



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efectos de la inhalación de vanadio
en la morfofisiología del útero de
ratones CD1.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

NAYELI AGLAÉ MELÉNDEZ GARCÍA



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.

1. Datos del alumno

Meléndez

García

Nayeli Aglaé

15174342

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307170596

2. Datos del tutor

M. en C.

Martha Patricia

Bizarro

Nevares

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Laura

Colín

Barenque.

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Rosario

Ortiz

Hernández.

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Teresa I.

Fortoul

van der Goes.

6. Datos del sinodal 3

Dr.

Mario Agustín

Altamirano

Lozano.

7. Datos del trabajo escrito.

Título: Efectos de la inhalación de vanadio en la morfofisiología del útero de ratones CD1.

Número de páginas: 58

Año: 2014

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al comité revisor de ésta tesis:

Dra. Laura Colín Barenque.
Dra. Rosario Ortiz Hernández.
M. en C. Martha Patricia Bizarro Nevares.
Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes.
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano.

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por el apoyo en la toma de fotografías utilizadas en este proyecto:

Biól. Armando Zepeda Rodríguez.
Técnico Académico Francisco Pasos Nájera.

Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por el apoyo en las técnicas histológicas empleadas en este trabajo:

Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira.
Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata.

Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Por el mantenimiento y cuidado de los animales ocupados en el presente:

Dr. Enrique Pinzón Estrada.
Dr. Ismael Torres Saldaña.

Laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Pediatría. Por el asesoramiento en la técnica inmunohistoquímica:

M. en C. Francisco Javier García Vázquez.

Dra. María Elena Ayala Escobar, por el apoyo en la realización del radioinmunoensayo.

Lorena Sofía López Zepeda, por desarrollar el software "DENSIFE".

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, mi apoyo, el motor de mi vida, sin ustedes esto no sería una realidad. Este proyecto es suyo, es nuestro:

Mis padres, Daniel y Amanda... porque su apoyo incondicional, su esfuerzo, su ejemplo y su amor me han traído hasta aquí, porque detrás de todo este trabajo están ustedes. Los amo.

Mis hermanas, Daniela y Laura... por todo el tiempo que estamos juntas, sus risas y su cariño, por ustedes quiero ser mejor cada día. Las amo.

A Juan Carlos, por amarme y apoyarme tanto, por todos los bellos momentos a tu lado, por acompañarme los sábados de citología y durante éstos cuatro años en la facultad... por ser tú.

A Fátima, por compartir conmigo los ratones y tu tiempo, pero sobre todo por tu amistad.

A Paty, por ser una excelente tutora... por todos los conocimientos, consejos y el tiempo que me diste, porque además también me brindaste tu amistad y cariño.

A Marce, Lau y Adri... por sus valiosos consejos y las charlas en el laboratorio. Por ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Tere por abrirme las puertas del laboratorio, por las aportaciones y el apoyo a este trabajo. Por motivarnos a hacer ciencia.

A Armando y Paco, por recibirme siempre con una sonrisa y por su apoyo a este proyecto.

A todas las personas que me han dado su cariño y su amistad, y han estado conmigo en los incontables buenos momentos y en los pocos malos ratos.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Contaminación atmosférica	2
2.1.1 Contaminación atmosférica y salud reproductiva	3
2.2. Partículas Suspendidas	4
2.3. Vanadio	5
2.3.1 Fuentes de emisión	5
2.3.2 Usos.....	6
2.3.3 Vías de Exposición	6
2.3.4 Toxicocinética.....	7
2.3.5 Mecanismos de acción	8
2.3.6 Daños a la salud	9
2.4. Vanadio y reprotoxicidad	10
2.5. Sistema reproductor femenino	10
2.5.1 Ovario.....	11
2.5.2 Oviducto.....	13
2.5.3 Útero	13
2.5.4 Vagina	14
2.5.5 Ciclo estral.....	14
3. Justificación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos.....	19
6. Método	20
6.1. Modelo experimental.....	20
6.2. Citología exfoliativa vaginal.....	20
6.3. Toma de muestras	20
6.4. Radioinmunoensayo	22
6.5. Morfometría	22
6.6. Inmunohistoquímica	22
7. Resultados	24
7.1. Peso corporal	24
7.2. Citología exfoliativa vaginal.....	24
7.3. Radioinmunoensayo	27
7.4. Morfometría	29
7.5. Inmunohistoquímica	33
8. Discusión.....	38
9. Conclusiones.....	43
10. Perspectivas.....	43
11. Referencias	44

ABREVIATURAS

cAMP	Adenosin Monofosfato cíclico
CAMs	Moléculas de Adhesión Celular
CGP	Células Germinales Primitivas
CO	Monóxido de carbono
E2	17- β estradiol
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ER α	Receptor de estrógenos alfa
ER β	Receptor de Estrógenos beta
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GLUT4	Transportador de Glucosa tipo 4
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropinas
GSK-3	Cinasa Glucógeno Sintasa 3
HB-EGF	Factor de Crecimiento de Unión a Heparina
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF-I	Factor de Crecimiento de tipo insulina I
IL-6	Interleucina 6
KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos
LH	Hormona Luteinizante
MAPK	Proteínas Cinasas Activadoras de Mitógenos
msnm	metros sobre el nivel del mar
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)
NF- $\kappa\beta$	Factor Nuclear kappa beta
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
O ₃	Ozono
P4	Progesterona
PKB/Akt	Proteína Cinasa B
PKC	Proteína Cinasa C
PM	Material Particulado
PR	Receptor de Progesterona
PST	Partículas Suspendidas Totales
PTB-1B	Proteína Tirosina Fosfatasa 1B
RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SO ₂	Dióxido de azufre
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
VO ⁺²	Vanadilo
VO ₄ ⁻³	Vanadato
WHO	World Health Organization
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

1. RESUMEN

Se ha propuesto que la contaminación ambiental tiene efectos reprotóxicos que se deben a la exposición materna a partículas suspendidas totales (PST), las cuales en la Zona Metropolitana del Valle de México sobrepasan los límites recomendados por la WHO (World Health Organization). Los efectos que tienen las PST en la función reproductiva se deben a los metales, como el vanadio (V), que tienen adosados. El vanadio es un metal de transición que es emitido a la atmósfera, principalmente, por la quema de combustibles fósiles, y el petróleo de México es uno de los que contienen mayores concentraciones de este metal.

En modelos experimentales (ratón y rata) se ha demostrado el efecto del vanadio en fetos, recién nacidos y en el sistema reproductor masculino; sin embargo no se ha descrito si la inhalación de vanadio ocasiona alteraciones en el útero, el cual está involucrado directamente en el desarrollo embrionario, en la gestación y procesos fisiológicos relacionados con la función reproductiva.

En este trabajo se evaluó el efecto de la inhalación de vanadio en ratones de la cepa CD1, sobre el ciclo estral y niveles hormonales (estrógenos E2 y progesterona P4), así como en la morfología del útero y en la presencia de receptor de estrógenos alfa (ER α) en este órgano.

Se utilizaron 40 ratones hembra de la cepa CD1 de 30-35 g, de los cuales 20 inhalaban V₂O₅ 0.02M y 20 inhalaban solución fisiológica, todos, una hora dos veces por semana durante 4 semanas; asimismo se realizó citología exfoliativa vaginal diaria para determinar la etapa del ciclo estral en la que se encontraban los individuos controles y los expuestos a la inhalación de V, y se registró el peso corporal para determinar si el tratamiento tenía algún efecto sobre este. Al cabo de las 4 semanas los animales fueron sacrificados; de cada uno de los ratones se tomaron muestras de sangre para procesarla con la técnica de radioinmunoensayo, se disecó el útero y se procesó para la técnica histológica convencional (hematoxilina-eosina), se hicieron cortes seriados para realizar la morfometría: mediciones del grosor del epitelio, del estroma y del miometrio, así como el número y diámetro de las glándulas; también se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para determinar la presencia y distribución del ER α .

Con la citología exfoliativa se observó que durante las 4 semanas los animales controles presentaron un ciclo estral normal, mientras que a las 3 semanas de inhalación de vanadio los animales ya presentaban células de descamación vaginal inmaduras (parabasales y basales) correspondientes a un estado de anestro. Al momento del sacrificio (4 semanas), la concentración en sangre de E2 y P4 disminuyó en las hembras que inhalaban vanadio. Por otro lado el grosor del estroma y del miometrio, así como el diámetro y el número de glándulas del útero de los animales expuestos a vanadio aumentó de manera significativa respecto al útero de los animales del grupo control. La presencia y distribución del ER α no se vio alterada por la exposición al vanadio.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían estar relacionados con los abortos pretérmino, bajo peso al nacer y las reabsorciones, reportados en otros trabajos por la administración de vanadio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Contaminación Atmosférica

La presencia de sustancias extrañas (contaminantes) en concentraciones y lapsos suficientes para alterar el equilibrio de las propiedades físicas y químicas naturales de la atmósfera, además de tener efectos nocivos en los humanos, plantas y animales, es lo que se conoce como contaminación atmosférica (Vallejo et al., 2003; Gallego et al., 2012). Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés, 2012) constituye uno de los principales riesgos a la salud puesto que se ha comprobado una relación estrecha entre los niveles de contaminación y el aumento en la mortalidad y morbilidad tanto en países desarrollados como en desarrollo.

Existen dos tipos de contaminantes de la atmósfera: los contaminantes peligrosos del aire y los contaminantes criterio, éstos últimos denominados así puesto que dañan la salud humana y sus niveles atmosféricos son altos por lo que su estudio se ha vuelto de gran importancia. Se consideran contaminantes criterio: el dióxido de nitrógeno (NO_2), dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), ozono (O_3) y material particulado (PM); los dos últimos afectan a más personas que cualquiera de los otros y la exposición a éstos representa un riesgo grave para la salud (Zuk et al., 2007; WHO, 2012). Las fuentes emisoras de éstos contaminantes son, en su mayoría, antropogénicas pues se originan de la quema (a veces incompleta) de combustibles fósiles usados en los medios de transporte, industrias o casas habitación; aunque algunos otros provienen de fuentes naturales, o se originan por la combinación de otros contaminantes.

La WHO se ha encargado de monitorear los niveles atmosféricos de los contaminantes criterio y en base a ello ha establecido concentraciones inofensivas recomendables, lo cual se ha logrado con las redes de monitoreo internacionales. En América Latina, donde se superan los estándares recomendables de los contaminantes criterio, como las PM_{10} (Fig. 1), se estima que mil millones de personas están expuestas a PM_{10} ; esto se ha visto potenciado por el crecimiento poblacional y la urbanización, asimismo las características geográficas de algunos países propician la concentración de los contaminantes (Weitzenfeld, 1992); un ejemplo de ello es la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), que comprende el Distrito Federal y 59 municipios del Estado de México, en donde los niveles de contaminación sobrepasan por mucho los límites permisibles por las normas nacionales e internacionales (Fig. 2), pues además de estar ubicada a 2240 metros sobre el nivel del mar (msnm) lo que provoca que la quema de combustibles sea deficiente, entre los $19^\circ 03'$ - $19^\circ 54'$ latitud norte donde recibe una intensa radiación solar propiciando la formación fotoquímica de contaminantes como el O_3 y el PM, está rodeada de un sistema montañoso que ocasiona el estancamiento de todos los contaminantes (Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM, 2010), su población ha crecido considerablemente y por lo tanto su índice de urbanización se ha incrementado.

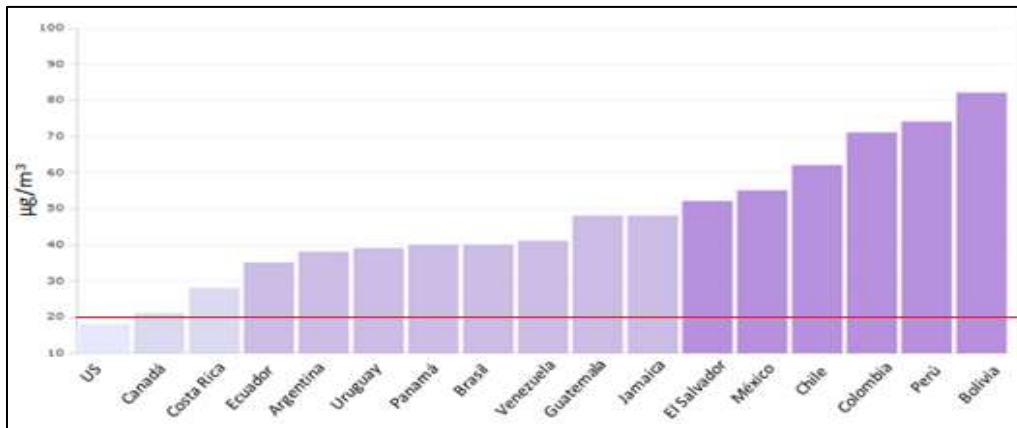


Figura 1. Concentración media anual de PM₁₀ en zonas urbanas de América Latina, 2003-2010. La concentración media anual recomendada es de 20µg/m³ (WHO, 2012).

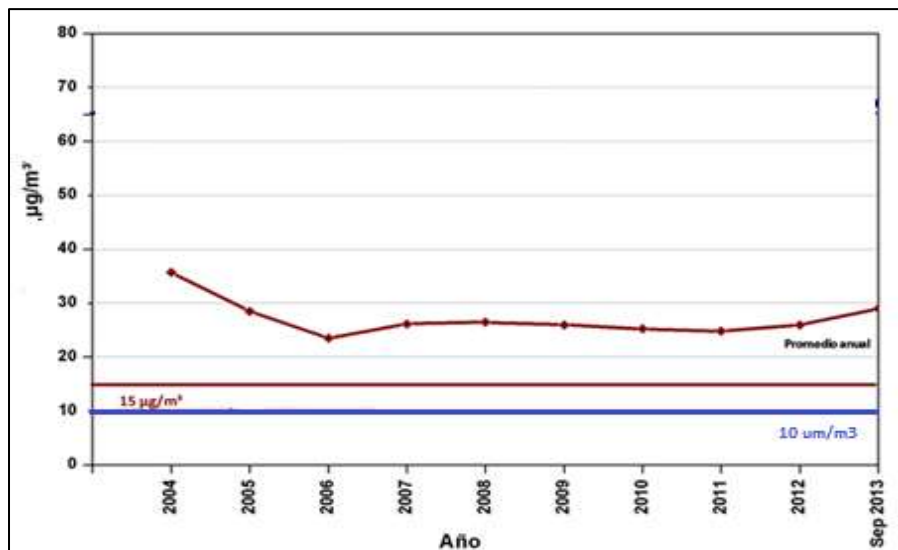


Figura 2. Concentración media anual de PM_{2.5} en la ZMVM (SIMAT, 2011). La Norma Oficial Mexicana indica que la concentración media anual máxima permitida es de 15 µg/m³, mientras la WHO indica que el límite son 10 µg/m³. No obstante ninguno de los estándares se cumple.

2.1.1 Contaminación atmosférica y salud reproductiva

Los contaminantes atmosféricos, incluso en bajas concentraciones, tienen efectos adversos en la salud pues dependen también de las propiedades físicas y químicas de éstos, de la frecuencia y duración de la exposición además de la vulnerabilidad de las personas expuestas (Kampa y Castanas, 2011). Los daños causados por este tipo de contaminantes, están relacionados con el desarrollo de algunos tipos de cáncer, enfermedades respiratorias, cardiovasculares, problemas neurológicos y reproductivos (Samet et al., 1999; Romieu et al., 2008; Curtis et al., 2006; PROAIRE 2011).

Se ha propuesto que la exposición materna a contaminantes atmosféricos está relacionada principalmente con nacimientos pretérmino, bajo peso al nacer, mortalidad temprana y restricción del crecimiento intrauterino (Glinianaia et al., 2004; Maisonet et al., 2004; Veras et al., 2010; Slama et al., 2008; Stieb et al., 2012). Algunos otros asocian el incremento en la contaminación del aire con defectos en las funciones reproductivas en los adultos y aumento de la infertilidad femenina (Sharara y Seifer, 1998; Veras et al., 2010). Los contaminantes pueden interferir en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, afectar directamente las células germinales (Veras et al., 2010) o afectar el sistema inmune. Alteran las funciones reproductivas directamente, si su estructura química es parecida o interactúa con alguna biomolécula endógena; indirectamente si provoca la activación o represión de alguna enzima o si su metabolismo crea otras sustancias nocivas; todo ello tendría efectos celulares en el tracto reproductivo o alteración en la homeostasis endocrina, lo cual conduciría a una morfología y fisiología anormal de los órganos y la consecuente falla en los procesos reproductivos (Sharara y Seifer, 1998). Estos daños son causados principalmente por las PM pues sus componentes son altamente tóxicos y llegan a las vías respiratorias bajas, pasan a la sangre y por lo tanto a todos los sistemas (Holstius et al., 2012; Perin et al., 2010; Veras et al., 2010; Sram, 1999).

2.2 Partículas Suspendidas

Las partículas suspendidas son un conjunto de materiales líquidos y sólidos que se agregan alrededor de un núcleo de carbón. Estos materiales pueden ser producto de procesos naturales como incendios forestales, erosión y erupciones volcánicas; ser de origen biológico como el polen o desechos biológicos; o provenir de fuentes antropogénicas: quema de combustibles, desechos industriales, fertilizantes, pesticidas, entre otros (Zuk et al., 2007). Los componentes de las PM pueden ser orgánicos como fenoles, ácidos, alcoholes, polen y microorganismos, e inorgánicos: nitratos, sulfatos, silicatos y metales (hierro, plomo, manganeso, zinc y vanadio) (SIMAT, 2011).

Por su tamaño las partículas suspendidas se clasifican en PST si su diámetro es igual o menor a 100 μm , PM_{10} cuyo diámetro es igual o menor a 10 μm y $\text{PM}_{2.5}$ cuando su diámetro es igual o menor a 2.5 μm . Los primeros estudios sobre la contaminación por estas partículas se centraron en las PST y posteriormente el objetivo fueron las PM_{10} pues se observó que dado su diámetro diminuto pueden traspasar las barreras nasales y faríngeas para llegar hasta los pulmones, actualmente se han incluido en los estudios a las $\text{PM}_{2.5}$ puesto que representan un mayor riesgo para la salud porque pueden llegar hasta la región alveolar y de ahí sus componentes o el catabolismo de éstos pasan al torrente sanguíneo, lo cual desencadenaría efectos dañinos en todos los sistemas y no solo en el respiratorio (Zuk et al., 2007; SIMAT, 2011; Rojas et al., 2003). Sus efectos dañinos están relacionados directamente con su tamaño, con el tiempo de exposición a ellas y con sus componentes. Estas partículas afectan, principalmente, a los sistemas respiratorio y cardiovascular pues ocasionan tos, dificultad para respirar, bronquitis crónica, infecciones respiratorias, agravar los síntomas de asma, ataques cardíacos, arritmias, aterogénesis, y trombogénesis (Donaldson et al., 2003; EPA, 2003; Zuk et al., 2007). Se estima que las partículas suspendidas son causantes del

9% de las muertes por cáncer de pulmón, 5% de los decesos por enfermedades cardiopulmonares y 1% de muertes por infecciones pulmonares en el mundo (WHO, 2012). Según el SIMAT (2011), en México se incrementa el riesgo de muerte prematura un 2% por cada $10 \mu\text{m}^3$ más en la concentración de PM_{10} .

Los daños a la salud se han atribuido a la presencia de metales en las PM; ya que éstos, por ejemplo el vanadio, pueden generar estrés oxidante lo que desencadena acetilación de histonas, transcripción del factor $\text{NF-}\kappa\beta$, entre otras alteraciones que causarían inflamación y daños a mayor escala o sistémicos (Donaldson et al., 2003).

2.3 Vanadio

El vanadio (V) es un metal de color grisáceo que se encuentra en el grupo VB de la tabla periódica entre los elementos de transición, su número atómico es 23 y su masa atómica relativa es 50.942, existe en los estados de oxidación de -1 a +5; tiene una densidad de 6.11 g/cm^3 , un punto de fusión 1950°C y de ebullición a 3600°C (Rodríguez-Mercado et al., 2006). Este metal ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre con una concentración aproximada de 100 mg/kg (ATSDR, 2009). El vanadio está presente con mayor abundancia en los estados V^{+3} , V^{+4} y V^{+5} , y se ha descrito que éstos tienen funciones biológicas como la síntesis de clorofila y micronutriente en algunas especies marinas; en el organismo se encuentra predominantemente como anión vanadato (VO_4^-) y como catión vanadilo (VO^{+2}). Debido a su uso industrial se han descrito las propiedades de varios compuestos inorgánicos de vanadio, el más comercial es el pentóxido de vanadio (V_2O_5) una sal de color amarillo, poco hidrosoluble con punto de fusión de 1750°C y de ebullición de 690°C , puesto que es un agente muy tóxico se ha establecido un límite de exposición ocupacional de 0.05 mg/m^3 (Rodríguez-Mercado et al., 2006)

2.3.1 Fuentes de emisión

El vanadio está presente en 65 minerales entre los que se cuenta la carnotita, roscolita, vanadita y patronita (ATSDR, 2009). Asimismo está presente en el petróleo crudo en complejos con otros metales, siendo el petróleo venezolano y el mexicano los que tienen la mayor concentración de vanadio, los combustibles derivados de éste petróleo tienen de 0.2 a $0.160 \mu\text{g/V}$. El carbón también tiene vanadio en una concentración aproximada de 14 a 56 mg/kg (Fortoul et al., 2011; WHO, 2001).

