

5  
2ej.



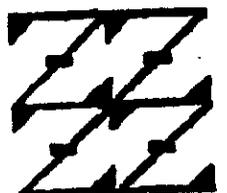
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**REPROTOXICIDAD INDUCIDA POR TETRAÓXIDO DE VANADIO  
EN EL RATÓN MACHO CD-1**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ANDRÉS ARAGÓN MARTÍNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. MARIO A. ALTAMIRANO LOZANO**



LO BORGANO  
DE FUERZA REPLICACION

Noviembre de 1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

267718



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.

## DEDICATORIA

A María Elena Por el cariño, apoyo y paciencia  
que siempre me ha brindado. Gracias amor.

A mis padres Magdalena y Andrés porque nunca  
perdieron la Fé en su hijo.

A mis hermanos Rocío, Laura, Leticia, Antonio, Rosa y a  
todos mis sobrinos, por acompañarme en todo momento.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario Altamirano Lozano por la orientación y el apoyo brindado durante el desarrollo este trabajo.

Esta tesis fué realizada en la Facultad de estudios Superiores Zaragoza, UNAM.  
En la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR), Laboratorio de  
Citogenética, Mutagénesis y Toxicología Reproductiva, bajo la dirección del Dr. Mario  
A. Altamirano Lozano.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de la DGAPA proyecto clave  
IN-214597 y CONACyT proyecto clave 25417-M.

# Índice

---

Resumen-----	i, ii
Introducción-----	2
Toxicología reproductiva-----	3
Reproducción en el macho-----	5
Estructura del espermatozoide-----	6
Características de los metales-----	9
Vanadio-----	11
Usos del vanadio-----	12
Importancia biológica-----	13
Efectos sobre la reproducción-----	16
Justificación-----	18
Hipótesis-----	20
Objetivos-----	21
Material y métodos-----	22
Resultados-----	27
Discusión-----	46
Conclusiones-----	57
Bibliografía-----	58

### Resumen

El vanadio (V) es un metal traza que se ha acumulado en el ambiente debido a las múltiples actividades industriales en que es utilizado. Se han propuesto otros usos potenciales en cuanto a salud humana se refiere (ej. antitumorígeno). Sin embargo, puede inducir efectos tóxicos en diferentes sistemas de prueba. En los fluidos biológicos se le encuentra como  $V^{5+}$ , y dentro de las células como  $V^{4+}$ .

Por otro lado, se sabe que la exposición de machos a sustancias químicas puede ocasionar alteraciones en la calidad y cantidad de espermatozoides producidos durante la gametogénesis.

Con base en lo anterior se decidió analizar los efectos del tetraóxido de vanadio ( $V_2O_4$ ,  $V^{4+}$ ) en la espermatogenesis del ratón CD-I. Para lo cual se procedió en primer lugar a determinar la Dosis Letal Media por vía ip del  $V_2O_4$  (150 mg/kg.); para posteriormente tratar por la misma vía, durante un período de 60 días, a 4 grupos de ratones con diferentes dosis del compuesto (0, 4.7, 9.4 ó 18.8 mg/kg.) y, evaluar el conteo, los porcentajes de movilidad, viabilidad, y la morfología espermáticas, el diámetro de los túbulos seminíferos y la apariencia histológica del epitelio germinal.

Los datos obtenidos mostraron que el conteo espermático tiende a disminuir conforme se incrementa la dosis de  $V_2O_4$ . En la dosis de 18.8 mg/kg. se aprecia una reducción significativa en el porcentajes de movilidad ( $50.34 \pm 8.74$  vs.  $62.62 \pm 3.17$  del testigo), la viabilidad disminuye significativamente en las concentraciones de 9.4 y 18.8 mg/kg. ( $77.40 \pm 6.32$  y  $76.28 \pm 2.74$  respectivamente vs.  $93.39 \pm 1.96$  del testigo). El

porcentaje de anormalidades morfológicas en espermatozoides incrementan de forma significativa en el grupo tratado con 9.4 mg/kg. ( $11.98 \pm 5.66$  vs.  $7.08 \pm 1.80$  del testigo).

El  $V_2O_4$  en las concentraciones utilizadas no altera el diámetro de los túbulos seminíferos, pero ocasiona alteraciones en el epitelio germinal que van desde la muerte celular hasta la pérdida completa de los tipos celulares comunes a los túbulos seminíferos..

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que los efectos tóxicos inducidos por el  $V_2O_4$  pueden ser resultado de daño peroxidativo y de inhibición en el desarrollo citoesquelético a nivel de las células de Sertoli.

### Introducción

El hombre siempre ha estado expuesto a múltiples sustancias, algunas de las cuales ocurren de forma natural en el ambiente, mientras que otras surgen como producto de su actividad transformadora. Algunas de estas sustancias han ejercido un efecto dañino o tóxico sobre los organismos y el medio ambiente, lo que llevó a discernir su origen y clasificarlas como toxinas a aquellas de origen natural y como tóxicos aquellos derivados del quehacer humano (Abundis, 1996).

De esta forma se entiende por toxicidad la propiedad o propiedades de una sustancia que produce efectos dañinos a un sistema biológico. Mientras que, un tóxico es la sustancia que produce este efecto biológico (Landis y Yu, 1995).

Algunos tóxicos son xenobióticos a los sistema vivos. El término xenobiótico indica que los agentes referidos no ocurren naturalmente bajo condiciones favorables. Sin embargo, componentes naturales del objeto biológico pueden asumir las características de xenobiótico al ser introducidas por una ruta no fisiológica o en cantidades no fisiológicas (Ariëns y Simonis, 1982).

Las actividades industriales de la era moderna nos han puesto en contacto con sustancias a concentraciones a las que nunca se había expuesto la vida, es por ello que existe una preocupación constante por las consecuencias que pueden tener los agentes físicos y químicos, productos de este desarrollo tecnológico sobre el hombre y los seres vivos (Ariëns y Simonis, 1982; Morales, 1988).

Toxicología reproductiva

La Toxicología Reproductiva es una parte de la Toxicología General que tiene relación con los efectos adversos producidos por agentes exógenos (es decir que no se encuentran naturalmente en los organismos o la naturaleza) sobre la reproducción (ECETOC, 1983), figura 1.

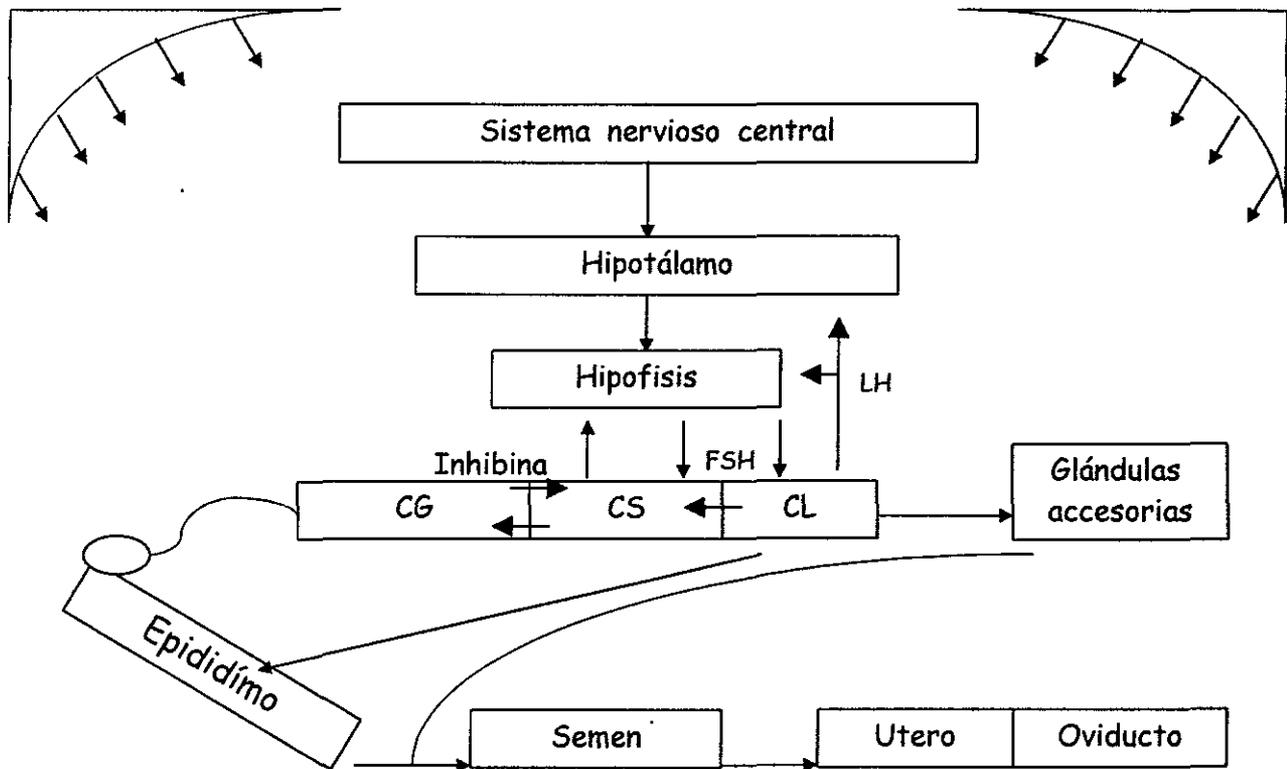


Figura 1. Interdependencia de los componentes del sistema reproductor del macho. Hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), células germinales (CG), células de Sertoli (CS) y células de Leydig (CL) (Modificado de Amann, 1986).

Dependiendo del sexo, un mismo tóxico puede producir diferentes efectos al entrar en contacto con el organismo (Mattison *et al.*, 1990). En el caso del macho la elevada y constante producción de células gaméticas, así como los múltiples componentes que integran su sistema reproductor lo hacen muy susceptible al daño inducido por agentes exógenos.

La función normal del sistema reproductivo del macho requiere de la comunicación neural entre el sistema nervioso central, el hipotálamo y las gónadas. Las señales hormonales y neuroquímicas transmiten información entre el hipotálamo, la adenohipófisis, células de Leydig, células de Sertoli y el epitelio germinal (Amann, 1986, Griswold, 1995)(figura 1).

En la evaluación del estado funcional del sistema reproductor del macho los estudios epidemiológicos tienen dificultades inherentes, como que: 1) no miden la dosis interna del tóxico en el organismo, 2) no distinguen entre los efectos maternos y paternos y 3) no distinguen los efectos somáticos y germinales (Wyrobek, 1993). De aquí se desprende la necesidad de contar con marcadores biológicos (esto es técnicas) que nos indiquen alteraciones tempranas sobre la salud.

Un biomarcador en Toxicología Reproductiva es un indicador de los efectos adversos en los componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ocurrir en cualquier paso de la ruta que inicia con la exposición y/o los cambios biológicos tempranos y progresa a la ocurrencia de resultados reproductivos anormales, que

pueden ser medidos en muestras biológicas (NRC, 1989; Ostrosky-Wegman y Gonsebatt, 1997).

### **Reproducción en el macho**

La secuencia de eventos citológicos que resultan en la formación de espermatozoides maduros a partir de células precursoras es conocida como espermatogénesis. Éste proceso tiene lugar en los túbulos seminíferos del testículo durante la vida reproductiva del macho (de Kretser y Kerr, 1994).

El proceso de espermatogénesis involucra una serie de divisiones mitóticas por parte de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, extensos cambios morfológicos de las espermátidas durante la espermiogénesis y su liberación como células libres en el lumen del tubo seminífero por la espermiación (Eddy y O'Brien, 1994).

El apropiado funcionamiento de la espermatogénesis es una de las claves para el futuro, puesto que si no ocurriera diariamente la producción sucesiva de un gran número de espermatozoides seríamos infértiles como especie, y de esta forma no podríamos transmitir nuestros genes para la siguiente generación (Sharpe, 1994).

De lo anterior se desprende que la función primaria del sistema reproductor del macho es producir espermatozoides que puedan sucesivamente fertilizar un óvulo y producir descendencia saludable. Este fin requiere su producción en número

suficiente, con características adecuadas de movilidad y capacidad de fertilización (Foster y Lamb IV, 1988; Chapin *et al.*, 1992).

### Estructura del espermatozoide

Los espermatozoides de mamífero tienen dos grandes componentes, la cabeza y el flagelo.

La cabeza consiste del acrosoma, el núcleo, pequeñas cantidades de estructuras citoesqueléticas y citoplasma. El acrosoma está rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas, se localiza en la parte anterior del núcleo. El núcleo contiene solo un miembro de cada par cromosómico y la cromatina se encuentra altamente condensada. El flagelo contiene un axonema central rodeado por una funda externa de fibras densas que se extienden desde la cabeza hasta cerca de la parte posterior, además la parte posterior presenta mitocondrias que envuelven en forma de hélice estrecha las fibras densas, y la parte posterior del flagelo contiene una funda fibrosa que rodea las fibras densas externas, estos dos últimos elementos en conjunto forman el citoesqueleto del flagelo (Figura 2).

Tanto el flagelo como la cabeza se encuentran estrechamente envueltos por la membrana plasmática y contienen poco citoplasma. Aunque todos los espermatozoides de mamífero tienen estas características generales, existen diferencias especie-específicas tanto en el tamaño y forma de la cabeza como en la longitud y tamaño relativo de los componentes del flagelo (Eddy y O'Brien, 1994).

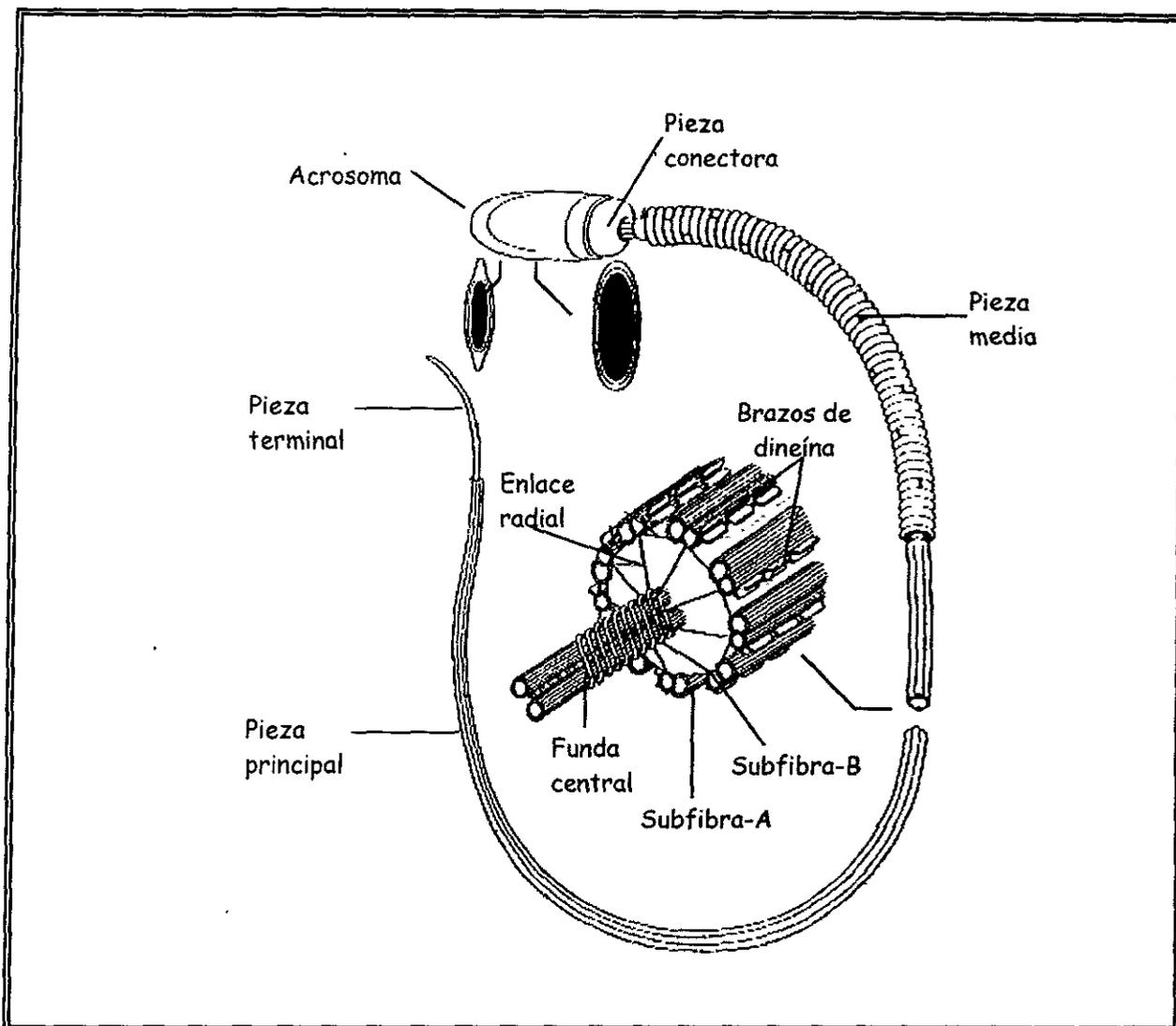


Figura 2. Estructura básica de un espermatozoide de mamífero (tomado de Katz, 1991).

