



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza

Carrera de Biología

“Evaluación de los efectos del óxido de vanadio IV (V_2O_4),
sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la
cepa CD-1, aplicado durante la organogénesis”

Área: Biología del Desarrollo y Genética

TESIS

Que para obtener el título de:
Bióloga

Presenta:
Ocampo Aguilera Nydia Angélica

Director: Dra. Álvarez Barrera Lucila

Asesor: Dr. Juan José Rodríguez Mercado



Ciudad de México, 10 de abril de 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **OCAMPO AGUILERA NYDIA ANGÉLICA**, con número de cuenta **309263559**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **10 de abril de 2018** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dr. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO

VOCAL Dra. LUCILA ÁLVAREZ BARRERA*

SECRETARIO Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

SUPLENTE Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

SUPLENTE Dr. RODRIGO ANIBAL MATEOS NAVA

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación de los efectos del óxido de vanadio IV (V₂O₄), sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la cepa CD-1, aplicado durante la organogénesis.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D. F., a 07 de marzo de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Teratogénesis bajo la supervisión de la Dra. Lucila Álvarez Barrera y el Dr. Juan José Rodríguez Mercado, en la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN) a cargo del Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM.

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo DGAPA-PAPIIT proyecto IN-224916 y IN-225216.

*Los triunfadores no esperan el aplauso de nadie
para continuar. Solo creen en si mismos.*

Agradecimientos

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano por darme la oportunidad de ingresar a la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología ambiental (UNIGEN) de la FES-Zaragoza, pero sobre todo por creer en mi.

A la Dra. Lucila Álvarez Barrera por su paciencia y tiempo empleado por los sacrificios realizados y sugerencias para la revisión del presente trabajo.

A el Dr. Juan José Rodríguez Mercado por su tiempo empleado, consejos y hacer mas llevadera la realización del presente trabajo.

Al Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava que siempre me alentó a seguir adelante y no darme por vencida y a enseñarme solo un poquito de todo lo que sabe.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma que dedicó parte de su tiempo para la revisión de la tesis y por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Róman, Dr Adrina y todo el personal del Bioterio su por ser pieza clave en este trabajo y recibirme siempre de la mejor manera.

A Víctor Alcántara Mejía, por acompañarme siempre en todo este proceso y estar presente en mis triunfos pero sobre todo en mis fracasos y aunque nunca imagine llegar hasta estas alturas de la vida contigo, me he dado cuenta que no habrá mejor equipo y porque sabes que creo que juntos vamos a lograr todos nuestros sueños, gracias.

A todos mis compañeros del L5PA por su apoyo y amistad que de un momento a otro encontré en el laboratorio y por que jamás creí encontraría amigos así.

Dedicada con todo mi corazón

A ti mamá Angelica Ponce Aguilera que estas en el cielo nunca me olvido de ti, siempre has sido una pieza fundamental del motor que impulsa todo mi esfuerzo para lograr mis sueños, te extraño.

Mamá Ofelia Galeana Guadarrama y Papá Rodolfo Ocampo Galeana que no tienen idea de lo que me acaban de ayudar a lograr, me hacen muy feliz y estoy muy orgullosa de ser su hija sin ustedes esto no hubiera sido posible gracias por creer en mí y no soltarme de la mano cuando más los necesitaba, los amo.

Dianita, hermanita gracias por escucharme todas las noches y siempre ser mi amiga y cómplice, sabes a lo que me refiero. Abraham, hermanito estoy muy orgullosa de ti y siempre que me necesites aquí estoy para ti.

Tías Hera, Cony, Bety y tíos Fernando, Martín gracias por todo su apoyo a cada uno en especial por que esto no lo logre sola, cada uno de ustedes me ayudaron, aportando su granito de arena así que este no es solo mi triunfo también es de ustedes y enserio créanme sin ustedes no lo hubiera logrado.

Abue Domi gracias por pensar en mí y mis hermanos aunque siempre estuviste lejos, también te extraño

A toda la familia que aunque no nombre a cada uno también forman parte de este logro.

Gracias dios, por esta familia.

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
2.1. Emisión de vanadio (V) al ambiente	2
2.2. Vías de exposición y efectos sobre la salud	3
2.3. Biocinética del vanadio	6
2.4. Transporte de vanadio de la placenta al feto y de la leche a las crías	8
2.5. Antecedentes de efectos sobre el desarrollo embrionario	10
2.6. Modelo biológico.....	13
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	17
5. Objetivos	17
5.1. General.....	17
5.2. Particulares	17
6. Materiales y métodos	18
6.1. Compuestos químicos.....	18
6.2. Animales	18
6.3. Tratamientos.....	19
6.4. Obtención de fetos.....	19
6.5. Evaluación de anomalías y malformaciones externas.....	20
6.5.1. Fijación con solución Bouin	20
6.5.2. Técnica de tinción hueso (rojo de alizarina)	20
6.5.3. Técnica tinción hueso-cartílago (rojo de alizarina-azul de alciano)	20
6.6. Análisis estadístico.....	21
7. Resultados	22
7.1. Toxicidad materna	22
7.2. Toxicidad embrionaria y fetal.....	22
7.3. Anomalías externas	24
7.4. Anomalías esqueléticas.....	27
7.5. Cráneo.....	28
7.6. Esqueleto axial	32

7.7. Esqueleto distal.....	35
7.7.1. Huesos de las extremidades superiores	35
7.7.2. Huesos de las extremidades inferiores	38
8. Discusión.....	42
8.1. Toxicidad materna	42
8.2. Toxicidad embrionaria y fetal.....	43
8.3. Anormalidades	45
9. Conclusiones.....	51
10. Referencias	52
11. Anexo	60

1. Resumen

El vanadio (V) es considerado contaminante ambiental y estudios *in vivo* han demostrado que sus compuestos en estado de oxidación 5+ producen efectos sobre el desarrollo embrionario y fetal como: parto prematuro, disminución en el peso, falta de osificación y anomalías esqueléticas. Sin embargo, durante la combustión de combustibles fósiles pueden formarse compuestos de V con estado de oxidación 4+ de los cuales no se tiene información de los efectos sobre el desarrollo y la reproducción. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del óxido de vanadio IV (V_2O_4) en ratones descendientes de hembras tratadas durante la preñez.

Se utilizaron cinco grupos de 10 hembras preñadas: un testigo negativo al que se le administró vía ip agua inyectable, otro que se utilizó como testigo positivo al que se trató con 1 mg/kg de $CdCl_2$ y tres a los que se les administró 4.7, 9.3 y 18.75 mg/kg de V_2O_4 , respectivamente. Los tratamientos con V fueron administrados los días 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación y en el día 17 las hembras se sacrificaron y se extrajeron los fetos colocándolos en alcohol etílico al 70% para revisarlos de forma externa en el estereoscopio, del total el 50% de la camada, la mitad se le realizó la tinción de hueso (rojo de alizarina) y la mitad restante hueso y cartílago (rojo de alizarina y azul de alcino). En el tratamiento de 9.3 mg/kg de V_2O_4 aumentó el total de fetos muertos, mientras que en 18.75 mg/kg el 25% de las hembras murieron y en las sobrevivientes de este tratamiento se observó incremento de reabsorciones y disminución tanto del peso como de la longitud de los fetos.