Dos tercios de las emisiones de vanadio se deben a actividades humanas como la quema de combustibles fósiles y carbón y su uso en la industria metalúrgica. La otra parte de las emisiones proviene de fuentes naturales: polvo continental, volcanes, aerosoles marinos, incendios forestales, se reporta que de estas fuentes se generan globalmente 8.4 toneladas de vanadio al año (Barceluox, 1999; Fortoul et al., 2007)

Se ha observado que la concentración de vanadio en la atmósfera es de 20-300 ng/m³ en las grandes ciudades, aunque se han alcanzado niveles más altos (10 mg/m³) en Nueva York y otras grandes urbes (Korbecki et al., 2012). En México se reportan concentraciones de 0.62 µg/m³ en zonas urbanas y 0.011 µg/m³ en áreas rurales (Fortoul et al, 2002), también se observó un aumento significativo en la concentración de vanadio en pulmones de residentes de la Ciudad de México en la década de 1990 respecto a aquellos habitantes de 1960 (Fortoul et al., 2002).

En lugares cercanos a industrias metalúrgicas o aquellas donde se utiliza vanadio se calcula que en el aire hay aproximadamente 1 µg/m³ de vanadio, mientras la exposición ocupacional se estima que es de 50 a 100 mgV/m³, alcanzando niveles de hasta 500 mgV/m³ (Barceloux, 1999).

2.3.2 Usos

El vanadio se extrae de los minerales que lo contienen (véase 2.3.1) para su uso en la industria. Se utiliza en pequeñas cantidades para el refinamiento final en la fabricación de acero, aleaciones no ferrosas, aleaciones ferrovanadio, brocas de tungsteno y magnetos superconductores pues proporciona mayor resistencia, maleabilidad y dureza a las aleaciones. También es usado como catalizador en la conversión de dióxido a trióxido sulfúrico durante producción de ácido sulfúrico y en la formación de plástico para la conversión de naftaleno a anhídrido ftálico. Se utiliza como agente colorante en pigmentos y tintas de colores café, verde o amarillo, para dar color y filtrar rayos ultravioletas en vidrios, y en la elaboración de reveladores fotográficos (Barceloux, 1999; WHO, 2001; ATSDR, 2009). En la industria se prefiere el uso de vanadio puro pues reacciona rápidamente con el carbón, el nitrógeno y el oxígeno a temperaturas sobre los 300°C (Barceloux, 1999).

Asimismo algunos compuestos de vanadio se han utilizado en materiales biomédicos como amalgamas, materiales para ortodoncia, prótesis ortopédicas, válvulas cardiovasculares; en suplementos alimenticios o multivitamínicos (Rodríguez-Mercado et al., 2006; ATSDR, 2009); también en modelos experimentales (en humanos y animales) como medicamentos para el manejo del metabolismo de la glucosa y de la insulina pues mediante varios mecanismos como la inhibición [mediante especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)] de proteínas tirosinas fosfatasa (PTB-1B, la cual desfosforila los receptores de insulina) se produce resistencia a la insulina; la activación de PKB/Akt permite el transporte de insulina por el GLUT4 y la inactivación de GSK3 estimula la síntesis de glucógeno a partir de glucosa (Korbecki et al., 2012).

2.3.3 Vías de exposición

Los efectos de cualquier tóxico dependen de la duración de la exposición, las características del compuesto, la rutas o vías de exposición del organismo, entre otros factores. En el caso de los compuestos de vanadio la población en general está expuesta al contacto, la inhalación o ingestión del vanadio.

Dérmica

Debido a la baja solubilidad de los compuestos de vanadio en agua y lípidos, no se han reportado efectos de éstos por la absorción mediante ésta vía (ATSDR, 2009), aunque al contacto, el vanadio puede producir irritación y dermatitis (SEPA, 2006).

Oral

La principal vía de exposición al vanadio es la oral, pues se encuentra de forma natural en frutas, vegetales, especies marinas y carnes rojas; del vanadio que se ingiere solo el 10% es absorbido (Rodríguez-Mercado et al, 2006). Se ha descrito que en las frutas, vegetales, grasas y aceites se encuentran de 1-5 µg/kg de vanadio; los granos, los alimentos marinos y las carnes rojas contienen de 5-30 µg/kg; algunas especias como la pimienta negra tiene la mayor concentración de vanadio: 987 µg/kg. Por todo ello se estima que en el Reino Unido en la dieta diaria se ingieren 13 µg/día de vanadio, mientras en Estados Unidos la ingesta se calcula entre 6-18 µg/día (EFSA, 2004).

La exposición al vanadio por la ingesta de agua es mínima, la concentración promedio es de 4.3 µg/l llegando hasta 70 µg/l en mantos acuíferos cercanos a zonas industriales o minas. El vanadio en el agua es producto de la erosión de los suelos y de actividades antropogénicas (Rodríguez-Mercado et al., 2006; Barceloux, 1999).

Inhalación

Se considera que mediante la inhalación de vanadio se absorbe una mayor cantidad (25%) de éste metal en comparación con cualquier otra vía de exposición (Rodríguez-Mercado et al, 2006), por lo cual las concentraciones en la atmósfera de este metal y la exposición ocupacional representan un riesgo para la salud ya que la inhalación de vanadio produce toxicidad intermedia (Barceloux, 1999).

El vanadio se encuentra en la atmósfera como complejos de óxidos de vanadio provenientes de fuentes antropogénicas o de fuentes naturales como partículas minerales trivalentes y menos solubles (Barceloux, 1999).

2.3.4 Toxicocinética

La inhalación e ingestión de vanadio son las rutas por las que los seres humanos están expuestos principalmente, se han hecho diversos estudios sobre la forma y tiempo en que éste metal actúa en el organismo después de entrar al cuerpo por alguna de las dos vías. Así pues, se reporta que después de una exposición por vía oral se absorbe aproximadamente el 3% del vanadio ingerido (WHO, 2001); la máxima absorción ocurre por la inhalación de algún compuesto de vanadio, siendo los de valencia +5 los más tóxicos (Barceloux, 1999), dónde más de un 76% del vanadio total es absorbido. El 90% del vanadio absorbido se encuentra en el plasma sanguíneo como vanadil adosado a la transferrina (principalmente) o a la albúmina (Barceloux, 1999), así viaja por

el torrente sanguíneo hacia los tejidos en 3 estados de oxidación: +3 (el cual puede ser oxidado a las formas +4 y +5), +4 y +5, éste último puede ser reducido a la forma +4 por diversos compuestos reductores componentes del plasma, sin embargo el pH neutro del organismo propicia la forma de V^{5+} , el cual entra a la célula preferentemente por canales de fosfato y mecanismos similares al transporte de cationes divalentes. En las células, se estima que del vanadio que ingresa a ellas el 61% se une a grupos fosfato, el 29% a proteínas, el 9% a radicales sulfhidrilo y vitaminas, el resto está libre. Ya en los tejidos el vanadio es acumulado como V^{4+} (VO^{2+}) (Rodríguez-Mercado et al., 2006), siendo huesos y dientes los que presentan la mayor concentración de vanadio (aproximadamente 25%) seguidos del hígado que acumula el 5%, el riñón que concentra el 4% y el bazo que acumula solo el 0.1%, asimismo se ha encontrado que los testículos pueden acumular el 0.2% del vanadio que es absorbido después de una exposición (WHO, 2001). El vanadio no acumulado se desecha en forma bifásica, es decir, un alto porcentaje se elimina rápidamente en aproximadamente 20 horas y el resto se elimina en un lapso de 40 a 50 días; mediante la orina se elimina el 90% de vanadio no acumulado y solo el 10% es excretado en la heces (Barceloux, 1999; Rodríguez-Mercado et al., 2006).

2.3.5 Mecanismos de acción

Las alteraciones del organismo producidas por el vanadio, se deben principalmente a su capacidad oxidativa (Barceloux, 1999). Como se mencionó el vanadio es acumulado en el organismo en su estado de oxidación 4+, éste ion puede ser oxidado al estado 5+ mediante la reacción de Fenton liberando un radical hidroxilo, asimismo el V^{5+} puede ser reducido por NADPH al estado 4+ generando peróxido de hidrógeno (Korbecki et al., 2012), el vanadio también puede reaccionar con el radical superóxido resultando el radical peroxovanadilo (Samet et al., 1999). El exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) causa la peroxidación de los lípidos de membrana dañándola y por consiguiente a la célula, también permite la liberación de citocromo C de la mitocondria lo que inicia la vía de apoptosis mediada por las caspasas 3 y 9, activando la proteína cinasa C (PKC) (Afeseh et al., 2009). Además las ROS generadas por los compuestos de vanadio y los iones ortovanadato, debido a su similitud con los iones ortofosfato, son inhibidores de tirosinas fosfatasas (Mailhes et al., 2003; Samet et al., 1999; Korbecki et al., 2012) y de la bomba $ATPase_{Na+K+}$, igualmente interfiere con otras enzimas como las ATP-hidrolasas, adenilatocinasa, ribonucleasa y gliceraldeído-3-fosfato hidrolasa (Barceloux, 1999). Asimismo se ha reportado que el vanadio activa proteínas cinasas activadoras de mitógenos (MAPKs) (Fortoul et al., 2011), el factor de transcripción $NF-\kappa\beta$ junto con otras proteínas relacionadas con la inflamación como interleucinas y quimosinas, ambos mediante la generación de ROS (Korbecki et al., 2012). El DNA también es dañado por el vanadio y las ROS que genera, ya que causa la oxidación de bases pirimídicas, rompimientos de cadena sencilla y micronúcleos lo que tendría como consecuencia el arresto mitótico, inducción de la transcripción, errores de replicación e inestabilidad genética (Fortoul et al., 2011; Korbecki et al., 2012).

2.3.6 Daños a la salud

En trabajadores ocupacionalmente expuestos y voluntarios, se ha observado que la inhalación de vanadio provoca principalmente daños en las vías respiratorias: tos, hemorragias nasales, rinitis, irritación en garganta y boca, dolor en el pecho, bronquitis y neumonitis (Barceloux, 1999; Rodríguez-Mercado et al., 2006). No obstante los daños no solo se remiten al sistema respiratorio pues se ha visto que el vanadio también tiene efectos en el tracto gastrointestinal pues una exposición aguda puede provocar vómito, diarrea y movimiento intestinal aumentado, además de coloración verdosa en la lengua. El sistema circulatorio también se ve afectado tras la inhalación de vanadio ya que se ha reportado disminución en los grupos sulfhidrido, albúmina y colesterol en la sangre (Rodríguez-Mercado et al., 2006). También se han descrito efectos en el sistema nervioso como temores, neurastenia y algunas otras deficiencias motoras (Afeseh, 2009).

En modelos animales, se ha visto que la inhalación de vanadio tiene efectos adversos en varios órganos y sistemas. En huesos y dientes se ha observado un aumento en la concentración de vanadio en éstos proporcional al tiempo de exposición, ocasionando: disminución de la composición inorgánica de los huesos, rugosidad y desorden de la estructura del esmalte dental, y malformaciones de los incisivos de ratón (Fortoul y Ruiz, 2007). En cuanto al sistema circulatorio se encontró que la inhalación de vanadio causa anemia normocrómica normocítica con bajos niveles de hemoglobina y hematocrito, incremento en el número de leucocitos, neutrófilos, linfocitos, fibrinógeno y proteínas séricas totales en sangre, se observó también que aumentó el conteo de plaquetas y su morfología cambió a megaplaquetas, asimismo incrementó el número y tamaño de megacariocitos en médula ósea y bazo; algunos de esto hallazgos sugieren un estado de inflamación crónica (González-Villalva et al., 2009; Fortoul et al., 2011). En el hígado se ha demostrado la presencia de focos de infiltrado inflamatorio, células binucleadas con meganúcleos lo que sugiere actividad regenerativa, y un aumento de peroxidación lipídica en las membranas celulares (Ávila-Costa y Fortoul, 2007). En timo se ha visto que la inhalación de vanadio altera la morfología de éste órgano pues cambió la distribución corteza-médula así como la proporción de las células (Piñón-Zarate et al., 2007). En el bazo, la inhalación de vanadio provocó esplenomegalia, aumento de la pulpa blanca e incremento en tamaño y número de megacariocitos (Fortoul et al., 2011). En pulmón se ha observado que la inhalación de V_2O_5 causa un incremento de citosinas como IL-6 y TNF- α en el epitelio bronquiolar, engrosamiento de la capa muscular de los bronquios y disminución de las células bronquiales no ciliadas (Fortoul et al., 2007). Asimismo se han observado efectos neurotóxicos, tales como disminución de la densidad de espinas dendríticas de las células granulares, así como apoptosis y necrosis neuronal en el bulbo olfatorio; disminución de la marca para tirosina hidroxilasa y pérdida de espinas dendríticas en el cuerpo estriado; necrosis de células piramidales y granulares, y disminución de espinas dendríticas en el giro dentado del hipocampo; deficiencia de la memoria espacial y del olfato, disrupción de la barrera hematoencefálica, entre otras (Colín-Barenque et al., 2009; Ávila-Costa et al., 2007). Asimismo se han reportado rompimientos de cadena sencilla en el DNA y la formación de micronúcleos (Fortoul et al., 2011).

2.4 Vanadio y reprotoxicidad

El sistema reproductor masculino de ratones expuestos a la inhalación de vanadio también se ha visto alterado pues se observó necrosis de espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli, decremento de γ -tubulina y actina en células germinales, de Sertoli y de Leydig, así como deslocalización y disminución de conexina 43 en testículos de ratones CD1 (Fortoul et al., 2011). Otros estudios han observado que el vanadio, administrado en diferentes dosis, vías de administración y compuestos, daña la morfología (bajo peso y necrosis) y fisiología testicular pues se ha reportado una disminución en el conteo y motilidad de espermatozoides (Domingo, 1996; WHO, 2001; Morgan y El-Tawil, 2003; Fortoul et al., 2011).

La mayoría de los estudios reprotóxicos describen daños provocados en embriones, fetos y recién nacidos por diversos compuestos de vanadio administrados por vía oral, intraperitoneal o intravenosa, como: incremento en el número de reabsorciones, pérdidas pre y post implantación, muertes fetales y nacimiento de individuos con bajo peso, asimismo se ha visto disminuido el número de sitios de implantación y fetos viables (Domingo, 1999; Morgan y El-Tawil, 2003; EPA, 2011). En otros trabajos se observan efectos teratogénicos en su mayoría relacionados al deficiente desarrollo del esqueleto (retardo o bajo grado de osificación, extremidades cortas o deformes) (Altamirano et al., 1993; Domingo, 1996; Morgan y El-Tawil, 2003) y alteraciones en el sistema nervioso (Faría de Rodríguez et al., 1998; Poggioli et al., 2001, Morgan y El-Tawil, 2003); de igual forma se ha visto que la exposición a vanadio aumenta la duración del ciclo estral en ratas y reduce el número de hembras que ciclan (Morgan y El-Tawil, 2003; EPA, 2011).

En el modelo de inhalación de nuestro laboratorio Martínez-Pedraza en 2007, reportó daños en el epitelio vaginal, aumento de folículos atrésicos en estadios avanzados y disminución del receptor de estrógenos beta en ovario de ratones CD1. Sin embargo siguen siendo pocos los estudios que se enfocan en los efectos que tiene el vanadio en el sistema reproductor femenino por lo que se necesitan más estudios al respecto; sobre todo por la inhalación de compuestos pentavalentes, debido a que es la vía y los compuestos que representan un mayor riesgo a la salud.

2.5 Sistema reproductor femenino de ratón

El aparato reproductor femenino de todos los mamíferos está formado por los ovarios, oviductos, el útero, el cérvix, la vagina y la vulva (Fig. 3).

El desarrollo embrionario de éstas estructuras de origen mesodérmico, ocurre en los inicios del desarrollo embrionario (10 días después del coito, en ratón) cuando en la pared del saco vitelino cerca al alantoides se diferencian las células germinales primitivas (CGP, de origen endodérmico) (Eynard et al., 2008) que migran hacia las regiones adyacentes a los riñones (también en desarrollo) (Gilbert, 2005), una vez ahí actúan como señales para que las células del mesonefros y el epitelio celómico proliferen formando las dos crestas genitales (Campbell y Wein, 2009). La

proliferación de éstas células forma un agregado denominado “blastema gonadal” a partir del cual se diferencian los cordones sexuales, arreglo de células epiteliales delimitados por una lámina basal que contienen las CGP; y el estroma donde se encuentran células mesenquimatosas y vasos sanguíneos, formándose así las gónadas indiferenciadas (11 días después del coito en ratón) que presentan una médula (mesénquima) y una corteza (epitelio germinal) (Jiménez, 2003). Los cordones sexuales se desplazan hacia la médula y degeneran mientras el epitelio germinal se desarrolla en cordones sexuales corticales y contienen a las CGP, éstos forman cúmulos que rodean, cada uno, una célula germinal; todo ello dará origen a los ovarios. Por otro lado comienza: el desarrollo de dos conductos paramesonéfricos müllerianos por la invaginación del epitelio celómico (Campbell, 2009), y la involución de los conductos mesonéfricos de Wolff. La fusión de la parte caudal de los conductos müllerianos forma el conducto uterovaginal que dará lugar al útero y porción superior de la vagina, mientras la porción no fusionada se convierte en las trompas de Falopio; en éstas estructuras el músculo y el tejido conectivo derivan del mesénquima (Eynard et al., 2008; Welsh, 2008).

2.5.1 Ovario

En el ratón los ovarios son dos estructuras esféricas dónde se desarrollan los ovocitos y se sintetizan hormonas esteroideas, están cubiertos cada uno por una membrana delgada o bursa, compuesta por mesotelio (vasos sanguíneos, nervios y músculo liso) y se sitúan en la parte caudal de los riñones y están unidos a la pared dorsal del cuerpo por el mesovario. La superficie externa del ovario está cubierta por el epitelio germinal, formado por una capa de células cúbicas (Treuting y Dintzis, 2012). En la estructura interna del ovario es posible distinguir dos regiones: la medular y la cortical; la médula está formada por tejido conectivo fibroso, contiene numerosos vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La zona cortical del ovario es avascular y está compuesta por un estroma formado de tejido conectivo fibroelástico, en esta región también se encuentran folículos ováricos en diferentes etapas de maduración y los cuerpos lúteos (Fig. 4) (Hedrich, 2012). Los folículos están formados por capas de células foliculares y células de la teca, dispuestas concéntricamente alrededor de un ovocito. Se consideran cinco tipos de folículos según su estado de madurez, los folículos primordiales están formados por un ovocito primario rodeado de una capa de células foliculares aplanadas. Los folículos primarios presentan varias capas de células foliculares cuboidales (ahora denominadas células de la granulosa) que rodean al ovocito, asimismo las células estromales que rodean al folículo primario se diferencian en células de la teca interna (vascular) y externa. Los folículos secundarios se forman por numerosas capas de células de la granulosa y células de la teca, también se observan espacios entre las células de la granulosa que se llenan de líquido folicular (antro folicular). Los folículos de Graaf contienen al ovocito que será ovulado rodeado por una capa de glicoproteínas y proteoglicanos (zona pelúcida), que a su vez está limitada por una sola capa de células de la granulosa (corona radiada), el antro folicular tiene su máximo tamaño. Cuando se libera el ovocito las células de la granulosa y de la teca se hipertrofian formando el cuerpo lúteo (Green, 2007).

