMYK fueron procesadas por el programa de análisis de imágenes de MatLab (desarrollado por la pasante de la carrera de Médico Cirujano Lorena Sofía López Zepeda). Con los valores de pixeles fue realizado un análisis estadístico (ANOVA-tuckey GraphPad Prism 5, $p < 0.05$).

8. Resultados

8.1 Peso

Como puede observarse en la gráfica 1, ni la exposición a vanadio ni la administración de vitamina C alteró el peso de las ratonas. Asimismo, en ningún grupo se observaron diferencias significativas entre las cuatro semanas de tratamiento.



Gráfica 1. Media (\pm SE) de peso por grupo durante la semana 1 a 4 de tratamiento. ANOVA (tuckey) $p \leq 0.05$

8.2 Radioinmunoensayo

17- β estradiol

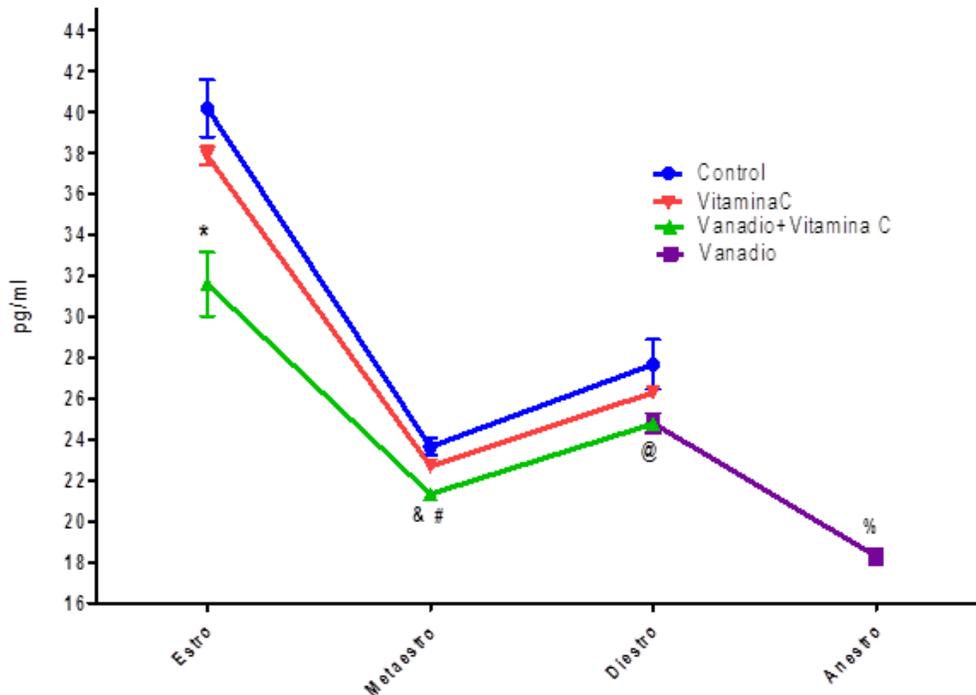
Tabla 1. Valores de 17- β estradiol en suero pg/ml ($x \pm$ ES).

	Estro	Metaestro	Diestro	Anestro
Control	40.17 \pm 1.39	23.64 \pm 0.39	27.66 \pm 1.19	-
Vanadio	-	-	24.79 \pm 0.48	18.28 \pm 0.39
Vanadio + Vit C	31.57 \pm 1.55	21.32 \pm 0.30	24.76 \pm 0.16	-
Vitamina C	37.85 \pm 0.43	22.68 \pm 0.16	26.28 \pm 0.19	-

En la Gráfica 2 es posible observar que en los grupos control, vanadio+ Vitamina C y vitamina C se presenta el mismo comportamiento del 17- β estradiol, es decir hay un pico en el estro, baja drásticamente durante el metaestro y de nuevo aumenta en el diestro. Por el contrario, en el grupo de ratones expuestos a la inhalación de vanadio no se reportó ningún individuo en etapas diferentes a diestro y anestro, aunque sí es posible observar la disminución de esta hormona entre ambas etapas. Cabe destacar que para ningún grupo se tienen datos del nivel de estrógenos en proestro debido a que al momento del sacrificio ninguna de las ratonas se encontró en esta etapa, según la citología exfoliativa vaginal.

Asimismo, en la gráfica puede observarse que durante el estro el grupo vanadio + vitamina C presentó la menor concentración de estrógenos ($31.57 \text{ pg/ml} \pm 1.55$) con respecto al grupo control ($40.17 \text{ pg/ml} \pm 1.39$); el nivel de estrógenos del grupo vanadio + vitamina C ($21.32 \text{ pg/ml} \pm 0.30$) fue menor en comparación con los grupos control ($23.64 \text{ pg/ml} \pm 0.39$) y vitamina C ($22.68 \text{ pg/ml} \pm 0.16$) durante el metaestro; y en el grupo vanadio + vitamina C ($24.76 \text{ pg/ml} \pm 0.16$) la concentración sérica de estrógenos fue menor comparado con el grupo control ($27.66 \text{ pg/ml} \pm 1.19$) durante el diestro. Por otro lado, el de 17- β estradiol del grupo vanadio durante el anestro ($18.28 \text{ pg/ml} \pm 0.39$) fue el mínimo y presentó diferencia estadísticamente significativa con relación a todas las demás etapas de los tres grupos (control, vanadio + vitamina C y vitamina C), así como con el grupo vanadio durante el diestro ($24.79 \text{ pg/ml} \pm 0.48$) (Tabla 1).

Concentración de 17-β estradiol en el suero por etapa del ciclo



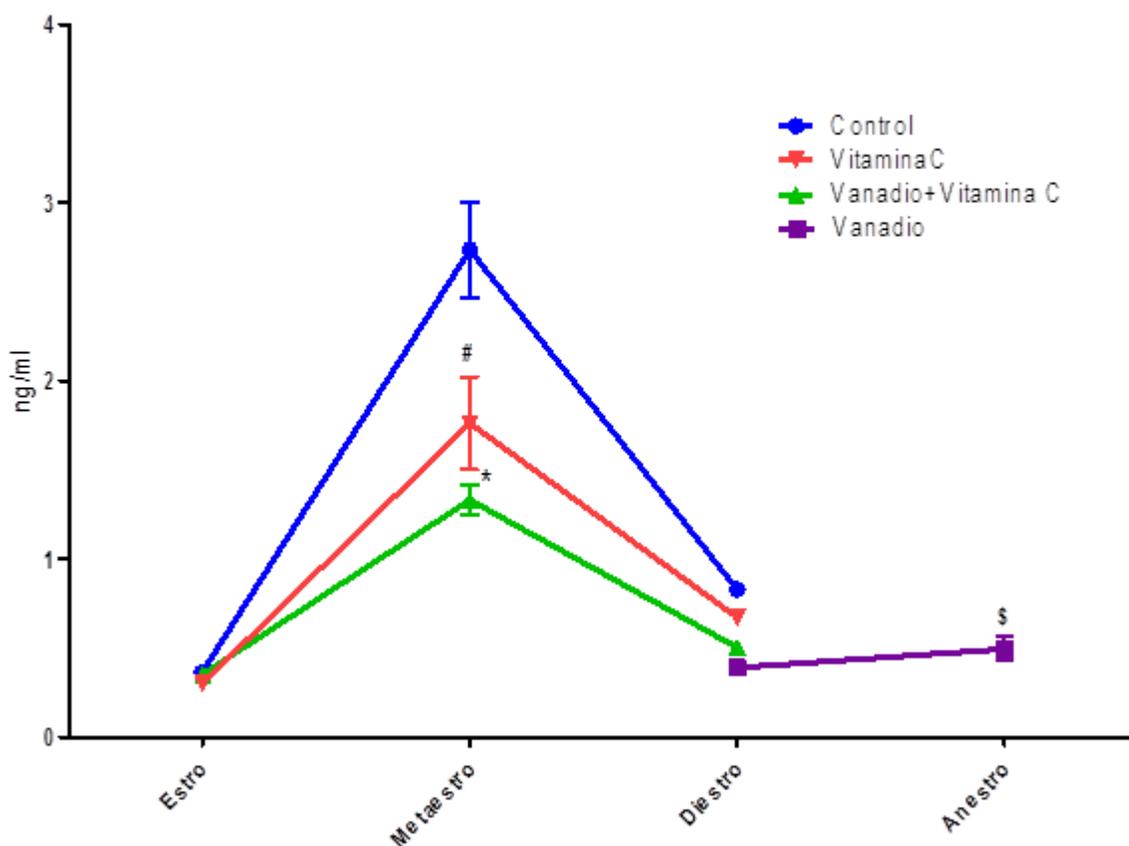
Gráfica 2. Concentración media (+- ES) de 17-β estradiol en suero por etapa del ciclo estral. ANOVA $p < 0.05$. * Diferencia del grupo vanadio + vitamina C con el estro del grupo control; & diferencia con el metaestro del grupo control; # diferencia con el metaestro del grupo vitamina C; @ diferencia del diestro grupo vanadio + vitamina C con el diestro del grupo control; % diferencia con todos los grupos en todas las etapas.