En la revisión externa de los fetos se encontraron extremidades inferiores rotadas, hematomas y daño en la cabeza en el tratamiento de 4.7 mg/kg; para el tratamiento de 9.3 mg/kg, se observó incrementó el número de fetos con protuberancias en la cabeza y con hematomas y en el tratamiento de 18.75 mg/kg las alteraciones encontradas fueron ojos sin parpado, cuello corto, daño en la cabeza y hematomas. En la revisión de huesos, el V_2O_4 induce osificación incompleta en cráneo, en esqueleto axial y distal.

Con base en los resultados, se puede decir que la administración *in vivo* de V_2O_4 a ratones hembra CD-1 produce toxicidad materna, embriotoxicidad, fetotoxicidad, anomalías externas y esqueléticas, por lo que bajo las condiciones experimentales empleadas, el V_2O_4 induce efecto teratógeno.

2. Introducción

Con el incremento de la contaminación industrial todos estamos expuestos a varios contaminantes como los pesticidas, los hidrocarburos y metales (Al-Saleh, *et al.*, 2011). Concentraciones altas de metales emitidos al ambiente por desechos industriales o fertilizantes, entran en la cadena alimenticia a través de las plantas, que son consumidas por animales y finalmente el humano.

La población en general puede estar expuesta a los metales: respirando aire contaminado, consumiendo agua de beber o en alimentos (Callan, *et al.*, 2013). Algunos compuestos una vez que ingresan al organismo se distribuyen y se almacenan en determinados órganos. Varios metales cruzan las barreras biológicas sin dificultad, incluso traspasan la barrera placentaria lo que propicia que estos lleguen al embrión o al feto tales como el cadmio y plomo (Paz-Miño, *et al.*, 2002; Branch, 2004; Bermejo, 2010; Salazar-Monte, *et al.*, 2011). De hecho, una de las etapas del desarrollo como la prenatal es considerada de las más sensible, debido a la gran proliferación y diferenciación celular que se está llevando en el embrión y feto (Fort, *et al.*, 2014; Zheng, *et al.*, 2014).

El vanadio (V) es un metal de transición que es liberado a la atmósfera por la quema de combustibles fósiles y se ha convertido en un contaminante ambiental, lo que ha llevado a la necesidad de saber más sobre sus efectos en la salud, especialmente en la etapa prenatal.

2.1. Emisión de vanadio (V) al ambiente

La liberación del vanadio al ambiente ocurre de manera natural mediante emisiones volcánicas, polvos continentales, incendios forestales y aerosoles de sales marinas (Imtiaz, *et al.*, 2015). Además, la actividad industrial como la siderúrgica y refinerías de petróleo, la quema de combustibles fósiles y el carbón (WHO, 1988), han incrementado la concentración de este metal en la atmósfera (Imtiaz, *et al.*, 2015).

Se ha estimado que se liberan alrededor de 65 000 toneladas de vanadio al ambiente por procesos naturales, como erupciones volcánicas y erosión de suelos, mientras que de forma antropogénica se añaden cerca 200 000 toneladas por año (Roberts, *et al.*, 2016). Por mencionar un ejemplo, en las grandes ciudades las cantidades de vanadio en el aire van de 20 a 100 ng/m³ de forma anual, con mayores concentraciones en los meses invernales, cuando se utiliza el carbón para generar calor (Kucera, *et al.*, 1992).

2.2. Vías de exposición y efectos sobre la salud

El vanadio se encuentra en diferentes estados de oxidación, que van desde 1- hasta 5+, formando parte de diferentes compuestos. En la atmósfera se halla formando óxidos de V, presentes en las partículas de menos de 10 µm de diámetro de las cenizas y polvos (Woodin, *et al.*, 2000; Ehrlich, *et al.*, 2008). De manera cotidiana la población humana puede estar expuesta a este metal al respirar el aire urbano, para la Ciudad de México existen informes de la concentración de este metal en la atmósfera; en el material particulado PM₁₀ se encuentra en 0.114 µg/m³ y para el caso de PM_{2.5} es de 0.093 µg/m³ (Espinoza-Zurutuza, *et al.*, 2017). Además, se han encontrado correlaciones de la presencia del metal y la incidencia de enfermedades cardiovasculares, incluso con la mortalidad producida por ciertos cánceres, neumonía y bronconeumonía (IPCS, 1988, 2001; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; EPA, 2011).

Las mujeres embarazadas están expuestas a partículas finas de V, de forma inhalada, sobre todo cuando habitan cerca de vías automovilísticas muy transitadas o laboralmente y el metal puede llegar a los fetos en desarrollo, lo cual, se corrobora con los datos del Centro Nacional de Estadística de Salud de los estados de Connecticut y Massachusetts, los cuales confirmaron que dependiendo de la zona donde vivían existía una relación entre la concentración de vanadio con el bajo peso de los bebés y la elevada concentración de partículas provenientes de la combustión de las gasolinas (Bell, *et al.*, 2010). Lo anterior fue reportado también en una población de China, donde encontraron relación entre el bajo peso de los recién nacidos y la presencia de vanadio en la sangre de cordón umbilical (Zheng, *et al.*, 2014).

En mujeres embarazadas que residen en una provincia de China, encontraron que conforme incrementan las cantidades de vanadio en la orina de la madre, se incrementa el riesgo de que los recién nacidos presenten bajo peso al nacer (Jiang, *et al.*, 2017). En México no encontramos informes de este tipo, pero se ha observado incremento en la concentración de vanadio en el ambiente en los últimos años y su relación con las cantidades del metal en tejido de pulmones de personas que vivieron en los años noventa en comparación de los que vivieron en los sesenta, indican de forma indirecta el aumento de las concentraciones del vanadio en la atmósfera (Fortoul, *et al.*, 2002). También, recientemente López-Rodríguez, *et al.* (2017), reportaron la presencia de varios metales, entre ellos V, en muestras de sangre de niños en edad escolar que presentaron anemia, los cuales habitan en el estado de Hidalgo lugar donde hay actividad minera, compañías cementeras y refinería.

Los productos de desechos industriales y electrónicos pueden contaminar el suelo y el agua con metales pesados, por lo que los alimentos contaminados son la fuente más importante de exposición de la población humana, ya que se sabe que el nivel de contaminación de los alimentos es directamente proporcional a la concentración del metal presente en el suelo, en el agua de riego y los fertilizantes (**Figura 1**) (Vimalraj, *et al.*, 2017).

En suelos se han registrado cantidades de vanadio de 3-310 $\mu\text{g/g}$, cambiando en áreas contaminadas aumentando hasta 400 $\mu\text{g/g}$ (WHO, 2000), una vez en el suelo puede ser captado y procesado por las plantas que son consumidas por herbívoros de manera que ingresa a la cadena alimenticia. En el agua, se encuentra de 0.2-100 $\mu\text{g/L}$ en aguas continentales y en océanos de 0.29-29 $\mu\text{g/L}$ (WHO, 2000) teniendo contacto con los organismos acuáticos entre ellos los peces o mariscos que son consumidos por los humanos (Vimalraj, *et al.*, 2017).