Por otro lado, los modelos de experimentación no tienen características reproductivas similares a las del hombre. Sin embargo, esto no niega la validez del uso de animales en la búsqueda de agentes que afecten la función reproductora del varón (Amann, 1986).

Los roedores se han usado ampliamente como modelos en la evaluación toxicológica de productos químicos, incluyendo aquellos que afectan la función testicular.

El ratón ha sido utilizado ventajosamente en el estudio de efectos de drogas quimioterapéuticas sobre la función testicular (Meistrich, 1986), así como de otros múltiples agentes químicos (Wyrobek y Bruce, 1975; Wyrobek *et al.*, 1983; WHO, 1988; Shelby *et al.*, 1993).

Los aspectos funcionales de la integridad espermática son muy importantes y quizá inseparables de los aspectos morfológicos. Así mismo, es igualmente relevante el examen de semen para las evaluaciones de fertilidad, para el desarrollo de anticonceptivos o para las pruebas de toxicidad usando las medidas tradicionales de producción espermática, porcentaje de formas normales y porcentaje de movilidad, las cuales pueden tener una amplia influencia en los sucesos reproductivos (Scialli, 1989). Aunque los cambios en la movilidad espermática no son por si mismos indicativos de exposición tóxica o efecto sugieren una reducida habilidad reproductora del macho que los produce, debido a que una disminución en la movilidad espermática resulta en un disminución de la fertilidad (Chapin *et al.*, 1992).

La expresión final de la función testicular consiste en la integración estructural y funcional de los espermatozoides, los que al conjugarse con las secreciones de la cola del epidídimo, la próstata, las glándulas bulbouretrales y las vesículas seminales durante la eyaculación, constituyen el semen en todas las

especies de mamíferos. En esta asociación dinámica de espermatozoides y plasma seminal, ambas partes tienen un papel muy importante dentro de los eventos que culminan con la fertilización ya que los espermatozoides deben ser estructural y funcionalmente íntegros y por lo tanto, metabólicamente activos para fertilizar el gameto homólogo (Reyes *et al.*, 1991).

### Características de los metales

De los 109 elementos identificados hasta la fecha cerca de 80 son considerados como metales. Los metales son usualmente definidos con base en las propiedades físicas de su estado sólido, tales como: alta reflectividad, alta conductividad eléctrica, alta conductividad térmica y propiedades mecánicas. Los metales en estado sólido están caracterizados por su estructura cristalina, por el tipo específico de enlace químico en que los electrones están deslocalizados y móviles, y por sus propiedades magnéticas (Lagerkvist., 1986; Vouk, 1986).

Los elementos metálicos forman una variedad de compuestos en diferentes estados de oxidación, entre los que se incluyen compuestos inorgánicos convencionales, como sales y semejantes, complejos metálicos, compuestos de coordinación y organometálicos.

Desde el punto de vista toxicológico, la definición más usual de metal está basada en las propiedades de sus iones en solución acuosa: un metal es un elemento

que bajo condiciones biológicas permite reaccionar a uno o más electrones y formar un catión. (Lagerkvist *et al.*, 1986).

La solubilidad de los compuestos metálicos en agua y lípidos es de gran importancia toxicológica debido a que es uno de los factores que influyen sobre la disponibilidad y absorción de los metales (Lagerkvist *et al.*, 1986; Sharma y Taludker, 1987). En cada grupo del sistema periódico la solubilidad de los compuestos metálicos disminuye conforme incrementa del número atómico (Lagerkvist *et al.*, 1986).

Los metales pueden dividirse en pesados, con densidades superiores a 5 gr/cm<sup>3</sup>; y ligeros, con densidades inferiores a 5 gr/cm<sup>3</sup>. Muchos metales pesados traza son indispensables para la vida, aunque solo se encuentren en concentraciones muy pequeñas en los tejidos del cuerpo (Duffus, 1983; Bolaños, 1990). Puede definirse a un elemento traza como aquel que se encuentra en concentraciones de 1000 ppm o inferior en la corteza terrestre (Duffus, 1983). En general se considera como elemento esencial a un elemento consistentemente presente en ciertas especies biológicas y cuya deficiencia en la nutrición puede provocar enfermedad, anormalidades metabólicas o perturbaciones en el desarrollo (Da Silba y Williams, 1991).

Con respecto a los efectos de los compuestos metálicos en la reproducción gestación y lactación, está bien establecido que su toxicidad depende de una serie de factores tales como: la forma química del compuesto específico, el estado de

oxidación, la ruta de exposición, la solubilidad en lípidos, el periodo de tratamiento y la dosis administrada (Domingo, 1996; Sharma y Talukder, 1987).

### Vanadio

El vanadio, número atómico 23, está ampliamente distribuido en la naturaleza, con una abundancia del 0.014% (Rehder, 1991). Es un metal de color grisáceo, con densidad de  $6.11 \text{ g/cm}^3$ , sus estados de oxidación van de  $V^-$ ,  $V^0$ ,  $V^{2+}$ ,  $V^{3+}$ ,  $V^{4+}$  y  $V^{5+}$ , de éstos, los tres últimos son los más comunes y el  $V^{4+}$  es su forma más estable y el  $V^{3+}$  en forma de sal es fuertemente reductor. Se disuelve en agua, ácidos y forma vanadatos con bases (Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988).

Se conocen cerca de 70 aleaciones con otros metales principalmente con hierro, uranio, titanio y aluminio. Se encuentra formando parte de materiales de tipo fósil, en roca bituminosa, en sedimentos de roca caliza, en minerales como roscoelita, vanadita, desclozita, cuprodesclozita, carnotita y titanferromagnetita (Rehder, 1991; WHO, 1988).

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

### Usos del vanadio

Entre los usos de vanadio, encontramos que en la metalurgia del hierro de un 75 a 85% es usado como aditivo en aleaciones de varios tipos de acero. En la industria química orgánica e inorgánica, es usado como catalizador, donde el pentóxido de vanadio y los metavanadatos son de importancia especial en la producción de ácido sulfúrico, plásticos, en la oxidación de compuestos orgánicos (Stokinger, 1981; Baroch, 1983; Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988) y su uso se ha expandido hasta formar parte de materiales superconductores (WHO, 1995).

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

En humanos el  $V^{4+}$  es utilizado para mejorar el rendimiento físico de atletas durante entrenamientos pesados (Fawcett *et al.*, 1997), en líneas celulares tumorales humanas ha mostrado propiedades antineoplásicas (Jackson *et al.*, 1997) y recientemente ha sido propuesto como un posible anticonceptivo vaginal (D' Cruz *et al.*, 1998).

### Importancia biológica

Es un elemento traza esencial, importante en el metabolismo del hueso, cartílago y en el proceso de crecimiento de ratas y pollos. Juega un papel importante en la nutrición de varias formas de vida, y a pesar de que no existen datos de alteraciones producidas por deficiencia en el humano, se piensa que puede estar involucrado en la regulación de algunos procesos fisiológicos (Sabbioni *et al.*, 1983; Carson *et al.*, 1987; French y Jones, 1993).

Aunque el vanadio esta presente en casi todos los organismos vivos incluyendo los seres humanos, en altas concentraciones puede volverse tóxico (Nechay *et al.*, 1986).

En condiciones fisiológicas el vanadio se encuentra principalmente en estado de oxidación  $V^{5+}$  (vanadato) en los fluidos extracelulares, y al ingresar a las células es reducido por el glutatión y otros agentes a especies de  $V^{4+}$  (vanadilo) y es estabilizado con algunos ligandos (Bruech *et al.*, 1984; Nechay *et al.*, 1986; Sakurai *et al.*, 1980; Sakuray, 1994).

El ión vanadilo interactua fácilmente a proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, fosfatos, fosfolípidos, glutatión, citrato, ascorbato etc. mientras que el vanadato puede inhibir la función de las ATPasas de dineína, enzimas involucradas en el movimiento ciliar, flagelar, movimiento cromosómico, transporte exoplásmico e intracelular de vesículas de membrana (Nechay, 1984; Nechay *et al.*, 1986).

El vanadato es un potente inhibidor de las ATPasas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , más que el vanadilo (Nechay *et al.*, 1986). De la misma forma los iones de vanadio fungen como agentes inhibidores de las funciones de algunas enzimas involucradas en la síntesis de ADN (Sabbioni *et al.*, 1983).

Personas expuestas a óxidos y otro tipo de sales en el ambiente laboral presentan irritación en ojos, nariz, mucosa oral, piel, y enfermedades como dermatitis, conjuntivitis, tos y bronquitis crónica, bronconeumonía, traqueobronquitis, bronquiectasia, rinitis, laringitis, asma y enfisema, así como también anemia y necrosis pulmonar (Lagerkvist *et al.*, 1981; Carson *et al.*, 1987; WHO, 1988).

En trabajadores expuestos, el vanadio se absorbe principalmente por vías respiratorias y en especial por pulmón. Se estima que cerca del 25% de los compuestos solubles pueden ser absorbidos (Elinder *et al.*, 1988; WHO, 1988), mientras que la tasa de absorción oral es de menos del 1% (Lauwerys y Hoet, 1993)

Figura 3.

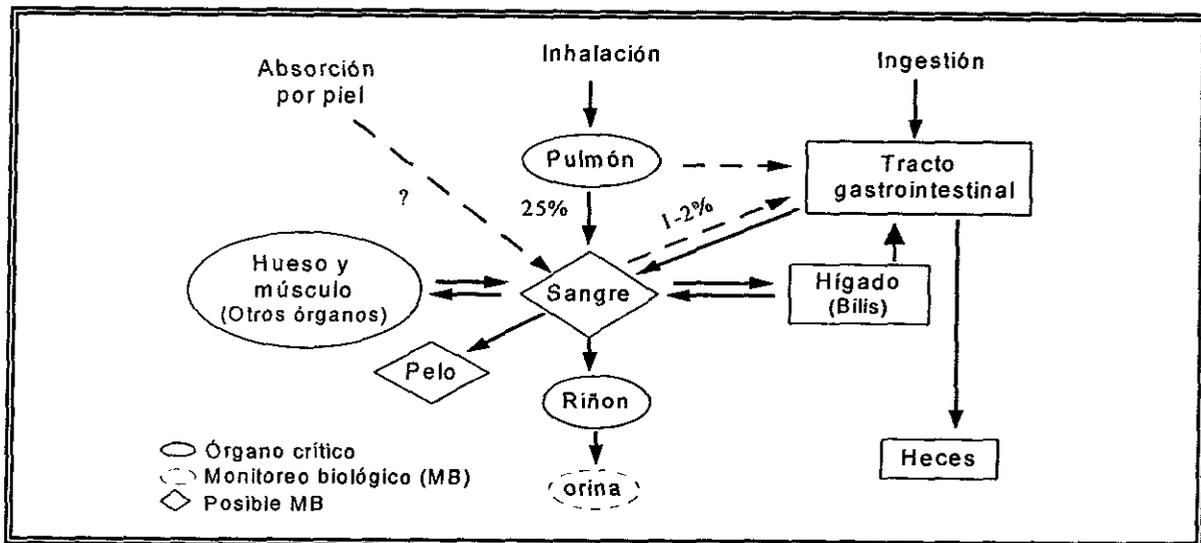


Figura 3. Toxicocinética del vanadio (Modificado de Elinder *et al.*, 1988)

En general las concentraciones de compuestos de vanadio en el organismo son bajas, pero son más altas en hígado, riñón y pulmón que en otros tejidos. Aproximadamente el 90% del vanadio circulante en plasma se encuentra unido a transferrina; es excretado por las vías urinarias de 20-40 horas, y en menor grado por las heces (Lauwerys y Hoet, 1993).

Las formas activas del vanadio en células de mamífero son el vanadio (V) y derivados (vanadato, pervanadato) o vanadio (IV), el catión vanadil (Etcheverry, *et al.*, 1996; Nechay *et al.*, 1986).

La toxicidad normalmente se presenta como resultado de la exposición industrial a altas cantidades de vanadio transportado por el viento. Por otro lado, la alta actividad farmacológica de ciertos compuestos de vanadio sugiere la explotación de este elemento con fines benéficos además, los complementos nutrimentales que contienen vanadio actualmente son ampliamente comercializados (Baran, 1998).

Recientes observaciones sugieren que el vanadio mimetiza algunas acciones de la insulina y puede ser usado en el tratamiento de diabetes tipo I dependiente de insulina, en aquellos casos en que la insulina no es aceptada. Este uso potencial del vanadio redirige el interés por los aspectos toxicológicos del metal, en particular, al potencial mutagénico y efectos teratogénicos (Leónard y Gerber, 1994; Dai *et al.*, 1994; Srivastva *et al.*, 1996).

### Efectos sobre la reproducción

Recientemente se ha reportado que la administración de 8.5  $\mu\text{g/g}$  de pentóxido de vanadio en ratones hembra CD-1 disminuye la fertilidad, el número de implantes, fetos vivos, peso fetal y aumenta las reabsorciones, mientras que en ratones macho disminuye significativamente el peso testicular después de 50 y 60 días de tratamiento. Reduce el porcentaje de movilidad espermática a partir de 10 días de tratamiento, el conteo espermático a partir de 20 días y el porcentaje de anomalías incrementa los 20, 50 y 60 días (Altamirano-Lozano *et al.*, 1996).

Datos disponibles de los efectos teratogénicos y reproductivos del vanadio muestran que la administración de metavanadato en ratas adultas induce deterioro en la espermatogénesis y disminuye la movilidad de los espermatozoides; mientras que la administración a ratas preñadas incrementa la tasa de embriomortalidad (WHO, 1988). *In vitro*, el ortovanadato inhibe la acción de la hormona luteinizante, que induce la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) en células de cuerpo lúteo de ratas seudopreñadas (Lahav *et al.*, 1986).

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

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

En ratas hembras prepuberales que fueron tratadas con pentóxido de vanadio al llegar a la pubertad se produjo un descenso en la tasa de ovulación, así como cambios en el peso del timo, glándulas submandibulares e hígado (Altamirano *et al.*, 1991).

Algunos estudios involucran el apareamiento de machos tratados con hembras no tratadas; con respecto al vanadio se ha observado que los cambios causados por la administración de altas dosis de metavanadato de sodio en el sistema reproductivo del ratón macho no tienen un impacto detectable en el número de implantes viables y no viables (Llobet *et al.*, 1993), lo que ilustra la relativa insensibilidad de este parámetro como un indicador de otros cambios en el tracto reproductivo del macho (Linder *et al.*, 1988).

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

### JUSTIFICACIÓN

Debido a las múltiples actividades cotidianas e industriales que involucran la intervención y liberación de compuestos metálicos al medio ambiente, la población humana en la actualidad se encuentra expuesta a concentraciones sin precedentes de estos contaminantes.

Un ión que en los últimos años ha cobrado interés como contaminante, tanto por su capacidad para interactuar con diversos componentes de los sistemas biológicos como por su potencial terapéutico y toxicológico es el vanadio.