Progesterona

En la gráfica 3 se observa que la media de progesterona en los cuatro grupos se comporta de la misma forma: bajo en estro, se presenta un pico en el metaestro y disminuye nuevamente en el diestro. En el caso del metaestro existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al nivel de progesterona del grupo vanadio + vitamina C (1.33 ng/ml \pm 0.08) y el grupo vitamina C (1.76 ng/ml \pm 0.26) comparados con el grupo control (2.73 ng/ml \pm 0.27) (Tabla 2). En el estro no existe diferencia en los niveles de hormona de ninguno de los dos grupos con respecto al control, ni entre ellos.

Por otro lado, el nivel de progesterona del anestro en el grupo vanadio (0.49 ng/ml \pm 0.06) es diferente de la etapa metaestro de los grupos control (2.73 ng/ml \pm 0.27) , vanadio + vitamina C (1.33 ng/ml \pm 0.08) y vitamina C (1.76 ng/ml \pm 0.26) (Tabla 2).

Concentración de 17-β progesterona en suero por etapa del ciclo



Gráfica 3. Concentración media (+- ES) de progesterona en suero por etapa del ciclo estral. ANOVA $p \leq 0.05$. *Diferencia entre el metaestro de grupo vanadio + vitamina C y metaestro del grupo control; # Diferencia entre el metaestro de grupo vitamina C y metaestro del grupo control; \$Diferencia entre el anestro del grupo vanadio y el metaestro de los grupos control, vanadio+vitamina C y vitamina C

Tabla 2. Valores de progesterona en suero ng/ml ($x \pm SE$).

	Estro	Metaestro	Diestro	Anestro
Control	0.36 ± 0.01	2.73 ± 0.27	0.82 ± 0.03	-
Vanadio	-	-	0.38 ± 0.002	0.49 ± 0.06
Vanadio + Vit C	0.35 ± 0.02	1.33 ± 0.08	0.50 ± 0.02	-
Vitamina C	0.30 ± 0.01	1.76 ± 0.26	0.67 ± 0.02	-

Al igual que en el caso del 17-β estradiol, no se obtuvieron datos correspondientes a la etapa de proestro debido a que el momento del sacrificio ninguna ratona se encontraba en esta etapa según la citología exfoliativa.

8.3 Citología exfoliativa

La citología exfoliativa vaginal observada en todos los grupos correspondió a la mencionada en la literatura tanto en las características celulares como en la secuencia de las etapas, es decir en todos los casos se presentaban en el siguiente orden: Proestro, estro, metaestro y diestro. De esta forma, durante el proestro se observaron únicamente células epiteliales nucleadas (Fig. 8A), esta etapa fue seguida en todos los casos por el estro donde predominan las células cornificadas (Fig. 8B). Después del estro, se observó el metaestro, etapa donde se presentaron los tres tipos celulares: células nucleadas, cornificadas y leucocitos (Fig. 8C). La última etapa fue en todos los casos el diestro en la que se observaron únicamente leucocitos (Fig. 8D).

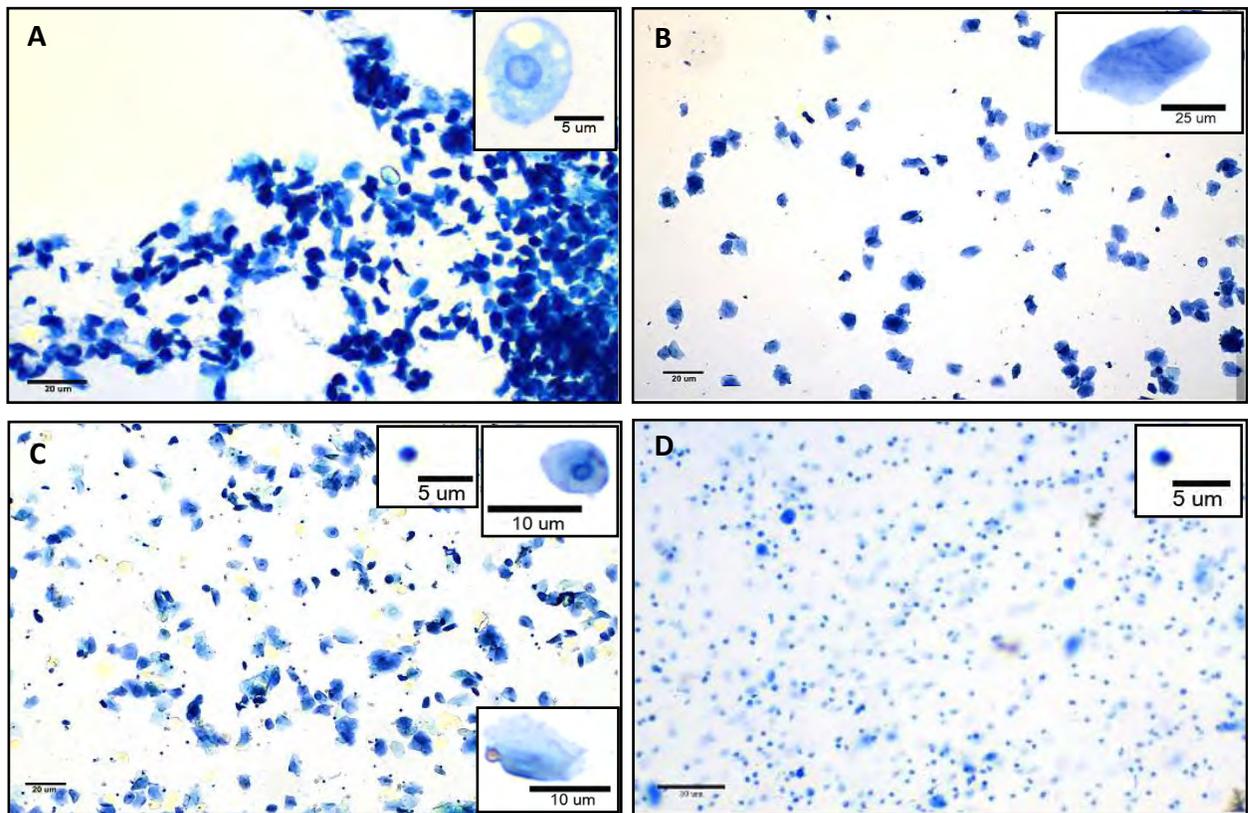


Figura 9. Fotomicrografías de frotis de secreciones vaginales teñidas con azul de metileno en las que se muestran las diferentes etapas del ciclo estral. Proestro (A); estro (B); metaestro (C); y diestro (D).

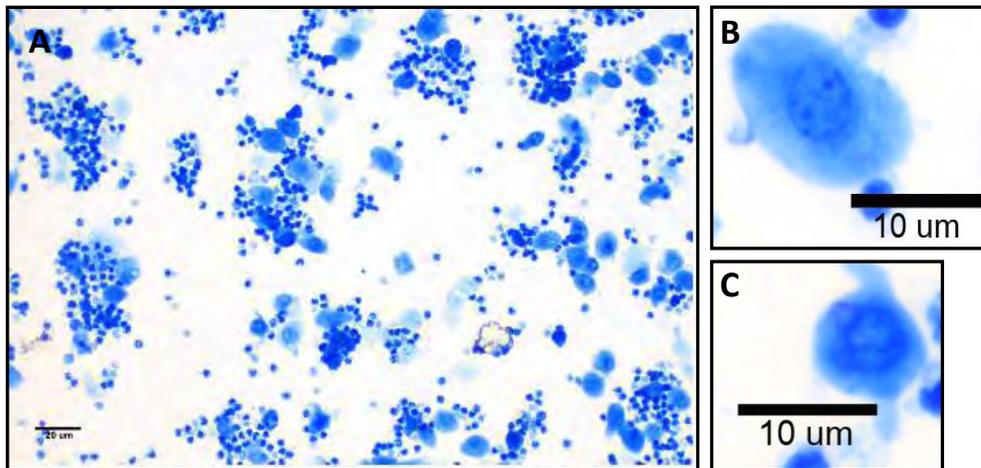


Figura 10. Fotomicrografía de secreción vaginal de ratones del grupo vanadio teñida con azul de metileno durante el anestro. Se muestran células cornificadas, leucocitos y células inmaduras (A), células parabasales (B) y células basales (C)

La gráfica 4 representa los porcentajes de animales que se encontraron ciclando regularmente en cada tratamiento a lo largo de las cuatro semanas. Como puede observarse, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las semanas 3 y 4 del grupo vanadio con respecto al control y a los grupos vanadio + vitamina C y vitamina C durante todas las semanas. Asimismo, las semanas 3 y 4 del grupo vanadio presentan diferencias entre sí.