Como se puede notar el alimento y agua para beber es una vía importante de exposición al vanadio, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés; EFSA, 2004) estimó que la ingesta diaria es de 13 a 15 $\mu\text{g/kg}$, aunque otros

autores proponen que se alcanzan valores de 60 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Byrne y Kosta, 1978; Heinemann, *et al.*, 2003), además, es importante mencionar que el vanadio presente en los alimentos se encuentra en estado de oxidación 3+ y 4+. Por ejemplo, algunas grasas y aceites como la margarina contienen 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, frutas y vegetales tienen concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en peso fresco. De manera particular, algunos alimentos de consumo habitual como la manzana contienen 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, el rábano 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o bien la pimienta negra en la que se han encontrado cantidades de 431 y 987 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Alimentos provenientes del mar y carnes se encuentran concentraciones de 5-40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; el bacalao contiene 28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en tanto que el pollo 22 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En la cerveza y el vino tinto se han detectado concentraciones de 0.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ y 11 $\mu\text{g}/\text{L}$, respectivamente; o bien en el tabaco que contiene cantidades que oscilan entre 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (French y Jones, 1993; Mukherjee, *et al.*, 2004; EFSA, 2004; IPCS, 1988, 2001, 2015).

Otra forma de ingerir el vanadio es mediante el uso de suplementos alimenticios que contienen sulfato de vanadilo (VOSO_4), el cual, se recomienda para controlar la diabetes, la hipertensión o para incrementar masa muscular en los deportistas y que además, se encuentra en estado de oxidación 4+ (Roberts, *et al.*, 2016).

En la exposición laboral en la industria se ha reportado que el vanadio origina cambios en el sistema respiratorio produciendo bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis, en algunos casos presentaron cambios en el ritmo cardiaco y lengua de color verde en trabajadores con hábitos de fumar (Woodin, *et al.*, 2000; Ehrlich, *et al.*, 2008; Fortoul, *et al.*, 2013, Imtiaz, *et al.*, 2015).

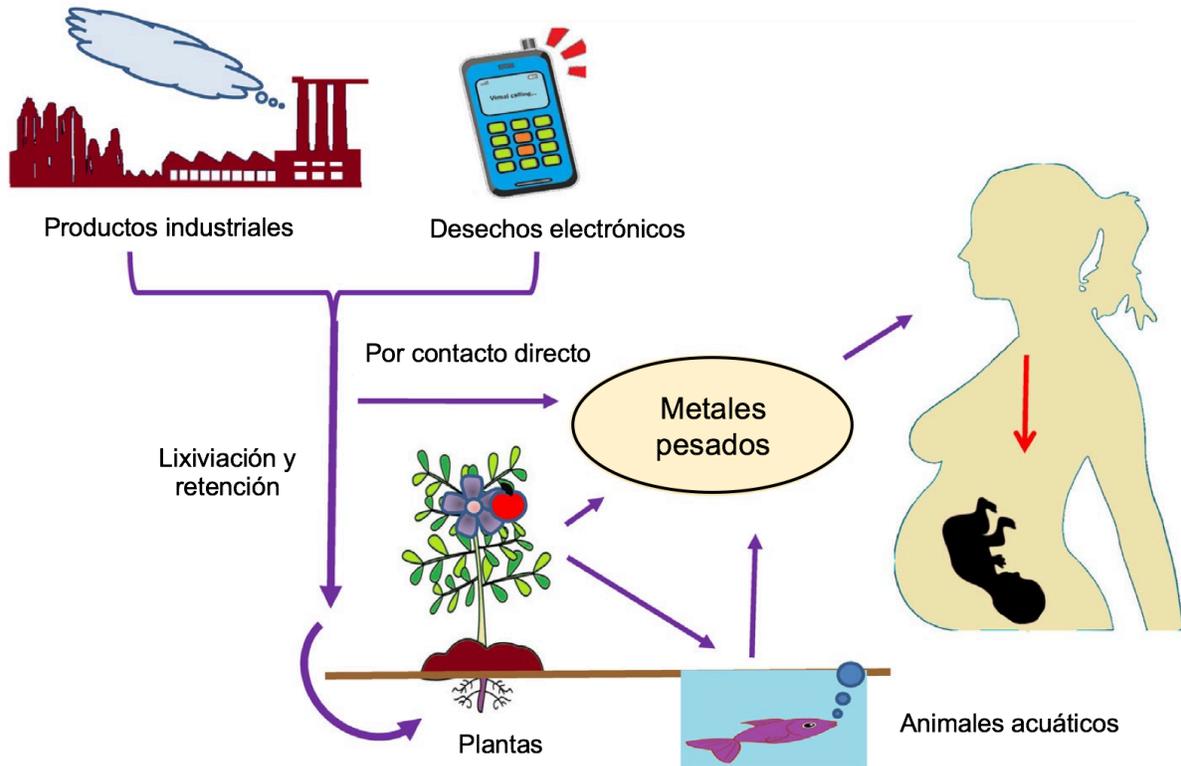


Figura 1. Diagrama de la exposición a metales pesados, incluyendo el vanadio, que muestra cómo ingresa al humano y llega al embrión o feto, produciendo efectos en el crecimiento y sobre el desarrollo (tomado y modificado de Vimalraj, *et al.*, 2017).

2.3. Biocinética del vanadio

Como ya se había mencionado el vanadio en la atmósfera se encuentra principalmente formando óxidos de vanadio, presentes en las partículas de menos de $10\ \mu\text{m}$ de diámetro de las cenizas y polvos que se encuentran en el ambiente (Woodin, *et al.*, 2000; Ehrlich, *et al.*, 2008). La entrada de vanadio al organismo ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio. La absorción por la piel es mínima, varios reportes coinciden en que el 10% del vanadio es ingerido o el 25% es inhalado respectivamente (**Figura 2**) (Elinder, *et al.*, 1988; Rehder, 2003; Mukherjee, *et al.*, 2004). La manera en que entra a la célula es por medio de canales iónicos, transporte pasivo o por endocitosis (Evangelou, 2002; Mukherjee, *et al.*, 2004).

Se ha descrito que el vanadio ingerido es transformado por el estómago a su forma catiónica (VO^{2+}) antes de empezar a ser absorbido en el duodeno, además, de que la absorción del VO^{2+} es cinco veces menor en comparación con la presencia de la forma aniónica (VO_4^{3-}) (Evangelou, 2002; Mukherjee, *et al.*, 2004). El vanadio con estado de oxidación 5+ es reducido a 4+ por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma (Sakurai, 1994; Rehder, 2003).

Una vez en torrente sanguíneo el vanadio es transportado principalmente por la transferrina o la albumina, seguido de citratos, lactatos y fosfatos. Se acumula en diferentes órganos como hígado, riñón, hueso y bazo, mientras que en pulmones y testículos se acumula en menor cantidad; también se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso. Los órganos que no mueven con facilidad el metal son hueso, músculos y pulmón, donde permanece por tiempo prolongado, lo cual, podría afectar la salud del individuo y causar enfermedades crónicas degenerativas que conduzcan al cáncer (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Levina y Lay, 2017).