El vanadio es un metal pesado que presenta varios estados de oxidación. La forma más estudiada y tóxica, predominante en los fluidos biológicos es la 5<sup>+</sup>. Sin embargo, algunas evidencias apuntan hacia la forma 4<sup>+</sup> como principal responsable de los efectos producidos por la forma 5<sup>+</sup> a nivel intracelular.

La presencia de elevadas cantidades de compuestos de este tipo en el ambiente pueden tener efectos nocivos sobre la salud. Algunos de estos efectos logran alterar el material genético del a nivel del sistema reproductor.

La producción de gametos en el macho es constante y en número elevado, estas características la hacen susceptible de sufrir alteraciones en su calidad y cantidad por parte de agentes químicos, debido a esto las células germinales derivadas del procesos pueden ser ineficaces para llevar a cabo la fecundación, o bien, acarrear alguna modificación genética que perturbe el desarrollo y nacimiento del producto resultante.

Dada esta situación, en el presente trabajo se decidió estudiar el efecto del tetraóxido de vanadio (estado de oxidación 4<sup>+</sup>) sobre la espermatogénesis, utilizando el modelo de ratón y evaluando los parámetros de morfología, movilidad, viabilidad, conteo espermático y área de los túbulos seminíferos.

### Hipótesis

El vanadio 5<sup>+</sup> es la forma predominante en los fluidos biológicos; sin embargo, una vez que ingresa a las células es reducido por diversas enzimas a la forma 4<sup>+</sup>, y es así como se acumula.

Diversos parámetros citogenéticos evaluados tanto *in vivo* han mostrado una elevada toxicidad expresada como una disminución de la viabilidad y daño al material genético cuando se administra vanadato. Es el nivel celular aquel en que se observa el daño. En el sistema reproductor de roedores macho por ejemplo, se ha encontrado un aumento en el porcentaje de espermatozoides con forma anormal.

Con base en lo anterior, si administramos un compuesto de vanadio con estado de oxidación 4<sup>+</sup> (tetraóxido de vanadio) directamente a ratones macho de la cepa CD-1 durante el ciclo espermatogénico, entonces induciremos toxicidad expresada en el sistema reproductor como alteraciones histológicas a nivel de los túbulos seminíferos, incremento en las anomalías espermáticas y reducción en el conteo, viabilidad y movilidad de los espermatozoides.

## OBJETIVOS

### General:

Evaluar los efectos reprotóxicos del tetraóxido de vanadio en túbulos seminíferos y células gaméticas de ratones CD1 tratados durante la espermatogénesis.

### Particulares:

Establecer la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) del tetraóxido de vanadio para ratones macho CD-1.

Evaluar la producción de anomalías espermáticas ocasionadas por la administración de tetraóxido de vanadio durante la espermatogénesis de ratón.

Valorar la movilidad, viabilidad y producción espermática de ratones tratados con tetraóxido de vanadio durante la espermatogénesis.

Establecer el efecto del tetraóxido de vanadio sobre el peso testicular en ratones tratados durante la espermatogénesis.

Evaluar el área de túbulos seminíferos en ratones tratados con tetraóxido de vanadio durante la espermatogénesis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Animales

Todos los animales utilizados en el trabajo fueron ratones macho de la cepa CD-1 de tres meses de edad y un peso entre 37.5 - 51 g, que fueron repartidos en grupos de 6 animales cada uno, se mantuvieron en cajas de plástico y condiciones controladas de iluminación-oscuridad (luz de las 05:00 a las 17:00 h). Se les permitió libre acceso al agua y alimento (Purina chow). Los ratones fueron pesados al momento de iniciar los tratamientos, cada tercer día y al momento del sacrificio en una balanza digital (ACCULAB V-333 con exactitud de 0,1 g).

### Disolución de trabajo

Antes de aplicar los tratamientos se preparó una suspensión de tetraóxido de vanadio ( $V_2O_4$  99,9 puro, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis, USA) mezclando el compuesto en agua desionizada. Las concentraciones finales se calcularon para ser administradas en 0,1 ml por cada 10 g de peso corporal del animal.

### Determinación De La LD<sub>50</sub>

Con el propósito de determinar la dosis en la que el tetraóxido de vanadio expresa su toxicidad como la muerte del 50% de la población de ratones machos de la cepa CD-1 a que se administra, se procedió a formar 6 grupos con 6 animales cada uno; los cuales fueron tratados ip con una de las siguientes concentraciones de  $V_2O_4$ : 130, 140, 150, 160, 180 ó 200 mg/kg en un volumen de 0,1 ml por cada 10 gramos de peso

corporal. El porcentaje de mortalidad para cada grupo se determinó 24 horas después y se graficó contra las diferentes dosis aplicadas.

Las concentraciones mencionadas se determinaron a partir de aproximaciones hechas con datos de LD<sub>50</sub> reportados en la literatura para otros compuestos de vanadio con estados de oxidación 4<sup>+</sup> (Llobet y Domingo, 1984).

### Grupos

Una vez obtenida la LD<sub>50</sub> se formaron los grupos para análisis espermático, los cuales fueron tratados durante 60 días con tetraóxido de vanadio de acuerdo a la siguiente tabla:

Grupo	Dosis, fracción de la LD <sub>50</sub> (mg / kg)	Número de animales	Duración del tratamiento (días)
1	0	6	60
2	1/8	6	60
3	1/16	6	60
4	1/32	6	60

Todos los animales recibieron cada tercer día una inyección i.p. de acuerdo al grupo en que se ubicaran.

### Evaluación Espermática

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó su disección. Los testículos se pesaron rápidamente con ayuda de una balanza analítica (OHAUS 130, exactitud de 0.001 g). Los conductos eferentes fueron removidos y su exprimido se colocó en 2 ml de solución Tyrode's (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO) a 37°C. De esta suspensión homogénea se dispuso una gota sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y fué valorada la movilidad espermática al contar 200 espermatozoides de cada ratón (Linder *et al.*, 1992; Seed *et al.*, 1996) en diferentes campos a 400 aumentos en un microscopio de contraste de fases (NIKON); las categorías fueron: espermatozoides con movimiento y espermatozoides sin movimiento. El porcentaje de espermatozoides con movimiento se definió como número de células móviles/ número de células totales x 100 (Seed *et al.*, 1996).

La viabilidad fué evaluada colocando 10 µl de la suspensión espermática en un tubo eppendorf y adicionando 10 µl de azul tripano, se agitó ligeramente y enseguida se colocó una gota sobre un portaobjetos para contar 200 células siguiendo el criterio de inclusión-exclusión, esto es: oscuras (que incluyeron el colorante) como muertas y claras como vivas (Sigma cell culture, 1997). Se utilizó el mismo método que en la evaluación de movilidad para obtener el porcentaje de células viables y de esta forma se presentaron.

El conteo espermático se determinó colocando 10 µl de la suspensión espermática de los conductos eferentes de cada ratón en la cámara de un hemocitómetro (PROPER Lumicyte 1/100 mm de profundidad) y contando en el microscopio, a 400 aumentos el número de espermatozoides presentes en cuatro cuadrantes. El promedio obtenido se multiplicó por 10<sup>4</sup>.

Del resto de cada suspensión espermática se hicieron 2 preparaciones, fueron secadas al aire y teñidas con Giemsa (1:16 en agua corriente por 30 minutos). De cada

preparación se examinaron 500 o más espermatozoides de diferentes campos (6000 o más espermatozoides por dosis) a 400 aumentos y fueron clasificados como normales o anormales de acuerdo al criterio de Wyrobek y Bruce (1975). Los resultados se presentaron como porcentaje de formas anormales y porcentaje relativo de cada forma anormal. Las preparaciones fueron codificadas antes de evaluar las anormalidades morfológicas en espermatozoides.

### **Análisis morfométrico de túbulos seminíferos**

El testículo derecho de cada ratón se fijó en Bouin (75 partes de ácido pícrico, 25 partes de formol y 5 partes de ácido acético glacial) durante 24 horas, para después ser deshidratado progresivamente con alcohol etílico de diferentes graduaciones e incluido en parafina.

De los órganos así obtenidos se hicieron cortes transversales seriados de 10  $\mu\text{m}$  en un microtomo (American Optical), recuperando uno cada 100  $\mu\text{m}$ .

Los cortes se colocaron en laminillas y la parafina se retiró mediante lavados en xilol. Las preparaciones se tiñeron con hematoxilina-eosina, fueron montados con bálsamo de Canadá y se observaron a 100 aumentos.

Con una reglilla micrométrica se midió el diámetro máximo y el perpendicular a éste de 50 túbulos seminíferos al azar en cada uno de los órganos obtenidos. Se utilizó la fórmula:  $\text{área} = r^2\pi$ ; donde  $r = \text{diámetro uno} + \text{diámetro dos}/4$ . Solamente se

midieron las secciones transversales y se tuvo cuidado de no medir cada túbulo más de una vez. Los resultados se presentan como el área promedio en  $\mu\text{m}$  por dosis.

En todas las preparaciones se busco la presencia de algún tipo de lesión

### **Análisis Estadístico**

Los datos cuantitativos de peso testicular, conteo espermático y área de los túbulos seminíferos de los grupos tratados con tetraóxido de vanadio fueron comparados contra el grupo testigo mediante la prueba t de Student; en caso de no cumplir con los supuestos requeridos por la misma se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

La evaluación estadística de la información sobre anormalidades espermáticas, viabilidad y movilidad se realizó comparando los datos del grupo control y de los grupos tratados con la prueba de Mann-Whitney

En todas las valoraciones estadísticas se utilizó una probabilidad de  $P < 0.05$  como criterio de significancia.

### RESULTADOS

En los animales tratados ip con una dosis de 150 mg/kg de tetraóxido de vanadio se observó una mortalidad del 50%. Los datos para cada dosis ensayada se presentan en la Gráfica 1.

La dosis letal media se corroboró administrando 150 mg/kg de tetraóxido de vanadio a dos grupos más. El resultado fue el mismo que en el primer ensayo.

#### **Síntomas de toxicidad**

Algunos de los animales que recibieron la dosis más alta murieron dentro de la primera hora posterior al tratamiento. La tasa más alta de mortalidad ocurrió durante las primeras 24 horas después del tratamiento. Se observó que los ratones empezaron a presentar una respiración acelerada e irregular y disminuyeron su actividad locomotora. Las excretas no tenían la consistencia normal, aunque no se presentó diarrea.

Los síntomas descritos se observaron también dentro de las primeras 24 horas. Los animales sobrevivientes no presentaron ningún síntoma después de 48 horas.

Con base en la información de LD<sub>50</sub> encontrada se determinaron las concentraciones de tetraóxido de vanadio a ser aplicadas en los grupos tratados durante 60 días para análisis espermático (Tabla 2).

Un ratón del grupo que se administró la dosis mas alta de tetraóxido de vanadio murió después de la aplicación número 21 (día 43 de tratamiento), probablemente debido a la toxicidad del compuesto.

## Resultados

Tabla 2. Diferentes fracciones de la LD<sub>50</sub> del tetraóxido de vanadio aplicadas a grupos de ratones durante 60 días.

Grupo	Número de animales	Fracción de la LD <sub>50</sub> (150 mg / kg)	Dosis (mg/kg)
1	6	0	0
2	6	1/8	18.8
3	6	1/16	9.4
4	6	1/32	4.7

### Peso corporal y testicular

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el peso corporal inicial y final de los grupos tratados con diferentes concentraciones de tetraóxido de vanadio y el grupo testigo (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tetraóxido de vanadio sobre el peso corporal y testicular de ratones después de 60 días de tratamiento (los datos representan la media ± el error estándar)

	Dosis (mg / kg)			
	0	4.7	9.4	18.8
Dosis total aplicada	0	141	282	564
Número de animales	6	6	6	5
Peso corporal inicial <sup>a</sup>	41.83±0.99	43.73±1.52	45.55±1.92	41.60±0.23
Peso corporal final <sup>a</sup>	43.25±0.72	43.91±1.64	47.93±1.79	43.34±3.12
Peso testicular total <sup>a</sup>	0.34±0.01	0.37±0.02	0.36±0.02	0.27±0.03*

<sup>a</sup> El peso está dado en gramos

\* P<0.05, prueba t de Student

El peso corporal en los diferentes grupos durante los 60 días de tratamiento presentó un comportamiento muy similar, lo cual apoya el resultado de no diferencia en los pesos finales (Gráfica 2).

Después de aplicar el tratamiento de 18.8 mg/kg  $V_2O_4$  el peso testicular del grupo disminuye de forma significativa con respecto al testigo ( $0.34 \pm 0.01$  vs.  $0.27 \pm 0.03$ ) (Tabla 3).

### **Conteo espermático**

Por otro lado se observa una tendencia hacia la disminución del conteo espermático conforme se incrementa la dosis, esto es  $235 \pm 32.98$  para el grupo testigo y  $222.50 \pm 12.24$ ,  $191.17 \pm 17.43$  y  $167.20 \pm 31.36$  para las concentraciones de 4.7, 9.4 y 18.8  $V_2O_4$  mg/kg respectivamente (Gráfica 3).

### **Movilidad espermática**

Con respecto al porcentaje de movilidad se encontró el 62.62 % para el grupo testigo, 62.03, 62.23 y 50.34 para las dosis de 4.7, 9.4 y 18.8  $V_2O_4$  mg/kg. La disminución en el porcentaje de movilidad para la dosis más alta es estadísticamente significativa comparada con el grupo control ( $P < 0.05$ ) (Gráfica 4).

### **Viabilidad espermática**

La viabilidad espermática presentó una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) en los grupos a que se administró 9.4 y 18.8  $V_2O_4$  mg/kg con respecto al grupo testigo, esto es 77.40 y 76.26 contra 93.39 respectivamente (Gráfica 5).

### **Área de los túbulos seminíferos y morfología**

El área de los túbulos seminíferos en los diferentes grupos no presenta cambios estadísticamente significativos (gráfica 6); sin embargo, se presentaron algunos cambios en la morfología del epitelio seminífero.

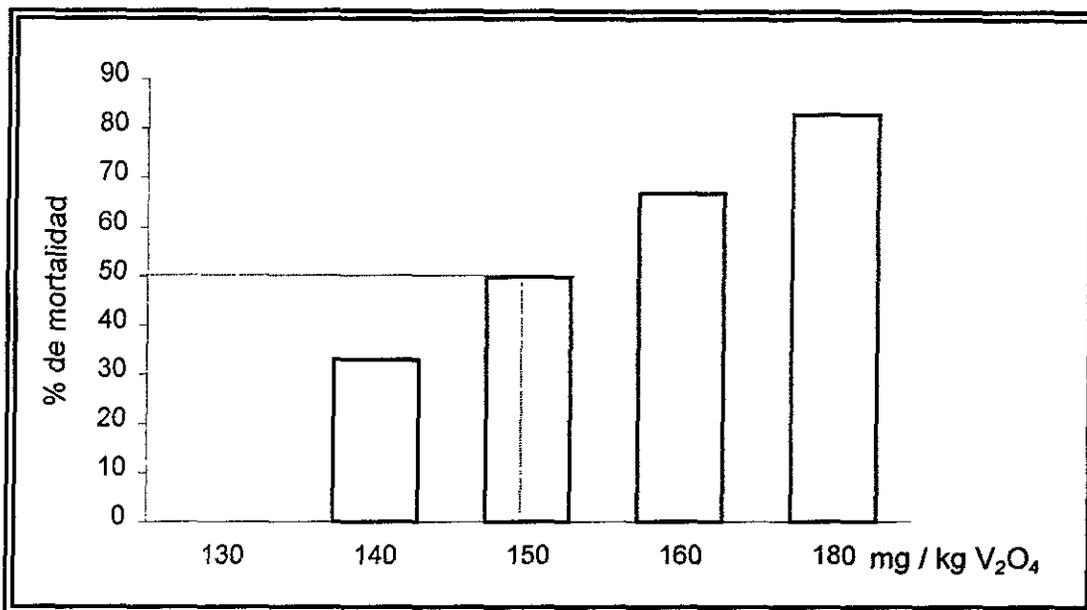
El epitelio germinal del grupo testigo se aprecia íntegro en las diferentes etapas del ciclo espermatogénico (Figura 1A). Se observan también muy pocas células de tipo "G" (Griñó *et al.*, 1963), cuyas características son: contorno definido, de tamaño en apariencia semejante a un espermatocito en fase de paquiteno, su citoplasma es eosinófilo, núcleo central grande con cromatina formando grumos gruesos y sin disposición característica.