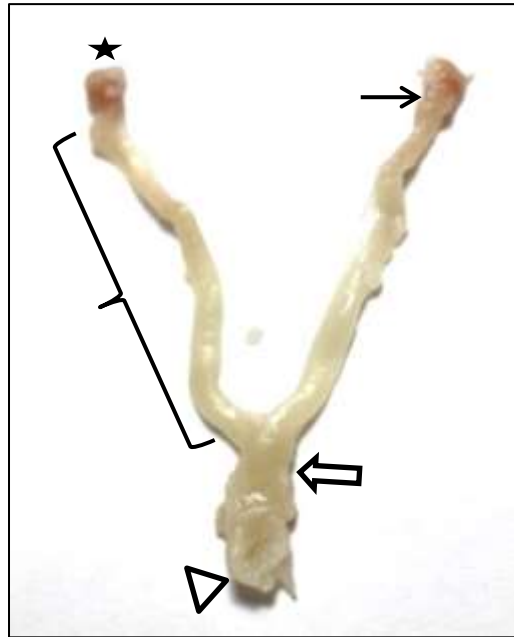


Figura 3. Aparato reproductor femenino de ratón CD1. Se observan los ovarios (*), el oviducto (→), el útero: cuernos o tubos ({}), y vagina (Δ).

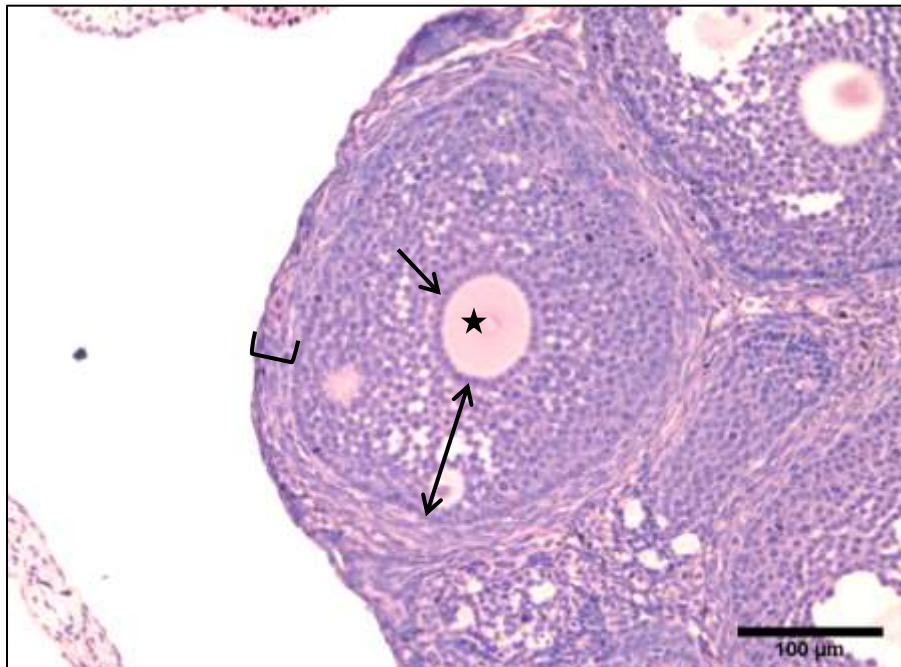


Figura 4. Corte transversal de ovario de ratón CD1. Se observa un folículo secundario: ovocito (*), corona radiada (→), zona o capa granulosa (↔) y la teca folicular ([]).

2.5.2 Oviducto

El oviducto es una estructura pareada tubular contorneada que unen a los ovarios con el cuerno uterino respectivo. Están formados por una porción muscular, localizada entre la pared uterina; un istmo, porción más estrecha del oviducto; un ampulla, región que se ensancha para conectar el istmo con el infundíbulo; un infundíbulo y una fimbria que se abre en el espacio periovárico. El infundíbulo, el ampulla y la fimbria están formados por un epitelio con células cilíndricas simple ciliadas y entre ellas células cúbicas no ciliadas; el istmo presenta un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con algunas células ciliadas; la lámina propia de estas estructuras consiste en una capa delgada de tejido conectivo con pocas células elásticas y fibras de músculo liso. La capa muscular está formada por fibras de músculo liso arregladas en forma circular, ésta se ensancha al aproximarse al útero. El oviducto está rodeado por una capa adventicia (Green, 2007).

2.5.3 Útero

En los ratones el útero es una estructura tubular en forma de "Y", pues está dividido en dos cuernos que se unen formando el cuerpo del útero. Este órgano se sostiene a la pared lateral del cuerpo mediante el mesometrio, ligamentos anchos que llevan vasos sanguíneos y linfáticos así como nervios. El cuerpo uterino en su parte superior está dividido por un septo en dos cavidades, mientras la parte inferior no está dividida y se continúa con la vagina (Green, 2007).

Los cuernos uterinos están formados por una capa mucosa, una muscular y una adventicia (Fig. 5). La mucosa, también llamada endometrio, está formada por un epitelio cilíndrico (que cambia de simple a pseudoestratificado según la etapa del ciclo estral) que se continúa con glándulas tubulares localizadas en la lámina propia endometrial, compuesta de tejido conectivo con fibrocitos, fibras de colágeno III, linfocitos y células tipo fibroblasto o células fusiformes, las cuales tienen receptores esteroideos (Conti et al., 2004; Treuting y Dintzins, 2012). Las glándulas se forman a partir de invaginaciones del epitelio luminal 5 días después del nacimiento, a diferencia de las demás estructuras del útero que se forman a los 12-15 días después del coito. Estas glándulas secretan, transportan y sintetizan sustancias complejas (factor inhibitorio de la leucemia, calcitonina, factores de crecimiento y citocinas) llamadas en conjunto histotrofo que son esenciales para la receptividad uterina y la implantación del embrión. La remodelación del endometrio y de las glándulas así como sus secreciones están reguladas por estrógenos, progesterona, interferón- γ , prolactina y hormona del crecimiento (Gray et al, 2011).

La capa muscular del útero o miometrio, está formada por una capa interna circular y una externa longitudinal de fibras de músculo liso separadas por una capa delgada de tejido conectivo vascular. La capa más externa o perimetrio está formada por una túnica adventicia y serosa, formada de una delgada capa de células epiteliales y otra de tejido conjuntivo que se continúa con el mesometrio. (Green, 2007; Hedrich, 2012).

El útero es un órgano complejo que tiene como principal función el proveer un sitio de implantación para el ovocito fecundado. Una vez formado el cigoto, el cuerpo lúteo se mantiene produciendo progesterona, la cual estimula al endometrio para segregar glucógeno creando un medio del que se nutrirá la mórula antes de implantarse y al mismo tiempo se vuelve altamente vascularizado. El endometrio aumenta el tamaño y número de sus células, así como el número de moléculas de adhesión celular (CAMs) para que, ya formado, el blastocisto se adhiera a él y comience el proceso de implantación (Sherwood et al., 2013). Ya implantado el embrión, la formación de la placenta es indispensable para la nutrición de éste y es mediante los vasos sanguíneos uterinos que se conecta con la circulación sanguínea materna que le otorga nutrientes y sustancias necesarias para su desarrollo; por otro lado el útero regula la funcionalidad del cuerpo lúteo que segrega progesterona, mediante la secreción de prostaglandinas F2 α , (Chards y Grudzinskas, 2003).

Asimismo, la posición anatómica del útero y el miometrio mantienen al embrión protegido de daños físicos o mecánicos; asimismo su arreglo especial de fibras musculares (circular interna y longitudinal externa), la presencia de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios además de rodearse de fibras elásticas facilitan la expulsión del feto al nacer (Chards y Grudzinskas, 2003); también se ha propuesto que las contracciones uterinas promueven el paso de los espermatozoides hacia los oviductos para la fecundación (Gilbert, 2005).

La histología y fisiología del útero es regulada por la acción de hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona), las cuales a su vez determinan el ciclo estral o reproductivo.

2.5.4 Vagina

La vagina es una estructura cilíndrica, compuesta por tres capas (Fig. 6). La más externa es la capa adventicia compuesta por tejido conectivo fibroso. La capa intermedia está formada por una capa circular interna y una capa externa longitudinal de músculo liso. La capa más interna del oviducto es la mucosa, formada por un epitelio plano estratificado y una lámina propia de tejido conectivo laxo altamente vascularizado. El epitelio se organiza en estratos, el estrato basal comprende a las células más inmaduras y que están en contacto con la membrana basal; el estrato parabasal está formado por las células que proliferaron del estrato basal; en el estrato suprabasal se observan células parabasales que se han diferenciado y se descaman en respuesta a los cambios cíclicos de los niveles hormonales de acuerdo al ciclo reproductivo o estral (Green, 2007; Hedrich, 2012).

2.5.5 Ciclo estral

El ciclo reproductivo o estral es el intervalo de tiempo que hay entre una etapa de celo o receptiva (durante la ovulación) y otra, comprende los cambios fisiológicos inducidos por hormonas sexuales (GnRH, FSH, LH, estrógenos, progesterona) en todas las hembras adultas de mamífero. Estos cambios son visibles tanto en la conducta como en los órganos reproductores (ovario, útero, vagina) (Hill y Wyse, 2006).

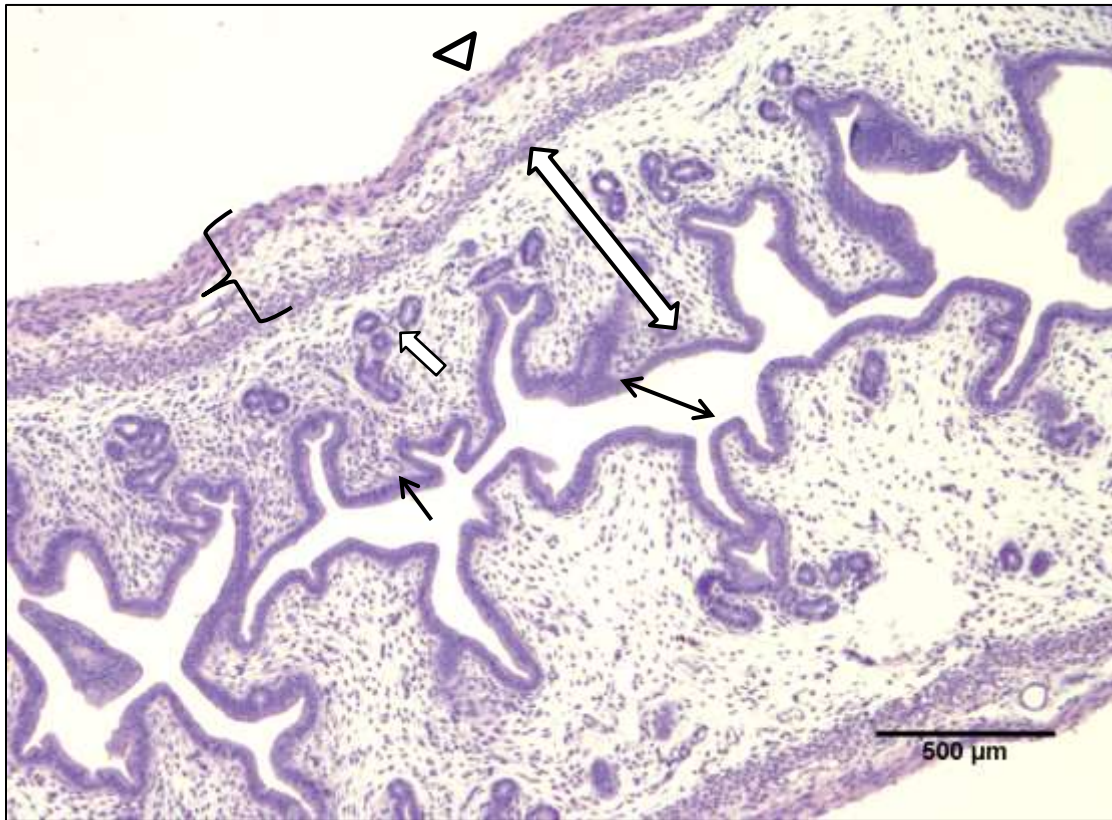


Figura 5. Corte longitudinal de útero de ratón CD1. Es posible distinguir el endometrio: lumen uterino (\leftrightarrow), el epitelio (\rightarrow), las glándulas (\updownarrow), el estroma (\leftrightarrow); el miometrio ($\{$) y el perimetrio (Δ).

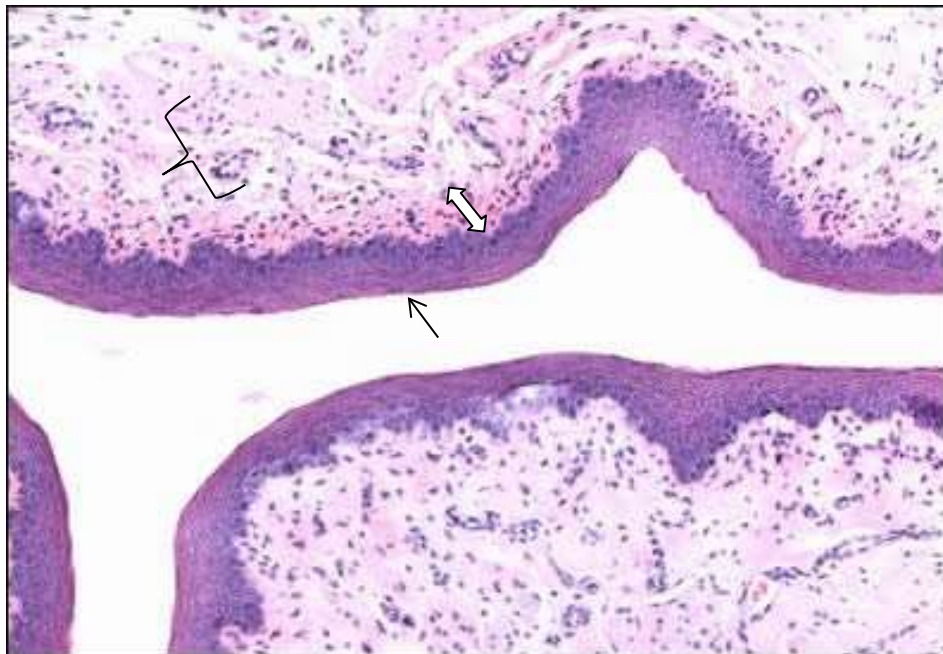


Figura 6. Corte longitudinal de la vagina de ratón. Se observan el epitelio estratificado (\rightarrow), la lámina propia (\leftrightarrow) y la capa muscular ($\{$). Tomado y modificado de Atlas of laboratory mouse (Conti et al., 2004).

En el ratón cada ciclo estral dura 4 o 5 días y comienza a las cuatro semanas de edad, poco después de la apertura vaginal. El ciclo se divide en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. En las primeras etapas se observa crecimiento celular en el tracto genital femenino y ocurre la ovulación; el metaestro se caracteriza por la degeneración del tracto genital; la última etapa es un periodo de reposo o crecimiento lento (Allen, 1992; Green, 2007). Particularmente las secreciones vaginales que contienen células de descamación pueden utilizarse para establecer la etapa en la cual se encuentra la hembra pues reflejan la estructura del epitelio vaginal (Fig. 7), el cual al igual que la morfología ovárica y uterina cambian dependiendo de la etapa del ciclo estral:

Proestro. El epitelio vaginal presenta numerosas capas de células epiteliales nucleadas con un incremento de células cornificadas, la secreción contiene numerosas células epiteliales nucleadas en clusters o individuales. En el ovario hay folículos grandes con mucho licor folicular, pocas mitosis en el epitelio germinal, que reviste al ovario, y en las células foliculares. En el útero las células de la mucosa endometrial crecen formando un epitelio cilíndrico, hay alta actividad mitótica aunque también se observa degeneración celular en el estroma y el epitelio, poco infiltrado inflamatorio e hiperemia en el estroma, el lumen comienza a dilatarse conforme avanza la etapa. En esta etapa preovulatoria el nivel de estrógenos aumenta y se libera más LH y FSH (Allen, 1992; Westwood, 2008; Caligioni, 2009).

Estro. En la vagina el epitelio cambia de células nucleadas a células cornificadas, las cuales se observan en la secreción, no hay mitosis ni leucocitos. En el ovario ocurre la ovulación, hay numerosas mitosis en el epitelio germinal y en las células foliculares, comienza a degenerar el cuerpo lúteo. En el útero, se observa mayor degeneración (necrosis) en las glándulas y el epitelio (que ahora es muy evidente), baja la actividad mitótica, hay infiltrado de leucocitos, la dilatación del lumen llega a su máximo y persiste hasta el final de la etapa. El nivel de estrógeno llega a su máximo y persiste hasta el término de la etapa, mientras los niveles de LH y FSH permanecen bajos (Allen, 1992; Westwood, 2008; Caligioni, 2009).

Metaestro. En la vagina se observan capas de células epiteliales nucleadas y cornificadas así como leucocitos, por lo que en la secreción se observan estos tres tipos celulares. En el ovario, el cuerpo lúteo crece, aumenta la atresia folicular. En el útero, el epitelio continúa degenerando pero también se observa actividad mitótica, hay infiltrado de leucocitos y el lumen comienza a contraerse. La concentración de estrógenos en plasma disminuye (Allen, 1992; Westwood, 2008; Caligioni, 2009).

Diestro. Hay pocas capas de células epiteliales en la vagina y muchos leucocitos, al final de la etapa comienza a crecer el epitelio, la secreción presenta numerosos leucocitos. Los folículos ováricos crecen, el cuerpo lúteo degenera y se forma tejido fibroso. El útero se observa pequeño e inactivo, el estroma tiene pocos vasos sanguíneos y el lumen está contraído, el epitelio es cúbico simple y muestra muy poca degeneración, en las glándulas hay pocas mitosis pero hacia el final de la etapa aumentan e incluso presentan algunas secreciones. Los niveles de estrógenos comienzan a elevarse mientras la LH y la FSH continúan en bajas concentraciones (Allen, 1992; Westwood, 2008; Caligioni, 2009).

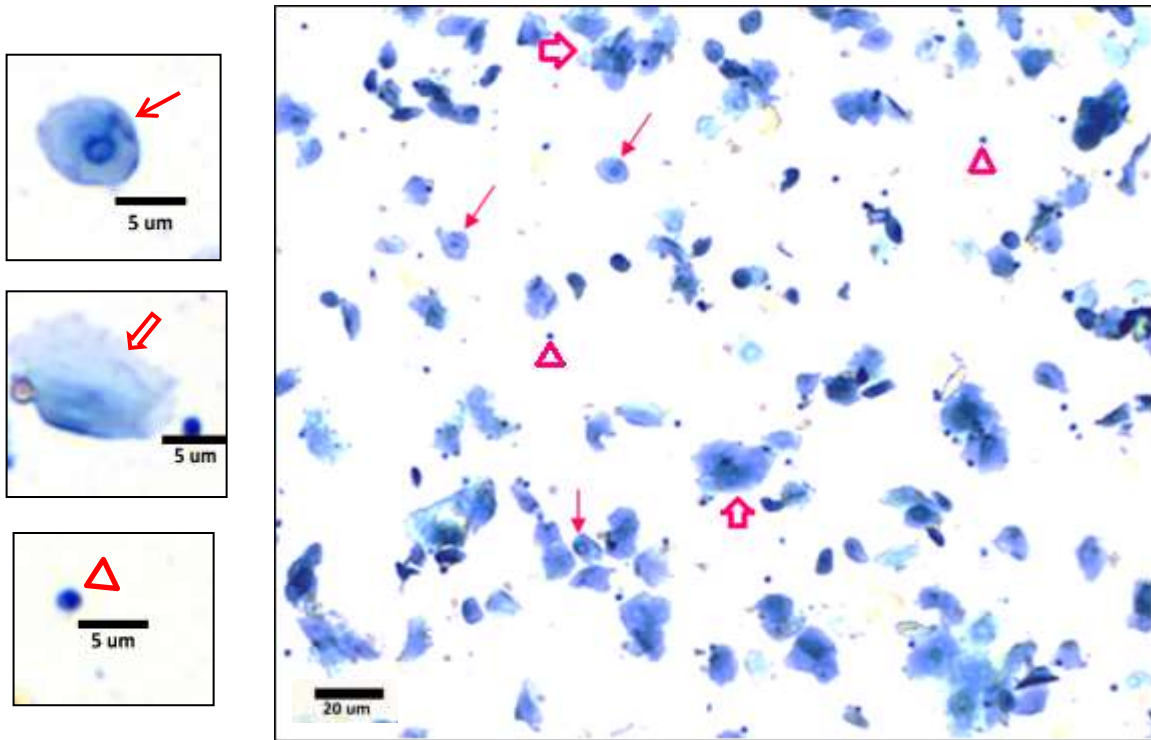


Figura 7. Citología exfoliativa. Células de descamación vaginal de un ratón CD1 en la etapa de metaestro, se observan células nucleadas (\rightarrow), células cornificadas ($\hat{\uparrow}$) y leucocitos (Δ). Durante el ciclo estral en el proestro observamos únicamente células nucleadas, en el estro solo células cornificadas, en el diestro solo leucocitos y en el metaestro los tres tipos celulares.