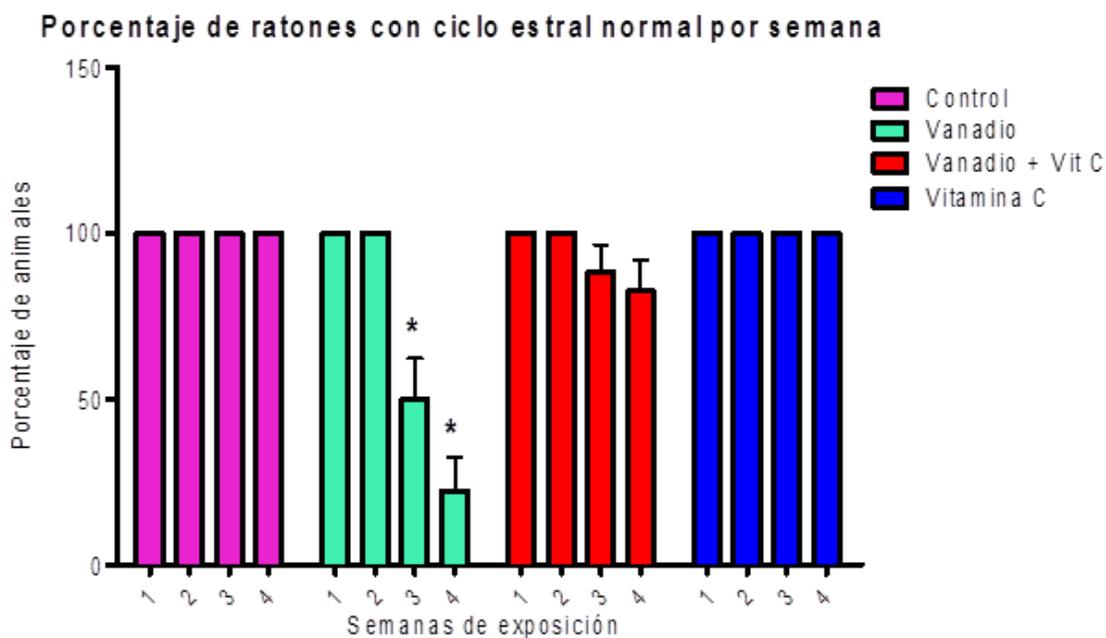
La administración de vitamina C no alteró la ciclicidad y en este grupo al igual que en el grupo control, a lo largo de todo el tratamiento no se observaron cambios en la regularidad del ciclo estral.

6.4 Morfometría del ovario

En la figura 11 se muestran ejemplos de folículos primarios (Figs. 11-A y 11-B), secundarios (Fig. 11-C) y preovulatorios (Fig. 11-D).

La gráfica 5 muestra el diámetro folicular medio por grupo y por tipo de folículo. Como puede observarse en el caso de los folículos primarios no existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos. El diámetro de los folículos secundarios del grupo vanadio ($212.9 \mu\text{m} \pm 11.76$) fue menor al diámetro de los folículos secundarios de los grupos control ($250.4 \mu\text{m} \pm 12.8$), vanadio + vitamina C ($262.6 \mu\text{m} \pm 3.90$) y vitamina C ($233.3 \mu\text{m}$

± 10.6) (Tabla 3). Por último, el diámetro de los folículos preovulatorios del grupo vanadio (313.0 ± 5.51) fue menor al diámetro de los folículos preovulatorios de los grupos control (370.3 ± 4.40) y vanadio + vitamina C (352.7 ± 8.64) (Tabla 3).



Gráfica 4. Porcentaje de ratones con ciclo normal por grupo a lo largo de las cuatro semanas de tratamiento. ANOVA (tuckey) $p \leq 0.05$. *Diferencia con todos los grupos en las cuatro semanas, así como en la tercera y cuarta semana del grupo vanadio.

Tabla 3. Diámetro de folículos primarios, secundarios y preovulatorios ($\mu\text{m} \pm \text{SE}$).

	Primarios (μm)	Secundarios (μm)	Preovulatorios (μm)
Control	100.6 ± 4.89	250.4 ± 12.8	370.3 ± 4.40
Vanadio	104.8 ± 3.76	212.9 ± 11.76	313.0 ± 5.51
Vanadio + Vitamina C	115.3 ± 3.14	262.6 ± 3.90	352.7 ± 8.64
Vitamina C	106.9 ± 3.05	233.3 ± 10.6	341.6 ± 6.34

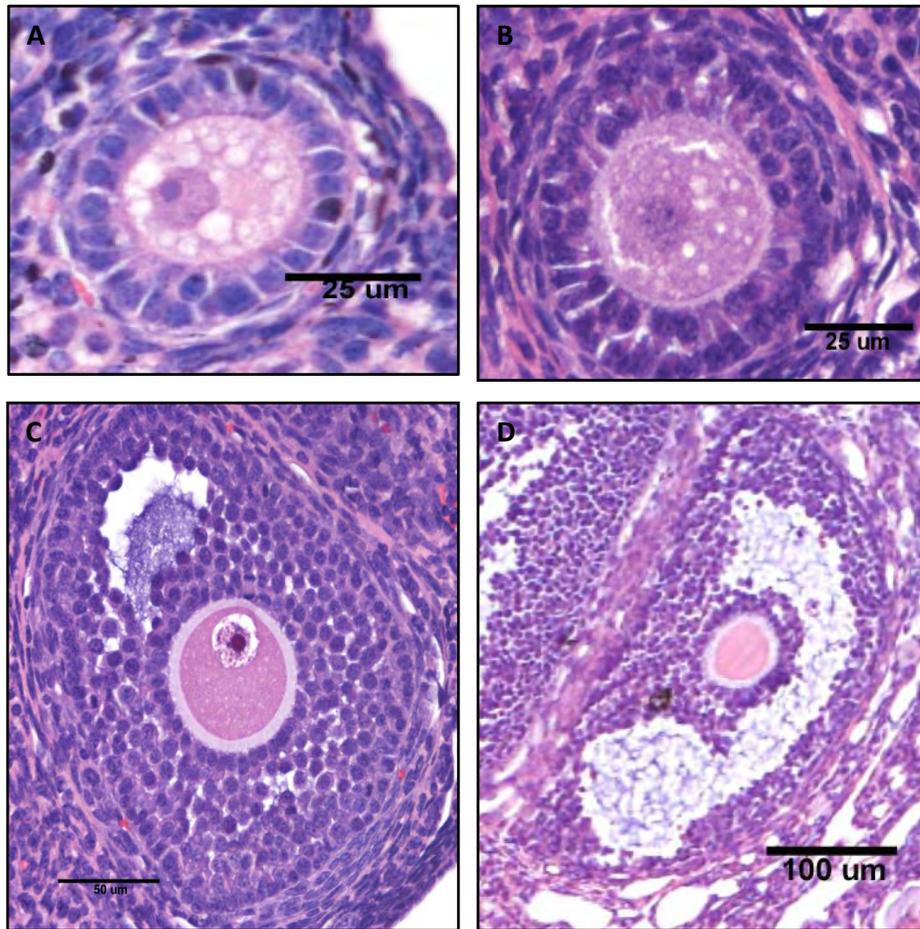


Figura 11. Folículos ováricos. Folículos primarios (A, B); folículos secundarios (C); folículos preovulatorios (D).

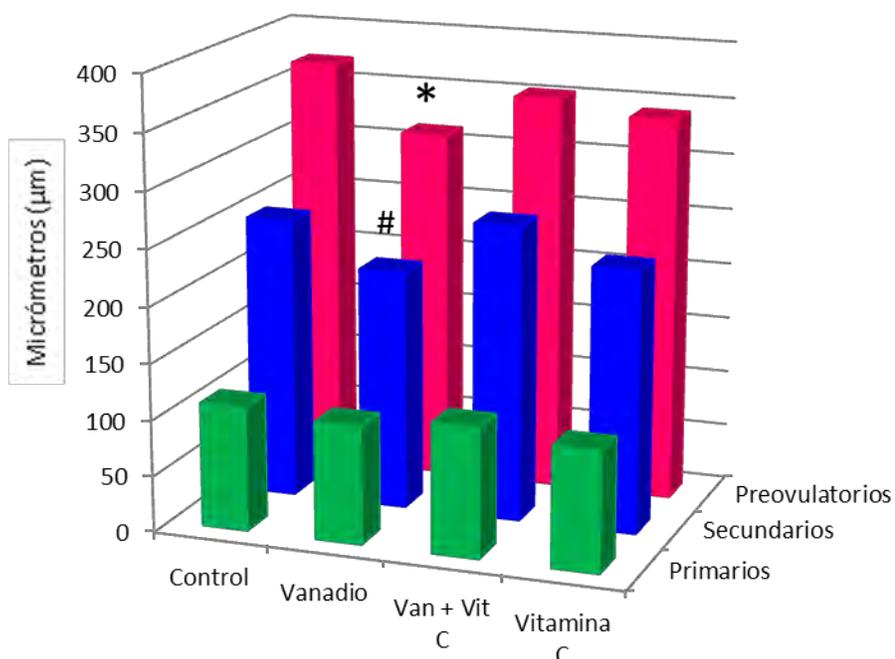
8.5 Inmunohistoquímica para 4-hidroxinonenal

La inmunohistoquímica para 4-hidroxinonenal reveló que este metabolito se encuentra incluso en el ovario de ratonas control por lo que existe una marca basal (gráfica 6). Como puede observarse en la figura 11, existen diferencias con respecto a la distribución de la marca según el grupo. En el grupo control se marcan las células de la granulosa (Fig. 12-A), con mayor intensidad las que se encuentran adyacentes al antro folicular, así como la zona pelúcida (Figs. 12-A y 12-B). Por el contrario, no se observa marca en las células de la teca o en las células del estroma ovárico (Figs. 12-A-C).