En animales de experimentación, la entrada del metal al organismo está en función de la ruta de administración, el tipo de tratamiento y las propiedades del compuesto (Domingo, 1996). Independientemente de la forma en que se aplique, el vanadio se acumula exclusivamente como vanadio 4+ (VO^{2+}) (Sharma, *et al.*, 1987; Alessio, *et al.*, 1988; Elinder, *et al.*, 1988; French y Jones, 1993).

Además, se sabe que el vanadio en modelos animales puede cruzar las barreras hematotesticular y placentaria e inducir alteraciones en las diferentes células del testículo e intervenir con el desarrollo embrionario y fetal (Domingo, 1996; Aragón, *et al.*, 2005). Su eliminación por la orina se da en dos fases, en las primeras 20 horas se excreta la mayor cantidad y entre los 40 a 50 días se elimina la parte restante (Elinder, *et al.*, 1988).

2.4. Transporte de vanadio de la placenta al feto y de la leche a las crías

Algunos autores coinciden que el vanadio puede atravesar la barrera placentaria, o ser transportado por la leche (Edel y Sabbioni, 1988; Paternain, *et al.*, 1990) y a acumularse en las membranas fetales (Roshchin, *et al.*; 1980; Hackett y Kelman, 1983; IPCS, 1988) así como en el esqueleto (Underwood, 1977).

Un estudio realizado por Edel y Sabbioni (1988) con pentavanadato (VO_4^{-3}), marcado radioactivamente, administrado vía intravenosa a ratas hembras Spraw-Dawley en el día 12 de gestación con $0.1 \mu\text{g}$ de V/mL, reportaron la presencia del metal principalmente en hígado, intestinos y riñones de los fetos. En tanto que en las madres la mayor cantidad se encontró en la placenta seguido de riñones, bazo e hígado, por otra parte, las cantidades de vanadio en la sangre de la madre y el feto fueron similares. En el mismo estudio confirmaron que el vanadio llega a las crías a través de la leche materna; para esto los autores inyectaron a las madres con $0.1 \mu\text{g}$ de V/mL dos días después del nacimiento de las camadas, se dejaron que amamantaran a sus crías y se detectó vanadio en la leche y en la descendencia. El vanadio presente en la leche materna puede remplazar al hierro presente en la lactoferrina, la cual es una proteína presente en la leche materna, por lo que este podría ser una forma de entrada del vanadio a través de la leche para los recién nacidos (**Figura 2**).

En 1990 Paternain, *et al.* administraron de forma oral sulfato de vanadilo pentahidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (estado de oxidación 4+) a ratones hembras Swiss los días 6 a 15 de gestación con dosis de 37.5, 75 o 150 mg/kg por día, y encontraron que las cantidades de vanadio presentes en los fetos aumentaba con respecto a la dosis ya que la cantidad de vanadio encontrada en los fetos fue de $0.226 \mu\text{g}$, $0.375 \mu\text{g}$ y $0.640 \mu\text{g}$, respectivamente.

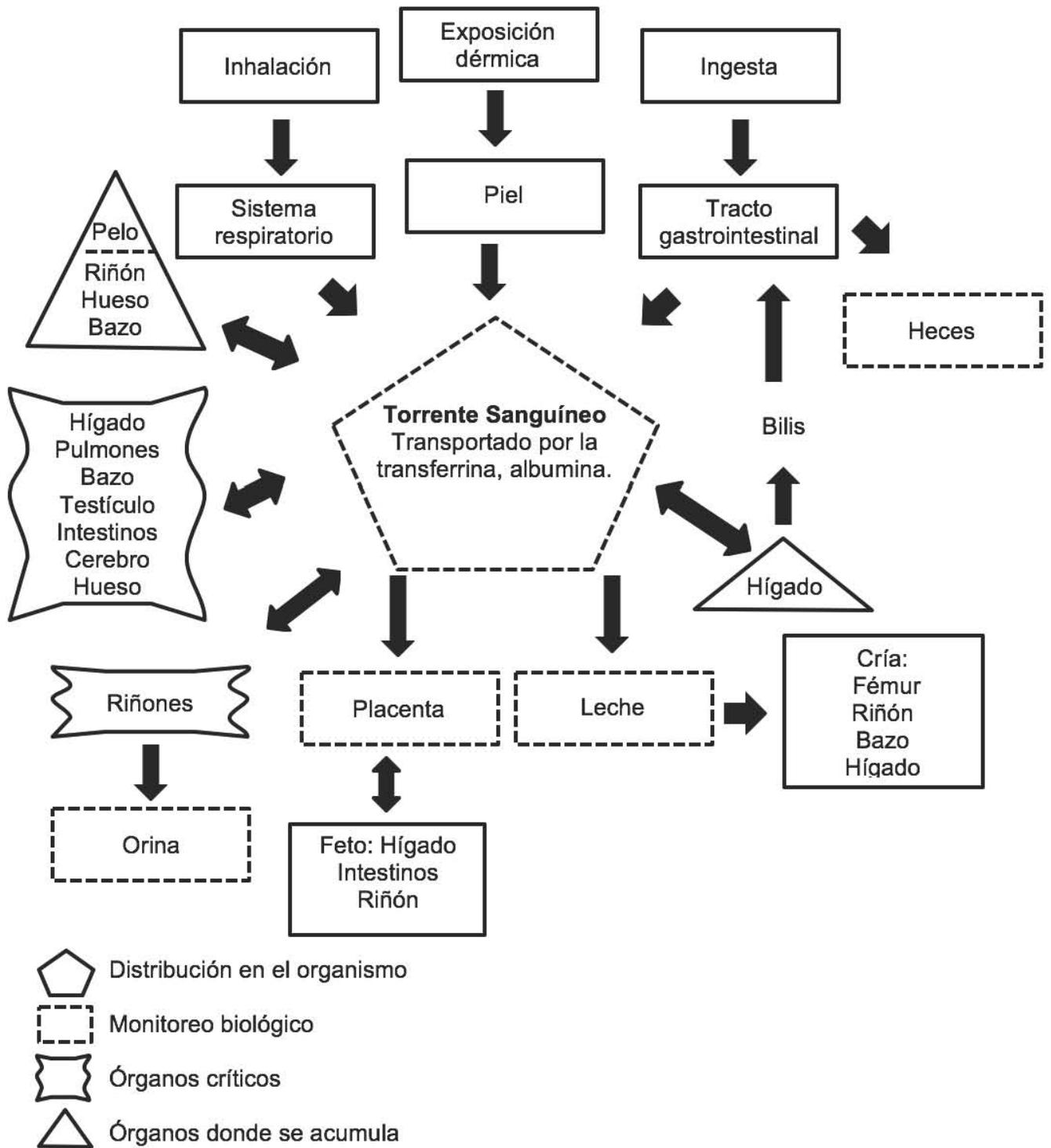


Figura 2. Ingreso y distribución del vanadio en el organismo. Diseñado a partir de Edel y Sabbioni, 1988; Elinder, *et al.*, 1988; Mukherjee, *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006.