Estos cambios tanto morfológicos como fisiológicos a lo largo del ciclo estral son resultado de la acción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo, estructura unida a la parte inferior del cerebro, segrega oxitocina y hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) de forma pulsátil al sistema portahipofisiario y de ahí a la hipófisis, donde se unen a receptores de la membrana celular. La hipófisis es una glándula endocrina compuesta por dos partes: la adenohipófisis y la neurohipófisis, ésta última almacena la oxitocina producida por el hipotálamo. La adenohipófisis produce y secreta la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) y las secreta hacia el ovario en pulsos que son regulados por la presencia de GnRH; la FSH promueve la esteroidogénesis en el ovario, el crecimiento y maduración de los folículos, mientras la LH regula la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y el mantenimiento de éste (Palma, 2001).

Los ovarios ante el estímulo de FSH y LH producen y secretan estrógenos y progesterona, entre otras hormonas. La progesterona es producida por el cuerpo lúteo como respuesta a la LH después de la ovulación. Sus órganos blanco son el hipotálamo, la vagina, la vulva, y el útero. En éste último, produce el aumento en altura del epitelio, las glándulas se vuelven más largas, enrolladas y ramificadas, y segregan sustancias formadas por glicoproteínas, minerales, entre otros elementos; la progesterona también inhibe las contracciones del miometrio (Palma, 2001).

Los estrógenos son producidos por los folículos ováricos: después de que la LH interacciona con su receptor en las células de la teca interna del folículo, éstas producen andrógenos que son transportados a las células de la granulosa, una vez ahí la FSH estimula un sistema enzimático aromatizante que convierte los andrógenos en estrógenos, éstos pasan a las células de la teca interna y de ahí a la circulación sanguínea. De ésta forma llegan a los órganos blanco (sistema nervioso central, vulva, vagina, útero y oviducto) dónde actúan mediante o como: un receptor intracelular nuclear, interacción con la bicapa lipídica de la membrana celular, interacción con receptores membranales de dopamina, de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y de factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I); o activación de segundos mensajeros, unión a receptores de membrana celular e interacción directa con el DNA. En el útero, los estrógenos promueven la proliferación celular del epitelio luminal y de las glándulas del endometrio, así como la secreción de éstas; producen hiperemia en el estroma; en el miometrio propician la hipertrofia de ambas capas musculares (longitudinal y circular) y sensibilizan sus células a la oxitocina, favoreciendo su contractibilidad (Tan et al., 1999; Palma, 2001; Groothuis et al., 2007).

En general existen dos isoformas del receptor de estrógenos (ER): el alfa (α) y el beta (β), ambos pertenecen a la familia de receptores nucleares, éstos modulan la transcripción de secuencias reguladoras de DNA, uniéndose directamente o reclutando coactivadores o correpresores; las dos isoformas del ER se activan por el cambio conformacional ocasionado por la unión preferente al 17- β estradiol (Hewitt y Korach, 2003). En el útero el receptor α (ER α) es el más abundante y se localiza en el epitelio, en las glándulas, en la lámina propia y en el miometrio (Winuthayanon et al., 2010). La actividad y niveles de expresión de este receptor dependen del ciclo estral y de los niveles hormonales ocasionados por éste, asimismo se ha demostrado que la presencia de 17- β estradiol incrementa los niveles del ER α en el útero (Tibbetts et al., 1998), observándose la máxima expresión durante el estro en el epitelio, en el diestro se observa mayor expresión en la lámina propia y glándulas, mientras en el miometrio su expresión no cambia durante el ciclo estral en ratas (Wang et al., 2000).

Se ha observado que el ciclo estral puede ser alterado por factores sociales como la introducción o ausencia de machos, la presencia de hembras nuevas (Marsden y Bronson, 1964 y 1965) y estar en grupos numerosos (Whitten, 1959); por factores alimenticios como la restricción calórica (Halberg y Visscher, 1952), el decremento en la ingesta y la pérdida de peso corporal (Terry et al, 2005); por factores ambientales como la exposición a ciertos químicos [fitoestrógenos, DDT, DES, clorotriazinas (Crisp et al., 1997)], o metales como el cadmio, el mercurio, el manganeso, el cromo y el vanadio (Athar y Vohora, 1995; Apostoli y Catalani, 2011; NTP, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

El petróleo mexicano contiene altas cantidades de vanadio, éste metal es emitido a la atmósfera por la quema de combustibles fósiles y se adosa a las $PM_{2.5}$, las cuales sobrepasan los límites recomendados en la ZMVM. Se ha observado que éstas partículas afectan la función reproductiva debido a los metales que contienen, por lo que es importante saber qué efectos tiene el vanadio, en la morfofisiología uterina, pues este órgano es importante en el desarrollo embrionario, la gestación y procesos fisiológicos esenciales para el éxito reproductivo.

4. HIPÓTESIS

Si el vanadio tiene efectos reprotóxicos, será posible que la inhalación de pentóxido de vanadio modifique la concentración de estrógenos y progesterona en sangre, por lo que el ciclo estral se verá alterado y, en consecuencia, también la morfología uterina y la presencia del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en éste órgano.

5. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inhalación de vanadio sobre la morfofisiología uterina, y relacionar los cambios histológicos y la presencia de $ER\alpha$ con los niveles de progesterona y estrógenos en sangre durante el ciclo estral de ratones hembra CD1.

4.2 Objetivos particulares

- Identificar las etapas del ciclo estral de ratones hembra CD1 controles y expuestos a la inhalación de vanadio mediante citología exfoliativa vaginal.
- Cuantificar las concentraciones en suero de 17β -estradiol y progesterona empleando la técnica de Radioinmunoensayo.
- Analizar los cambios morfológicos en el útero de animales controles y expuestos, mediante morfometría.
- Determinar la presencia de $ER\alpha$ en células uterinas de ratones expuestos y controles usando la técnica de inmunohistoquímica.

6. MÉTODO

6.1. Modelo experimental

Se utilizaron 40 ratones hembra CD1 adultos de 30-35 gramos (g) de peso, sin restricciones de alimentación ni agua y un periodo luz-oscuridad 12:12 horas (h), los cuales se dividieron en dos grupos de 20 individuos cada uno. El grupo denominado “vanadio” se sometió a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02 M una hora, dos veces por semana, durante cuatro semanas; por otro lado el grupo “control” inhaló vehículo (agua destilada) en el mismo esquema. Los animales fueron pesados diariamente para evaluar posibles cambios en el peso corporal en respuesta a los tratamientos.

Para la inhalación de V_2O_5 y vehículo, se colocó a los animales en una caja de acrílico transparente de 45x21x35 cm conectada a un nebulizador UltraNeb®99, el cual contenía V_2O_5 (grupo vanadio) o vehículo (grupo control) (Fig. 8).

6.2. Citología exfoliativa vaginal

Utilizando una micropipeta se hicieron lavados vaginales con 25 μ l de PBS para obtener las células de descamación vaginal (Fig. 9). La muestra obtenida se colocaba en un portaobjetos y se teñía con azul de metileno al 1%, para observarla en el microscopio y así determinar el tipo celular predominante. Todo lo anterior con todos los animales de ambos grupos, 7 días a la semana durante las cuatro semanas de inhalación. Asimismo se llevó un registro de la etapa del ciclo estral y el peso diarios de cada uno de los animales.

6.3. Toma de muestras

Después de las cuatro semanas de inhalación de V_2O_5 o vehículo, se realizó el sacrificio de los animales. Se anestesiaron con 200 μ l de pentobarbital sódico, se obtuvo una muestra de sangre directo del ventrículo derecho utilizando una jeringa para insulina de 1 ml (fig. 10), posteriormente se perfundieron por punción cardiaca, primero con solución salina al 0.9% y después con formaldehído amortiguado al 4%. Después se extrajo el útero (Fig. 11) y se colocó en 2 ml de formaldehído amortiguado al 4% durante un día, al cabo del cual se lavaron los órganos con PBS para procesarlos con la técnica histológica convencional y así obtener cortes de 3 μ m seriados con tinción hematoxilina-eosina (HE) y cortes en blanco para hacer inmunohistoquímica.



Figura 8. Nebulizador y caja de acrílico. Una vez introducidos los ratones y la solución a inhalar, se sellaba la caja totalmente.



Figura 9. Colecta de secreción vaginal. Se muestra la manera de tomar al ratón e introducir en la vagina la punta de la micropipeta con 25 μ l de PBS para vaciar el líquido, succionarlo de nuevo y así obtener las células de descamación del epitelio vaginal.



Figura 10. Colecta de sangre. Después de anestesiarse y diseccionar a cada ratón se extrajo sangre directa del corazón, como se muestra en la imagen utilizando una jeringa para insulina.

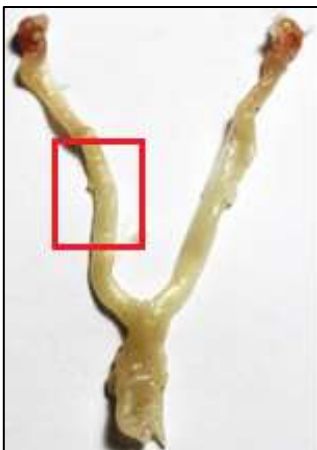


Figura 11. Tracto reproductor femenino de ratón. Se indica la zona del cuerno uterino que se eligió para su procesamiento con la técnica histológica convencional para tinción HE y cortes en blanco.

6.4. Radioinmunoensayo (RIA)

Las muestras de sangre de cada uno de los ratones se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos (min) dos veces para obtener el suero y posteriormente cuantificar los niveles de 17 β -estradiol (E2) y progesterona (P4), mediante la técnica de Radioinmunoensayo (RIA):

Se colocaron 100 μ l de suero problema y 1000 μ l de hormona marcada (¹²⁵I progesterona o ¹²⁵I 17 β -estradiol) en un tubo de propileno marcado con anticuerpo (anti-P4 o E2) de conejo hembra (tubos y hormonas del kit comercial Coat-A-Count®). Una vez preparados los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente por 3 hrs, después de las cuales se decantó el sobrenadante. Finalmente se colocaron los tubos en un contador de centelleo para evaluar la concentración de la hormona marcada, pues a mayor concentración de ésta menor concentración de la hormona no marcada proveniente del suero problema. Para esto último se realizó una curva (por duplicado) de cada hormona marcada, dónde se utilizaron concentraciones conocidas de ésta y así obtener el equivalente en radiactividad.

6.5. Morfometría

Del útero se procesó la región donde se dan las implantaciones en el cuerno uterino y fue la misma para todos los animales (ver Fig. 11). De los cortes histológicos transversales seriados (teñidos con HE), se eligieron 10 de cada individuo de ambos grupos para su análisis en el microscopio. Se observaron 30 campos por grupo, con un microscopio Olympus CH30 al objetivo 40x y se midió el grosor del epitelio, de la lámina propia y del miometrio; se midió únicamente el diámetro de las glándulas con forma circular (despreciándose aquellas que fueran irregulares), y se contabilizó el número de las glándulas uterinas (Fig. 12). Se agruparon las mediciones de acuerdo al grupo experimental (control o vanadio) y la capa uterina (epitelio, glándulas, lámina propia o miometrio) para comparar las medias mediante el análisis estadístico (t) con el software GraphPadPrism 5®.

6.6. Inmunohistoquímica para ER α

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica cromatogénica, según García (2012), a 10 cortes histológicos blancos (de 3 μ m de espesor) de cada individuo de ambos grupos. Para ello, primero se desparafinaron las preparaciones con calor y xilol, después se hidrataron en soluciones alcohol, y alcohol-agua. Posteriormente el desenmascaramiento de los epítopes se hizo en una olla de presión, en la cual se metieron las preparaciones sumergidas en Diva Decloaker (Biomedical Care®); posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 0.9%. A continuación se incubó el anticuerpo primario anti-ER α (Santa Cruz®, 1:200 con PBS-tween) durante 45 min a temperatura ambiente, al cabo de este tiempo el anticuerpo secundario (Biotinylated Link Universal, DAKO®) se añadió y se dejó 30 min, después se incubó con estreptavidina-HRP (DAKO®) por 30 min también a temperatura ambiente, finalmente se reveló la reacción con diaminobenzidina (DAB-Plus substrate kit, Invitrogen®) monitoreando al microscopio.

Una vez montadas (con cubreobjetos y resina) las preparaciones se observaron al microscopio (Olympus BH-2) con el aumento de 100x y se tomaron micrográficas por separado de cada capa uterina (30 campos por grupo) con una cámara digital (Canon T4, 18mpx). Posteriormente cada imagen fue procesada con el programa densitométrico DENSIFE para determinar el número de píxeles equivalentes a la marca positiva del anticuerpo. Se agruparon los datos de acuerdo al grupo experimental (control y vanadio) y la capa uterina (epitelio, lámina propia y miometrio) para hacer el análisis estadístico (t), en el software GraphPadPrism 5[®].

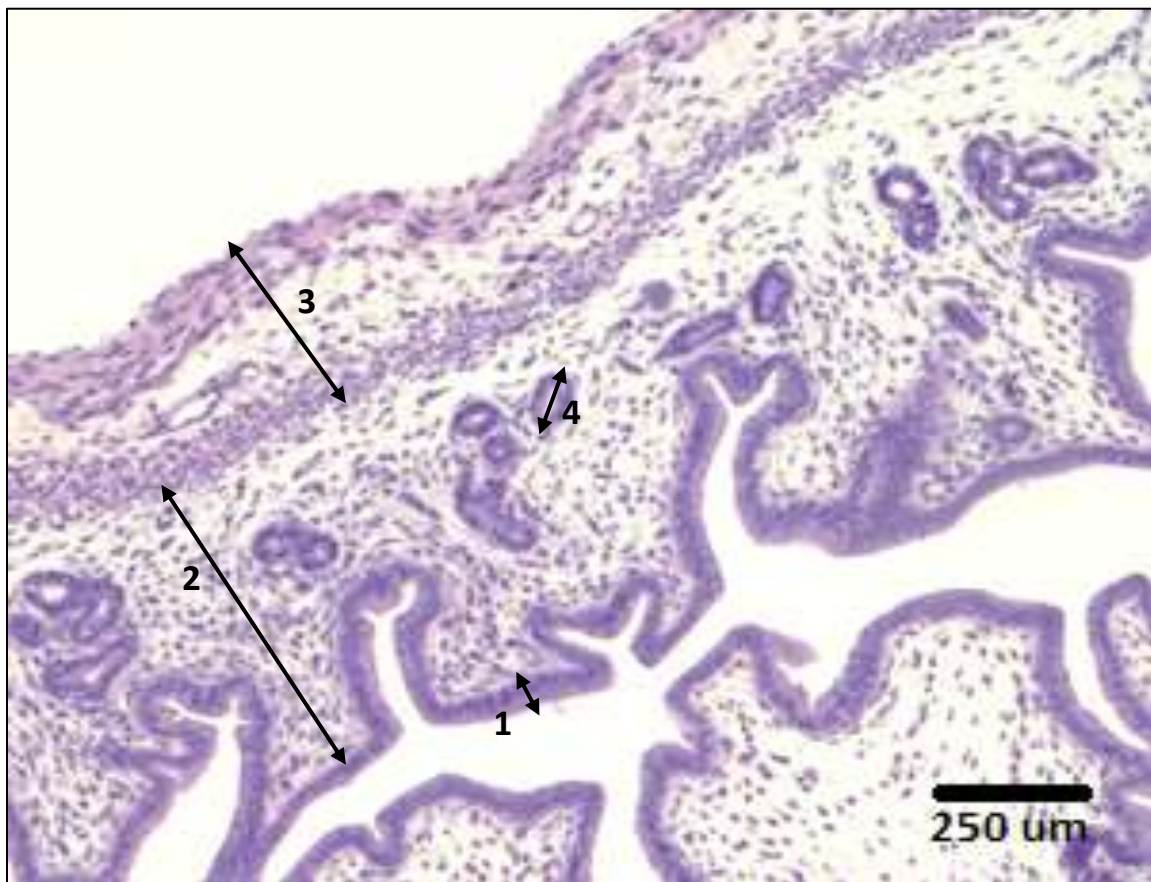


Figura 12. Corte transversal de útero de ratón CD1. Las flechas representan la dimensión de la capa y la forma de realizar las mediciones: (1) epitelio, (2) lámina propia, (3) miometrio, (4) diámetro de la glándula.

7. RESULTADOS

7.1 Peso corporal

Se tomó el peso diario de cada uno de los ratones hembra de ambos grupos (control y vanadio). No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre el peso de los animales control y los expuestos a la inhalación de V_2O_5 a lo largo de las cuatro semanas de duración del experimento (gráfica 1).



ANOVA, Tukey; \pm SEM; n=40

Gráfica 1. Media del peso corporal en gramos de los ratones del grupo control (n=20) y vanadio (n=20) a lo largo de 4 semanas. No hubo diferencias significativas entre los grupos ni durante las semanas de experimentación.

7.2 Citología exfoliativa vaginal

Mediante la citología exfoliativa se determinó la etapa del ciclo estral en la que se encontraba cada ratón, esto se registró diariamente por cuatro semanas para ambos grupos. En el grupo control, el 100% de los animales presentó un ciclo estral normal (presentaron periódicamente todas las etapas: proestro, estro, metaestro y diestro) durante las 4 semanas de experimentación (Fig. 13). Mientras en el grupo vanadio, a las 3 semanas de inhalación se redujo al 50% el número de ratones con un ciclo normal y a las 4 semanas el porcentaje de animales con un ciclo estral normal bajo hasta 27.7%; ambas reducciones son estadísticamente ($p < 0.05$) diferentes respecto al grupo control durante las 4 semanas y al grupo vanadio en las dos primeras semanas (gráfica 2). Es decir, a las 3 semanas y a las 4 semanas de inhalación de vanadio, el porcentaje restante de hembras se encontraban en anestro pues la citología mostraba células basales y parabasales, que son típicas de este estado (Fig. 14).

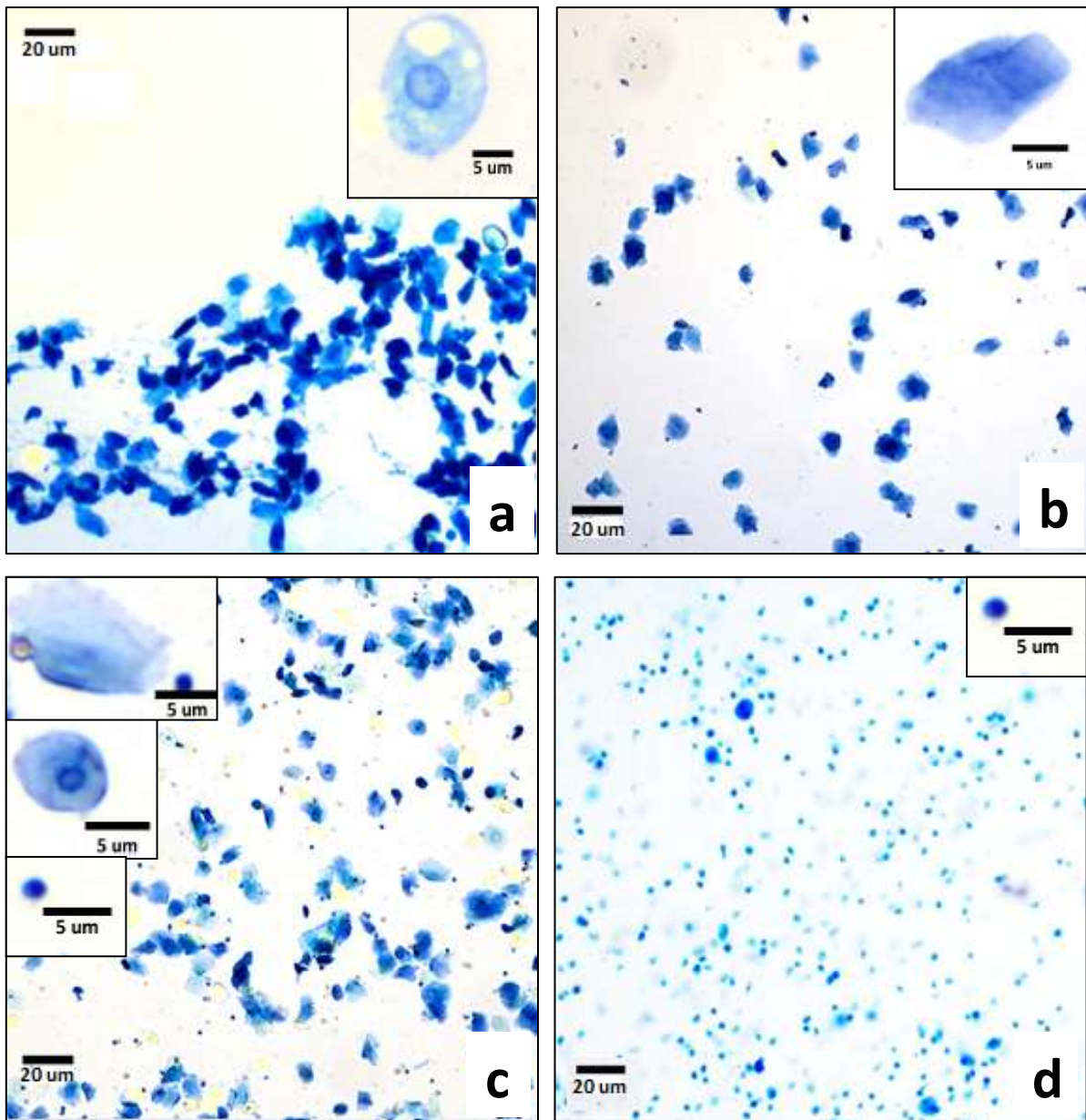


Figura 13. Citología exfoliativa vaginal. Ciclo estral normal. En los animales del grupo control, durante las 4 semanas de experimentación y en la semana previa, se observaron las cuatro etapas del ciclo estral: a) proestro, células nucleadas; b) estro, solo células cornificadas; c) metaestro, tres tipos celulares (cornificadas, nucleadas y leucocitos); d) diestro, únicamente leucocitos.