En el ovario de ratonas del grupo vanadio (Fig. 12-D-F) se observa una marca más intensa en las células de la granulosa, no sólo en las adyacentes al antro, sino todas desde la periferia del ovocito, las células de la teca al igual que en el grupo control no presentan

marca. La única variante que se presenta es que este grupo, es que en éste las células del estroma se encuentran marcadas (Fig. 12 I-E).

Media del diámetro de folículos ováricos de ratones por tratamiento



Gráfica 5. Diámetro folicular medio en los diferentes grupos. ANOVA $p \leq 0.05$. # Diferencia con folículos secundarios del grupo vanadio + vitamina C; * Diferencia con folículos preovulatorios del grupo control y con folículos preovulatorios del grupo vanadio.

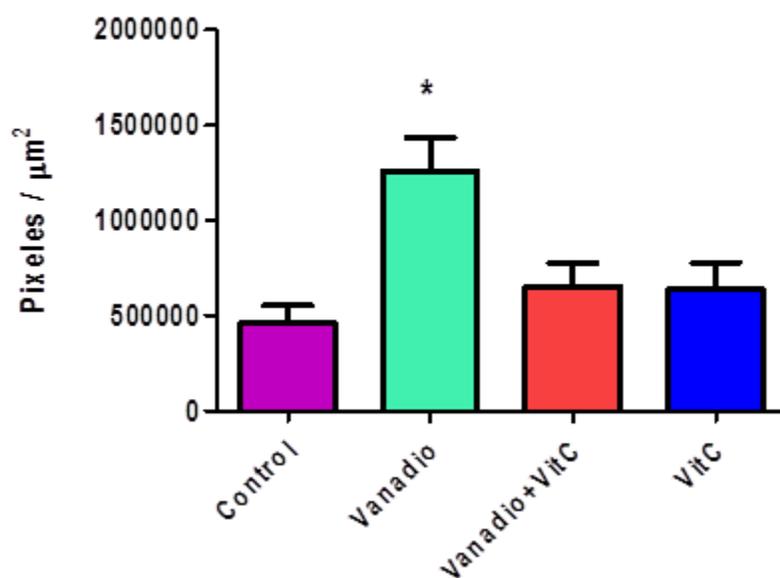
Tabla 4. Pixeles marcados por el cromógeno correspondientes a la presencia de 4-hidroxinonenal en el ovario (pixeles/ $\mu\text{m}^2 \pm \text{SE}$)

Grupo	Pixeles / μm^2
Control	458 425 \pm 93763
Vanadio	1 259 000 \pm 178 867
Vanadio + Vit C	650 099 \pm 124 262
Vitamina C	641 273 \pm 135 872

En los ovarios de ratonas vanadio + vitamina C (Figs. 11-G-I) y vitamina C (Figs. 11-J-L) las células marcadas al igual que en el control son las de la granulosa, no así las células de la teca ni las del estroma ovárico.

En la gráfica 6 se presenta la media de pixeles marcados con el cromógeno por cada grupo. Como puede observarse existe aumento estadísticamente significativo en el grupo vanadio ($1\,259\,000 \text{ pixeles}/\mu\text{m}^2 \pm 178\,867$) comparado con el control ($458\,425 \text{ pixeles}/\mu\text{m}^2 + 93763$), el grupo vanadio + vitamina C ($650\,099 \text{ pixeles}/\mu\text{m}^2 + 124\,262$) y vitamina C ($641\,273 \text{ pixeles}/\mu\text{m}^2 + 135\,872$) (Tabla 4).

Media de la marca de 4-Hidroxinonal ($\text{pixeles}/\mu\text{m}^2$) en ovario de ratón



Gráfica 6. Media (\pm SE) de pixeles marcados por cromógeno correspondientes a 4-hidroxinonal por grupo. ANOVA (tuckey) $p \leq 0.05$. * Diferencia con los grupos control, vanadio + vitamina C y vitamina C.

Control

Vanadio

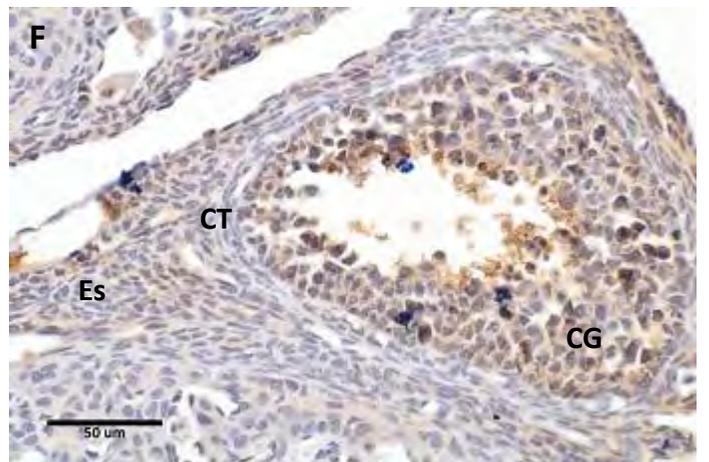
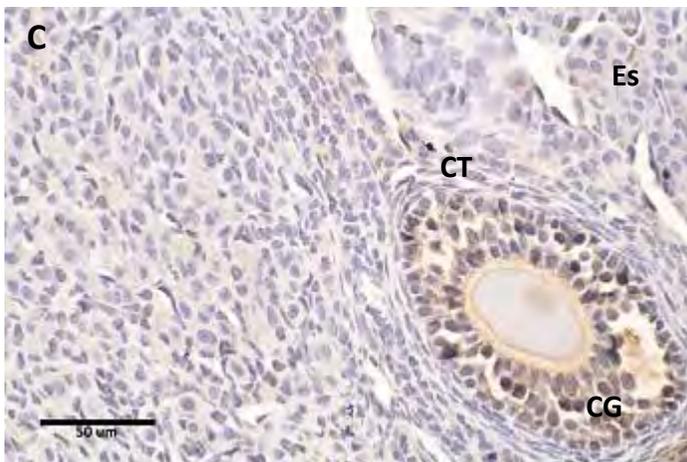
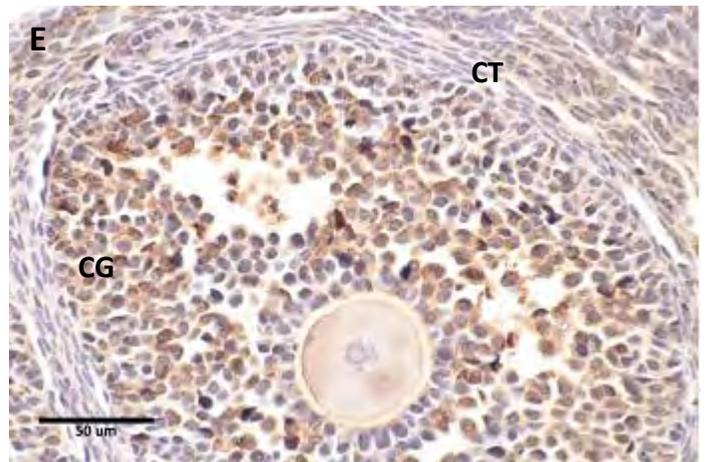
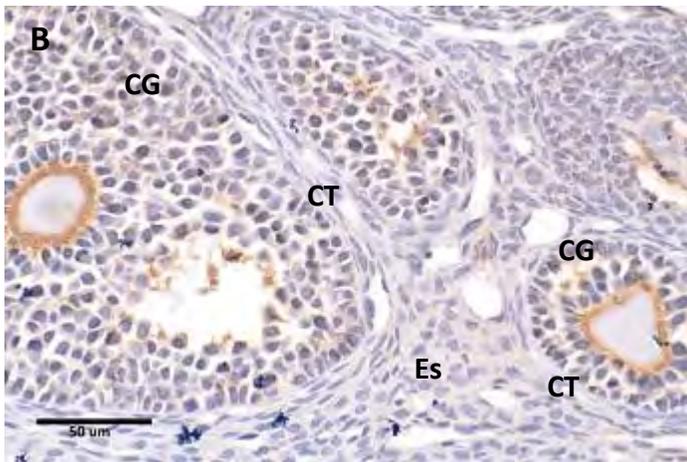
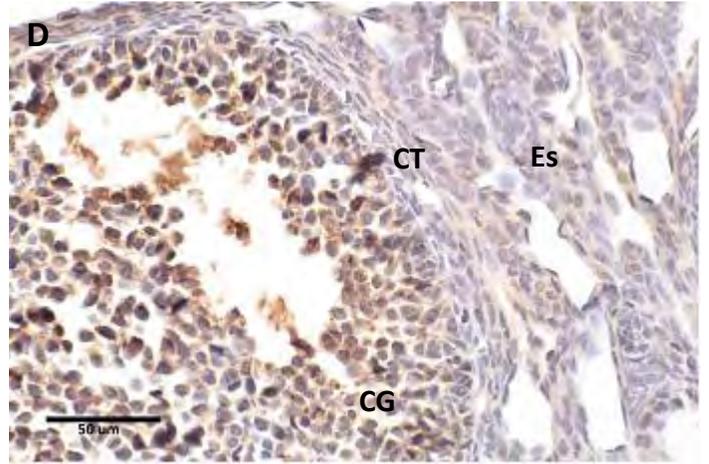
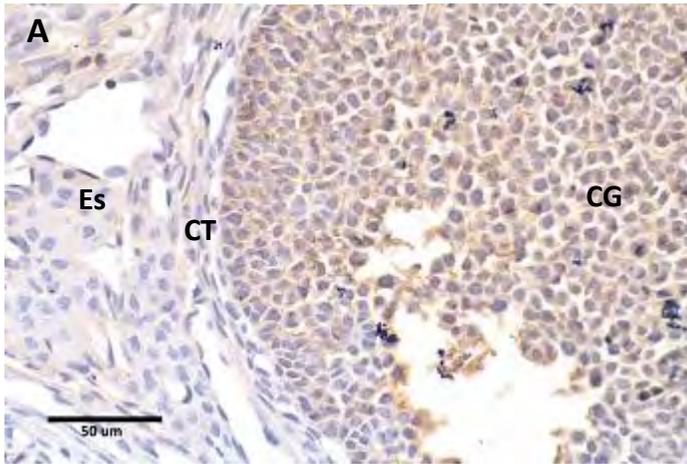