2.5. Antecedentes de efectos sobre el desarrollo embrionario

El vanadio produce varios efectos sobre la reproducción. En trabajos de investigación donde se utilizaron rata y ratón macho los resultados por exposición a vanadio y sus compuestos muestran daño en los órganos reproductivos (Kamboj y Kar, 1964), modifica la concentración hormonal y disminuye la calidad espermática (Chandra, *et al.*, 2007), mientras que en ratas hembras se modificó el ciclo estral y se encontró retraso en la apertura vaginal (Altamirano-Lozano, *et al.*, 1991). Los embriones y fetos obtenidos de ratas machos tratadas con metavanadato de sodio (NaVO_3) por vía oral durante 60 días y hembras durante 14 días antes de aparearse, con dosis de 5, 10, 20 mg/kg por día, mostraron retraso en el crecimiento (Domingo, 1986).

Respecto a los efectos producidos sobre el desarrollo embrionario en un trabajo con metavanadato de sodio (NaVO_3) 2, 4 o 8 mg/kg aplicado por vía intraperitoneal (ip) a ratonas en los días 6 al 15 de gestión, encontraron disminución del peso de las madres y en los fetos se observó reducción del peso, aumento del número de embriones muertos y paladar hendido en las dosis altas (Gómez, *et al.*, 1992).

En ratones hembra tratadas con ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), vía oral con dosis de 7.5, 15 o 30 mg/kg administrados los días 6 al 15 de gestación, presentaron efectos maternos como reducción de peso y en 30 mg/kg muerte materna, por otro lado, al analizar los productos, los fetos presentaron retardo en la osificación (Sánchez, *et al.*, 1991).

Cuando se administró intraperitonealmente metavanadato de amonio (NH_4VO_3) a hámster en dosis de 0.47, 1.88 o 3.75 mg/kg, en los días 5-10 de gestación, no reportaron toxicidad materna, pero si anomalías esqueléticas, como aumento de costillas y falta de osificación en esternones (Carlton, *et al.*, 1982).

Por otra parte, al administrar vía oral 200 mg/L (200 ppm) de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) en ratas machos Sprague-Dawley por 70 días y hembras Sprague-Dawley durante 61 días (antes y durante el apareamiento, la gestación y la lactancia), el grupo

de las hembras tratadas presentaron aumento de las reabsorciones y de fetos muertos, disminución del peso fetal, retraso del crecimiento, hematomas, micrognatia y anomalías viscerales en los fetos y con respecto a la revisión del esqueleto se observó separación de los huesos parietales, osificación incompleta y reducción del número de esternones, costillas extra y curvas, ausencia de carpos y de huesos caudales (Morgan y El-Tawil, 2003).

Por su parte, Wide en 1984, administró 0.9 (sin especificar unidades) de pentóxido de vanadio (V_2O_5) vía intravenosa a dos grupos de ratones hembra, uno inyectado el día 3 y el otro el día 8 de gestación, en este último se observó disminución de la osificación en los fetos y el 9% de ellos presentaron daño en la columna vertebral.

Otro estudio con (V_2O_5), donde se administró ip 8.5 mg/kg a ratones hembra en los días 6 al 15 de gestación, no se reportó toxicidad materna, pero se incrementó el número de fetos con anomalías principalmente en las extremidades (Altamirano-Lozano, *et al.*, 1993).

El único compuesto reportado donde utilizan el vanadio con estado de oxidación 4+, es el de Paternain *et al.*, 1990, donde dieron tratamientos con sulfato de vanadilo pentahidratado ($VOSO_4 \cdot 5H_2O$) vía oral del día 6 al 15 de gestación a ratones hembra en dosis de 37.5, 75 o 150 mg/kg, ellos reportaron toxicidad materna; como decremento del peso del riñón e hígado, asimismo, se encontró disminución del peso fetal, incremento de muerte embrionaria, algunas anomalías fetales y retraso de la osificación del esqueleto siendo más frecuente en regiones del cráneo y de las extremidades.

En resumen, como se puede ver en el **Cuadro I**, la mayoría de trabajos donde evaluaron el efecto en el desarrollo embrionario y fetal se realizaron con compuestos de vanadio donde éste presenta un estado de oxidación de 5+, y únicamente se encontró un estudio con 4+. Por lo que en este trabajo se decidió evaluar el efecto del óxido de vanadio IV (tetraóxido de vanadio, V_2O_4) sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la cepa CD-1, aplicando el compuesto a las hembras preñadas ip durante la organogénesis.

Cuadro I. Efectos de diferentes compuestos de vanadio sobre el desarrollo embrionario.

Estado de oxidación	Compuesto	Efectos embrionarios y fetales	Referencias
5+	Metavanadato de amonio (NH_4VO_3)	En hámster: disminución de la osificación y costillas súper numerarias.	Carlton, <i>et al.</i> , 1982.
		En rata: retraso del crecimiento, micrognatia, hematoma y anomalías esqueléticas.	Morgan y El-Tawil, 2003.
	Metavanadato de sodio (NaVO_3)	En rata: disminución del desarrollo embrionario y fetal.	Domingo, 1986.
		En rata: no se observaron efectos maternos ni fetales.	Paternain, <i>et al.</i> , 1987.
		En ratón: los fetos presentaron reducción del peso, aumentó el número de embriones muertos y paladar hendido en las dosis altas.	Gómez <i>et al.</i> , 1992.
	Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4)	En rata: disminución del número de hembras que concluían la preñez.	Ganguli, <i>et al.</i> , 1994.
Pentóxido de vanadio (V_2O_5)	En ratón: efectos maternos y retraso de la osificación.	Sánchez, <i>et al.</i> , 1991.	
4+	Sulfato de vanadilo pentahidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	En ratón: disminución de la osificación y daño en columna vertebral.	Wide, 1984.
		En ratón: no se reportó toxicidad materna. Alteraciones fetales principalmente en las extremidades.	Altamirano-Lozano, <i>et al.</i> , 1993.
3+	Sin reportes	Sin reportes	Sin reportes
No definido	Vanadio	En rata: no se encontraron efectos maternos, embriotoxicos y fetotoxicos.	Roschin, <i>et al.</i> , 1980.
	Partículas finas (PM_{25})	En humano: Incremento del riesgo de bajo peso al nacer de los recién nacidos.	Bell, <i>et al.</i> , 2010.

Tomada y modificada de Altamirano-Lozano, *et al.*, 2014.

2.6. Modelo biológico

El ratón es un mamífero excelente e incuestionable que ofrece muchas ventajas en la investigación sobre todo en áreas de la biología del desarrollo para adquirir conocimientos fundamentales y es ideal para estudiar compuestos químicos con usos terapéuticos (Bolon, 2015). Dentro de las ventajas como modelo se encuentra que son fáciles de criar, su pequeño tamaño hace fácil su manejo, su periodo de gestación es corto, su progenie es abundante, su bien documentada genética permite conocer la secuencia total de su genoma (Guénet y Bonhomme, 2004) el cual, posee semejanza estrecha con el genoma humano (Bolon, 2015).

En especial la cepa CD-1 tienen carácter dócil, promedio de crías 11.5, según otros autores de 12 a 14 (Benavides y Guénet, 2003), poseen aspectos reproductivos idóneos para su uso en la teratología, también son útiles en las áreas de oncología y toxicología (Harlan, 2012).