Estos tipos celulares son escasos en la región basal, frecuentemente forman parte de asociaciones celulares en el lumen del túbulo en relación a espermatozoides prontos a desprenderse, aunque pueden encontrarse rodeados por espermatocitos.

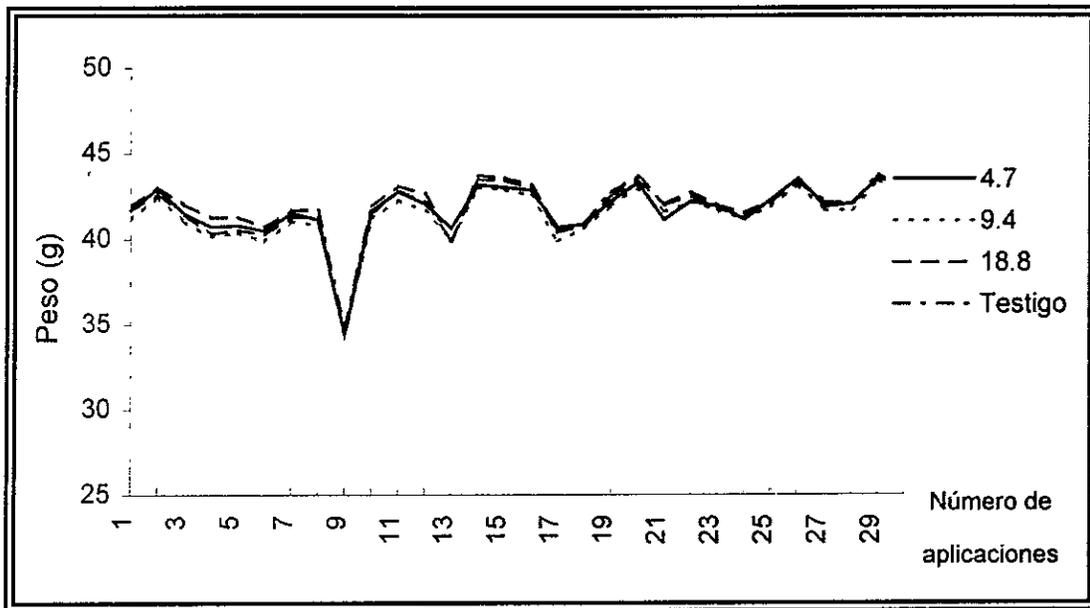
De acuerdo con Chapin (1988) la apariencia celular descrita corresponde a células muertas.

En contraste con el grupo control en aquellos grupos tratados con 9.4 y 18.8 mg/kg  $V_2O_4$  se observó más frecuentemente la presencia de células "G" (Figura 1B).

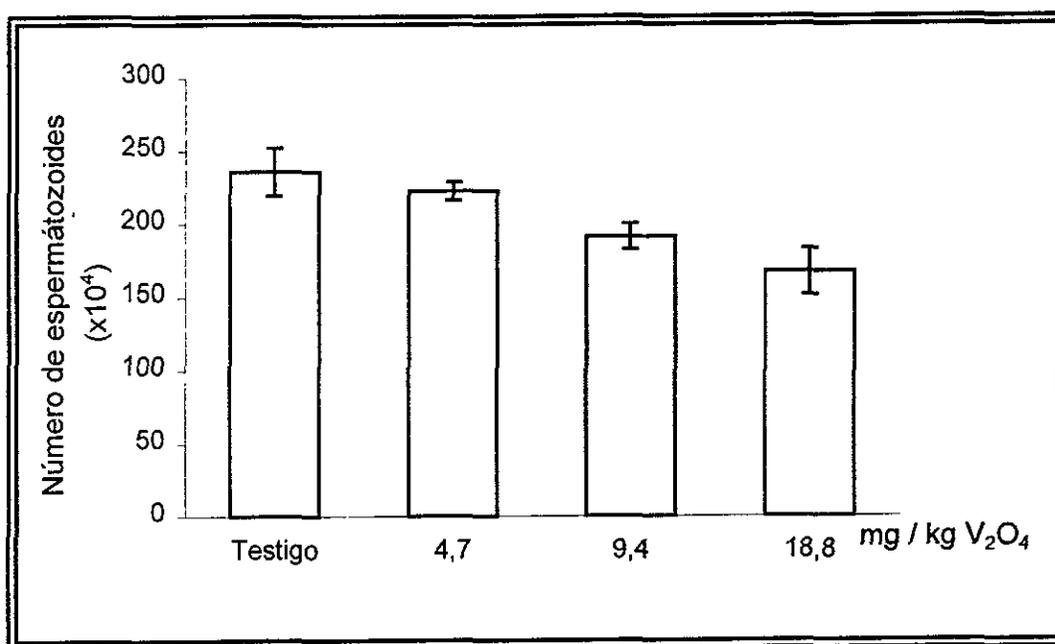
En algunos túbulos se apreció una pérdida de la celularidad común al epitelio seminífero n asociación con células "G" (Figura 2A), mientras que en otros la carencia de células germinales es completa (Figura 2B), en ambos se encuentran grandes vacuolas ópticamente vacías.



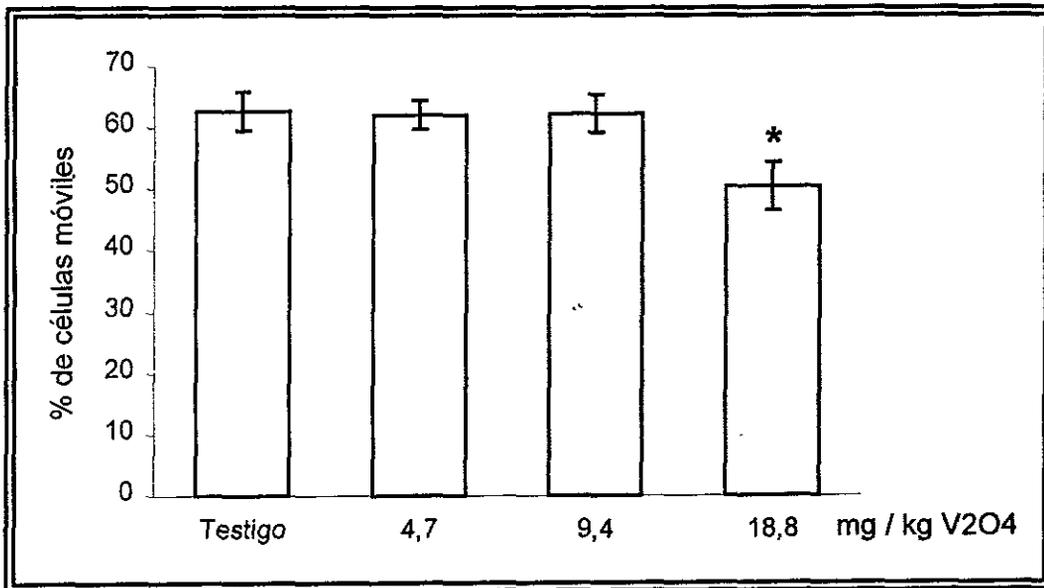
Gráfica 1. Porcentaje de mortalidad en grupos de ratones 24 horas después de ser tratados i.p. con diferentes dosis de tetraóxido de vanadio.



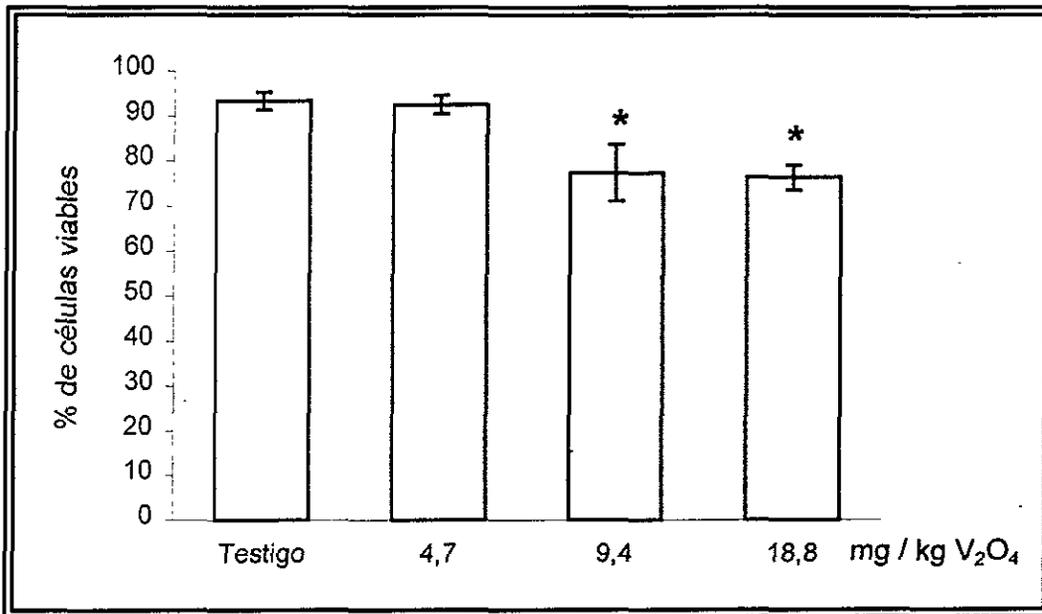
Gráfica 2. Comportamiento del peso corporal de ratones testigo o tratados con tetraóxido de vanadio a diferentes dosis durante 60 días.



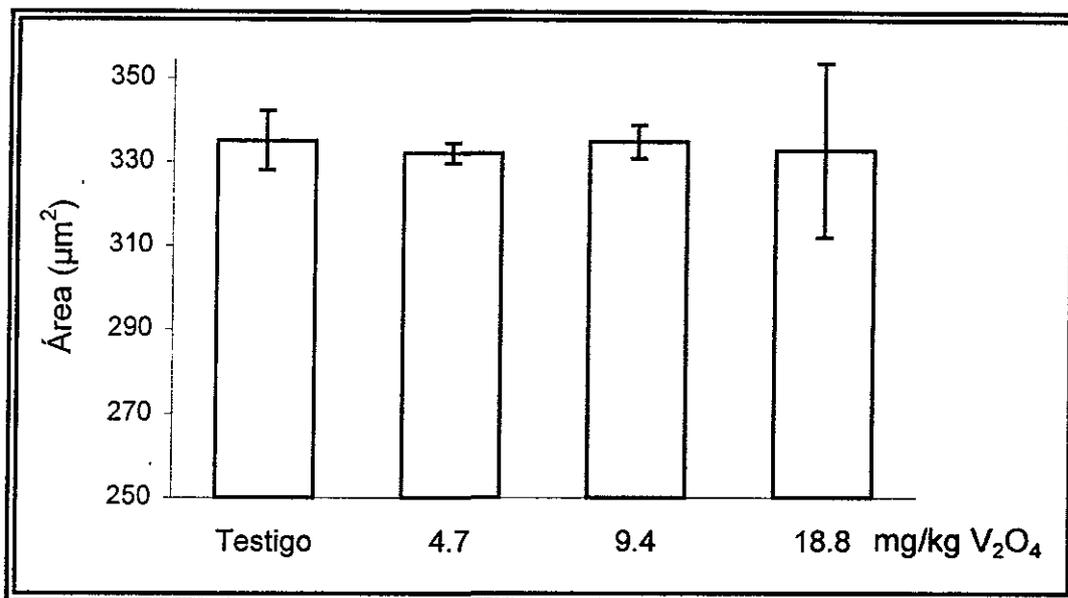
Gráfica 3. Conteo espermático de ratones tratados con diferente concentraciones de tetraóxido de vanadio durante 60 días. Los datos representa la media  $\pm$  el error estándar, n= 6.



Gráfica 4. Porcentaje de espermatozoides móviles en ratones tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días. Los datos representan la media  $\pm$  e error estándar, n= 6. \* P<0.05 vs. grupo testigo (Prueba U de Mann-Whitney).

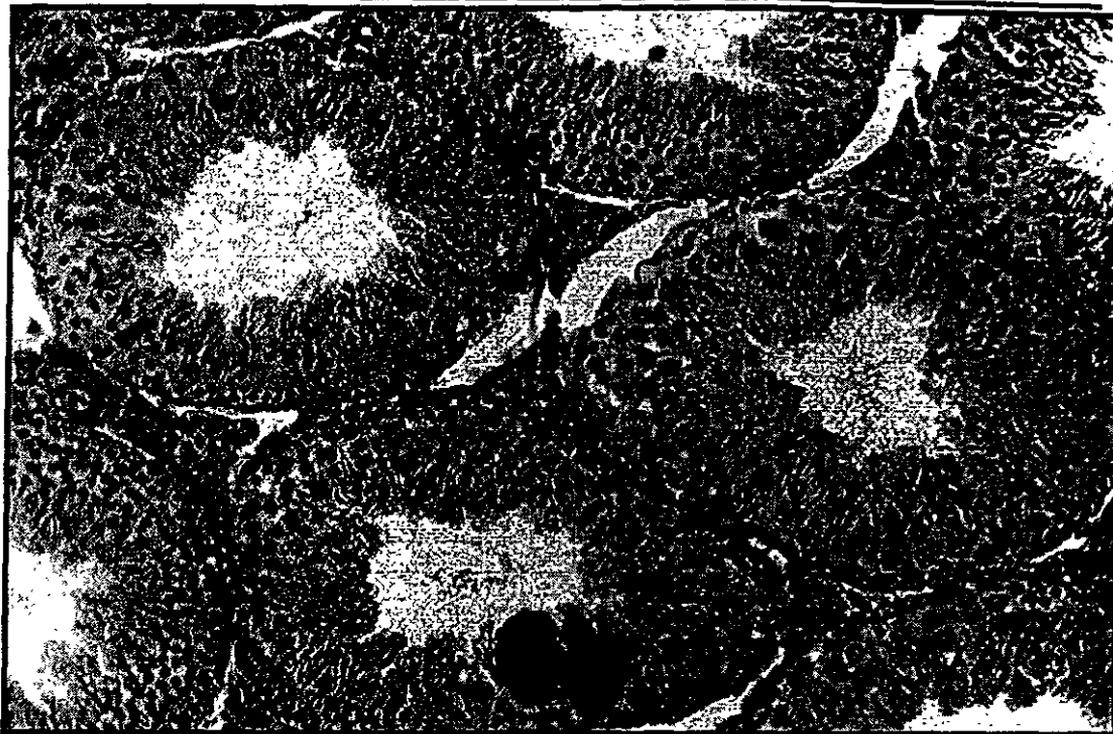


Gráfica 5. Porcentaje de espermatozoides viables en ratones testigo o tratados con diferentes dosis de tetraóxido de vanadio durante 60 días. Los dato representan la media  $\pm$  la desviación estándar, n= 6.\* P<0.05 vs. grupo testigo (Prueba U de mann-Whitney).



Gráfica 6. Área de túbulos seminíferos en ratones testigo o tratados con diferentes dosis de tetraóxido de vanadio durante 60 días. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar, n= 6.