Figura 12. Inmunohistoquímica en folículos secundarios y preovulatorios de ovario para 4-hidroxinonenal. Control (A-C); vanadio (D-F). CG= células de la granulosa; CT= células de la granulosa; CT= células de la teca; Es= estroma ovárico.

Vanadio + vitamina C

Vitamina C

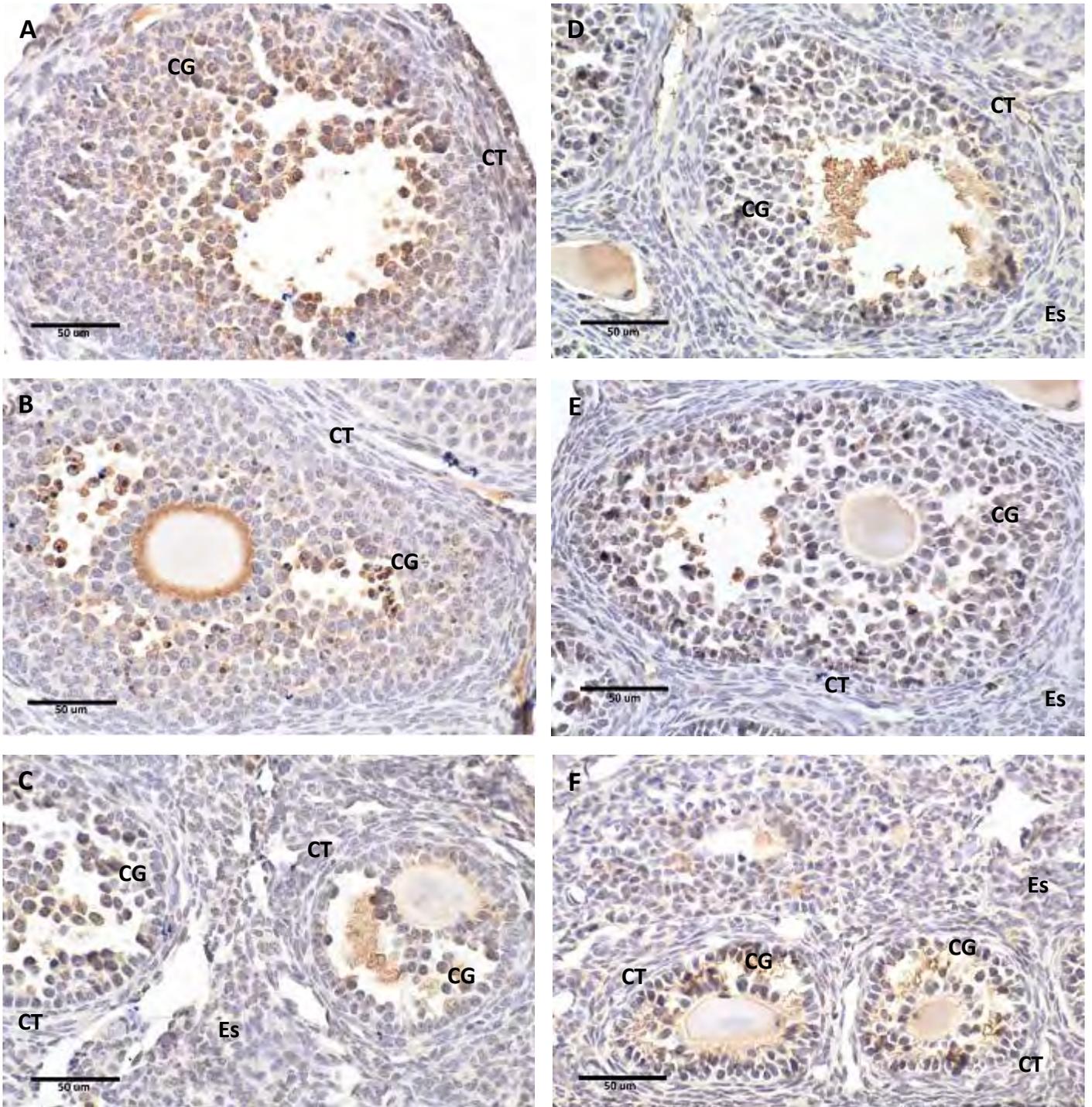


Figura 13. Inmunohistoquímica en folículos secundarios y preovulatorios de ovario para 4-hidroxinonenal. Vanadio + Vitamina C (A-C); vitamina C (D-F). CG= células de la granulosa; CT= células de la teca; Es= estroma ovárico.

9. Discusión

Este trabajo se enfocó en describir los efectos del vanadio por vía inhalada en el ovario de ratón, en términos de concentraciones séricas de hormonas esteroideas, regularidad en el ciclo estral, morfometría de los folículos ováricos, así como indagar sobre el mecanismo de acción de este metal mediante el uso de un agente antioxidante.

9.1 Peso

Como puede observarse en la gráfica 1, la administración de vitamina C por vía oral no causa aumento o disminución del peso de los ratones a lo largo del tratamiento en ninguno de los grupos. Una razón por la que esto sucede podría ser que la cantidad de azúcar que sirve de excipiente para la administración de ácido ascórbico no fuera suficiente para ocasionar el aumento.

9.2 Concentraciones séricas de 17- β estradiol y progesterona

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las dos principales hormonas esteroideas producidas en el ovario, muestran que la inhalación de vanadio a las cuatro semanas disminuye su concentración. Esta disminución puede estar dada por una alteración en diferentes puntos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ya que existen antecedentes de que los metales de transición como cadmio producen cambios en los niveles de gonadotropinas en él (Lafuente y Esquifino, 1999). El hipotálamo es el encargado de producir pulsos de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que sirven como señal a las células gonadotropas de adenohipófisis que las producen y envían por todo el torrente sanguíneo. Estos pulsos dependen de la retroalimentación negativa del eje en la que los estrógenos suprimen la secreción de GnRH, por lo que el hipotálamo posee receptores de estrógenos β (ER β) que censan los niveles circulantes de estas hormonas esteroideas. En el ovario, se ha reportado una disminución en la cantidad de ER β (Martínez-Pedraza, 2007) al administrar por vía inhalada pentóxido de vanadio, por lo que una causa probable de esta reducción en los niveles de hormonas puede ser que los mismos tipos de receptores se encuentren disminuidos en el hipotálamo y de esta forma toda la producción se altere. Se ha demostrado que el cadmio se acumula en el

hipotálamo, donde causa alteraciones, medidas en el aumento en la concentración de neurotransmisores como norepinefrina, dopamina y serotonina que están involucrados en los mecanismos de regulación de los niveles de gonadotropinas (Lafuente, *et.al.*, 2001).