Reproductivamente, en los ratones la fertilización ocurre en la parte superior del oviducto (ámpula), la implantación se da al día 4.5-5 (en estado de blastocito o blastocisto) y se implanta en la pared del útero. La gestación dura entre 18.5 a 19.5 días en las hembras primíparas, y entre 19 y 21 en las múltiparas, lo anterior depende del estado fisiológico, la constitución genética de la hembra y del número de crías que esté gestando (Benavides y Guénet, 2003).

En los vertebrados las etapas de desarrollo generalmente se definen en términos de uno o más eventos o rasgos importantes que ocurren durante ese período, los principales períodos que ocurren antes del nacimiento son: la concepción, preimplantación, implantación, organogénesis y crecimiento fetal, mientras que los que ocurren después del nacimiento son las fases neonatal, infantil, juvenil y adulta, cada período puede ser subdividido usando eventos o características adicionales (Bolon, 2015).

La etapa de desarrollo durante la cual ocurre la exposición tiene gran importancia en los efectos observados, si ocurre durante la organogénesis se pueden originar cambios

estructurales permanentes, si sucede después se producen efectos funcionales en el metabolismo (Al-Saleh, *et al.*, 2011; Bolon, 2015).

En los ratones el periodo de organogénesis ocurre aproximadamente entre el día 5 al 15 de gestación (Bolon, 2015), durante este se produce la segregación, migración y diferenciación celular, el agrupamiento de células y formación de tejidos destinados a formar órganos, de hecho, este periodo es muy sensible a la perturbación y alteraciones por compuestos que pueden afectar el desarrollo embrionario; como los teratógenos. La sensibilidad de este periodo en cuanto a la inducción de malformaciones abarca los días 5 al 14 de gestación en ratas y ratones lo que es equivalente al tercer mes en humanos (Timbrell, 2009).

Durante el periodo de organogénesis se pueden producir interferencias con procesos de desarrollo específicos, es decir se puede dañar la formación de un órgano en particular, como se muestra en la **Figura 3**, donde se observa que la inducción y el tipo de malformación es determinada por el día de gestación en el que se aplica el teratógeno en cuestión (Timbrell, 2009).

Los teratógenos son variados, entre estos se encuentran agentes ambientales que pueden llegar al embrión o feto mediante la madre y que son capaces de atravesar la placenta (Bermejo, 2010). Son de origen biológicos, físicos y químicos, por ejemplos, virus, bacterias, hongos, radiación ultravioleta, radiación ionizante, choques térmicos, radiaciones electromagnéticas, fármacos, sustancias de abuso, anticonceptivos, componentes de los cigarrillos o metales pesados (Paz-Miño, *et al.*, 2002; Branch, 2004; Salazar-Montes, *et al.*, 2011). El resultado puede involucrar la interferencia con el crecimiento normal, homeostasis, desarrollo, diferenciación, y/o comportamiento (Timbrell, 2009).

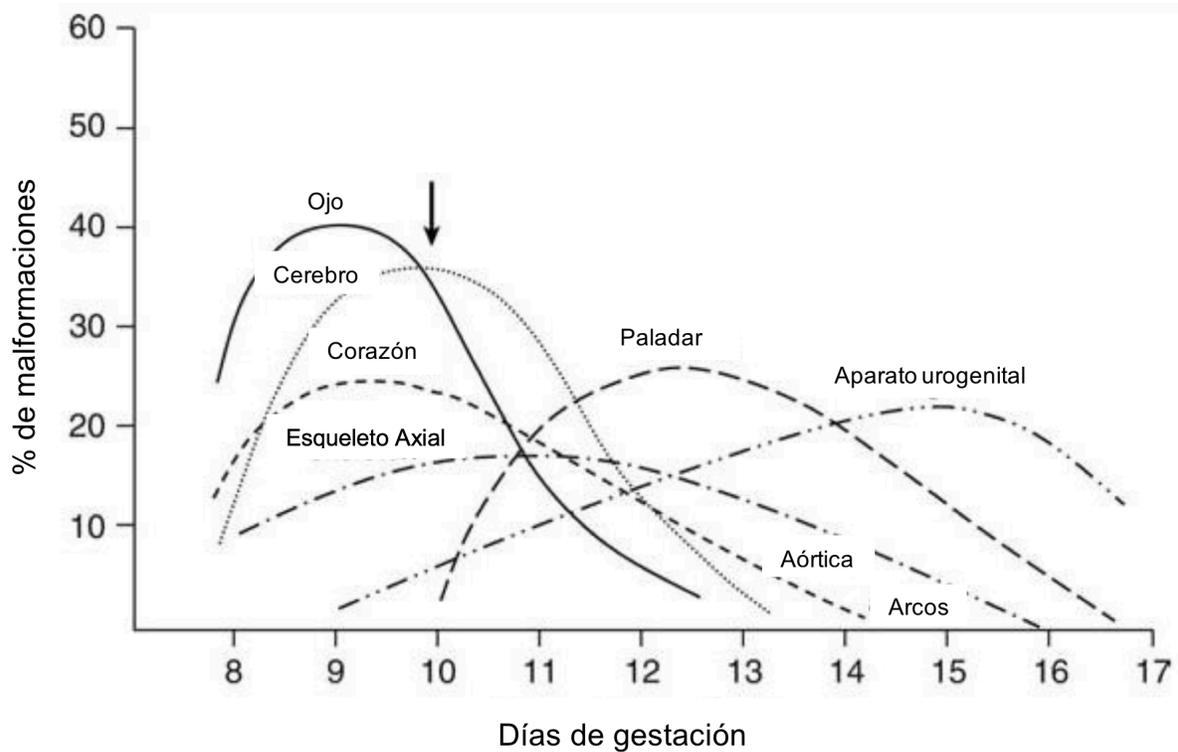


Figura 3. Malformaciones producidas en diferentes tejidos y órganos en rata. El porcentaje máximo de inducción está en función del día de aplicación del teratógeno; la flecha indica el momento en que se administra el teratógeno en estudio (tomado y modificado de Timbrell, 2009).

3. Justificación

La liberación del vanadio al ambiente ocurre de manera natural mediante emisiones volcánicas, incendios forestales y antropogénica por la industria siderúrgica, las refinerías de petróleo y la quema de combustible fósil, por mencionar algunos. Esta situación ha incrementado la concentración de vanadio en la atmósfera, entre los que se encuentran los óxidos de este metal, presentes en las partículas de menos de 10 μm de diámetro que se respiran en urbes altamente pobladas, como la Ciudad de México.

De manera cotidiana toda la población, incluyendo las mujeres embarazadas, están expuestas a este metal no solo por el aire sino también al consumir alimentos que lo contengan. Se conoce que atraviesa la barrera placentaria y el pentóxido de vanadio (V_2O_5) produce alteraciones de la osificación del esqueleto y acortamiento de extremidades de fetos de ratones tratados. Sin embargo, no se han explorado los efectos de otros de sus óxidos en el desarrollo embrionario y fetal, por lo que en el presente trabajo se estudió el efecto que pueda inducir el óxido de vanadio IV (V_2O_4) en los descendientes de ratones hembras preñadas y tratadas con este compuesto.