A



B

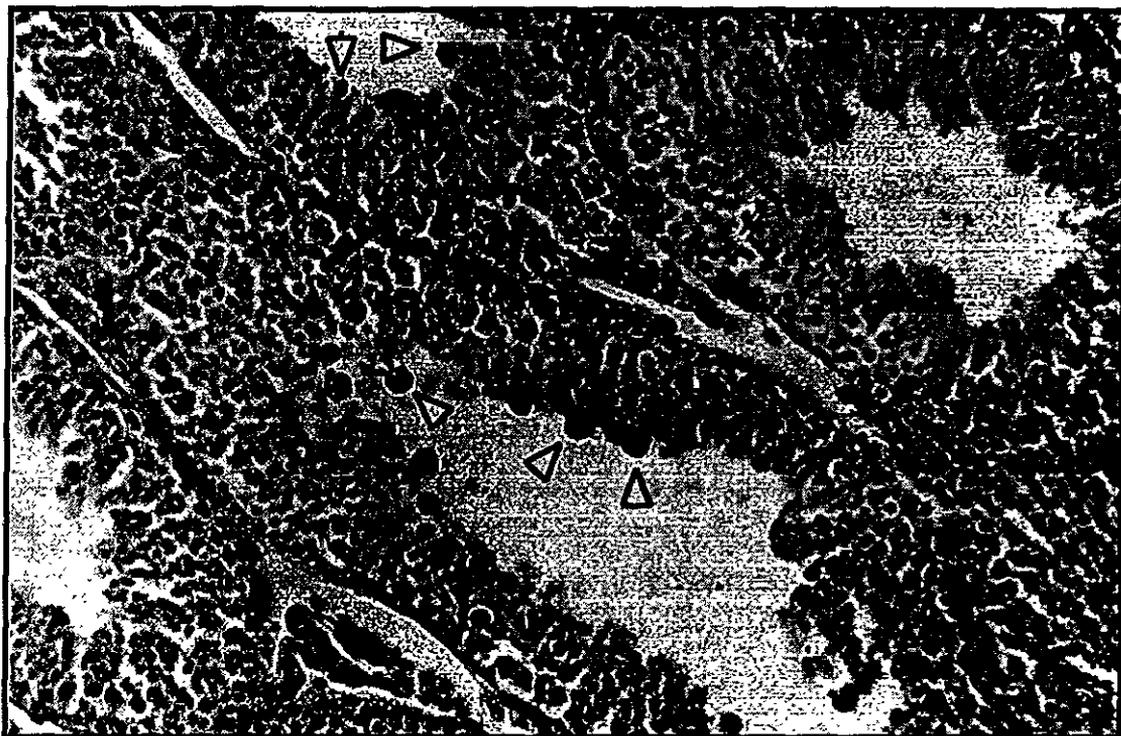


Figura 4. Túbulos seminíferos de ratón. Los testículos fueron fijados en Bouin, incluidos en paráfina y teñidos con hematoxilina-eosina. A) testigo, los límites del túbulo se encuentran definidos y el arreglo del epitelio seminífero presenta diferentes etapas de desarrollo del ciclo espermatogénico, no se observan tipos celulares ajenos al epitelios seminífero. B) 18.8 mg/kg de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Son evidentes las numerosas células "G" cercanas al lumen (puntas de flecha) y los espermatocitos que las rodean.

A



B



Figura 5. Túbulos de ratones tratados con 18.8 mg/kg V2O4. Lo testículos fueron fijados con Bouin, incluidos en parafina y teñidos con Hematoxilina-eosina. A) Se observa pérdida celular, persisten algunas espermatogonias (Eg), numerosas células "G" (puntas de flecha) y detritos celulares (flecha). B) Túbulo con vacuolas y pérdida completa del epitelio seminífero (T),

### Anormalidades espermáticas

Un espermatozoide típico del grupo control, con el gancho característico y una sola cola se muestra en la figura 6a. Las anomalías espermáticas inducidas por el tetraóxido de vanadio fueron, de acuerdo con Wyrobek y Bruce (1975): el gancho inusual (Fig. 6b), la cabeza con forma de plátano (Fig. 6c), Cabeza amorfa (Fig. 6d), enrollados sobre si mismos (Fig. 6e) y bicaudos (Fig. 6f). Sin embargo, se encontraron otras formas anormales como microcéfalos (Fig. 6g), macrocéfalos (Fig. 6h), bicéfalos (Fig. 6i), pieza media dividida (Fig. 6j), cuerpo fusionado (Fig. 6k), Flagelo con la pieza final enrollada (Fig. 6l), tricéfalos (Fig. 6m) y cabeza estrecha (Fig. 6n).

En los espermatozoide microcéfalos y macrocéfalos la disminución o el aumento de  $1/3$  del volumen de cabeza se fue utilizado como criterio de clasificación.

Las células con la pieza media dividida (Fig. 6j) presentan un desplazamiento del conjunto de mitocondrias dejando expuesto al parecer el axonema, que mantiene conectado el resto del flagelo (Fig. 2). La división en la pieza media puede presentarse más de una vez en el mismo espermatozoide.

Wyrobek y Bruce (1975) consideran en la categoría de bicaudos a espermatozoides con dos cabezas; en el presente trabajo ambas categorías se trabajaron por separado. Al encontrarse espermatozoides con dos cabezas y dos flagelos con la pieza media fusionada se les clasificó como "cuerpo fusionado" (Fig. 6k).

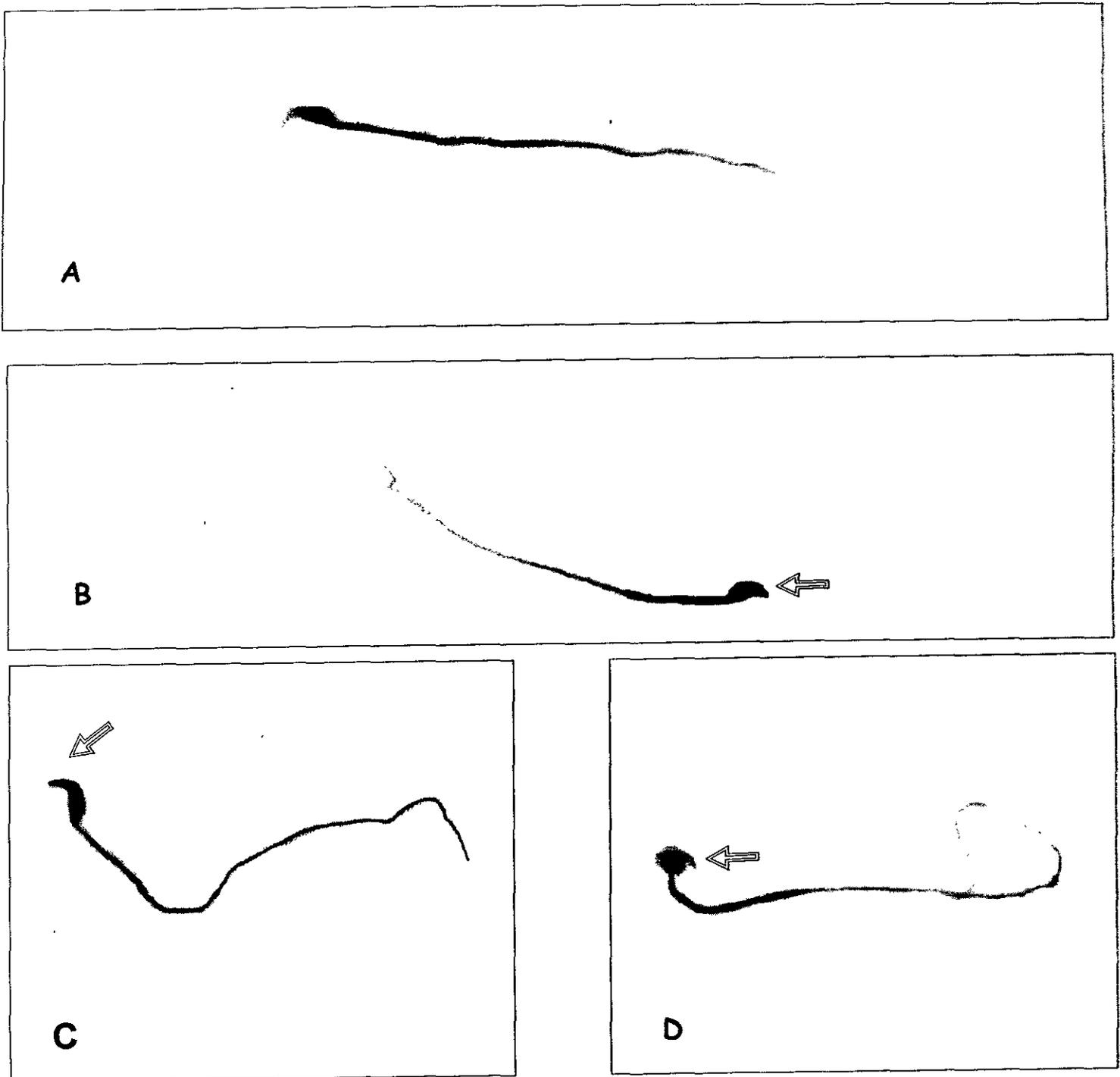
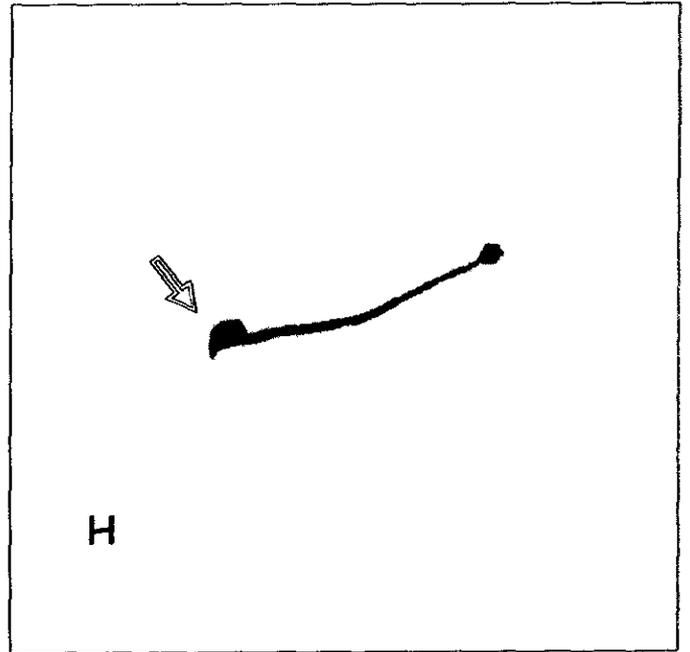
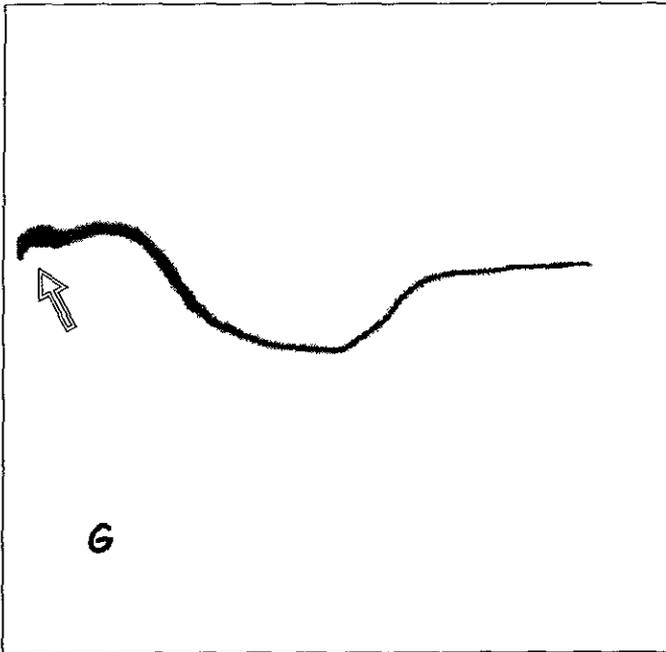
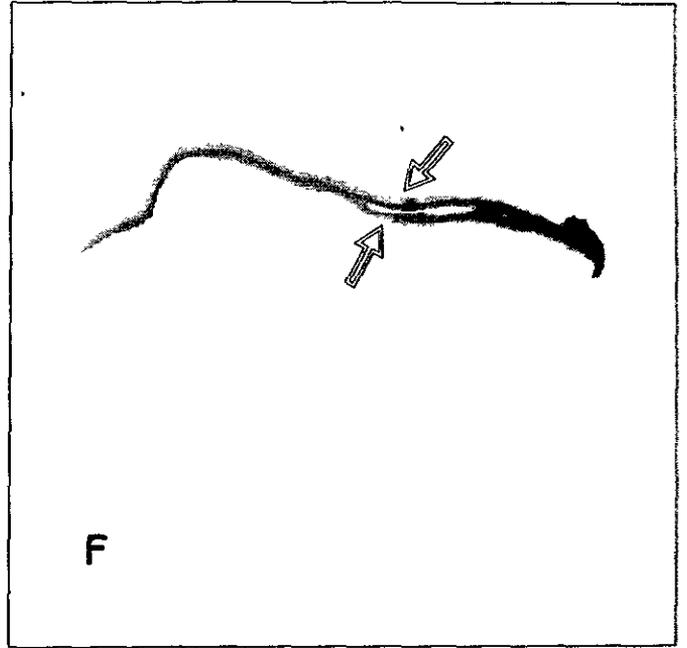
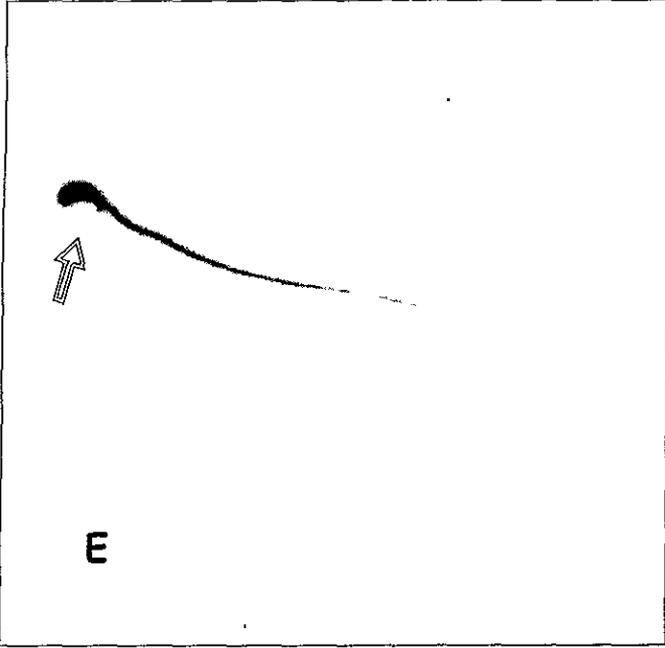
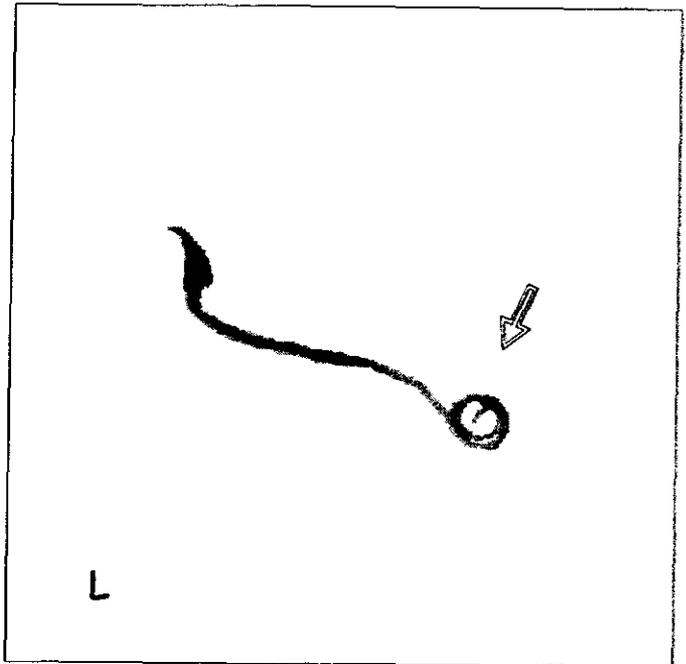
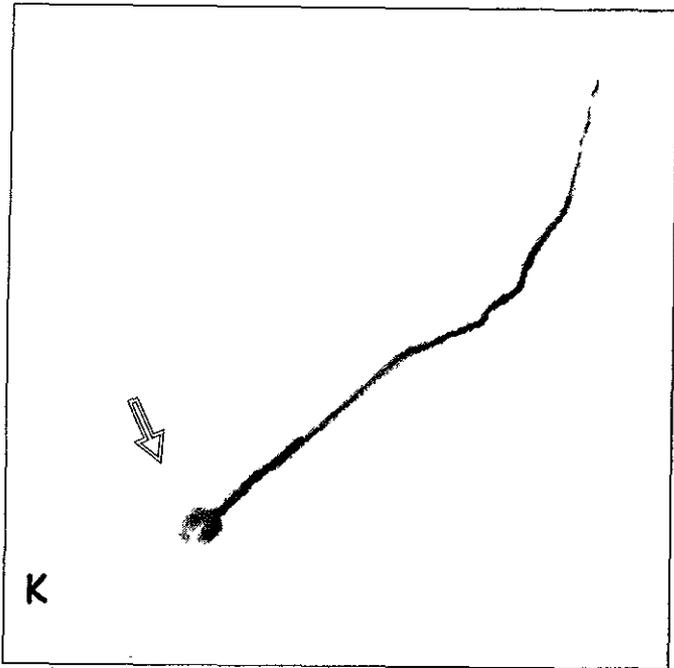
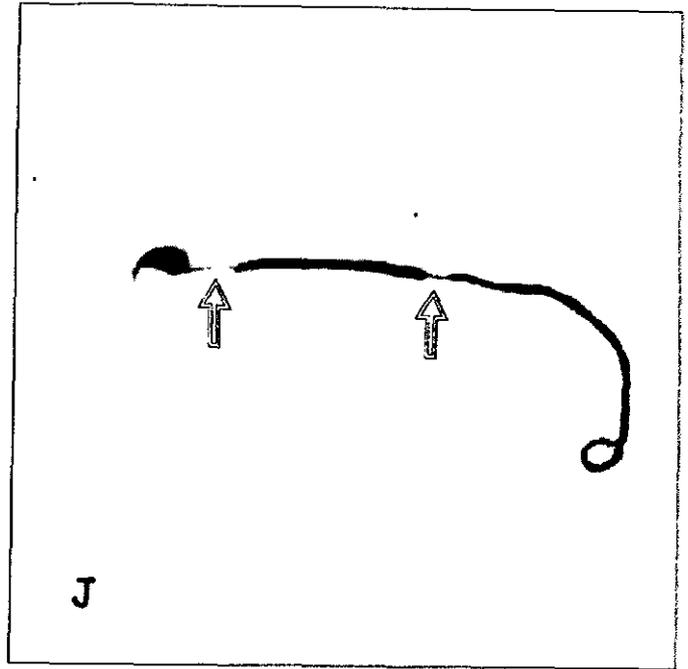
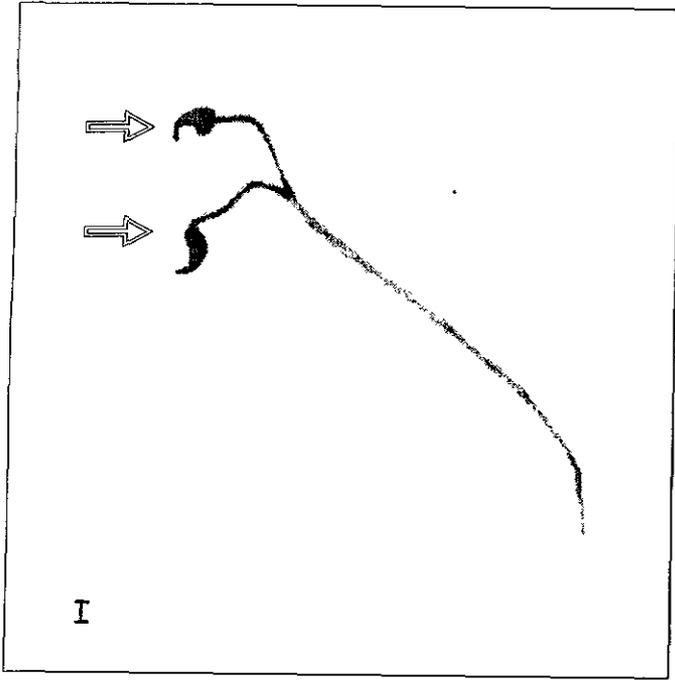