Por otro lado, en la adenohipófisis son secretadas las gonadotropinas LH y FSH de acuerdo a los pulsos de GnRH del hipotálamo (Richards y Pangas, 2010) y de encontrarse éstas gonadotropinas alteradas, la esteroidogénesis no se realiza adecuadamente. Chandra y colaboradores en el 2007 demostraron que al administrar por vía intraperitoneal metavanadato de sodio por 26 días bajan los niveles séricos de FSH, LH y testosterona en ratas, además de que se altera la función testicular, de manera que podría pasar lo mismo en este caso y por lo tanto, las hormonas esteroideas producidas en el ovario bajan sus niveles.

En el ovario adulto, las células de la granulosa expresan receptores para FSH y LH al inicio y al final del proestro respectivamente (Wiebe, *et. al.*, 1988). Se ha observado que en homogeneizados de ovario, el plomo impide la unión de ambas gonadotropinas a sus receptores (Gatzuli, *et.al.*, 1991; Vega, *et.al.*, 1995) por la excesiva producción de ROS, lo que sugiere que el vanadio podría actuar de manera semejante, ya que también las produce. Por otro lado, debido a que el estrés oxidante es un mecanismo de acción del vanadio, produce peróxido de hidrógeno que se ha observado reduce la producción de estrógenos y progesterona en células lúteas estimuladas con gonadotropina coriónica humana *in vitro*, debido a que esta especie reactiva de oxígeno disminuye la esteroidogénesis tanto dependiente como no dependiente de cAMP (Vega, *et.al.*, 1995).

Otra razón probable de la disminución en la concentración de hormonas, es que éstas son derivadas del colesterol, que es tomado por las células de la teca bajo la influencia de LH para sintetizar progesterona y algunos andrógenos como testosterona y androstenediona, que a su vez en presencia de FSH son precursores de estrógenos en las células de la

granulosa (Richards y Pangas, 2010). Se ha demostrado que el vanadio inhibe la síntesis de colesterol impidiendo el paso de ácido mevalónico a escualeno (Azarnoff, *et.al.*, 1961).

En el trabajo realizado por Martínez-Pedraza en 2007 en el que se utilizó el mismo modelo de inhalación que en el presente, se reportó un aumento en el número de folículos atrésicos en estadios avanzados (antrales tempranos y tardíos) cuyas células de la granulosa, son encargadas de producir la mayor cantidad de estrógenos y dado el aumento en este tipo de muerte celular, es posible que la disminución de 17β -estradiol sérico se deba también a una disminución en la cantidad de folículos íntegros.

En la gráfica 2 puede observarse que existe disminución radical en los niveles séricos de estradiol durante el anestro del grupo vanadio, que son incluso los más bajos de todos los grupos en todas las etapas. De igual forma, en la grafica 2 se puede identificar la disminución en los niveles de progesterona durante el anestro del grupo vanadio que asimismo, son los más bajos comparados con los otros grupos. Lo anterior puede explicarse además de todos los aspectos antes mencionados, por las especies reactivas de oxígeno producidas a causa de la inhalación de vanadio, medidas en términos de marca de 4-HNE (gráfica 6). Como se ha dicho, algunos radicales causan alteraciones en diferentes puntos de la producción de estrógenos y progesterona, además de que pueden disminuir las defensas antioxidantes de las células en estructuras como el hipotálamo (Muthuvel, *et.al.*, 2006) o los folículos ováricos (Jozwik, *et.al.*, 1999) y así afectar por ejemplo la membrana de células lúteas (Gazuli, *et.al.*, 1991), inhibir la translocación de colesterol a la mitocondria (Behrman y Aten, 1991) o alterar la función del citocromo P450_{SCC}, enzima encargada de transformar el colesterol a pregnenolona, un precursor de progesterona en la mitocondria (Carlson, *et.al.*, 1995). De esta forma, las ROS pueden ser una explicación a los resultados obtenidos en cuanto a las concentraciones de hormonas observados en este experimento.

En cuanto a la citología, durante el estro existe una disminución en los niveles de estradiol

en el grupo vanadio + vitamina C comparado con el grupo control y el grupo vitamina C (gráfica 2), y en el metaestro disminuye la concentración de progesterona tanto en el grupo vanadio + vitamina C como solo vitamina C. Esto puede ser explicado como resultado de la administración de ácido ascórbico como agente antioxidante, ya que como se mencionó en el párrafo anterior está demostrado que el estrés oxidante altera la esteroidogénesis, y al ser contrarrestado, es posible observar una reducción en los efectos provocados por la inhalación de vanadio. Sin embargo puede observarse que en el metaestro del grupo vanadio + antioxidante, los niveles de progesterona no son diferentes a los del grupo vanadio, y son diferentes a las concentraciones de progesterona del metaestro en el grupo control.

9.3 Ciclo estral

Los resultados obtenidos indican que a partir de la tercera semana de inhalación de vanadio, el porcentaje de ratones que se encontraban ciclando disminuyó con respecto al control alcanzando el porcentaje máximo durante la cuarta semana (Gráfica 4).

Está comprobado que diferentes compuestos de metales como cadmio, antimonio, bario y plomo provocan cambios en la duración del ciclo estral (Choe, *et.al.*, 2003). Al administrar dicromato de potasio en el agua de bebida en una dosis de 750 ppm la duración del ciclo estral aumenta significativamente comparado con grupos control de ratones Swiss albino (Murthy, *et.al.*, 1996). Se ha reportado que algunos compuestos de vanadio alteran la regularidad en el ciclo estral (Morgan y El-Tawil, 2003), y Martínez-Pedraza (2007) reportó que desde la primera semana se presenta un mayor número de células parabasales y basales, características del anestro.

La regularidad del ciclo estral está dada por la cantidad de hormonas que se producen a lo largo del ciclo, de forma que una vez que ha disminuido la FSH y aumenta la producción de estradiol por las células de la granulosa de folículos antrales y ocurre la ovulación, lo que aumenta es la concentración de LH y las células foliculares se modifican a células

lúteas, que posteriormente producen progesterona lo cual induce la síntesis de proteínas necesarias para mantener la implantación (Chaffin y VandeVoort, 2013).

Como se muestra en las gráficas 2 y 3, los niveles tanto de estradiol como de progesterona se ven reducidos a la cuarta semana de inhalación en los animales expuestos a vanadio comparado con los animales control, lo cual puede explicar el anestro ya que al estar depletadas las concentraciones de hormonas, no se puede llevar a cabo la ovulación de forma correcta y con ello la producción de progesterona se encuentra alterada.

En el caso de los grupos vanadio + vitamina C y vitamina C, el porcentaje de ratones que mantuvieron un ciclo estral regular no se alteró, aunque las concentraciones de hormonas disminuyeron de manera significativa con respecto al grupo control, lo que nos indica que el cambio en las concentraciones no fue suficiente para hacer que los ratones entraran en anestro (grafica 4); además, aunque disminuyen los niveles, se mantiene el patrón de la producción hormonal de acuerdo a la etapas del ciclo estral tanto en el estradiol (estro), como en la progesterona (metaestro). La vitamina C disminuye las afecciones a la regularidad del ciclo estral causadas por el vanadio, ya que al haber suplementación de ácido ascórbico, se mantiene el ciclo estral.

9.4 Morfometría ovárica

En la gráfica 5 puede observarse que sólo los folículos secundarios disminuyen significativamente su diámetro en el grupo vanadio comparados con los grupos control, vanadio + vitamina C y vitamina C; y también en el grupo vanadio, los folículos preovulatorios con los grupos control y vanadio + vitamina C. Estos cambios en la morfometría pueden ser explicados por la disminución de estrógenos y progesterona observados. Se ha reportado que la disminución en las gonadotropinas causa que no se puedan producir las suficientes capas de células de la granulosa en folículos (Baker, 1998), lo que podría estar causando el menor crecimiento.

Por otro lado, las metaloproteinasas (MMPs) son fundamentales para la remodelación folicular. Aunque no se conoce con exactitud el rol fisiológico que realizan en el ovario, se ha observado que propician la modificación del folículo para la formación del cuerpo lúteo, participan en los procesos de atresia, ovulación y crecimiento (Smith, *et.al.*, 2002).

Sin embargo con el modelo de inhalación de vanadio antes descrito se reportó que la MMP2 aumenta en el hipocampo a la cuarta semana, mientras que en el estriado lo hace a partir de la segunda semana (Colin-Barenque, *et.al.*, 2008), de manera que podría estar alterada también en el ovario a las cuatro semanas de inhalación y por lo tanto alterar el crecimiento de los folículos secundarios y preovulatorios, lo que a su vez es una razón para la disminución en la concentración de hormonas mencionado anteriormente.