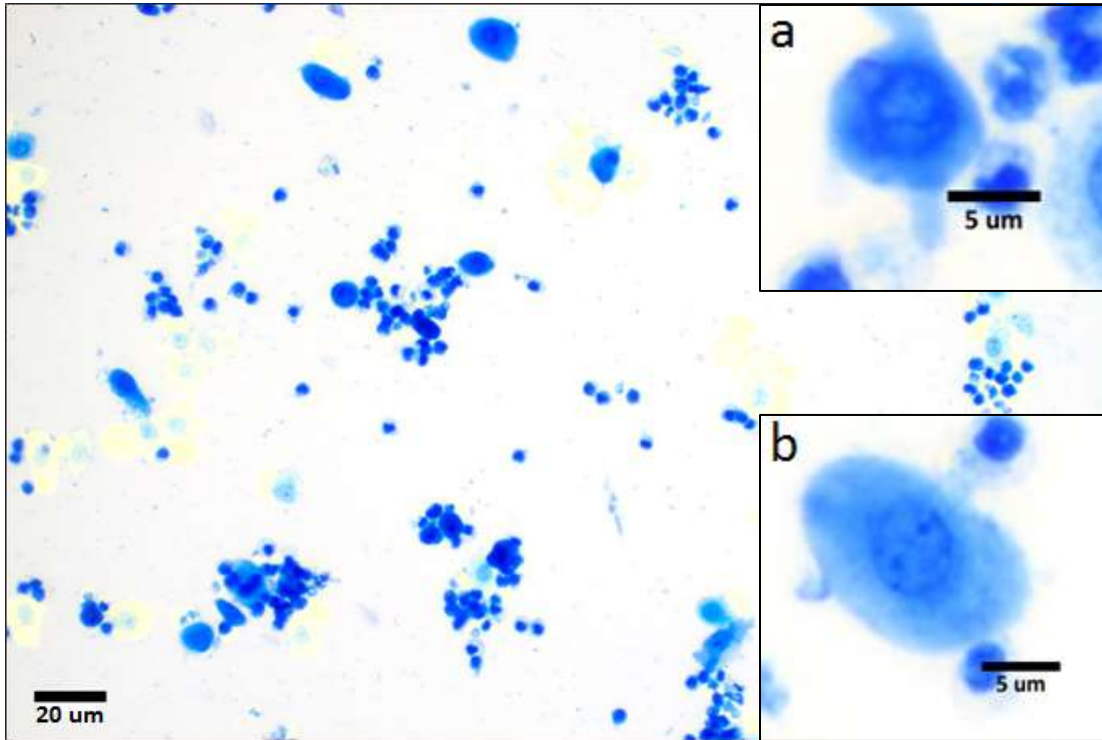
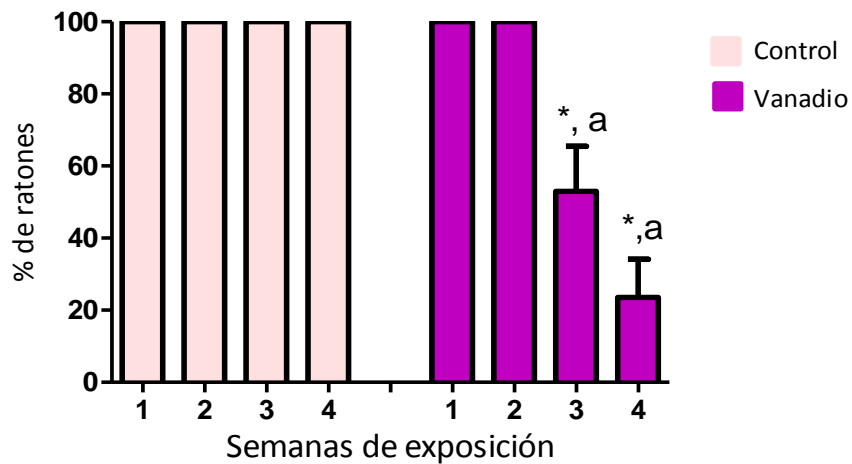


Figura 14. Citología exfoliativa vaginal. Anestro. En el grupo vanadio, durante la 3 y 4 semana de experimentación, se observaron células parabasales (a) y basales (b) en las secreciones vaginales obtenidas mediante citología exfoliativa; éste tipo celular es característico de una estado anormal, denominado anestro, en el cual se detiene el ciclo estral.

Ciclo estral normal



ANOVA, Tukey; \pm SEM; $p < 0.05$; $n=40$
 *= dif. vs gpo. control; a= dif. vs 1° y 2° semana del gpo. vanadio

Gráfica 2. Porcentaje de ratones del grupo control ($n=20$) y vanadio ($n=20$) con un ciclo estral normal durante las 4 semanas de exposición a vehículo o V_2O_5 . Hay diferencias significativas entre el grupo vanadio a las 3 y 4 semanas respecto al grupo control en todas las semanas.

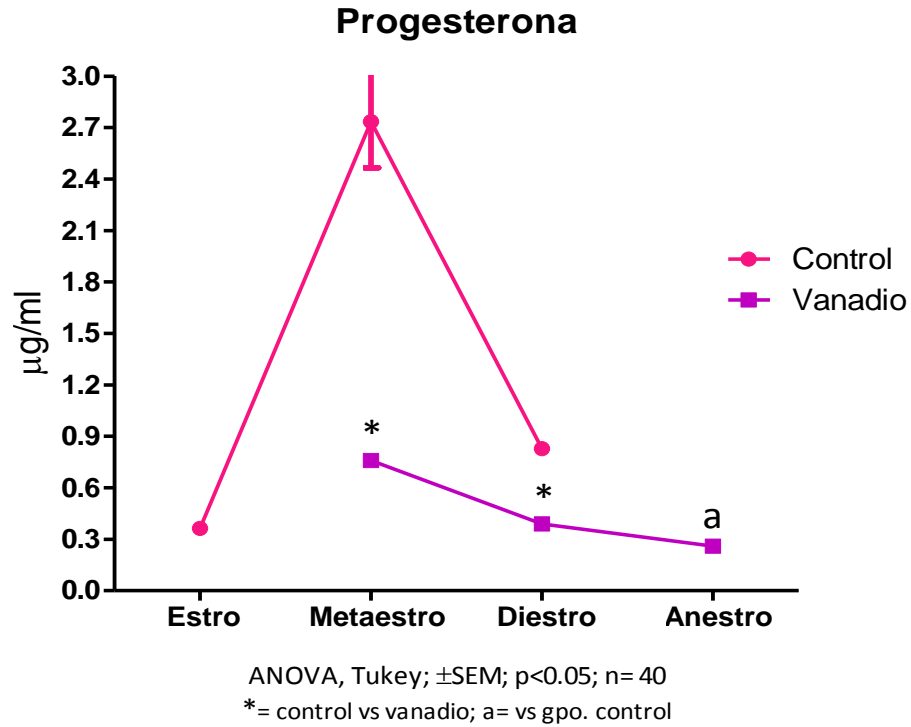
7.3 Radioinmunoensayo

Del suero sanguíneo obtenido se cuantificó, mediante RIA, la concentración de progesterona y 17-β estradiol de cada ratón de ambos grupos. En el grupo control, la concentración promedio de progesterona fue de 0.3641 µg/ml ±0.018 en la etapa de estro, 2.7350 µg/ml ±0.27 en el metaestro y 0.8284 µg/ml ±0.035 durante el diestro. Mientras en el grupo vanadio durante el metaestro fue de 0.7590 µg/ml ±0.029 y en el diestro 0.3887 µg/ml ±0.002, siendo ambas concentraciones más bajas que las observadas en las etapas respectivas de los animales control ($p>0.05$). Por otro lado la concentración de progesterona en suero de los animales en anestro fue de 0.2594 µg/ml ±0.037, este valor es significativamente más bajo que las concentraciones en cualquier etapa del grupo control. En ambos grupos se observa que la mayor concentración de progesterona en el suero sanguíneo es en la etapa de metaestro (tabla 1, gráfica 3).

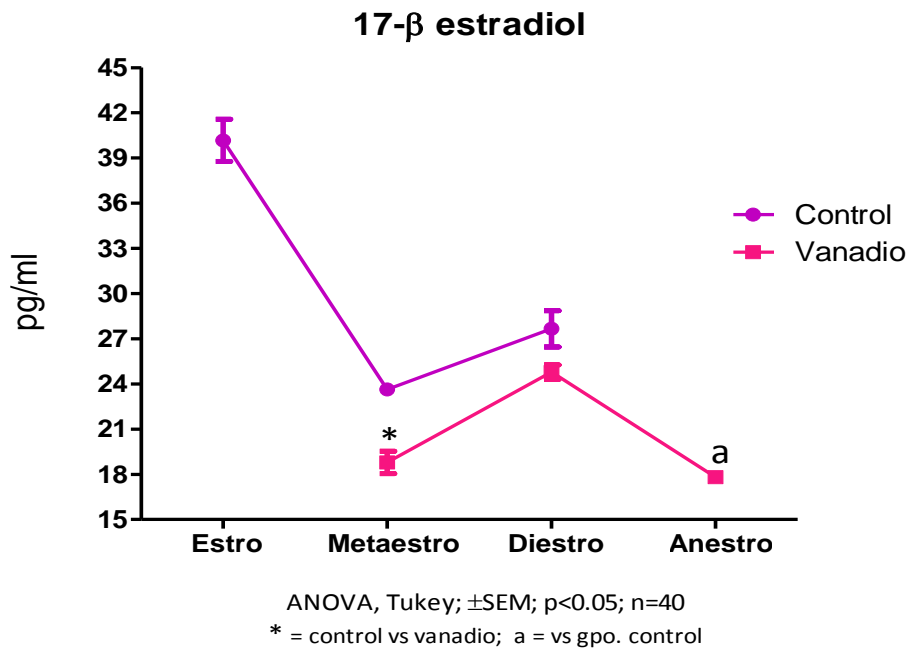
La concentración de 17-β estradiol tuvo su máximo valor promedio en la etapa de estro (en el grupo control) con 40.17 pg/ml ±1.395. En el metaestro la concentración promedio fue de 23.64 pg/ml ±0.395 en el grupo control en contraste con 17.82 pg/ml ±0.316 del grupo vanadio, ambos valores son estadísticamente diferentes ($p<0.05$). En el diestro la concentración promedio del grupo control fue 27.66 pg/ml ±1.196 y en el grupo vanadio fue de 24.79 pg/ml ±0.48, en esta etapa no se encontró diferencia estadísticamente significativa. En los animales, del grupo vanadio, en anestro la concentración promedio de ésta hormona fue de 18.79 pg/ml ±0.749, valor que es más bajo en comparación a las concentraciones promedio reportadas en todas las etapas del grupo control, $p<0.05$ (tabla 1, gráfica 4).

Grupo Hormona	Control			Vanadio		
	Estro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Anestro
Progesterona [µg/m]	0.3641 ±0.018	2.7350 ±0.27	0.8284 ±0.035	0.7590* ±0.029	0.3887* ±0.002	0.2594* ±0.037
Estradiol [pg/ml]	40.17 ±1.395	23.64 ±0.395	27.66 ±1.196	17.82* ±0.316	24.79* ±0.48	18.79* ±0.749

Tabla 1. Concentración de progesterona y estradiol en suero sanguíneo de ratones hembra CD1 del grupo control y del grupo expuesto a vanadio. Los niveles de ambas hormonas bajaron significativamente en las hembras expuestas. Los valores indican la media ± SEM. * diferencia respecto al control, $p<0.05$, ANOVA, tukey.



Gráfica 3. Concentración promedio de progesterona en suero sanguíneo. En los animales en anestro (grupo vanadio) se observó la menor concentración de progesterona; en contraste con la etapa de metaestro (grupo control) con el valor máximo de esta hormona.



Gráfica 4. Concentración promedio de 17- β estradiol en suero sanguíneo. En los animales en anestro (grupo vanadio) se observó la menor concentración; mientras la etapa de estro del grupo control presentó el valor máximo. No obstante en el diestro de ambos grupos no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de la hormona.

7.4 Morfometría

Con los cortes seriados de útero se obtuvieron mediciones del grosor de las capas histológicas que conforman éste órgano. Al momento del sacrificio los animales del grupo control se hallaban en las etapas de estro y metaestro, mientras los animales de grupo vanadio, como ya se mencionó, se encontraban en anestro. En el microscopio con el objetivo de 10x se observó una diferencia notable del grosor total del útero de los ratones entre el grupo control y el grupo que inhaló vanadio (Fig. 15). Con el objetivo de 40x se realizaron mediciones, y así se encontró que la altura del epitelio uterino ($16.5 \mu\text{m} \pm 0.46$) en los cortes del grupo vanadio es similar a la altura epitelial ($16.14 \mu\text{m} \pm 0.37$) del útero de ratones del grupo control ($p < 0.05$; tabla 2, gráfica 5).

En cuanto a la lámina propia, se observó un aumento significativo en el grosor de esta capa ($178.8 \mu\text{m} \pm 11.41$) en el útero de los animales que inhalaban vanadio respecto al grosor ($129.6 \mu\text{m} \pm 3.34$) en útero de los animales del grupo control ($p < 0.05$; tabla 2, gráfica 6).

El número de glándulas presentes en el estroma fue mayor en el útero de las hembras expuestas a vanadio (14.37 ± 0.61) en comparación con el número de glándulas uterinas (11.05 ± 1) en los animales del grupo control ($p < 0.05$; tabla 2, gráfica 7-a). El diámetro de las glándulas uterinas también varió entre los animales del grupo control y el grupo vanadio; siendo el diámetro de las glándulas del grupo vanadio ($36.68 \mu\text{m} \pm 1.66$) mayor y estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al diámetro ($27.91 \mu\text{m} \pm 0.72$) observado en el grupo control (tabla 2, gráfica 7-b).

Por otro lado, el grosor del miometrio aumentó en los animales del grupo vanadio ($131 \mu\text{m} \pm 5.5$) respecto al grosor de esta capa ($66.79 \mu\text{m} \pm 2.02$) en las hembras del grupo control (tabla 2, gráfica 8).

Capa	Grupo	Control	Vanadio
Epitelio (μm)		16.5 ± 0.46	$16.14 \pm 0.37^*$
Lámina propia (μm)		129.6 ± 3.34	$178.8 \pm 11.41^*$
Número de glándulas		11.05 ± 1	$14.37 \pm 0.61^*$
Diámetro de glándulas (μm)		27.91 ± 0.72	$36.68 \pm 1.66^*$
Miometrio (μm)		66.79 ± 2.02	$131 \pm 5.5^*$

Tabla 2. Grosor de las capas uterinas de ratón CD1. En las hembras del grupo expuesto a la inhalación de vanadio las capas aumentaron en grosor (excepto el epitelio) en comparación con los animales del grupo control. Los valores indican la media \pm SEM. * diferencia respecto al control, $p < 0.05$, t-test.

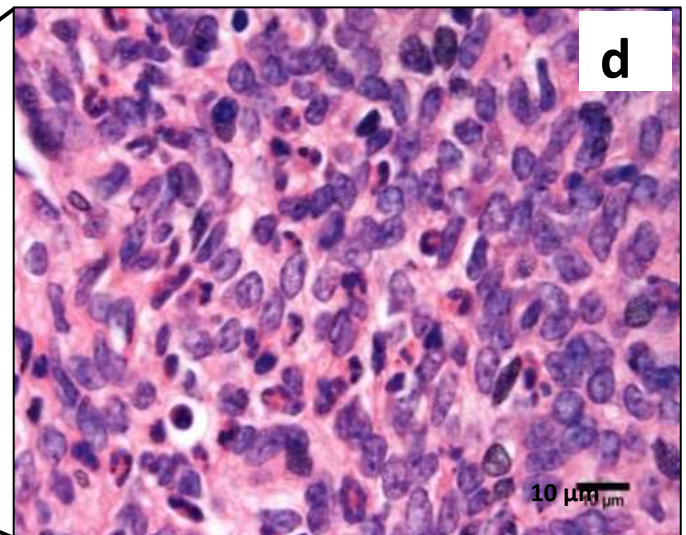
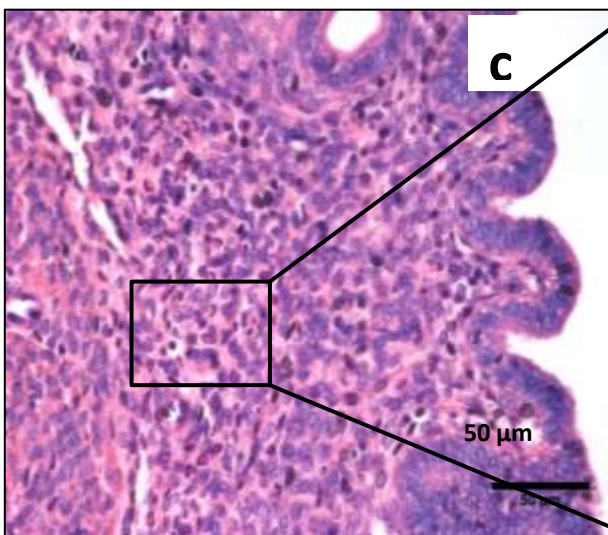
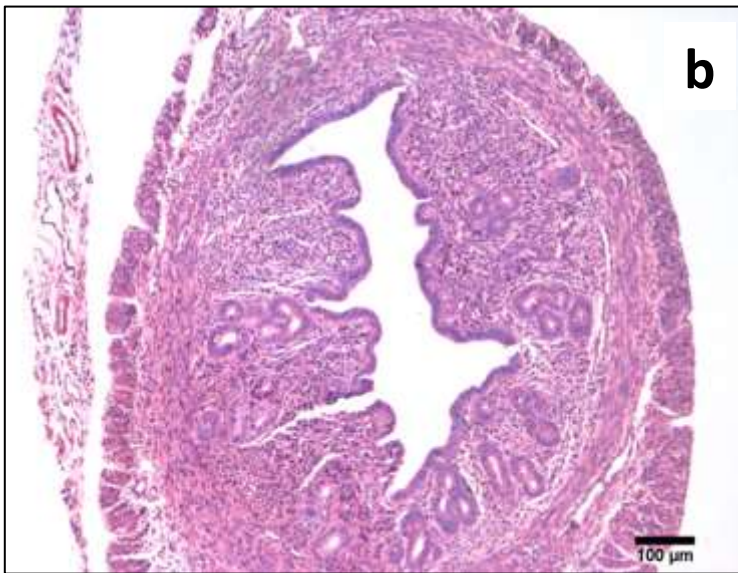
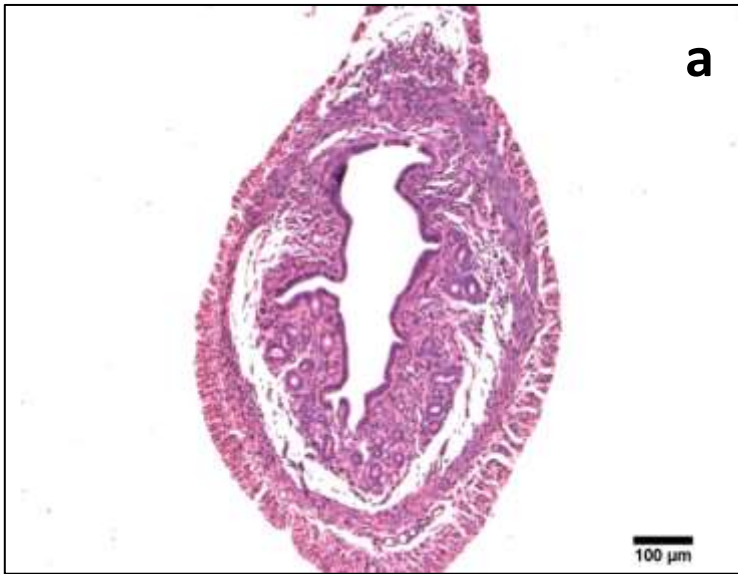
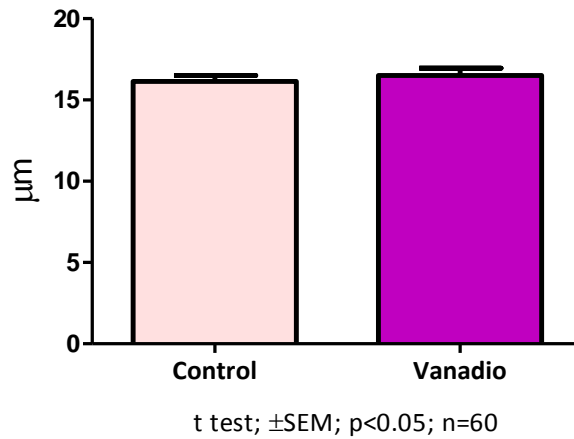


Figura 15. En una vista panorámica del útero, se observa que el tamaño del diámetro uterino de los ratones controles (a) es menor al útero de los animales expuestos a vanadio (b). Es decir, a las cuatro semanas de exposición a vanadio (por inhalación) se observa un incremento en el tamaño uterino y en el grosor de la lámina propia y el miometrio.