Figura 6. Espermatozoides de ratones tratados con tetraóxido de vanadio durante 60 días. A: Espermatozoide con morfología normal. B: Gancho inusual. C: cabeza con forma de platano. D: cabeza amorfa.

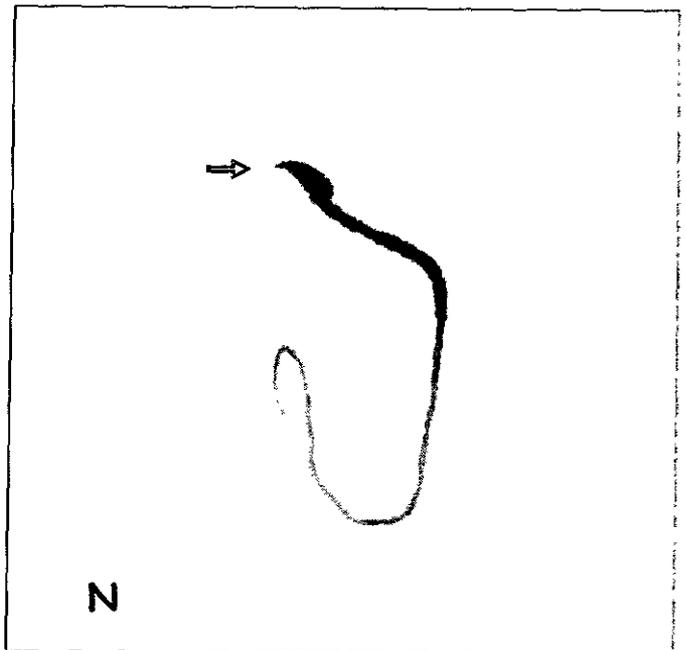
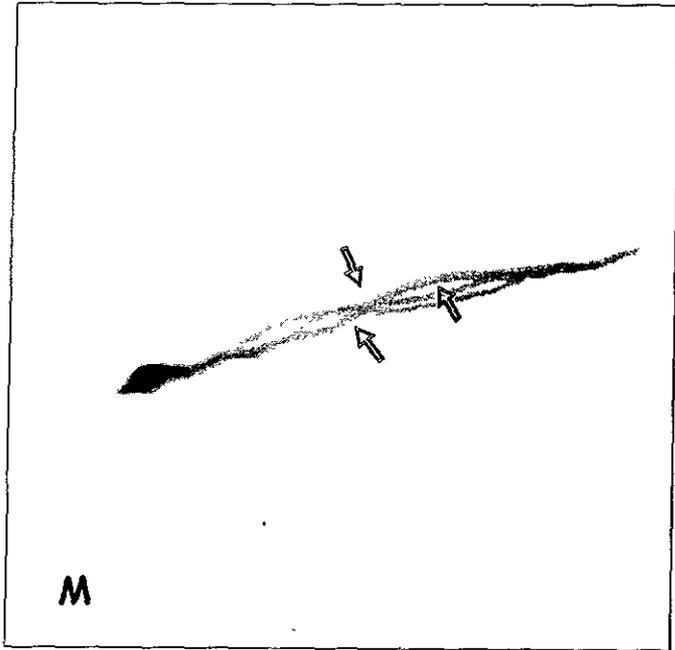


Continuación. E: Enrollado sobre si. F: bicaudo. G: microcéfalo. H: Macrocéfalo.

## Resultados



Continuación. I: bicéfalo. J: pieza media dividida. K: pieza media fusionada. L: pieza final enrollada.



Continuación. M: Tricaudo. N: Cabeza estrecha.

Los tipos de anomalías espermáticas más frecuentemente observadas fueron: el gancho inusual, los amorfos y el flagelo enrollado; estas formas representan en conjunto el 93.18, 94.32, 94.07 y 91.03 % respectivamente para el grupo testigo y los tratados con 4.7, 9.4 y 18.8 mg/kg V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

En la dosis de 4.7 mg/kg V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> se observa un aumento significativo en el porcentaje de anomalías con respecto al testigo. Aunque en el grupo de 18.8 también incrementa el porcentaje de anomalías, este no es estadísticamente significativo debido a la heterogeneidad observada en las muestras (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de anomalías espermáticas totales y por clase en ratones tratados con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> durante 60 días

	Dosis (mg / kg)			
	0	4.7	9.4	18.8
Porcentaje de espermatozoides anormales <sup>a</sup>	7.08±1.80	9.03±1.48	11.94±1.20 *	16.13±5.66
<b>Tipo de anomalía</b>				
Gancho anormal <sup>b</sup>	202 (45.91)	163 (28.15)	187 (25.16)	275 (33.33)
Cabeza de plátano <sup>b</sup>	10 (2.27)	6 (1.04)	7 (0.94)	21 (2.54)
Cabeza amorfa <sup>b</sup>	135 (30.68)	179 (30.91)	310 (41.72)	371 (44.97)
Enrollados sobre sí <sup>b</sup>	73 (16.59)	204 (35.26)	202 (27.19)	105 (12.73)
Bicaudos <sup>b</sup>	6 (1.36)	3 (0.52)	5 (0.67)	8 (0.97)
Otros <sup>c</sup>	14 (3.18)	24 (4.14)	32 (4.31)	47 (5.68)

<sup>a</sup> Los datos representan la media ± el error estándar de 6000 espermatozoides leídos por tratamiento

<sup>b</sup> Número total de 6000 espermatozoides leídos por tratamiento y porcentaje relativo para cada tipo de anomalía encerrado entre paréntesis

<sup>c</sup> Representa las anomalías g-m de la figura 6

\* P < 0,05 vs. grupo testigo (Prueba de Mann-Whitney)

En conjunto la proporción de las anomalías no descritas por Wyrobek y Bruce (1975)(fig. 6g-n) representan el 3.18, 4.14, 4.31 y 5.68 % con respecto al total de

formas anormales del grupo testigo y aquellos animales a que se administró 4.7, 9.4 y 18.8  $V_2O_4$  mg/kg respectivamente, Tabla 4.

### Discusión

Los síntomas de toxicidad debidos a la administración i.p. de tetraóxido de vanadio observados en el presente trabajo son congruentes con aquellos descritos por Llobet y Domingo (1984) al administrar i.p. sulfato de vanadilo (estado de oxidación 4<sup>+</sup>) en ratones macho de la cepa Swiss.

Por otro lado durante la espermiogénesis, en el extremo apical de las células de Sertoli (CS) se desarrollan estructuras citoesqueléticas entre las que se encuentran involucrados componentes como: los filamentos intermedios, microtúbulos y filamentos de actina. Estos últimos presentan una disposición paralela a la membrana, mientras que todo el conjunto es denominado especialización ectoplásmica (EE), cuya función es mantener unidas a su membrana a las espermátidas, antes de su liberación como espermatozoides (Meistrich, 1993; Vogl *et al.*, 1991), (Figura 7). Esta capacidad de unión de las CS permiten una producción diaria de espermatozoides normal (PDE)(Muffly *et al.*, 1994).

Para la terminación de la espermatogénesis, y por ende la PDE, se requiere de concentraciones adecuadas de la hormona folículo estimulante (FSH), que actúa sobre las CS manteniendo su capacidad de unión a las espermátidas (Muffly *et al.*, 1993; Muffly *et al.*, 1994).

En este sentido una disminución en la PDE es la expresión de una capacidad de unión (CU) afectada en las CS, y el trastorno se encuentra a nivel de los microfilamentos de f-actina y vinculina que forman parte de las especializaciones

ectoplásmicas (Muffly *et al.*, 1993; Muffly *et al.*, 1994), es por esto que la organización normal de los microfilamentos es necesaria para mantener la integridad del complejo de unión adherente (Hew *et al.*, 1993).

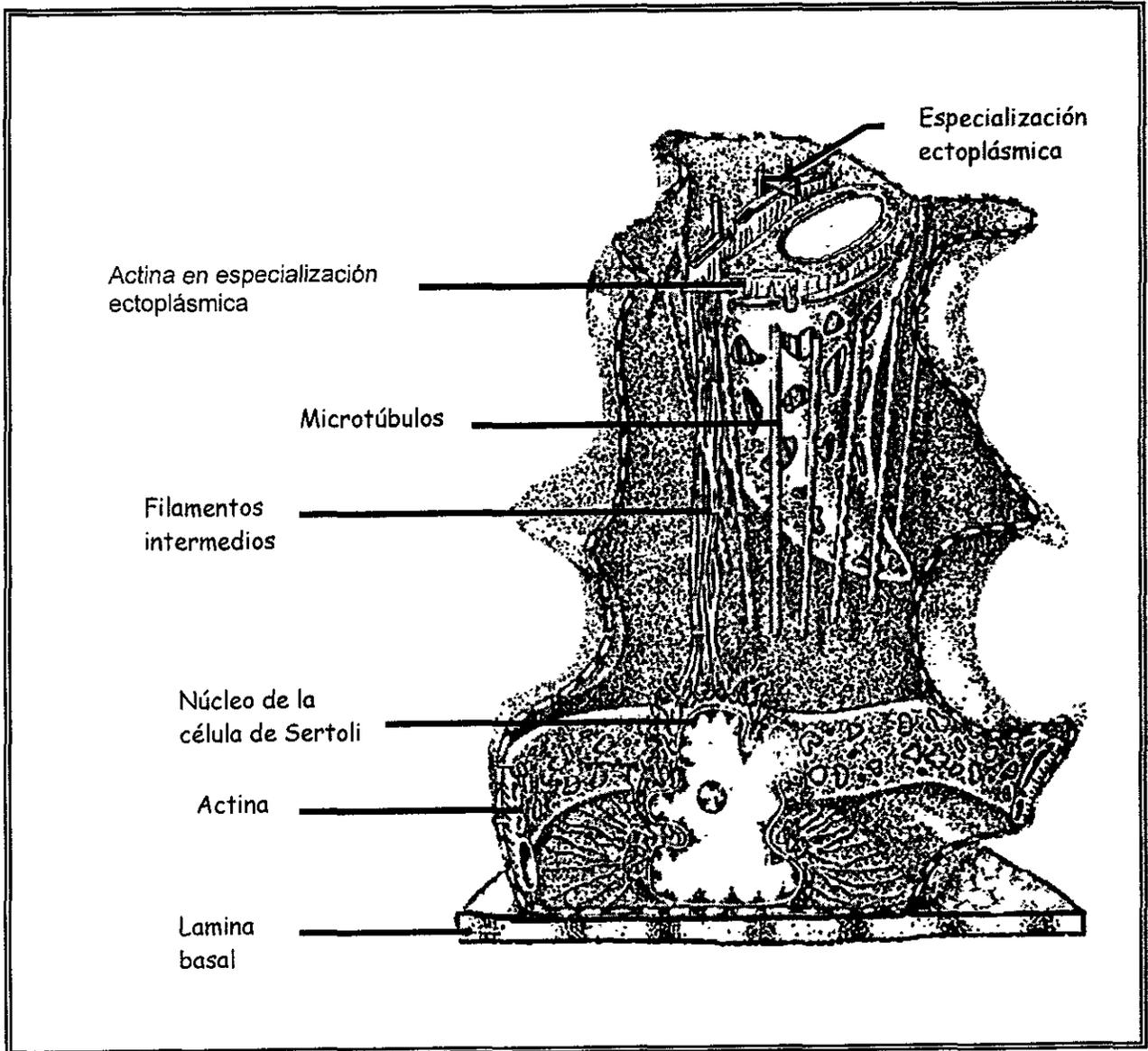


Figura 7. Esquema de un corte sagital de célula de sertoli en donde se muestran los elementos citoesqueléticos involucrados en las especializaciones ectoplásmicas (tomado de Vogl *et al.*, 1991)

Compuestos metálicos como el cloruro de cadmio son capaces de alterar la estructura de los haces filamentosos de actina y de esta forma disminuir la capacidad de las CS para anclar espermatidas (Mills y Ferm, 1989; Hew *et al.*, 1993; Pogach *et al.*, 1989), lo que se refleja en última instancia como una reducción en el conteo espermático.

Recientemente Ramírez *et al* (1997) demostraron que el vanadato es capaz de inhibir la polimerización de microtúbulos y de estimular la despolimerización de los mismos. Aunque no se conoce el mecanismo por el que se produce este efecto, se puede atribuir a la afinidad del vanadio por los enlaces disulfuro de las proteínas (Cherian, 1985).