Otra cuestión a considerar es la interacción que existe entre células de la granulosa y de ellas con el ovocito, que está determinada por varios elementos del citoesqueleto como tubulina (Albertini, *et.al.*, 2001). Se ha reportado que la γ -tubulina (Mussali-Galante, *et.al.*, 2005) y la actina (Rodríguez-Lara, 2013) disminuyen en células de Sertoli, Leydig y células germinales en testículo de ratón CD-1 expuesto a la inhalación de V_2O_5 en forma dependiente del tiempo de exposición, lo que nos indica es posible que la tubulina se vea afectada también en el ovario y de esta forma afectar el crecimiento folicular.

9.5 Estrés oxidante

En la gráfica 6 se muestra que hubo un aumento significativo en la marca de 4-HNE en los ovarios del grupo expuesto a la inhalación de vanadio comparado con los grupos control, vanadio + vitamina C y vitamina C. Como puede observarse, el grupo control presenta una media basal en la marca de 4-HNE lo que se debe a que los ovarios presentan ROS de manera natural ya que modulan reacciones fisiológicas como la maduración de los ovocitos, la esteroidogénesis, la formación del cuerpo lúteo y la luteólisis (Agarwal, *et.al.*, 2005).

En el caso del grupo vanadio, el aumento en la marca de 4-HNE indica la peroxidación lipídica, generada por el vanadio, de los fosfolípidos en las membranas plasmática y de los organelos membranosos. En cambio, en el caso del grupo vanadio + vitamina C y vitamina C la marca no es diferente al control pues el ácido ascórbico evita el daño oxidante.

En un modelo de estrés oxidante causado por polifenilos policlorados (PCBs), se ha demostrado que las ROS al causar estrés oxidante provocan una disminución en los niveles de LH y FSH, aumento en la cantidad de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica (LPO), así como disminución en la actividad antioxidante tanto enzimática como no enzimática (concentración de ácido ascórbico) en el hipotálamo. Se sugiere que los efectos antes mencionados fueron contrarrestados y los niveles tanto de H₂O₂ como de LPO y la actividad enzimática de ambos tipos fueron restituidos bajo la administración de vitamina C, sin embargo los niveles de gonadotropinas (LH y FSH) no fueron recuperados de manera significativa (Muthuvel, *et.al.*, 2007).

10. CONCLUSIONES

La inhalación subaguda de vanadio altera la función morfofisiológica del ovario, ya que disminuye las concentraciones de estrógenos y progesterona, induce anestro y disminuye el tamaño de folículos secundarios y preovulatorios. La presencia de 4-HNE como marcador de estrés oxidante sirve como evidencia de que éste es uno de los mecanismos mediante el cual el vanadio altera la función ovárica.

La administración de vitamina C como agente antioxidante funciona para disminuir significativamente el daño causado por la inhalación subaguda de vanadio en el ovario de ratón, ya que disminuye el anestro, no altera el tamaño de los folículos ováricos y no causa aumento en el marcador de estrés oxidante. Sin embargo, los niveles hormonales disminuyen en los grupos con suplementación de ácido ascórbico, lo que indica que la vitamina C no evita por completo el daño causado por el vanadio por lo que es recomendable realizar estudios posteriores al respecto.

La importancia de este trabajo radica en que se describen con mayor precisión los efectos de la inhalación de vanadio no sólo en la morfología, sino en la función del ovario como principal productor de estrógenos y progesterona en el organismo y permite indagar un poco más acerca de los efectos que las partículas suspendidas pudieran tener en la función reproductiva. Si bien no es posible hasta el momento decir que el vanadio es contundentemente causa de infertilidad, sí es posible inferir que lo será ya que la función normal del ovario se ve afectada. No obstante, son necesarios muchos más estudios para conocer su papel en todos los aspectos de la reproducción.

Dentro del modelo de inhalación utilizado este trabajo es de suma importancia, debido a que soportará cualquier estudio en el que se realicen comparaciones por sexo, ya que se observó que el vanadio sí afecta los niveles de estrógenos y progesterona, principales hormonas sexuales en hembras que participan en un sinnúmero de procesos fisiológicos y que son siempre el punto de partida para cualquier estudio de diferencias por sexo.

11. BIBLIOGRAFÍA

Albertini, D., Combelles, C., Benecchi, E. y Carabatsos, M. (2001) **Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development.** *Reproduction* 121:647-653.

Agarwal, A., Gupta, S. y Sharma, R. (2005). **Role of oxidative stress in female reproduction.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:28.

Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez, A., Antuna, S.B, Saldivar, L., Espejel-Maya, G., Mussali-Galante, P., Ávila-Casado, M.C., Reyes-Olivera, A., Anaya-Martinez, V., Fortoul, T.I. (2005) **Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: a mice experimental model.** *Neuroscience Letters* 381 (1-2): 21–25.

Azarnoff, D., Brock, F. y Curran, G. (1961). **A specific site of vanadium inhibition of cholesterol biosynthesis.** *Biochemistry and Biophysics Acta* 51:397-398.

Baker, T. (1988) **Oogenesis and ovulation.** En: Austin, C., y Short, R. (Eds.) *Germ Cell and Fertilization IV*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 17-45.

Barceloux, D. (1999) **Vanadium.** *Clinical Toxicology* 37(2): 265-278.

Behrman, H. y Aten, R. (1991). **Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells.** *Endocrinology* 147: 177-182.

Caligioni, C. (2009) **Assessing Reproductive Status/Stages in Mice.** *Current Protocols in Neuroscience*. APPENDIX: Appendix–4I.

Cam, M.C., Brownsey, R.W., McNeill, J.H. (2000) **Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent?** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78(10): 829-847.

Carlson, J., Sawada, M., Boone, D. y Stauffer, J. (1995) **Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by oxidants.** *Steroids* 60:272-276.

Catalá, A. (2006) **An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay.** *Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38: 1485-1495.

Catalá, A. (2009) **Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions.** *Chemistry and Physics of Lipids* 157:1-11.

Chaffin, C. y VandeVoort, C. (2013). **Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: A comparative perspective.** *Experimental Biology and Medicine* 238:539-548.

Chandra, A., Ghosh, R., Chatterjee, A., y Sarkar, M. (2007). **Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 101:944-956.

Chasteen, N.D., Lord, E.M., Thompson, H.J., Grady, J.K. (1986) **Vanadium complexes of transferrin and ferritin in the rat.** *Biochimica et Biophysica Acta* 884:84–92.

Choe, S., Kim, S., Kim, H., Lee, J., Choi, Y., Lee, H. y Kim, Y. (2003). **Evaluation of estrogenicity of mayor heavy metals.** *The Science of Total Enviromental* 312:15-21.

Colin-Barenque, L., Martínez-Hernández, M., Baiza-Gutman, L., Avila-Costa, M., Ordoñez-Librado, J., Bizarro-Nevarés, P., Rodríguez-Lara, V., Piñón-Zarate, G., Rojas-Lemus, M., Mussali-Galante, P. y Fortoul, T. (2008). **Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation.** *Journal of Applied Toxicology* 28:718-723.

Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. **Aire y atmósfera. Partículas Suspendidas.** El mosaico de América del Norte: panorama de los problemas ambientales más relevantes. En: cec.org. Consultado en: <http://www.cib.uaem.mx/SMH2013/pdfs/EjemploResumen.pdf> el 5 de Mayo de 2013.

Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B. DeMayo, F., Lydon, J.P., O'Malley, B.W. (2002) **Reproductive Functions of Progesterone Receptors.** *The Endocrine Society.* Descargado de: rphr.endojournals.org el 15 de Mayo de 2012.

Consejo Canadiense de Protección de los Animales. (1998). **Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación.** En: www.ccac.ca

Corti, A., Casini, A.F., Pompella, A. (2010) **Cellular pathways for transport and efflux of ascorbate and dehydroascorbate.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507: 107-115.

Dimond, E.G., Caravaca, J., Benchimol, A. (1963) **Vanadium: excretion, toxicity, lipid effect in man.** *American Journal of Clinical Nutrition* 12: 49-53.

Domingo J.L., Gómez, M., Llobet, J.M., Corbella, J. (1990) **Chelating agents in the treatment of acute vanadyl sulphate intoxication in mice.** *Toxicology* 62:203-11.

Domingo, J.L. (1996) **Vanadium: A review of the reproductive and developmental toxicity.** *Reproductive Toxicology* 10(3): 175-186.

Donaldson, K., Stone, V. (2003) **Current hypotheses of the mechanisms of toxicity of ultrafine particles.** *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita* 39(3): 405-410.

Drummond, A.E. (2006) **The role of steroids in follicular growth.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:16.

Drummond, A.E., Fuller, P.J. (2010) **The importance of ER β signalling in the ovary.** *Journal of Endocrinology* 205:15-23.

Elejalde-Guerra, J.I. (2001) **Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes.** *Anales de Medicina Interna* 18(6): 326-335.

Elinder, C.G., Gerhardsson, L., Oberdoerster, G. (1988) **Biological monitoring of toxic metals-overview.** En: *Biological monitoring of toxic metals* (W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 1-71.