4. Hipótesis

Se sabe que el vanadio atraviesa la barrera placentaria y llega al embrión, además, de que algunos de sus compuestos producen efectos sobre el desarrollo embrionario, por lo que si se administra V_2O_4 a ratones hembra de la cepa CD-1 preñadas, durante el periodo de organogénesis se espera encontrar efectos en los descendientes de estas hembras.

5. Objetivos

5.1. General

Evaluar los efectos sobre el desarrollo embrionario y fetal en los descendientes de ratones hembra de la cepa CD-1 tratadas con V_2O_4 del día 6 al 16 de gestación.

5.2. Particulares

- Evaluar la toxicidad en las hembras tratadas con tres diferentes dosis de V_2O_4 , aplicado vía intraperitoneal.
- Evaluar la embriotoxicidad y la fetotoxicidad en los descendientes de las hembras tratadas.
- Evaluar las alteraciones externas producidas por el V_2O_4 en fetos descendientes de las hembras tratadas.
- Evaluar las alteraciones en cartílago y hueso producidas por los tratamientos con V_2O_4 en fetos de la cepa CD-1.

6. Materiales y métodos

6.1. Compuestos químicos

El óxido de vanadio IV (tetraóxido de vanadio: V_2O_4 ; pureza 99% CAS 12036-21-4), cloruro de cadmio ($CdCl_2 \cdot H_2O$; CAS 10108-64-2), azul de alciano (CAS 33864-99-2), obtenidos de Sigma-Aldrich Química USA y el rojo de alizarina (CAS 130-22-3) de laboratorios Hycel de México.

6.2. Animales

Se utilizaron ratones sexualmente maduros de la cepa CD-1, hembras de 10 a 11 semanas de edad (con rango de peso 32-36 g), machos (con rango de peso de 39-42 g) que fueron proporcionados por el Bióterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mantenidos con fotoperiodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, a temperatura estándar ($21 \pm 22^\circ C$) con una humedad de 40-50%. Los animales tuvieron libre acceso al alimento (Rodent diet Tek Lad Global Diets, 18% de proteína) y agua. En el momento de las cruces, después de las 6 de la tarde las hembras se colocaron con los machos en una proporción 2:1, a la mañana siguiente se revisó la presencia del tapón vaginal, y el indicio de tapón se consideró como el día 0 de gestación.

Los experimentos se realizaron siguiendo las recomendaciones del American College of Toxicology: Policy Statement on the Use of Animals in Toxicology (Society of Toxicology, 2002), y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad de FES-Zaragoza UNAM (número de registro FESZ / DEPI / 363/14).

6.3. Tratamientos

Se utilizaron cinco grupos con alrededor de 10 hembras cada uno. El compuesto se administró vía ip los días 6, 8, 10, 12, 14, 16 de gestación (6 aplicaciones). Para la aplicación de V_2O_4 se utilizó la dosis letal 50 (dl_{50}) que es de 150 mg/kg (Aragón y Altamirano-Lozano, 2001) de la siguiente manera:

Grupo 1: Testigo negativo: agua inyectable (0.1 mL/10 g de peso del ratón).

Grupo 2: V_2O_4 18.75 mg/kg (1/8 dl_{50})

Grupo 3: V_2O_4 9.3 mg/kg (1/16 dl_{50})

Grupo 4: V_2O_4 4.7 mg/kg (1/32 dl_{50})

Grupo 5: Testigo positivo cloruro de cadmio ($CdCl_2$) 1 mg/kg.

Diariamente las hembras fueron pesadas y examinadas externamente para detectar signos de toxicidad, como pérdida de pelo, presencia de diarrea, sangrado, agitación, entre otros síntomas de intoxicación.

6.4. Obtención de fetos

En el día 17 de gestación las hembras fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y del útero se obtuvieron los fetos. Se registraron los datos para la evaluación de embriotoxicidad y fetotoxicidad tomando en cuenta:

- Peso total de los cuernos
- Peso total de los fetos del cuerno izquierdo y cuerno derecho
- Número de fetos de cuerno izquierdo y cuerno derecho
- Número de fetos vivos y fetos muertos del cuerno izquierdo y cuerno derecho
- Número de reabsorciones tempranas y tardías del cuerno izquierdo y cuerno derecho
- Los fetos se colocaron en frascos con alcohol etílico al 70% separándolos en cuerno izquierdo y cuerno derecho (durante 6 días), pasado el tiempo se colocaron en alcohol etílico al 100% (durante 6 días).

6.5. Evaluación de anomalías y malformaciones externas

Todos los fetos obtenidos se revisaron bajo el estereoscopio, se tomó la longitud cefalocaudal, se revisó externamente la cabeza, ojos, boca, lengua, tronco, extremidades superiores, inferiores, cola y el género.

Una vez revisados los fetos, las camadas se dividieron de la siguiente manera:

- 50% de los fetos se fijaron en solución bouin
- El otro 50% de los fetos se dividió en dos partes:

25% se tiñó con rojo de alizarina para revisar hueso.

25% se tiñó con azul de alciano y rojo de alizarina (cartílago y hueso).

6.5.1. Fijación con solución Bouin

Los fetos se colocaron de 6-8 h en solución Bouin y posteriormente en alcohol etílico al 70% para estudios histológicos posteriores.

6.5.2. Técnica de tinción hueso (rojo de alizarina)

Se retiraron las vísceras abdominales de los fetos y se colocaron en solución que contenía rojo de alizarina e hidróxido de potasio al 1%; aproximadamente 6 días o hasta que el tejido quede transparente. Después se revisó bajo el estereoscopio.

6.5.3. Técnica tinción hueso-cartílago (rojo de alizarina-azul de alciano)

Se retiraron las vísceras abdominales de los fetos, se colocaron en la solución de azul de alciano por 6 días para finalizar se pasaron a solución que contenía rojo de alizarina e hidróxido de potasio al 1% (por 5 días) y se revisó bajo el estereoscopio.

6.6. Análisis estadístico

Todos los datos paramétricos (longitud y peso) se presentan como la media \pm desviación estándar los cuales se analizaron con la prueba *t-Student*, y para datos no paramétricos se usó la prueba de ji^2 para comparar el grupo tratado con el control de acuerdo con Tiboni *et al.*, (2006) y Ara *et al.*, (2016). Se consideraron diferencias estadística valores de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Toxicidad materna

En este trabajo se administraron 4.7, 9.3 y 18.75 mg/kg de V_2O_4 vía ip, a ratones hembras preñadas de la cepa CD-1, se dieron en total seis aplicaciones, cada una en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

En el **Cuadro II** se puede observar el porcentaje de hembras muertas en los tratamientos. Para 4.7 y 9.3 mg/kg se trataron 11 hembras de las cuales una de ellas murió en cada tratamiento. En el tratamiento de 18.75 mg/kg de V_2O_4 , de las 12 hembras dos murieron después de la cuarta aplicación y una después de la tercera aplicación; también las hembras muestran disminución en la ganancia del peso durante la preñez ($p < 0.05$). Otros síntomas que aparecieron en las hembras tratadas con vanadio fue letargo, contracciones abdominales, y en algunas sangrado vaginal y diarrea.