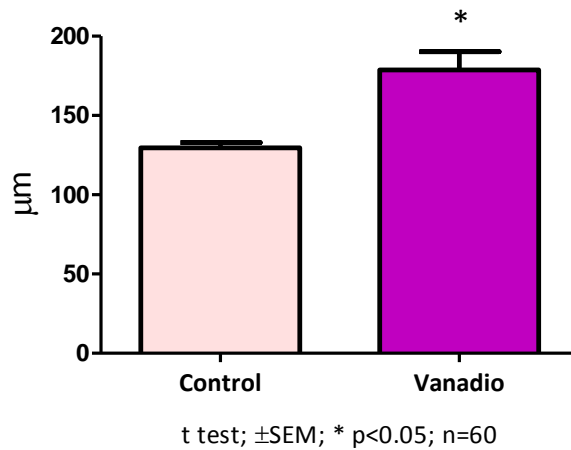
Por otro lado se observa una gran cantidad de infiltrado inflamatorio en la lámina propia (c y d) y miometrio en los animales expuestos a vanadio, es decir, en anastro.

Altura máxima del Epitelio

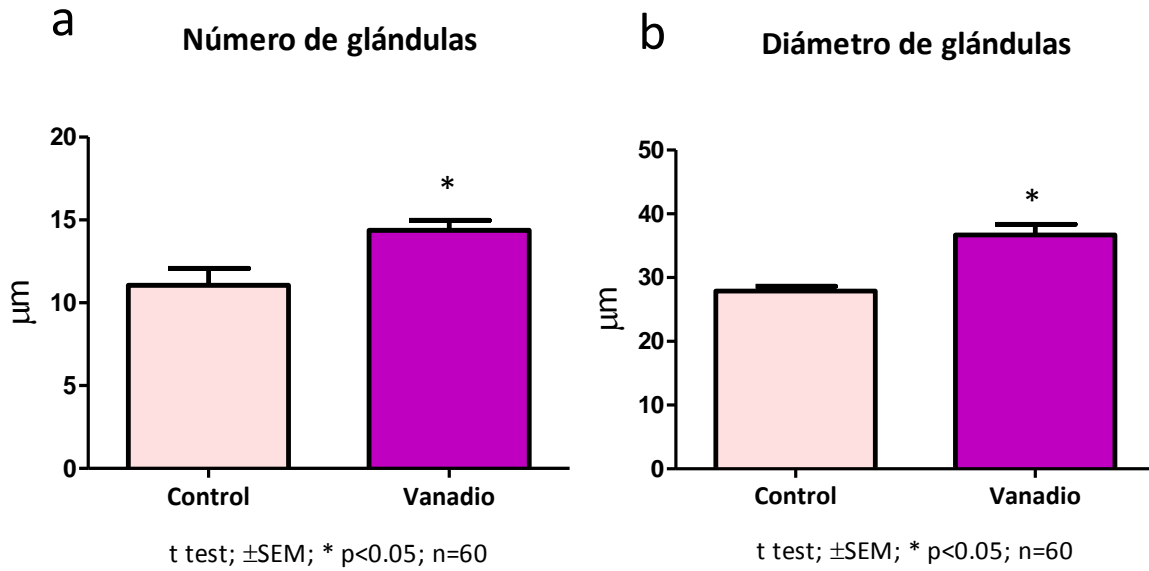


Gráfica 5. Altura, en μm , del epitelio luminal del útero de ratones CD1. El epitelio de los animales expuestos a vanadio, en anestro, resultó ser más alto que en los animales control en metaestro. Por otro lado la altura del epitelio uterino de los animales en metaestro es menor que la altura epitelial en los animales en estro.

Grosor máximo de la Lámina propia

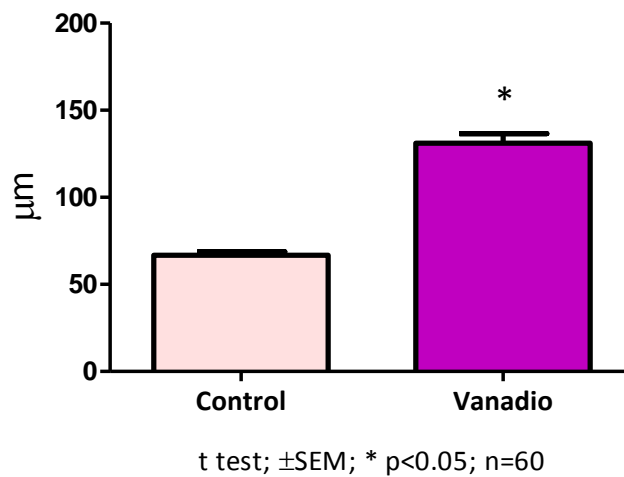


Gráfica 6. Grosor de la lámina propia uterina de ratones CD1. El grosor de la lámina propia en ambos grupos: control y vanadio, fue estadísticamente significativo; siendo las hembras que inhalaban vanadio las que presentaron un grosor mayor en esta capa uterina.



Gráfica 7. El número de glándulas promedio presentes en el estroma uterino varió en número (a) y tamaño (b), siendo en las hembras del grupo vanadio donde se observó mayor cantidad de glándulas y éstas a su vez fueron más grandes, en tamaño, que las presentes en el grupo control. La diferencia es estadísticamente significativa.

Grosor máximo del Miometrio



Gráfica 8. El grosor promedio del miometrio varió entre los grupos, de los cuales en el grupo vanadio se observó el máximo tamaño de las capas musculares, mientras las hembras del grupo control tuvieron un valor más bajo, ésta diferencia es estadísticamente significativa.

7.5 Inmunohistoquímica

Se observó la presencia y distribución del ER α mediante inmunohistoquímica y, posteriormente, se hizo un análisis densitométrico. En una vista panorámica (Fig. 16), en ambos grupos se observa una mayor intensidad de la marca en las células del epitelio luminal y de las glándulas; en la lámina propia las células con marca positiva (en café) son dispersas, es decir, no todas las células se marcan pero si la mayoría; el miometrio también presenta ER α en ambas capas (longitudinal y circular).

En el análisis densitométrico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad de la marca positiva para ER α en el epitelio uterino (gráfica 9, Fig. 17), la lámina propia (gráfica 10, Fig. 18) o el miometrio (gráfica 11, Fig. 19) de los animales del grupo control comparado con el grupo vanadio.

Sin embargo se observó que un patrón en la marca de ambos grupos, siendo más intensa en el epitelio uterino (control: 1.746×10^6 px ± 106158 ; vanadio: 1.941×10^6 px ± 165134) que en la lámina propia (control: 1.307×10^6 px ± 116829 ; vanadio: 1.154×10^6 px ± 141537) o el miometrio (control: 687413 px ± 71661 ; vanadio: 844986 px ± 76401) en ambos grupos (tabla 3, gráfica 12).

Grupo \ Capa	Epitelio (px)	Lámina propia (px)	Miometrio (px)
Control	$1.746 \times 10^6 \pm 106158$	$1.307 \times 10^6 \pm 116829$	687413 ± 71661
Vanadio	$1.941 \times 10^6 \pm 165134$	$1.154 \times 10^6 \pm 141537$	844986 ± 76401

Tabla 3. Diferencia de la intensidad de la marca para ER α entre las capas del útero de ratones CD1 controles y expuestos a vanadio. En ambos grupos en el epitelio se observó la mayor intensidad de la marca, mientras en el miometrio la marca presenta una menor intensidad. Los valores indican la media \pm SEM.

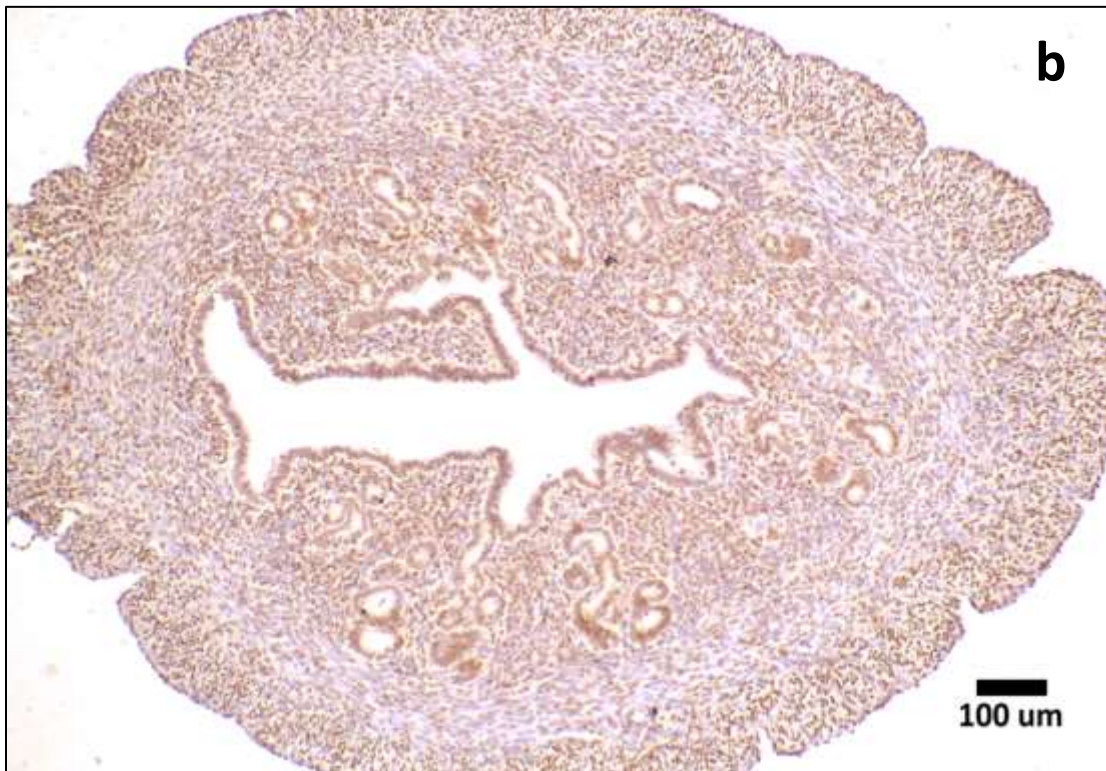
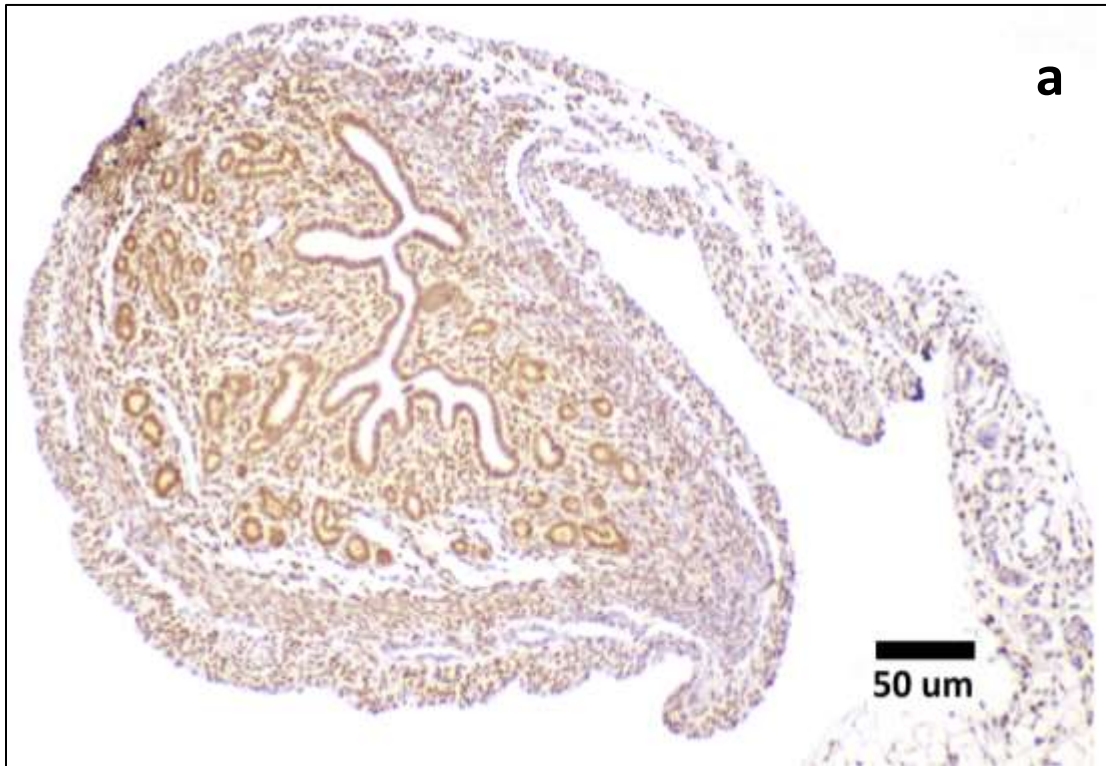


Figura 16. Presencia y distribución de ER α en útero de ratón CD1. Mediante inmunohistoquímica, es posible observar una distribución similar de ER α (marca positiva en café) en todas las capas uterinas tanto de las hembras control (a) como en las del grupo vanadio (b), asimismo la intensidad de la marca no se observa diferente entre los grupos.

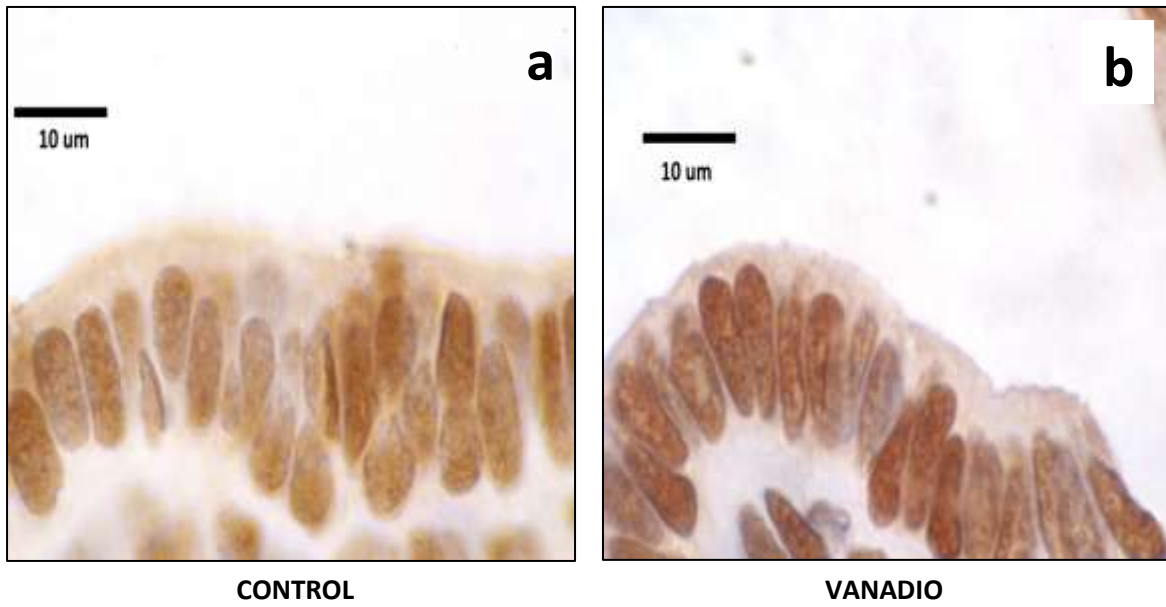
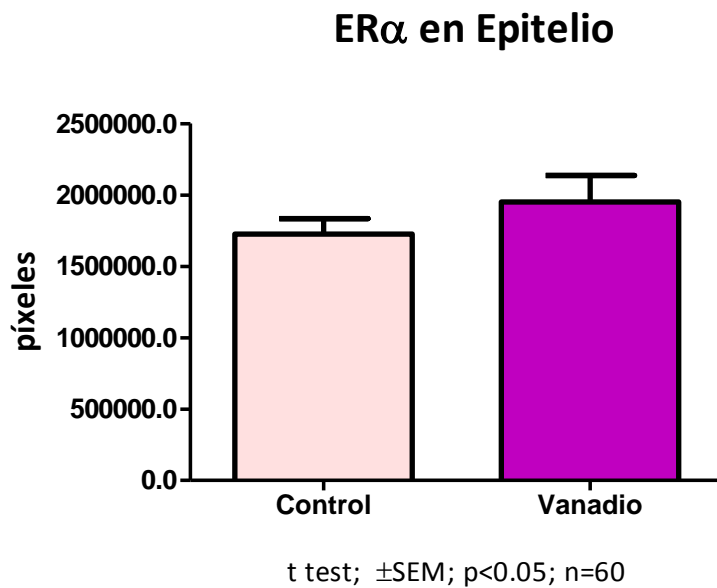


Figura 17. Micrografías del epitelio uterino de ratones CD1. Se observa la misma intensidad de la marca positiva (en café) para el ER α en el útero del grupo control (a) y del útero de los animales del grupo vanadio (b).



Gráfica 9. Análisis densitométrico de la marca positiva (medida en píxeles) para ER α en el epitelio uterino. No se observaron diferencias significativas entre el epitelio del útero de ratones controles y ratones que inhalaban vanadio.