Fortoul T.I., Quan-Torres, A., Sanchez, I., Lopez, I.E., Bizarro, P., Mendoza, M.L., Osorio, L.S., Espejel-Maya, G., Avila-Casado, M.C., Avila-Costa, M.R., Colin- Barenque, L., Villanueva, D.N. y Olaiz-Fernandez, G. (2002). **Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s.** *Archives of Environmental Health* 57: 446-449.

Fortoul, T. I., Rodriguez-Lara, V, Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colin-Barenque, L., Montañó, L. F., García-Peláez, I., Bizarro-Nevarés, P., López-Valdez, N., Falcón-Rodríguez, C. I., Jiménez-Martínez, R. S., Ruiz-Guerrero, M. L., López-Zepeda, L.S., Morales-Rivero, A., Muñoz-Rivera-Cambas, A. (2010) **Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion.** *Journal of Biochemical and Biomedicine.* Vol. 2011: 1-11.

Gatzuli, E., Aten, R. y Behrman, H. (1991). **Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells.** *Endocrinology* 128: 2253-2258.

Ghosh, P., D'Cruz, O.J., DuMez, D.D., Peitersen, J. (1999) **Structural and functional characterization of seven spermicidal vanadium(IV) complexes: potentiation of activity by methyl substitution on the cyclopentadienyl rings.** *Journal of Inorganic Biochemistry* 75: 135-143.

Gilmour, P.S., Brown, D.M., Lindsay, T.G., Beswick, P.H., MacNee, W., Donaldson, K. (1996) **Adverse health-effects of PM10 Particles involvement of iron in generation of hydroxyl radical.** *Occupational and Environmental Medicine*;53:817-22.

González-Mangadoa, N., Morera-Pratb, J. (2001) **Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes.** *Archivos de Bronconeumonía* 37: 407 –410.

González-Villalva, A., Fortoul, T.I., Avila-Costa, M.R., Piñón-Zarate, G., Rodríguez-Lara, V., Martínez-Levi, G., Rojas-Lemus, M., Bizarro-Nevarés, P., Díaz-Bech, P., Mussali-Galante, P., Colin-Barenque, L. (2006) **Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V₂O₅ inhalation.** *Toxicology and Industrial Health* 22:113–116.

Gutteridge, J.M.C. (1998) **Lipid peroxidation: some problems and concepts.** En: Halliwell, B. (ed.) *Oxygen Radicals and Tissue Injury*. FASEB, Bethesda, M.D. 9-19.

Harland, B.F., Harden-Williams, B.A. (1994) **Is vanadium of human nutritional importance yet?** *Journal of the American Dietetic Association*; 94:891–894.

Jiménez- Martínez , R. (2009) **Daño Oxidante en Corteza Cerebral y Plexo Coroideo de Ratonés Expuestos a Pentóxido de Vanadio por Vía Inhalada,** Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Jones, M.M., Basinger, M.A. (1983). **Chelate antidotes for sodium vanadate and vanadyl sulfate intoxication in mice.** *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 12:4-6.

Jozwik, M., Wolczynski, S., Jozwik, M. y Szamatowicz, M. (1999). **Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans.** *Molecular Human Reproduction* 5:409-413.

Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. (2012). **Biochemical and medical importance of vanadium compounds.** *Acta Biochimica Polonica* 59(2): 195-200.

Lafuente, A. y Esquifino, A. (1999). **Cadmium effects on hypothalamic activity and pituitary hormone secretion in the male.** *Toxicology Letters* 110: 209-218.

Lafuente, A., Márquez, N., Pérez-Lorenzo, M., Pazo, D. y Esquifino, A., (2001). **Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats.** *Experimental Biology and Medicine* 226(6): 605-611.

LGEEPA. **Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.** (2013) Última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 07-06-2013.

Linster, C.L., Van Shaftingen, E. (2006). **Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals.** *The FEBS Journal* 274:1-22.

Luck, M.R., Jeyaseelan, I., Scholes, R.A. (1995) **Ascorbic Acid and Fertility.** *Biology of Reproduction* 52: 262-266.

Martínez-Pedraza, M. 2007. **Efecto del pentóxido de vanadio en ovario y epitelio vaginal: modelo murino de exposición por inhalación.** Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Mayor-Oxilia, R. (2010) **Estrés oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante**. *Revista del Instituto de Medicina Tropical* 5(2): 23-29.

Morgan, A.M., El-Tawil, O.S. (2002). **Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats**. *Pharmacological Research* 47:75-85.

Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M. (2004) **Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors**. *Reproduction*. 128: 139-146.

Murthy, R., Junaid, M. y Saxena, D. (1996) **Ovarian dysfunction in mice following chromium (IV) exposure**. *Toxicology Letters* 89: 147-154.

Mussali-Galante, P., Rodríguez-Lara, V., Hernández-Tellez, B., Ávila-Costa, M.R., Colin-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Piñón-Zarate, G., Saldívar-Osorio, L., Díaz-Beck, P., Herrera-Enríquez, M.A., Tovar-Sánchez, E., Fortoul, T.I. (2005) **Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times**. *Toxicology and Industrial Health* 21(9): 215–222.

Muthuvel, R., Venkataraman, P., Krishnamoorthy, G., Gunadharini, D., Kanagaraj, P., Jone-Stanley, A., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M. y Arunakaran, J.(2006). **Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats**. *Clinica Chimica Acta* 365:297-303.

Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de Septiembre de 2005.

PROAIRE. **Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020**. SEMARNAT, INE, SSA, Comisión Ambiental Metropolitana.

Rehder, D. (2003). **Biological and medicinal aspects of vanadium**. *Inorganic Chemistry Communication* 6:604-617.

Rhoads, K., Sanders, C.L. (1985) **Lung clearance, translocation and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung**. *Environmental Research* 1985;36: 359–378.

Richards, J.S., Pangas, S.A. (2010) **The ovary: Basic Biology and Clinical Implications**. *The Journal of Clinical Investigation* 120(4): 963-972.

Rodríguez, I., Araki, K., Khatib, K., Martinou, J.C., Vassalli, P. (1997) **Mouse Vaginal Opening Is an Apoptosis-Dependent Process Which Can Be Prevented by the Overexpression of Bcl2**. *Developmental Biology* 184: 115-121.

Rodríguez-Lara, V.; Morales-Rivero, A., Muñiz Rivera-Cambas, A. y Fortoul, T.I. (2013) **Vanadium inhalation induces actin changes in mice testicular cells.** *Toxicology and Industrial Health* 1-8.

Rodriguez-Mercado, J. y Altamirano-Lozano, M. (2006) **Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad.** *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22 (4) 173-189.

Roshchin, A.V., Ordzhonikidze, E.K., Shalганova, I.V. (1980) **Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state.** *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology & Immunology* 24:377-383.

Ross, M.H., Pawlina, W. (2007) **Histología: Texto y Atlas color con biología celular y molecular. 5ª. Edición.** Médica Panamericana. Buenos Aires. 992 p.

Roubicek, D.A., Gutiérrez-Castillo, M.E., Sordo, M., Cebrián-García, M.E., Ostrosky-Wegman, P. (2007) **Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City.** *Mutation Research* 631:9-15.

Shiau, S.Y., Lin, S.F. (1993) **Effect of supplemental dietary chromium and vanadium on the utilization of different carbohydrates in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*.** *Aquaculture* 110: 321-330.

SMA. Secretaría del Medio Ambiente. **Inventario de Emisiones de Contaminantes Criterio de la ZMVM 2010.**

Smith, M., Ricke, W., Bake, L., Dow, M. y Smith, G. (2002). **Ovarian tissue remodeling: Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 191:45-56.

Vega, M., Carrasca, I., Castillo, T., Troncoso, J., Videla, I. y Devoto, L. (1995) **Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells.** *Journal of Endocrinology* 147: 177-182.

Venereo-Gutiérrez, J.R. (2002). **Daño oxidativo, radicales libre y antioxidantes.** *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2): 126-133.

Wasan, K.M., Risovic, V., Yuen, V., McNeill, J.H. (2006) **Differences in plasma homocysteine levels between Zucker fatty and Zucker diabetic fatty rats following 3 weeks oral administration of organic vanadium compounds.** *Metabolic processes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19: 251-258.

WHO. World Health Organization (2001) **Vanadium pentoxide and other vanadium compounds**. *International Programme on Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document 29*: 1-53.

Wiebe, J. y Buckingham, K. (1988) **Effect of preantral and neonatal exposure to lead on gonadotropin receptors and steroidogenesis in rat ovaries**. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 24:461-476.

Wilson, M.R., Lightbody, J.H., Donaldson, K., Sales, J., Stone, V. (2002) **Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro***. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 184:172-9.

Zoller, W.H., Gordon, G.E., Gladney, E.S., Jones, A.G. (1973) **The sources and distribution of vanadium in the atmosphere**. En: *Advances in Chemistry Series No. 123. Trace Elements in the*