De esta forma la acumulación de vanadilo en las CS puede conducir a la disminución del conteo espermático por su interacción con los elementos citoesqueléticos que conforman las EE, lo cuál reduciría la CU de las células de Sertoli. En conjunto, estas evidencias experimentales nos permiten explicar la tendencia al descenso del número espermático conforme se incrementa la dosis de tetraóxido de vanadio (Gráfica 3).

Por otro lado Hayashi y Kimura (1986) encontraron que el vanadilo, pero no el vanadato es capaz de inhibir la activación del adenilato ciclasa (AC, enzima fundamental para la expresión de las funciones de la FSH entre otras hormonas proteicas en sus células blanco) en presencia de análogos no hidrolizables del

guanosin trifosfato en membranas adrenales de rata y, dado que la FSH es necesaria para llevar a término la espermatogénesis, este resultado a nivel de las CS nos lleva a pensar que la disminución del conteo espermático (Gráfica 3) puede ser el resultado de la inhibición de las funciones de la FSH durante la espermatogénesis. La sugerencia anterior se apoya en el hecho de que, tanto en el testículo (Al-Bayati *et al.*, 1991) como en el semen (Chew *et al.*, 1996) se ha reportado la presencia de vanadio.

Otra causa posible relacionada con la disminución del conteo espermático es la es el número de las CS. Debido a que las CS solamente pueden soportar un número determinado de CG, una reducción en el número de las primeras ocasiona necesariamente una disminución en la producción de espermatozoides. Sin embargo, no existen reportes de toxicidad que relacionen directamente compuestos de vanadio con las CS.

El movimiento flagelar es la expresión fundamental de la vitalidad de las células germinales, y es esencial para la función reproductiva, esto involucra una serie compleja y acoplada de procesos químicos, electroquímicos y mecanoquímicos que pueden en algún momento ser influenciados por el ambiente en que se desarrollan (Katz, 1991). La capacidad de movimiento es adquirida durante el tránsito de los espermatozoides por el epididímo (Comhaire, 1993; Eddy y O'Brien, 1994).

La mayor fuente de energía de las células germinales es el adenosin trifosfato (ATP), el cual es producido por las mitocondrias localizadas en la pieza media del espermatozoide, e hidrolizada por la ATPasa en el flagelo. La energía liberada ocasiona

la contracción de los brazos de dineína, que a su vez inducen el movimiento deslizante entre los dobletes microtubulares del flagelo, traducándose esto en movimiento (Comhaire, 1993; Katz, 1991).

El vanadilo puede acumularse en las mitocondrias (Sakurai, 1994), inhibir las ATPasa de dineína (Nechay, 1984; Nechay *et al.*, 1986) y oxidar al NADH y NADPH (nicotinamida adenin dinucleótido y nicotinamida adenin dinucleotido fosfato respectivamente) (Liochev y Fridovich, 1987; 1990), por lo que la disminución observada en el porcentaje de movilidad espermática al administrar 18.8 mg/kg  $V_2O_4$  puede ser explicada por un desacoplamiento de los componentes enzimáticos que participan en la producción de ATP en las mitocondrias del espermatozoide.

En los diferentes grupos de ratones tratados con tetraóxido de vanadio se observa que los porcentajes de viabilidad espermática son mayores a los de movilidad, es decir: muchos de los espermatozoides vivos carecen de movimiento, esta situación sugiere que las células presentan una estructura subcelular anormal (Comhaire, 1993; Gagnon *et al.*, 1991; WHO, 1987)

Los tejidos que conforman al testículo y principalmente los espermatozoides presentan una alta proporción de lípidos como ácidos grasos poliinsaturados (Sheriff, 1986; Aitken y Clarkson, 1987), situación que hace a sus membranas susceptibles de daño peroxidativo por especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ) y el radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) (Jeulin *et al.*, 1989).

Existen sistemas enzimáticos como el glutathion peroxidasa/reductasa (Alvarez y Storey, 1989) y la catalasa (Jeulin *et al.*, 1989), cuya función es captar y destruir las ERO para mantener el equilibrio en las células (Alvarez y Storey, 1989). Por lo que, cuando ocurre un desbalance entre la generación de ERO y su destrucción, puede presentarse daño celular (Gagnon *et al.*, 1991; Jeulin *et al.*, 1989).

La membrana espermática es muy sensible a los efectos del oxígeno y los radicales libres. Una sensibilidad variable puede reflejar una disminución intra o extracelular de los agentes antiperoxidantes protectores que se encuentran en el espermatozoide y su ambiente, o bien una constitución de membrana diferente. Estas diferencias pueden ocurrir en la espermatogenesis o durante la maduración en el epididímo (Rao *et al.*, 1989).

En hombres infértiles el volumen seminal y el porcentaje de células móviles presentan una correlación inversa con la generación de ERO (Iwasaki y Gagnon, 1992; Rao *et al.*, 1989). De igual modo, la concentración de ERO tiende a disminuir en poblaciones espermáticas con más del 60% de movilidad (Iwasaki y Gagnon, 1992). Esta información sugiere que: 1) el fluido de las vesículas seminales (sus secreciones contribuyen con la mayoría del volumen seminal) presenta sistemas captadores de especies reactivas de oxígeno y 2) que el daño a espermatozoides es ocasionado por la generación de ERO (Gagnon *et al.*, 1991).

Espermatozoides con daño o deficiencias morfológicas generan altas concentraciones de ERO, en comparación con aquellos que presentan una movilidad

normal (Aitken *et al.*, 1989), aunque algunos de los que presentan una morfología normal pueden ser bioquímica y funcionalmente anormales, por lo que pueden formar también ERO (Gagnon *et al.*, 1991; Rao *et al.*, 1989).

Si los sistemas enzimáticos captadores de especies reactivas de oxígeno disminuyen en las secreciones de las vesículas seminales, será mayor el daño ocasionado en membranas y menor la destrucción de ERO.

Sheriff (1991), observó en homogenizados de testículo una disminución de la concentración de glutathion y un aumento en la peroxidación de lípidos al aplicar ip. metavanadato de sodio a ratas Sprague-Dawley (2.5 y 5 mg/kg) por 2 ó 7 días. Durante una exposición subcrónica a vanadio 4+ como en el presente estudio, el compuesto metálico puede acumularse dentro de las células y ejercer su efecto tóxico sobre vesículas seminales y en epitelio seminífero, como parece haber ocurrido en el trabajo de Sheriff. Es factible que el descenso del porcentaje (Gráfica 4) de movilidad obtenido en la dosis de 18.8 mg/kg haya sido producido por mecanismos y eventos como los mencionados arriba.

En espermatozoides incubados con ERO se reduce también la concentración de ATP y por ende la movilidad; aunque la cantidad de ATP puede mantenerse o ser recuperada en presencia de lactato + piruvato (Gagnon *et al.*, 1991). Sin embargo, si la ATP-asa no puede desfosforilar al ATP y contraer los brazos de dineína en los microtúbulos del flagelo, tampoco puede generarse movimiento.

El vanadio puede acumularse en mitocondria y núcleo (Sakurai, 1994), inhibir las ATPasas de dineína (Nechay, 1984; Nechay *et al.*, 1986) e inducir la formación de ERO, además de ocasionar una disminución en la concentración de glutatión en testículo (Sheriff, 1991). Los efectos tóxicos del vanadio sobre la movilidad espermática puede ser triple: 1) disminuyendo los sistemas enzimáticos captadores de ERO, 2) contribuyendo a la formación de ERO y por ende a la peroxidación de lípidos y 3) inhibiendo las funciones de las ATPasas en la pieza intermedia del flagelo durante el paso de los espermatozoides por el epididimo (Chen *et al.*, 1996, detectó la presencia de vanadio en el plasma seminal de hombres infértiles).

La presencia de espermatozoides con morfología anormal indica que el proceso de espermatogenesis fue afectado y que espermatozoides con morfología anormal pueden ser funcionalmente ineficientes (Krzanowska *et al.*, 1995).

Puesto que en su mayoría la cabeza del espermatozoide está compuesta por el núcleo (además de regiones discretas ocupadas por el acrosoma y el citoplasma) y múltiples elementos citoesqueléticos, la forma se encuentra estrechamente relacionada con la morfogénesis nuclear, que a su vez esta dada por la fuerzas ejercidas durante el desarrollo de los componentes citoesqueléticos (Cole *et al.*, 1989; Meistrich, 1993).

El manchete es una estructura microtubular que se une a la envoltura nuclear y circunscribe el núcleo de las espermátidas en mamíferos en las etapas tempranas de la

espermiogénesis. Éste elemento puede encontrarse involucrado en la morfogénesis nuclear de las espermátidas y colaborar de esta forma con alguna fuerza constrictora que de la forma final a la cabeza del espermatozoide (Meistrich, 1993).

Algunas alteraciones genéticas que involucran la modificación de un solo gene son específicas para la inducción de formas espermáticas características, como en los ratones mutantes *azh* en que la formación del manchete es defectuosa, lo que da origen a peculiares formas anormales de cabeza (Meistrich *et al.*, 1987).

Algunos agentes químicos como la vinblastina son capaces de interferir con la polimerización de los microtúbulos e inducir la formación de espermatozoides con anomalías semejantes a aquellas que se presentan en los ratones *azh*, con desarrollo deficiente del manchete. La interferencia con el ensamble microtubular del manchete entonces puede resultar en formas nucleares aberrantes (Cole *et al.*, 1989; Meistrich, 1987).

Wyrobek y Bruce (1975) reportan que un alto porcentaje de espermatozoides enrollados sobre si son inducidos por vinblastina (Fig. 6e). Estas anomalías aunque tienen relación con la polimerización de los microtúbulos se encuentran en un nivel distinto al del manchete. La diferencia en los resultados obtenidos puede ser ocasionado por la sensibilidad de cepas distintas a un mismo compuesto.

En relación a los ratones CD-1 tratados en el presente trabajo con diferentes dosis de tetraóxido de vanadio se observa un aumento en el porcentaje relativo de espermatozoides enrollados sobre si (Tabla 4), en relación al grupo testigo, lo cual es

consistente con un reporte de Rao *et al.* (1989), que encuentra correlación entre la peroxidación de lípidos y la frecuencia de anomalías de la pieza principal del flagelo así como de Wyrobek y Bruce (1975) al administrar vinblastina como agente inhibidor de la polimerización de los microtúbulos. Aunque la morfología de las anomalías descritas por Rao no son similares a las encontradas en el presente trabajo también se encuentran involucrados elementos microtubulares

Los hechos anteriores nos pueden llevar a pensar que la propiedad inhibidora de la polimerización y estimulante de la despolimerización observada en el vanadato (Ramírez, 1997) puede depender del estado de desarrollo más susceptible de las células germinales. Estas etapas pueden ser aquellas en que se da un acelerado desarrollo de las estructuras citoesqueléticas tanto en las CS (durante la formación de las EE) como en las CG (durante la espermiogénesis y en las divisiones mitóticas o meióticas en los compartimientos basal y adluminal respectivamente).

Las causas por las cuales se forman espermatozoides con cabeza anormal no están dadas por factores que afectan el volumen de la cromatina espermática, como: contenido o compactación del ADN en el núcleo y diferencias en la organización de la cromatina (Lee *et al.*, 1997; Wyrobek *et al.*, 1994). Sin embargo, un agente que induce anomalías espermáticas es también un agente que interfiere con la integridad del ADN o con la expresión de este material genético (Wyrobek y Bruce, 1975).

Algunos grupos de trabajo han reportado la capacidad de compuestos inorgánicos que contienen  $V^{4+}$  para inducir la hidroxilación de 2'-deoxiguanosina y

rompimientos en la cadena de ADN vía reacciones mediadas por radicales libres (Sakurai *et al.*, 1992; Sakurai *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996).

Entre los posibles mecanismos de daño al ADN se encuentran el incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular suficiente para activar endonucleasas, el ataque directo al ADN por  $\text{V}^{4+}$  mediante la formación de radicales altamente reactivos (ej. hidroxil) y rompimientos de la molécula por interacción covalente y/o de puentes de hidrógeno (D' Cruz *et al.*, 1998).

por lo anterior se puede esperar que los defectos en la formación de la cabeza y el flagelo estén dados tanto por la interacción del tetraóxido de vanadio sobre los componentes citoesqueléticos de las células de Sertoli y las células germinales durante el transcurso de su desarrollo a espermatozoides principalmente en la espermiogénesis, como por un efecto genotóxico del tetraóxido de vanadio sobre las células germinales.

## CONCLUSIONES

El conteo espermático tiende a disminuir conforme incrementa la dosis de tetraóxido de vanadio. Esta pérdida celular tal vez ocurra en aquellos estadios en que se da un rápido desarrollo de elementos citoesqueléticos en las células de Sertoli.

La administración subcrónica i.p. de tetraóxido de vanadio en altas concentraciones provoca una disminución significativa de la viabilidad y la movilidad espermáticas, posiblemente ocasionada por eventos de lipoperoxidación.

En concentraciones elevadas el tetraóxido de vanadio incrementa la producción de espermatozoides con morfología anormal, efecto que puede ser ocasionado por interferencias en la polimerización de los microtúbulos a nivel de las células de Sertoli y por daño directo al ADN mediado por especies reactivas de oxígeno producidas por el tetraóxido de vanadio.

En los animales tratados con las dos concentraciones más altas de tetraóxido de vanadio, los túbulos seminíferos presentan rasgos histopatológicos que van desde a aparición de células muertas hasta la pérdida completa del epitelio seminífero.

BIBLIOGRAFÍA

Abundis, M.H.M. (1996) "Determinación de la mutación y recombinación somáticas en la inducción de efectos genotóxicos por tres sales de vanadio en *Drosophila melanogaster*". Tesis de maestría. UNAM.

Aitken, R.J. y J.S. Clarkson. 1987. Cellular basis of the defective sperm function and its association with the genesis of the reactive oxygen-species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81: 459-469.

Aitken, R.J., J.S. Clarkson y S. Fishel. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40: 183-197.

Al-Bayati, M.A., O.G. Raabe, S.N. Giri y J.B. Knaak. 1991. Distribution of vanadate in the rat following subcutaneous and oral routes of administration. *J. Am. Coll. Toxicol.* 10: 233-241.

Altamirano, M., M.E. Ayala, A. Flores, L. Morales y R. Dominguez. 1991. Sex differences in the effects of vanadium pentoxide administration to prepuberal rats. *Med Sci Res.* 19: 825-826.

Altamirano-Lozano, M., L. Alvarez-Barrera, F. Basurto-Alcantara, M. Valverde y E. Rojas. 1996. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *teratog. Carcinog. Mutag.* 16: 7-17.

Altamirano-Lozano, M., E. Roldán-Reyes, E. Bonilla y M. Betancourt. 1997. Effect of some metals compounds on sperm motility *in vitro*. *Med. Sci. Res.* 25: 147-150.

- Alvarez, J.G. y B.T. Storey. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77-88.
- Amann, P.R. 1986. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environ. Health Perspect.* 70: 149-158.
- Ariens, E.J. y A. M. Simonis. *General principles of nutritional toxicology*. En: Nutritional Toxicology, Volumen 1. De. J.N. Hatchcock. Academic Press. New York, USA. 17-81.
- Aveldaño; H.I., N.P. Rotstein y N.T. Vermouth. 1992. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. *Biochem. J.* 283: 235-241.
- Baran, J. E. 1998. Vanadium detoxification. En: Vanadium in the Environment, segunda parte., Ed. O. Nriagu. John Wiley and Sons. 317-345.
- Bardin, C.W.; C.Y.Cheng, N.A. Mustow y G.L. Gunsalus. The Sertoli cell. En: The Physiology of Reproduction. segunda edición, eds: E. Knobil y J.D. Neil. Raven Press, Ltd. New York, USA.. pp. 1291-1333.
- Baroch, E.F. 1983. Vanadium and vanadium alloys. En: Encyclopedia on chemicals technology. John Wiley and Sons, N.Y. Cap.23.
- Bolaños, F. (1990) El impacto biológico: problema ambiental contemporáneo. UNAM. México, D.F. pp. 177-338 y 383-438.

Bruech, M.: M.E. Quintanilla, W. Legrum, J. Koch, K.J. Netter y G.F. Fuhrmann. 1984. Effects of vanadate on intracellular reduction equivalents in mouse liver and the fate of vanadium in plasma, erythrocytes and liver. *Toxicology*. 31: 283-295.