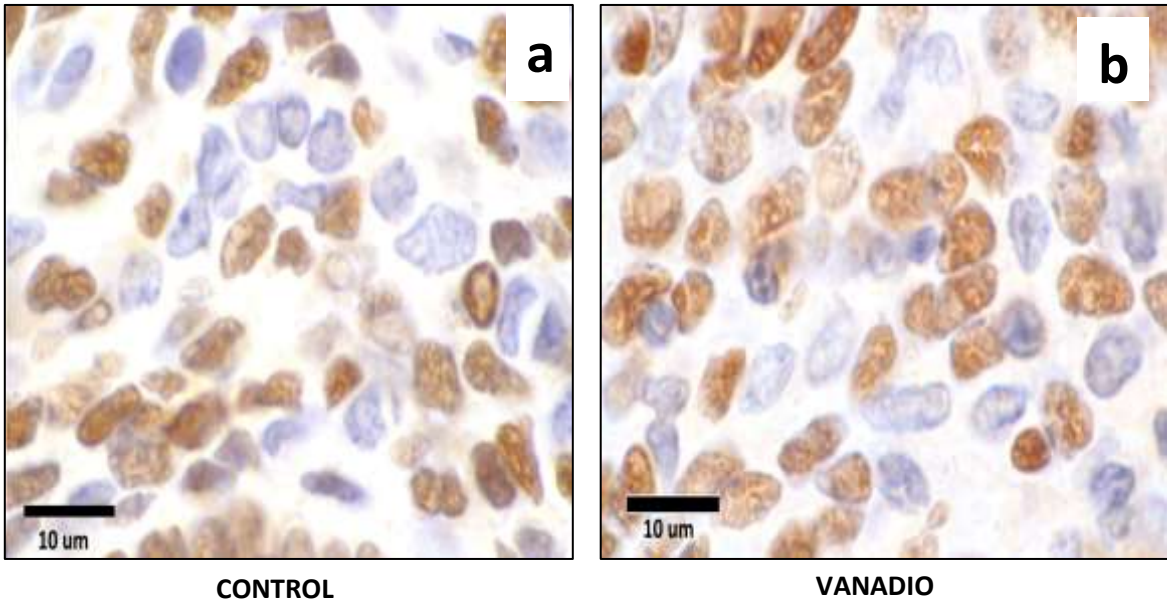
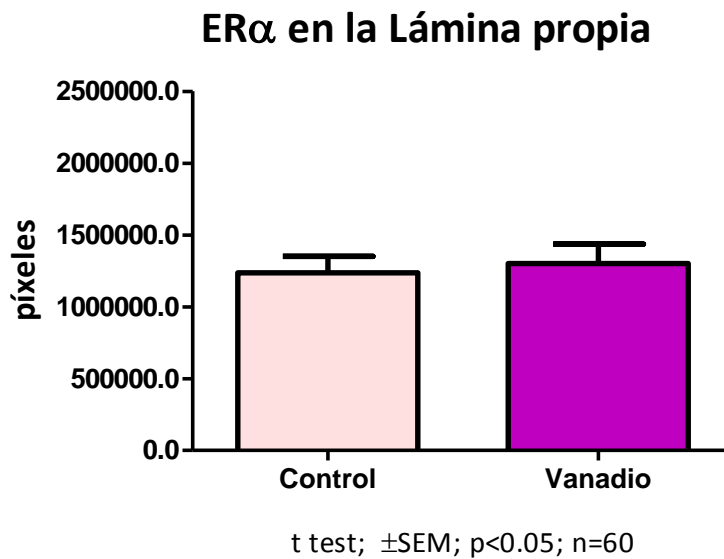


Figura 18. Micrografías de la lámina propia del útero de ratones CD1. Con la técnica de inmunohistoquímica se detectó la presencia de ER α en las células del estroma uterino; se observa marca positiva semejante en intensidad y distribución tanto en el útero de ratones control (a) como en el grupo vanadio (b).



Gráfica 10. Análisis densitométrico de la marca positiva (medida en píxeles) para ER α en la lámina propia uterina. No se presentaron diferencias significativas de la intensidad de la marca entre el útero de animales control y los expuestos a la inhalación de vanadio.

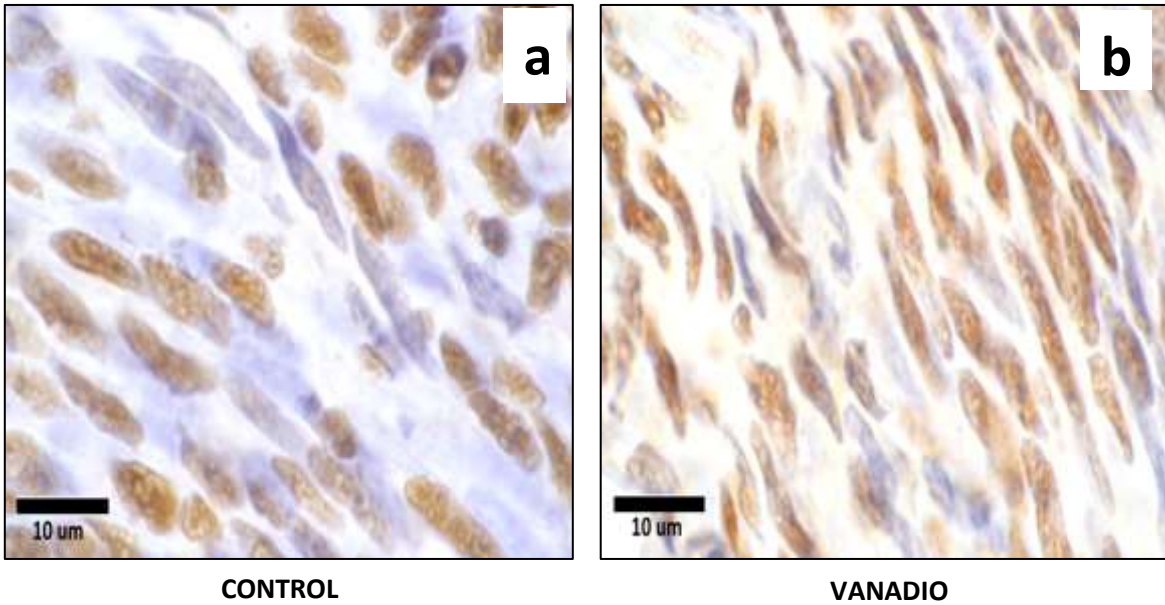
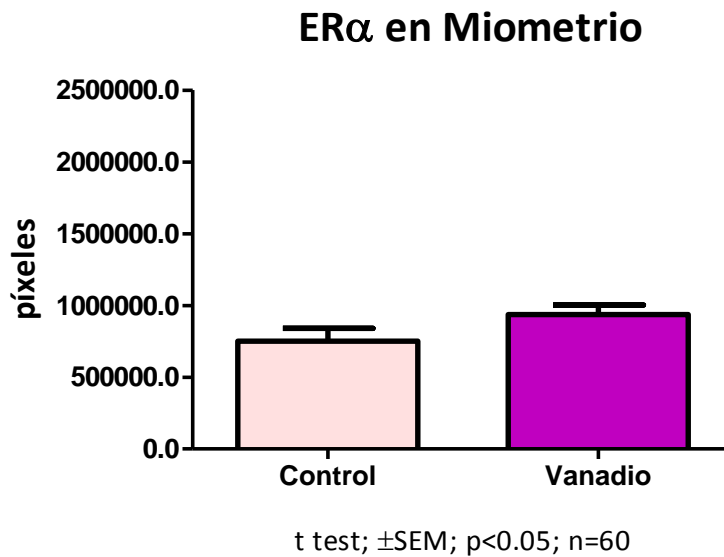
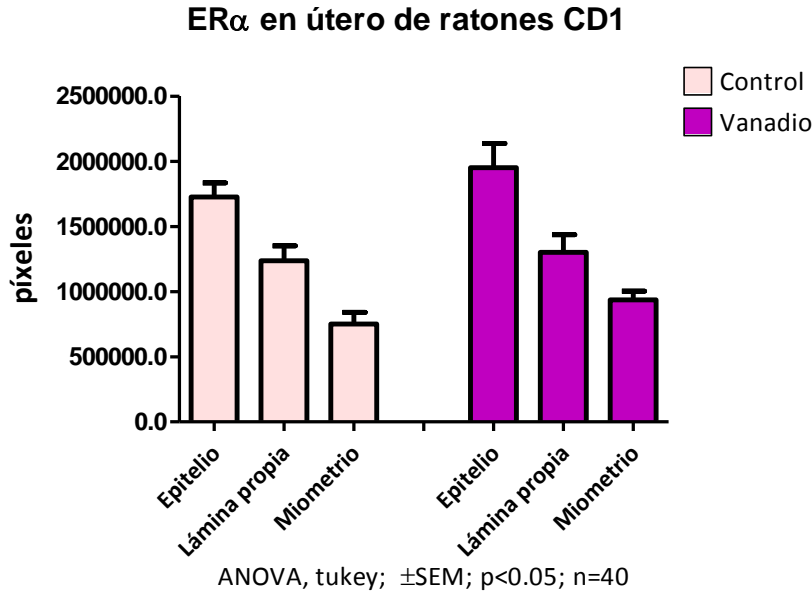


Figura 19. Micrografías del miometrio en el útero de ratones CD1. Se observa la presencia de ER α en las células musculares del miometrio en animales control (a) y vanadio (b), la marca no se aprecia en todas las células pero la intensidad es uniforme y no varía entre los grupos.



Gráfica 11. Análisis densitométrico de la marca positiva (medida en píxeles) para ER α en el miometrio de ratones hembra CD1. La marca en general tiene una menor intensidad en comparación de las otras regiones evaluadas (epitelio y estroma), sin embargo no hay diferencia entre el miometrio de ratones del grupo control y el grupo expuesto al vanadio.



Gráfica 12. La intensidad de la marca positiva para el ER α , es mayor en el epitelio uterino que en el miometrio, este hecho se presenta tanto en los animales del grupo control, como en los animales del grupo vanadio.

8. DISCUSIÓN

8.1. Peso

Ya que se ha comprobado que la dieta, el metabolismo y la pérdida o ganancia de peso corporal afecta la función reproductiva (Terry et al., 2005), en este trabajo se registró el peso diario de cada uno de los animales. No se observó diferencia entre el peso de las ratonas del grupo control y vanadio a lo largo de las cuatro semanas de experimentación, con lo cual es posible descartar alguna anomalía en el peso corporal (obesidad, pérdida de peso, etc.) como causante de los efectos observados en las hembras expuestas a vanadio.

8.2 Citología exfoliativa vaginal

Después de cuatro semanas de inhalación de vanadio, más del 70% de las hembras de éste grupo presentaban células de descamación vaginal inmaduras (basales y parabasales), lo cual es un indicador de anestro o inhibición del ciclo estral (Mills et al., 1979). Martínez-Pedraza (2005), con el mismo modelo de inhalación utilizado en este trabajo, también se observó interrumpido el ciclo estral de los ratones que inhalaban vanadio; asimismo la inhalación de 8 mg/m³ y 16 mg/m³ de pentóxido de vanadio aumentó la duración del ciclo estral en ratas y redujo el número de animales que ciclaban (NTP, 2002).

Los cambios cíclicos del epitelio vaginal se dan en respuesta a factores de crecimiento (HB-EGF, EGF, IGF-I, KGF), citoqueratinas (Buchanan et al., 1998), cambios en la absorción y flujo de calcio (Goldman et al., 2007), entre otros mecanismos. Se ha comprobado que el vanadio promueve la secreción de HB-EGF (Ingram et al., 2003), lo cual indica que este metal podría modificar la expresión de otros factores de crecimiento y provocar cambios en la histología vaginal, también se ha visto que las células epiteliales basales proliferan rápidamente en respuesta a E2, el cuál promueve la expresión de factores de crecimiento (Buchanan et al., 1998). Por otro lado las células suprabasales, para su cornificación o queratinización, necesitan de un incremento en la absorción de calcio (Goldman et al., 2007), lo cual podría estar inhibido por el vanadio, ya que este metal inhibe la enzima calcio-ATPasa y reduce el flujo de calcio extracelular (O'Neal et al., 1979).

Por otro lado la presencia de células inmaduras en las secreciones vaginales podría tener su causa en la interrupción hormonal a nivel del ovario, pues en nuestro modelo de inhalación se ha visto que existe un aumento de folículos atrésicos así como un baja en la expresión de ER β (Martínez-Pedraza, 2007) y una disminución en tamaño de folículos primarios. Asimismo se ha observado un incremento en la peroxidación lipídica de células de la teca en ovarios de animales expuestos a vanadio, en este modelo de inhalación (García-Ibarra, 2014); estas alteraciones morfológicas conllevarían a una deficiencia en la función endocrina del ovario, es decir, la producción alterada de estrógenos y progesterona, las cuales regulan los cambios en el epitelio vaginal durante el ciclo estral.

8.3 Radioinmunoensayo

Se observó que la inhalación de vanadio detiene o inhibe el ciclo estral y ya que éste está regulado por el ciclo hormonal, se hizo un análisis de las concentraciones en sangre de 17- β estradiol (E2) y progesterona (P4) de las hembras de ambos grupos, para determinar si el vanadio altera los niveles de estas hormonas, pues otros metales de transición como el cadmio afecta la síntesis de hormonas esteroideas (Takiguchi y Yoshihara, 2006; Paksy et al., 1992). Los resultados obtenidos, por radioinmunoensayo, demostraron que los niveles de ambas hormonas fueron significativamente más bajos en el grupo expuesto a vanadio.

La síntesis de ambas hormonas (E2 y P4), podría esta atenuada debido a un daño o alteración en el eje hipotálamo-hipófisis, pues algunos metales (plomo, mercurio, cadmio, cobre, cromo, níquel, vanadio) son considerados disruptores endocrinos (DE), los cuales pueden actuar directamente, como ligandos y unirse a los receptores de las células blanco, como agonistas o antagonistas de la hormona en cuestión, por ejemplo el cadmio, el vanadio, el cromo, el plomo, el níquel y el cobre pueden unirse al ER α imitando la función del E2, en células Mcf-7 de cáncer de mama expuestas a diferentes compuestos de estos metales (Martin et al., 2003). Además estos metales pueden alterar el eje hormonal indirectamente por la generación de estrés oxidante (Apostoli et al., 2007), como la disminución de la respuesta a la FSH y LH, así como la inhibición de la esteroidogénesis

causada por la exposición de células de la granulosa de rata a peróxido (Margolin et al., 1990; Behrman y Aten, 1999).

Se ha descrito que la GnRH disuelta en agua destilada en presencia de percloratos de cobre $\text{Cu}(\text{ClO}_4)$, de níquel $\text{Ni}(\text{ClO}_4)$ o de cobalto $\text{Co}(\text{ClO}_4)$, forma complejos con éstos metales de transición (posiblemente al unirse a residuos de histidina), los cuales compiten con la hormona nativa por el receptor de la misma, modificando la ovulación inducida por esta hormona y las rutas de señalización intracelular, pues los complejos muestran cinética y estabilidad diferente a la hormona nativa, lo que ocasionaría cambios en la carga y el arreglo espacial del receptor en la membrana celular (Nakamura et al., 2005). El vanadio, al ser también un metal de transición podría estar actuando de manera similar a estos metales, ya que también se ha visto puede unirse a residuos de histidina de otras moléculas como el ER α (Martin et al., 2003). La unión con la GnRH, podría modificar la actividad biológica de la GnRH nativa alterando el balance en la secreción o síntesis de LH y FSH.

Aunado a esto, Obianime y colaboradores (2009) observaron un decremento en los valores sanguíneos de LH, FSH y prolactina en ratas, provocado por la administración intraperitoneal de metavanadato de amonio. Esta disminución de LH y FSH causada por el vanadio podría ser la causa de los bajos niveles de E2 y P4 en sangre de las hembras expuestas a la inhalación de vanadio, ya que los pulsos de LH y FSH están relacionados directamente con la síntesis en el ovario de E2 y P4.

Por otra parte, la disminución del ER β en el ovario causada por la inhalación de vanadio (Martínez, 2007), podría provocar la deficiencia en los niveles de E2 en la sangre, pues se ha visto una disminución en la síntesis de E2 y en la expresión de la aromatasa en ratones que no expresan el ER β comparados con ratones que si lo expresan (Drummond 2006; Drummond 2010). Asimismo el aumento de atresia de los folículos maduros, observado por Martínez-Pedraza en 2007, conllevaría a niveles bajos tanto de estradiol como de progesterona, pues son los folículos ováricos en estadios avanzados los que sintetizan estrógenos y en los que se lleva a cabo la ovulación, seguida de la formación del cuerpo lúteo que sintetiza de progesterona (Graig et al., 2011).

La síntesis de P4 y E2, comienza con el incremento en la actividad de la enzima adenilato ciclasa, promovido por la unión de LH a su receptor en las células de la teca de los folículos ováricos; posteriormente el aumento de cAMP induce la transcripción de enzimas esteroideogénicas (CYP11A1, CYP17A1, HSD3B, HSD17B) que median la conversión de colesterol a progesterona y/o andrógenos (androstenediona y testosterona), estos últimos difunden hacia las células de la granulosa y son convertidos a estrógenos (estrone, 17- β estradiol, 2-OH-estradiol y 4-OH-estradiol) mediante otras enzimas esteroideogénicas (CYP19A1, HSD17B, CYP1B1, CYP1A1/2, CYP3A4) activadas también por la síntesis de cAMP (Graig et al., 2011). Por lo anterior, una baja de cAMP en las células de la teca y la granulosa estaría relacionada con la disminución de E2 y P4, lo cual es posible ya que se ha observado que el vanadio inhibe la síntesis de cAMP en cuerpos lúteos de ratas (incubados *in vitro*, expuestos a ortovanadato) (Lahav et al., 1986). Asimismo la inhibición de la síntesis de colesterol provocada por el vanadio, observada por Curran y colaboradores (1959) en cultivos de hígado con diamonio oxitartratovandato, afectaría la síntesis de E2 y P4.

8.5 Morfometría

La inhalación de vanadio indujo el anestro y disminuyó los niveles de E2 y P4 en las hembras expuestas respecto a las ratonas del grupo control, dado que el ciclo estral y el estado hormonal controlan la morfología del útero (Allen, 1992; Palma 2001; Groothuis et al., 2007) se hizo un análisis morfométrico de éste órgano. Asimismo se ha visto que el vanadio, con el mismo modelo de inhalación, modifica la morfología ovárica: aumenta el número de folículos atrésicos en estadios avanzados (Martínez-Pedraza, 2007) y disminución del tamaño de folículos primarios (García-Ibarra, 2013), por lo que este metal también podría afectar la morfología del útero ya que el útero está regulado por las hormonas que sintetiza el ovario.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el grosor de la lámina propia, el número y diámetro de las glándulas, así como el grosor del miometrio fue mayor en las hembras del grupo vanadio que en los animales del grupo control. Asimismo se observó gran cantidad de infiltrado inflamatorio en el miometrio y la lámina propia de los animales que inhalaron vanadio.

Éstos resultados son similares a los obtenidos por Tchernitchin y colaboradores (2008), al administrar cadmio (vía subcutánea) a ratas impúberes, ellos observaron un incremento en la eosinofilia y edema en el endometrio, asimismo en ausencia de estradiol observaron que el cadmio causa hipertrofia celular en el miometrio.

En el grupo vanadio se observó que el aumento en el grosor de la lámina propia y del miometrio están relacionados con el infiltrado inflamatorio (leucocitos, componentes de la matriz extracelular y fluidos) presente en ambas capas, se ha descrito que este metal induce la expresión de interleucinas: IL-6 y TNF- α en el epitelio bronquiolar de ratones expuestos a vanadio, con el mismo modelo utilizado en el presente trabajo (Falcón-Rodríguez, 2008; Pantoja-Urbán, 2012), y también promueve la expresión de IL-8 en células epiteliales bronquiales de humano expuestas a vanadio adosado a partículas residuales de combustibles (ROFA, por sus siglas en inglés) (Carter et al., 1997). Estas interleucinas promueven la producción de otras citosinas y la diferenciación, activación y proliferación de los leucocitos (Tamayo, 1997).

Por otro lado, se ha observado que en ratones ovariectomizados, adrenalectomizados e hipofisectomizados, la administración de EGF imita la acción mitogénica de los estrógenos en el útero (Nelson et al., 1991; Ignar-Trowbridge et al., 1992), y se sabe que el vanadio tiene la capacidad de inducir la expresión del HB-EGF (Ingram et al, 2003), miembro de la familia de factores de crecimiento al igual que el EGF y el IGF-I; por lo que aún en ausencia de estrógenos, este metal podría inducir la expresión de estos factores en el útero, estimulando así la proliferación celular en el epitelio, el estroma, las glándulas y el miometrio, dando como resultado un aumento en el grosor de las capas uterinas.

8.4 Inmunohistoquímica

Se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la presencia y distribución del ER α en el útero de ratones del grupo control y el grupo vanadio. Pues se ha demostrado la relación del ER α tanto en la morfología del útero como en los niveles de E2 (Wang et al., 2000; Winuthayanon et al., 2010).

Se observó que no hubo diferencia entre las hembras de los grupos vanadio y control, ni en la presencia ni en la distribución del ER α tanto en el epitelio, como en la lámina propia y en el miometrio. Esto sugiere que la inhalación de vanadio, aunque disminuyó los niveles de E2, podría activar al ER α y a la vez mantener su expresión. Martín y colaboradores (2003), demostraron (*in vitro*) que en células MCF-7 de cáncer de mama tratadas con vanadato de sodio, el anión vanadato estimuló la proliferación celular, inhibió la unión del E2 al ER α y al mismo tiempo activó a este receptor, también indujo la expresión de genes regulados por el E2 (PR y pS2). Esto sugiere que la inhalación de vanadio, aunque disminuyó los niveles de E2, podría activar al ER α y a su vez mantener su expresión, pues se ha visto que el receptor mismo puede unirse a secuencias ERF-1 (factor de transcripción) que modulan su propia expresión (McPherson et al., 1997; Santagati et al., 1997; Parl, 2002).

Asimismo se ha descrito que el vanadio induce la activación de p53, en células epidermales JB6 expuestas a este metal (Huang et al., 2000). La presencia y distribución del ER α en el útero de ratones expuestos a la inhalación de vanadio, aún con bajas concentraciones de estrógenos, podría deberse a la activación de p53 inducida por el vanadio, pues se ha observado que p53 está relacionado con la sobreexpresión del ER α en células MCF-7 de cáncer de mama, éste factor supresor de tumores regula la expresión génica del receptor, probablemente, uniéndose a otros factores de transcripción (Angeloni et al., 2004).

Por otro lado se ha visto que en biopsias de tejido mamario canceroso, la expresión de IL-6 es proporcional a la expresión de receptores de estrógenos y progesterona (Fontanini et al., 1999); como se mencionó anteriormente, el vanadio aumenta la expresión de IL-6 (Falcón-Rodríguez, 2008; Pantoja-Urbán, 2012), así pues, la marca positiva del ER α en el útero del grupo vanadio podría darse aún con la disminución en la secreción de E2.

No se encontraron diferencias entre grupos en la intensidad de la marca positiva para el ER α , sin embargo se observa mayor intensidad de la marca en el epitelio, seguido del estroma y la menor intensidad se observa en el miometrio. Estos resultados concuerdan con los visto por Wang y colaboradores (2000), también por inmunohistoquímica, para determinar la presencia de ER α en el útero de ratas: la mayor expresión del ER α se observa en el epitelio en todas las etapas del ciclo, aunque la máxima expresión es durante el estro y proestro; el estroma presenta una expresión menor, con su nivel más alto durante el diestro y el metaestro; mientras en el miometrio la marca se mantiene igual en todas las etapas. Aunque cabe resaltar que el vanadio no modificó la intensidad de la marca en el útero de los animales expuestos.

9. CONCLUSIONES

La inhalación subaguda (4 semanas) de vanadio detiene el ciclo estral, disminuye la concentración en sangre del E2 y la P4, aumenta la altura del epitelio luminal, el grosor del estroma y el miometrio, el número y diámetro de las glándulas del útero, pero no cambia la presencia y distribución del $E\alpha$ en este órgano.

Los resultados obtenidos aquí, demuestran que el vanadio ocasiona alteraciones en un órgano de alta importancia en la reproducción como el útero, en el cual no se habían evaluado los efectos de este metal en ningún modelo de exposición; y, si bien ahora no es posible comprobarlo, podrían estas alteraciones estar relacionadas con la infertilidad, los abortos pretérmino, las reabsorciones y el efecto teratogénico del vanadio descrito en otros trabajos.

Este trabajo sugiere poner una mayor atención en cuanto a los daños en la función reproductiva que podrían causar, en la ZMVM y otras grandes ciudades, los altos niveles de partículas suspendidas y en particular los metales que tienen adosados, como el vanadio que también está en altas cantidades en el petróleo mexicano y además es considerado un disruptor endocrino.

10. PERSPECTIVAS

Se ha estudiado la actividad como disruptor endocrino que se le ha atribuido al vanadio y a otros metales de transición, la habilidad de inducir la expresión de ciertas proteínas como los factores de crecimiento y citosinas, la generación de estrés oxidante y procesos inflamatorios. Sin embargo aún queda por determinar cuál de estos mecanismos de acción podrían estar implicados en los efectos del vanadio en el útero.

No obstante, aunque los resultados obtenidos en esta investigación son un gran avance en cuanto al daño causado en el útero por la inhalación de vanadio (principal de vía de exposición y más tóxica) aún queda por determinar si estas alteraciones pueden ocasionar daños reproductivos como la infertilidad, fetotoxicidad y teratogenicidad, entre otros.

11. REFERENCIAS

- Afeseh H., Kanthasamy A., Anantharam V., Song C., Witte T., Houk R., Kanthasamy A. Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase c-delta dependent oxidative signaling mechanisms: relevance to etiopathogenesis of Parkinson's disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009, 240:2; 273-285.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for vanadium. Department of Health and Human Services. U.S. 2009.
- Allen E. The oestrous cycle in the mouse. *Am J Anat.* 1992, 30:3; 297-371.
- Altamirano M., Alvarez L., Roldan E. Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med Sci Res.* 1993, 21:1; 711-713.
- Angeloni S., Martin M., García-Morales P., Castro-Galache M., Ferragut J., Saceda M. Regulation of estrogen receptor- by the tumor suppressor gene p53 in MCF-7 cells. *J Endocrinol.* 2004, 180:3; 497-504.
- Apostoli P., Catalani S. Metal ions affecting reproduction and development. *Met. Ions Life Sci.* 2011, 8:1; 263-303.
- Apostoli P., Telisman S., Sager P. Chapter 12: Reproductive and developmental toxicity of metals. *Handbook on the toxicology of metals.* Acedemis Pres, Elsevier. 3° edition. 2007, 213-250.
- Athar M., Vohora S. Chapter 4: Health effects. *Heavy metals and environment.* New Age International (P). 1995, 45-63.
- Avila-Costa M., Fortoul T. Vanadium and the liver, in *Vanadium: Its Impact on Health.* Nova Science Publishers. USA, 2007; 57-74.
- Ávila-Costa M., Fortoul T., Colín-Barenque L., Ordoñez-Librado J., Gutiérrez-Valdez A., Vanadium and the Nervous System, in *Vanadium: Its Impact on Health.* Nova Science Publishers. USA. 2007; 29-42
- Barceloux D. Vanadium. *Clinical Toxicology.* 1999, 37:2; 265-278.
- Behrman H., Aten R. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinology.* 1999, 128:6; 2958-2966.
- Buchanan D., Kurita T., Taylor J., Lubhan D., Cunha G., Cooke P. Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification and cornification. *Endocrinology.* 1998, 139:10; 4345-4352.
- Caligioni C. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci: Appendix-41.* doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48. 2009.
- Campbell W., Wein A. *Urología. Médica Panamericana.* Argentina, 2009; 3136.

- Carter J., Ghio A., Samet J., Devlin R. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997, 146:2; 180-188.
- Chards T., Grudzinskas J. *The uterus.* Cambridge University Press. 2003. 18-41
- Colín-Barenque L., Ávila-Costa M., Martínez M. Alteraciones ultraestructurales en giro dentado de ratones expuestos a la inhalación de Pentóxido de vanadio. *Acta Microscópica.* 2009, 18:3; 541-548.
- Conti C., Gimenez I., Benavides F., Frijhoff A., Conti M. *Atlas of laboratory mouse histology.* Texas Histopages. 2004. En <http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/introduction.html>. Consulta 15 de octubre 2013.
- Craig Z., Wang W., Flaws J. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction.* 2011, 142; 633-646.
- Crisp T., Clegg E., Cooper R. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. U.S. Environmental Protection Agency. 1997. 21-32.
- Curran G., Azarnoff D., Bolinger R. Effect of cholesterol synthesis inhibition in normocholesteremic young men. *J Clin Invest.* 1959, 38:7; 1251-1261.
- Curtis L., Rea W., Smith-Willis P., Fenyves E., Pan Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environment International.* 2006, 32:6; 815-830.
- Domingo J. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive toxicology.* 1996, 10:3; 175-182.
- Donaldson K., Stone V. Current hypotheses on the mechanism of toxicity of ultrafine particles. *Ann 1st Super Sanità.* 2003, 39:3; 405-410.
- Environmental Protection Agency (EPA). Office of air and radiation. 2003. En <http://www.epa.gov/airquality/particlepollution/health.html>. Consulta 26 de septiembre de 2013.
- Drummond A. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2006, 4:16; 1-11.
- Drummond A. The importance of ER β signaling in the ovary. *Journal of Endocrinology.* 2010, 205:1; 13-23.
- Environmental Protection Agency (EPA). Toxicological review of vanadium pentoxide. Integrated Risk Information System. 2011.
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA Journal.* 2004, 33; 1-22.

- Eynard A., Valentich M., Rovasio R., García W. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. Médica Panamericana. Argentina, 2008; 497-542.
- Falcón-Rodríguez C. Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio. Estudio comparativo en rata y ratón. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008
- Faría de Rodríguez C., Villalobos H., Nava de Leal C. Teratogenic effects of ammonium metavanadate on CNS of the offspring of albino rats. A histological and histochemical study. Invest Clin. 1998, 39:1; 55-85.
- Fontanini G., Campani D., Roncella M., Cecchetti D., Toniolo A., Basolo F. Expression of interleukin 6 (IL-6) correlates with oestrogen receptor in human breast cancer. Br J Cancer. 1999, 80-4; 579-584.
- Fortoul T., Quan A., Sánchez I., López I., Bizarro P., Mendoza M., Osorio L., Espejel G., Ávila M., Ávila-Costa M., Colin L., Villanueva D., Olaiz F. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. Archives of Environmental Health. 2002, 57:5; 446-449.
- Fortoul T., Rojas M. Chapter 1: Vanadium as an air pollutant. Vanadium: its impact on Health. Nova Science Publishers. 2007; 1-6.
- Fortoul T., Ruiz M. Bone and teeth effects, in Vanadium: Its Impact on Health. Nova Science Publishers. USA. 2007; 1-6.
- Fortoul T., Rodríguez-Lara V., Mussali-Galante P., Diaz-Bech P., Montañó F. Vanadium and respiratory system, in Vanadium Its Impact on Health. Nova Science. USA. 2007; 21-27
- Fortoul T., Rodríguez V., González A., Rojas M., Cano C., Ustarroz M., Colin L., Montañó L., García I., Bizarro P., et al. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. J Biom Biotechnol. 2011, 2011:951043. doi: 10.1155/2011/951043. Epub 2011 May 22.
- Gallego A., González I., Sánchez B., Fernández P., Garcinuño R., Bravo J., Pradana J., García M., Durand J. Contaminación atmosférica. UNED Publicaciones. Madrid. 2012; 63.
- García-Ibarra F. Efecto de la administración de ácido ascórbico sobre las alteraciones morfofisiológicas del ovario inducidas por la inhalación de vanadio en un modelo murino. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014.
- García F. Manual de inmunohistoquímica. Laboratorio de Patología Molecular. Instituto Nacional de Pediatría. México. 2012.
- Gilbert S. Biología del desarrollo. Médica Panamericana. Argentina, 2005; 585-614.
- Glinianaia S., Rankin J., Bell R., Pless-Mullooli T., Howel D. Particulate air pollution and fetal health: A systematic review of the epidemiologic evidence. Epidemiology 2004, 15; 36-45.

- Goldman J., Murr A., Cooper R. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research (Part B)*. 2007, 80; 84-97.
- González-Villalva A., Rodríguez-Lara V., Montaña F. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Current Topics in Toxicology*. 2009, 6:1; 31–38.
- Gray C., Bartol F., Tarleton B., Wiley A., Johnson G., Bazer F., Spencer T. Developmental biology of uterine glands. *Biology of Reproduction*. 2011, 65:5; 1311-1323.
- Green E. Biology of the laboratory mouse. Adapted for the web by Mouse Genomic Informatics. 2007. En <http://www.informatics.jax.org/greenbook/index.shtml>. Consulta 15 de octubre 2013.
- Groothuis P., Dassen H., Romano A., Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reproduction Update*. 2007, 13:4; 405-417.
- Hallberg F., Visscher M. A difference between the effects of dietary calorie restriction on the estrous cycle and on the 24-hour adrenal cortical cycle in rodents. *Endocrinology*. 1952, 51:4; 329-335.
- Hendrich H. *The laboratory Mouse*. Academic Press, Elsevier. United Kingdom. Second edition, 2012; 172-177.
- Hewitt S., Korach K. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors α and β in reproductive tissues. *Reproduction*. 2003, 125; 143-149.
- Hill R., Wyse G. *Fisiología animal*. Editorial Médica Panamericana. España. 2006; 501-510.
- Holstius D., Reid C., Jesdale B., Morello-Frosch R. Birth Weight following pregnancy during the 2003 Southern California Wildfires. *Environmental Health Perspectives*. 2012. En <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1104515>
- Ignar-Trowbridge D., Nelson K., Bidwell M., Curtis S., Washburn T., McLachlan J., Korach K. Coupling of dual signaling pathways: Epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1992, 89:1; 4658-4662.
- Ingram J., Rice A., Santos J., Van Houten B., Bonner J. Vanadium-induced HB-EGF expression in human lung fibroblasts is oxidant dependent and requires MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003, 284; 774-782
- Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la Zona Metropolitana del Valle de México. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. 2010; 17-31.
- Jiménez L. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación. México, 2003; 713-734.
- Kampa M. y Castanas E. en PROAIRE 2011-2020. Comisión Ambiental Metropolitana. México. 2011; 13-23.
- Korbecki J., Baranowska I., Gutowska I., Chlubek D. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *ActaBiochimicaPolonica*. 2012, 59:257; 1-6.

- Lahav M., Rennert H., Barzilai D. Inhibition by vanadate of cyclic AMP production in rat corpora lutea incubated in vitro. *Life Sci.* 1986, 39:36; 2557-2564.
- Mailhes J., Hilliard C., Fuseler J., London S. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Elsevier, Mutation Research.* 2003, 538; 101-107.
- Maisonet M., Correa A., Misra D., Jaakkola J. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. *Environmental Research.* 2004, 95:1; 106-115.
- Margolin Y., Aten R., Behrman H. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1990, 127:1; 245-250.
- Marsden H., Bronson F. Estrous synchrony in mice: alteration by exposure to male urine. *Science.* 1964, 144:3625; 1469.
- Marsden H., Bronson F. The synchrony of oestrus in mice: relative roles of male and female environments. *J. Endocrinol.* 1965, 32:3; 313-319
- Martin M., Reiter R., Pham T., Avellanet Y., Camara J., Lahm M, Pentecost E., Pratap K., Gilmore B., Divekar S., Dagata R., Bull J., Stoica A. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2003, 144:6; 2425-2436.
- Martínez-Pedraza M. Efecto del pentóxido de vanadio en ovario y epitelio vaginal. Modelo murino de exposición por inhalación. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.
- McPherson L., Baichwal V., Weigel R. Identification of ERF-1 as a member of the AP2 transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, 94:9; 4342-4347.
- Mills J., Valli V., Lumsden J. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J.* 1979, 20:1; 95-101.
- Morgan A., El-Tawil O. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacological Research.* 2003, 47:1; 75-85.
- Nakamura K., Kodaka M., El-Mehasseb I., Gajewska A., Okuno H., Ochwanowska E., Witek B., Kozlowski H., Kochman K. Further structural analysis of GnRH complexes with metals ions. *Neuroendocrinology Letters.* 2005, 26:5; 35-40.
- National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide. 2002.
- Nelson K., Takahashi T., Bossert N., Walmer D., McLachlan J. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, 88:1; 21-25.
- Obianime A., Gogo-Abite M., Roberts I. The effects of ammonium metavanadate on biochemical, hormonal, hematological and histopathological parameters of female Wistar rats. *Niger J Physiol Sci.* 2009, 24:2; 187-194.

- O'Neal S., Rhoads D., Racker E., Vanadate inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and other ATPases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979, 89:3; 845-850.
- Paksy K., Varga B., Lázár P. Cadmium interferes with steroids biosynthesis in rat granulosa and luteal cells in vitro. *Bio Metals*. 1992, 5:4; 245-250
- Palma G. *Biología de la Reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. 2001.
- Pantoja-Urbán A. Efecto de la inhalación de vanadio en la presencia de IL-6, MMP-9 y MMP-12: diferencia por sexos. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 2012.
- Parl F. Estrogen expression in breast cancer (chapter 5), in *Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer*. IOS Press. Second edition. 2000; 154-160.
- Perin P., Maluf M., Czeresnia C., Nicolosi D., Nascimento P., Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 2010, 93:1; 301-303.
- Piñón-Zarate G., Rojas-Lemus M., García-Zepeda E., Fortoul T. Metals and immune system, in *Metals and Toxicological Implication in Health*. Research Signpost, 2007; 43-64.
- Poggioli R., Arletti R., Bertolini A., Frigeri C., Benelli A. Behavioral and developmental outcomes of prenatal and postnatal vanadium exposure in the rat. *Pharmacol Res*. 2001, 43:4; 341-347.
- Proaire. Programa para mejorar la calidad del aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal.
- Rodríguez-Mercado J., Altamirano-Lozano M. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Int. Contaminación Ambiental*. 2006, 22:4; 173-189.
- Rojas L., Garibay V. Las partículas suspendidas, aeropartículas o aerosoles: ¿hacen daño a la salud?; ¿podemos hacer algo? *Gaceta Ecológica del Instituto Nacional de Ecología*. 2003, No. 069; 29-44.
- Romieu I., Castro F., Kunzil N., Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *European Respiratory Journal*. 2008, 31:1; 179-176.
- Samet J., Silbajoris R., Wu W., Graves L. Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999, 21; 357-564.
- Santagati S., Gianazza E., Agrati P., Vegeto E., Patrone C., Pollio G., Maggi A. Oligonucleotide squelching reveals the mechanism of estrogen receptor autologous down-regulation. *Mol Endocrinol*. 1997, 11:7; 938-949.
- Scottish Environment Protection Agency (SEPA). Scottish pollutant release inventory. 2006. En <http://apps.sepa.org.uk/spria/Pages/SubstanceInformation.aspx?pid=110>. Consulta 27 de septiembre de 2013.

- Sharara F., Seifer D., Flaws J. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertility and Sterility*. 1998, 70:40; 613-622.
- Sherwood L., Klandorf H., Yancey P. *Animal physiology: from genes to organisms*. Brooks/Cole CENAGE learning. Second edition. United States. 2013; 783-802.
- Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT). Indicadores de la calidad del aire. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. 2011. En <http://www.calidadaire.df.gob.mx/calidadaire/index.php?opcion=2&opcioninfoproductos=26>. Consulta 26 de septiembre de 2013.
- Slama R., Darrow L., Parker J., et al. Meeting Report: Atmospheric pollution and human reproduction. *Environmental Health Perspectives*. 2008, 116:6; 791-798.
- Sram R. Impact of air pollution on reproductive health. *Environmental Health Perspectives*. 1999, 107:11; 542-543.
- Stieb D., Chen L., Eshoul M., Judek S. Ambient air pollution, birth weight and preterm birth: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Research*. 2012, 117; 100-111.
- Takiguchi M., Yoshihara S. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environ Sci*. 2006, 13:2; 107-116.
- Tamayo F. Las citosinas. *Fundamentos de inmunobiología*. Universidad Nacional Autónoma de México. 1997, 347-394.
- Tan J., Paria B., Dey S., Das S. Differential Uterine Expression of Estrogen and Progesterone Receptors Correlates with Uterine Preparation for Implantation and Decidualization in the Mouse. *Endocrinology*. 1999, 140:11; 5310-5321.
- Tchernitchin A., Olivares F., Aranda C., Bustamante R., Gaete L., Ferrada K., Villagra R., Vera J., Iturbe R., Kim Y., Hernández N., Bizjak T., Novsak S. Efectos de la exposición aguda a cadmio en la acción de estrógenos en útero de rata impúber. *Rev Chil Pediatr*. 2008, 79:4; 373-380.
- Terry K., Chatman L., Foley G., Kadyszewski E., Fleeman T., Hurtt M., Chapin R. Effects of feed restriction on fertility in female rats. *Birth defects research (part B)*. 2005, 74; 431-441.
- Tibbetts T., Mendoza M., O'Malley B., Conneely O. Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*. 1998, 59; 1143-1152.
- Treuting P., Dintzis S. *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas*. Academic Press, Elsevier. United Kingdom, 2012; 253-276.
- Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermsillo A., Márquez M., Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana*. 2003; 139: 57- 63.

- Veras M., García E., Dolhnikoff M., Nascimento P. Air Pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2010, 13:1; 1-15.
- Wang H., Eriksson H., Sahlin L. Estrogen receptors α y β in the female reproductive tract of rat during the estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 2000, 63; 1331-1340.
- Weitzenfeld H. Contaminación atmosférica y salud en América Latina. *Boletín de la Organización Panamericana de la Salud*. 1992, 26:1; 97-109.
- Welsh U. *Histología. Médica Panamericana*. Argentina, 2008; 473-520.
- Westwood F. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*. 2008, 36; 375-384.
- Whitten W. Occurrence of anoestrus in mice caged in groups. *J. Endocrinol*. 1959, 18:1; 102-107.
- Winuthayanon W., Hewitt S., Orvis G., Behringer R., Korach K. Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *PNAS. Biochemistry*. 2010. En www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1013226107
- World Health Organization (WHO). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. *Concise International Chemical Assessment Document 29*. Geneva. 2001.
- World Health Organization (WHO). Environment and health. 2012. En http://www.who.int/gho/phe/outdoor_air_pollution/en/index.html. Consulta 26 de septiembre de 2013.
- Zuk M., Tzintzun G., Rojas L. Tercer Almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en nueve ciudades mexicanas. *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*. 2007; 19-20.