Carson, L.B.: V.H. Ellis y L.J. McCann. 1987. Toxicology and biological monitoring of metals in humans. Lewis publishers, INC. N.Y. pp. 276-282.

Chapin, R.E. 1988. Morphologic evaluation of seminiferous epithelium of the testis. En: Physiology and Toxicology of Male Reproduction. Academic Press. USA. pp. 155-177.

Chapin, E.R., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, Ch.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell, S. Schrader, V. Slott, R.Z. Sokol y G. Toth. 1992. Methods of assessing rat sperm motility. *Reprod. Toxicol.* 6: 267-273.

Chew, W., X.D. Han, Y.W. Zhu y H. Huang. 1996. Comparative study of elements seminal plasma in fertile and infertile men. En: Biology and Medicine Metal ions; vol 4. Eds. Collery, Ph., J. Corbella, J.L. Domingo, J.C. Etienne y J.M. Llobet. Jhon Libbey Eurolex, Paris. pp. 557-559.

Cherian, G. (1985) *Metallothionein and metal toxicity*. CRC Pres. Boca Raton. Fl. USA.

Cole, A.:M. Meistrich, L.Cherry y P.K. Trostle-Weige. 1989. Nuclear and manchette development in spermatids of normal and *azh/azh* mutant mice. *Biol. Reprod.* 38: 385-401.

Comhaire, F.H. 1993. Methods to evaluate reproductive health of the human male. *Reprod. Toxicol.* 7: 39-46.

Dai, S., K. H. Thompson y H. McNeill. 1994. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharm. Toxicol.* 74: 101-109.

Da Silba, J.J.R. y R.J.P. Williams. 1991. The biological chemistry of the elements. Calarendon Press. N.Y. USA. pag. 5.

D´Cruz, O.D.; P. Ghosh y F.M. Uckum. 1998. Spermicidal activity of metallocene complexes containing vanadium (IV) in humans. *Biol. Reprod.* 58: 1515-1526.

De Kretser, D. M. y J.B. Kerr. 1994. The cytology of the testis. En: The Physiology of Reproduction. Segunda edición, eds: E, Knobil y J.D. Neil. Raven Press, Ltd. New York, USA.. pp. 1117-1290.

Domingo, J.L., J.L. Paternain, J.M. Llobet y J. Corbella. 1986. Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturition and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.* 819-824.

Domingo, J.L. 1996. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.* 10: 175-182.

Duffus, J.H. 1983. Toxicología ambiental. Omega. Barcelona, España. pp. 82-83 y 91.

ECETOC, 1983. Identification and assessment of the effects of reproduction and development (Reproductive Toxicology). Monograph No. pp. 132.

Eddy, E.M. y O´brien, D.A. 1994. The espermatozoon. En: The Physiology of Reproduction. Segunda edición, eds: E, Knobil y J.D. Neil., Raven Press, Ltd. New York, USA. pp. 30-77.

Elinder, C.G.; L. Gerhardson y G. Oberdoerster. 1988. Biological monitoring of toxic metals-overview. En: Biological Monitoring of Toxic Metals. Eds. Clarkson W.T., Friberg L., Nordberg F. y Sanger R., Plenum Press. NY. USA. pp 1-72.

Etcheverry, S.B., V.C. Sálice, C.M. Vescina y A.M. Cortizo. 1996. Mitogenicity, citotoxicity and morphological changes by vanadium compounds on Swiss 3T3 cells. en: Metal ions in Biology and Medicine; vol 4. Eds. Ph, Collery, J. Corbella, J.L. Domingo, J.C. Etienne y J.M. Llobet. John Libbey Eurolex, Paris. pp. 298-300.

Fawcett, J.P.; S.J. Farquhar, T. Thou y B.I. Shand. 1997. Oral vanadium sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol. Toxicol.* 80: 202-206.

Foster, P.M.D. y J. C. Lamb IV. 1988. Introduction. En: Physiology and Toxicology of Male Reproduction. EDS. J.C. Lamb IV y P.M.D. Foster. Academic Press. USA. 1-6.

French, R.J. y J.H. Jones. 1993. Role of vanadium in nutrition: metabolism essentiality and dietary considerations. *Life Sci.* 52: 339-346.

Gagnon, C.; A. Iwasaki, E. de Lamirande y N. Kovalski. 1991. Reactive oxygen species and human spermatozoa. En: The Male Germ Cell, spermatogonium to fertilization, ed. B. Robaire. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637: 436-444.

Griñó, E. , J. Sas, R. Domínguez y L. Benedetti. 1963. Aspectos histopatológicos de la espermatogénesis en la rata despues de lesiones hipotalámicas. *Rev. Argent. Endocrinol. Metab.* 135: 3-13.

- Griswold, M.D. 1995. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.* 52: 211-216.
- Hayashi, Y. y Kimura, T. 1986. The effects of vanadium on the activation of adenylate cyclase from rat adrenal membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 869: 29-36.
- Hew, K.W., G.L. Heath, A.H. Jiwa y M.J. Welsh. 1993. Cadmium *in vivo* causes of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 49: 840-849.
- Hew, K.W., W.A. Ericson y M.J. Welsh. 1993. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 15-21.
- Hope, B.K. 1994. A biogeochemical budget for vanadium. *Sci. Total Environ.* 141: 1-10.
- Iwasaki, A. y C. Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.* 57: 409-416.
- Jacksson, J.K., W. Min, T.F. Cruz, S. Cindric, L. Arsenuit, D.D. Von-Hoff, D. Degan, W.L. Hunter y H.M. Burt. 1997. A poimer-based drug dellivery system for the antineoplastic agent bis(mtolato)axovnadium in mice. *Br. J. Cncer.* 75(7): 1014-1020.
- Jeulin, C. ; J.C. Soufir, P. Weber, D. Laval-Martin y R. Calvayrac. 1989. Catalasa activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24: 185-196.
- Katz, D.F. 1991. Characteristics of sperm motility. En: The Male Germ Cell, spermatogonium to fertilization, ed. B. Robaire. *Ann. N. Y. Academ. Sci.* 637: 175-202.

Krzanowska, H.; J. Styrna y B. Wabik-Sliz. 1995. Analysis of sperm quality in recombinant mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space. *J. Reprod. Fertil.* 104: 347-354.

Lagerkvist, G.; G.F. Nordberg y V. Vouk. 1986. vanadium. En: Handbook on the Toxicology and Metals. vol. 2. Elsevier Science Publishing Co. Inc. Holanda. Cap. 27.

Lahav, M.; H. Renert y D. Barzilai. 1986. inhibition by vanadate of cyclic AMP production in rat corpora lutea incubated *in vitro*. *Life Sci.* 39: 2557-2564.

Landis, G.W. y Yu, M-H. 1995. Introduction to environmental toxicology, impacts of chemicals upon ecological systems. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, USA. pp. 18-24.

Lauwerys, R.R. y P. Hoet. 1993. Industrial chemical exposure, guidelines for biological monitoring. Segunda edición. Lewis Publisher. Boca Raton. USA. pp. 95-96, 293.

Lee, J.D., M.J. Allen y R. Balhorn. 1997. Atomic force microscope analysis of chromatin volumes in human sperm with head-shape abnormalities. *Biol. Reprod.* 56: 42-49.

Léonard, A. y G.B. Gerber. 1994. Mutagenicity carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutat. Res.* 317: 81-88.

Linder, R.E., G.L. Rehnberg, L.F. Strader y J.P. Diggs. 1988. Evaluation of reproductive parameters in adult male Wistar rats after subchronic exposure (gavage) to benomyl. *J. Toxicol. Environ. Health.* 25: 285-298.

Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott y J.D. Suarez. 1992. Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reprod. Toxicol.* 6: 491-505.

Liochev, S. y Fridovich, I. 1987. The oxidation of NADH by tetravalent vanadium. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 247-278.

Liochev, S. y Fridovich, I. 1990. Vanadate-stimulated oxidation of NAD(P)H in presence of biologic membranes and others sources of  $O_2^-$ . *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 1-7.

Llobet, J.M. y J.L. Domingo. 1984. Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice. *Toxicol. Lett.* 23: 227-231.

Llobet, J.M., M.T. Colomina, J.J. Siruent, J.L. Domingo y J. Corbella. 1993. Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Toxicology.* 80: 199-206.

Mattison, D.R.; P.K. Working, W.F. Blazak, C.L. Hughes jr., J.M. Killinger, D.L. Olive y K. S. Rao. 1990: Criteria for identifying and listing substances know to cause reproductive toxicity under California's proposition 65. *Reproductive Toxicology.* 4: 163-175.

Meistrich, M.L., A. Cole, M.L. Cherry y P.K. Trostle-Weige. 1987. Nuclear and manchette development during spermiogenesis of normal and *azh* mutant mice. En: Cell Biology of Testis and Epididimys. Ann. N. Y. Academ. Sci. pp. 304307.

- Meistrich, M.L. 1993. Nuclear morphogenesis during spermiogenesis. En: Molecular Biology of the Male Reproductive System. Ed.D. de Kretser. Academic press, Inc. New York. USA. pp. 67-97.
- Mills, J.W. y Ferm, V.H. 1989. Effect of cadmium on f-actin and microtubules of Madin Darby canine kidney cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 101: 245-254.
- Morales, R.P. 1988. El daño a la información genética y los intercambios entre cromátidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo*.14: 65-72.
- Muffly, K.E.; S.J. Nazian y D.F. Cameron. 1993. The junction-related sertoli cell cytoskeleton in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biol. Reprod.* 49: 1122-1132.
- Muffly, K.E.; S.J. Nazian y D.F. Cameron. 1994. Effects of follicle-stimulating hormone on the junction-related Sertoli cell cytoskeleton and daily sperm production in testosterone-treated hypophysectomized rats. *Biol. Reprod.* 51: 158-166.
- Nechay, R.B. 1984. Mechanism of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 501-524.
- Nechay, R.B., L.B. Nanninga, y P.S.E. Nechay. 1986 Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxil, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Arch. Biochem. Biophys.* 251: 128-138.
- Nriagu, J. O. 1998. History, occurrence and uses of vanadium. En: Vanadium in the Environment, part 1: Chemistry and Biochemistry. Ed. J. O. Nriagu. John Wiley and Sons, Inc. USA. pp. 1-24.

Odeigah, P.G.C. 1997. Sperm head abnormalities and lethal effects of formaldehyde in albino rats. *Mutat. Res.* 389: 141-148.

Ostrosky-Wegman P. y M. E. Gonsebatt. 1997. Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos de xenobióticos. *Gac. Méd. Méx.* 133 (suplemento 1): 93-96.

Peakall, D. 1992. Animal biomarker as pollution indicators. CHAPMAN & Hall. Great Britain, London. Cap. 9.

Pogach, L.M.; Y. Lee, S. Gould. W. Giglio, M. Meyenhofer y H.F. S. Huang. 1989. Characterization of cis-platinum-induced sertoli cell dysfunction in rodents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 98: 350-361.

Ramírez, P.; D.A. Eastmond; J.P. Laclete y P. Ostrosky-Wegman. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* 386: 291-298.

Rao, B.; J.C. Soufir, M. Martin y G. David. 1989., Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 224: 127-134.

Redher, D. 1991. The bioinorganic chemistry of vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed.Engl.* 30: 148-167.

Reyes, F.A., Z.R. Martínez, M.M. Luna y O.M.E. Chavarría. 1991. La bioquímica de la función testicular. El túbulo seminífero en: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Ed. Domínguez, C.R. Porrúa. Mexico. cap. VIII.

- Sabbioni, E., L. Clerici y A. Brazelli. 1983. Different effects of vanadium ions on some DNA-metabolizing enzymes. *J. Toxicol. Environm. Health.* 12:737-748.
- Sakurai, H., S. Shimomura, K. Fukuzawa y K. Ishizu. 1980. Detection of oxovanadium(IV) and characterization of its ligand environment subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium (V). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96: 293-298.
- Sakurai, H., M. Nakai, T. Miki, K. Tsuchiya, J. Takada y R. matsushita. 1992. DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in a vanadyl ion-hydrogen peroxide system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189: 1090-1095.
- Sakurai, H. 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ. Health. Perspect.* 102 (suplemento 3): 35-36.
- Sakurai, H., H. Tamura y K. Okatani. 1995. Mechanism for a new antitumor vanadium complex hydroxyl radical-dependent DNA-cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. 206: 133-137.
- Seed, J.; R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris,, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen., D.N.R. Veeramachaneni y L.D. Wise. 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reprod. Toxicol.* 10: 237-244.

Scialli, R.A. 1989. Introduction. En: Sperm measures and reproductive success. Eds: Burger, J.E.Jr., G.R. Tardiff, R.A. Scialli y H. Zenick. ARL Inc. USA, New York. 313 pp. XV-XVI.

Sharma, A. y G. Talukder. 1987. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environm. Mutagenesis*. 9: 191-226.

Sharpe, M.R. 1994. Regulation of spermatogenesis. En: The Physiology of Reproduction. segunda edición, eds: E. Knobil y J.D. Neil. Raven Press, Ltd. New York, USA.. pp 1363- 1434.

Shelby, D.H., J.B. Bishop, M.J. Mason y R.K. Tindall. 1993. Fertility, reproduction and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environ. Health Perspect.* 100: 283-291.

Sheriff. D.S. 1991. Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reprod. Toxicol.* 5: 513-515.

Sheriff, D.S. 1986. Effect of prolactin on testicular lipid metabolism in pubertal rats. *Hormone Res.* 23: 60-63.

Shi, X., H. Jiang, Y. Mao, J. Ye y U. Saffiotti. 1996. Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage. *Toxicology*. 106: 27-38.

Sigma cellculture, 1997. Technical information. Sigma Aldrich Corp. pp. 201.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Srivastava, A. K.; J.L. Chiasson y S.K. Pandey. Mechanism of insulin of vanadium compounds. En: Biology and Medicine Metal ions; vol 4. Eds. Collery, Ph., J. Corbella, J.L. Domingo, J.C. Etienne y J.M. Llobet. Jhon Libbey Eurolex, Paris. pp. 328-330.

Stokinger, H.E. 1981. The metal. En: Patty's Industrial Higiene and Toxicology, 3a Ed. Vol. II A. Clayton, F.E. Eds. John Wiley and Sons, N.Y. pp. 1149-1221.

Vogl, A.W., Pfeiffer, D.C. y D.M. Redenbach. 1991. Ectoplasmic ("junctional") specializations in mammalian Sertoli cells: influence on spermatogenic cells. En: The Male Germ Cell, spermatogonium to fertilization, ed. B. Robaire. Ann. N. Y. Academ. Sci. 637: 175-202.

Vouk, V. 1986. General chemistry of metal. En: Handbook on the toxicology of metal. (Eds) L. Friberg, G.f. Nordberg y V. Vouk. Elsevier Sci. Pub. Cap. 1.

WHO. 1987. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge Press. Gran Bretaña. pp. 16-67.

WHO. 1988. *Environmental Health Criteria*, No. 81. Vanadium. Génova.

WHO. 1995. Vanadio y algunas sales de vanadio. Guía para la salud y la seguridad. PISSQ. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental.

Wyrobek, A.J. y Bruce, W.R. 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 4425-4429.

Wyrobek, A.J., L.A. Gordon, J.G. Burkhardt, M.C. Francis, R.W. Kapp, Jr., G. Letz, H.V. Halling, J.C. Topham y M.D. Whorton. 1983. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm test in non-human mammals: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 115: 385-392.

Wyrobek, A.F., G. Watchmaker y L. Gordon. 1984. Sperm morphology testing in mice. En: Handbook of mutagenicity test procedures 2a ed. eds. B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramel. Elsevier. N.Y. USA. pp. 739-750

Wyrobek, A.F. 1993. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *Reprod. Toxicol.* 7: 3-16.

Wyrobek, A.F.; W.A. Robins, Y. Menharein, D. Pinkel y H-V. Weir. 1994. Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y and X-Y in human sperm using two chromosome fluorescence *in situ* hibridization. *Am. J. Med. Genet.* 53: 1-7.