Al día 17 de gestación cuando se realizó el sacrificio, en el grupo de 18.75 mg/kg de las 9 hembras que sobrevivieron, en tres se obtuvieron fetos, una solo tenía reabsorciones y en cinco hembras solo se observó los sitios de implantes sin fetos ni reabsorciones (**Cuadro II**).

Con respecto al testigo positivo se utilizó 1 mg/kg de $CdCl_2$ ya que se sabe que es un teratógeno (Ara, *et al.*, 2016), se trataron 12 hembras de las cuales, tres hembras al momento de ser sacrificadas no tenían fetos, solo reabsorciones. Durante la revisión diaria de las hembras se observó contracciones abdominales al momento de administrar el compuesto, además de sangrado vaginal.

7.2. Toxicidad embrionaria y fetal

Para la evaluación de embriotoxicidad y fetotoxicidad se realizó el conteo total de implantes, fetos vivos, fetos muertos, reabsorciones tempranas (muerte del embrión en

los primeros días de gestación), reabsorciones tardías (muerte del feto en los últimos días de gestación), longitud cefalocaudal y el peso de la camada. En el **Cuadro III** se observa que para el tratamiento de 9.3 mg/kg se incrementó el número de fetos muertos.

Cuadro II. Datos obtenidos de las hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

	Tratamiento en mg/kg				
	V ₂ O ₄				CdCl ₂
	0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1
No. de hembras tratadas	10	11	11	12	12
Muerte materna en proporción (%)	0	1/11 (9.1)	1/11 (9.1)	3/12 (25)	0
Ganancia de peso (media ± DE)	24.6 ± 6.5	28.5 ± 5.2	23.9 ± 4.1	11.1 ± 2.9 *	21.7 ± 8.9
No. de hembras que finalizaron el tratamiento:					
No. de hembras que finalizaron el tratamiento: (%)					
• Con fetos	10	10 (100)	10 (100)	3 (33.3)	9 (75)
• Únicamente con sitios de implantación	0	0	0	5/9 ** (55.5)	0
• Únicamente con reabsorciones	0	0	0	1/9 (11.1)	3 (25)

* $p < 0.05$ vs. grupo testigo (*t* de Student).

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (*ji*²).

La administración de V₂O₄ durante el periodo de organogénesis provocó daños durante la etapa de desarrollo del embrión y la etapa de feto (**Cuadro III**). En la dosis de 18.75 mg/kg disminuyó el número de fetos vivos obteniendo 17 (5.6 ± 4.1) en comparación al grupo control del que se obtuvieron 122, asimismo, se aumentó el número de reabsorciones y disminución de la talla y peso, todo esto con respecto al testigo negativo. Al administrar CdCl₂ se obtuvieron 93 fetos y no se observaron diferencias con respecto al testigo (**Cuadro III**).

Cuadro III. Datos obtenidos de las hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

	Tratamiento en mg/kg				
	V ₂ O ₄				CdCl ₂
	0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1
Hembras con fetos que finalizaron el tratamiento	10/10	10/11	10/11	3/12	9/12
Implantes	137	139	146	33	110
Fetos vivos (por camada M ± DE)	122 (13.5 ± 3.4)	123 (12.3 ± 2.4)	114 (11.4 ± 2.8)	17 ** (5.6 ± 4.1)*	93 (9.2 ± 6.3)
Fetos muertos (por camada)	0	3 (0.3 ± 0.4)	16 ** (1.6 ± 1.7)*	0	1 (0.1 ± 0.3)
Reabsorciones tempranas (por camada)	14 (1.5 ± 1.3)	14 (1.4 ± 1.5)	14 (1.4 ± 1.5)	12 ** (4 ± 2.6)*	14 (1.4 ± 0.8)
Reabsorciones tardías (por camada)	1 (0.1 ± 0.3)	0	2 (0.2 ± 0.4)	4 ** (1.3 ± 2.5)*	3 (0.3 ± 0.9)
Total de reabsorciones (por camada)	15 (1.6 ± 1.3)	13 (0.6 ± 1.1)	16 (0.8 ± 1.2)	16 ** (4 ± 3.8)*	17 (1.7 ± 1.1)
Peso por camada en g	11.9 ± 3.5	13.1 ± 2.3	12.1 ± 3.5	3.3 ± 2.3 *	10.9 ± 6.3
Longitud de los fetos por camada	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.1 *	2.1 ± 0.1

M ± DE, media y desviación estándar.

* $p < 0.05$ vs. grupo testigo (*t* de Student).

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (*ji*²)

7.3. Anormalidades externas

Se revisaron de manera externa todos los fetos vivos obtenidos de los diferentes grupos, se examinó la forma de cabeza, orejas, ojos, boca, lengua, posición de cuello tronco extremidades superiores inferiores, cola y sexo, comparando con las características que presentaban los fetos del grupo testigo y con lo reportado en la literatura (Taylor, 1986; Bolon, 2015). En el **Cuadro IV**, se presentan los datos de la revisión externa, donde se observa que en el tratamiento con 4.7 mg/kg de V₂O₄ de los 123 fetos evaluados el 40.6% presentaron extremidades inferiores con rotación, el 96.7% hematomas principalmente en cabeza y 21% un orificio en la cabeza (**Figura 4a, 4g y 4h**). En el tratamiento de 9.3

mg/kg, se revisaron 114 fetos de los cuales el 26.3% protuberancias en cabeza (**Figura 4i**) y 65.7% hematomas principalmente en cabeza. Con respecto al tratamiento de 18.75 mg/kg se analizaron 17 fetos en los que se hallaron 11.7% que presentaron ojos sin parpado, 47% con cuello corto, 88.2% de fetos mostraron hematomas en la nariz y cabeza (**Figura 4d, 4c, 4f**).

Cuadro IV. Datos obtenidos de la revisión externa de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

	Tratamiento en mg/kg				
	V ₂ O ₄				CdCl ₂
	0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1
Camadas examinadas	10/10	10/11	10/11	3/12	9/12
Fetos examinados	122	123	114	17	93
Fetos con anomalías externas: (%)					
• Ojos sin parpado	0	0	0	2 ** (11.7)	0
• Cuello corto	6 (4.9)	0	9 (7.8)	8 ** (47)	7 (7.5)
• Exencefalia	0	0	1 (0.8)	0	0
• Extremidad superior rotada	0	0	0	0	14 ** (15.1)
• Extremidad inferior rotada	0	50 ** (40.6)	0	0	14 ** (15.1)
• Cola doblada	0	1 (0.8)	1 (0.8)	0	0
• Hematomas	0	113 ** (91.8)	75 ** (65.7)	15 ** (88.2)	13 ** (36.5)
• Daño en cabeza	0	26 ** (21.1)	7 ** (6.1)	5 ** (29.4)	2 (2.1)
• Protuberancias en cabeza	0	3 (2.4)	30 ** (26.3)	0	0
Fetos con una o más anomalías externas	6 (4.9)	119 ** (96.7)	89 ** (78)	15 ** (88.2)	55 ** (59.1)

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (ji^2)

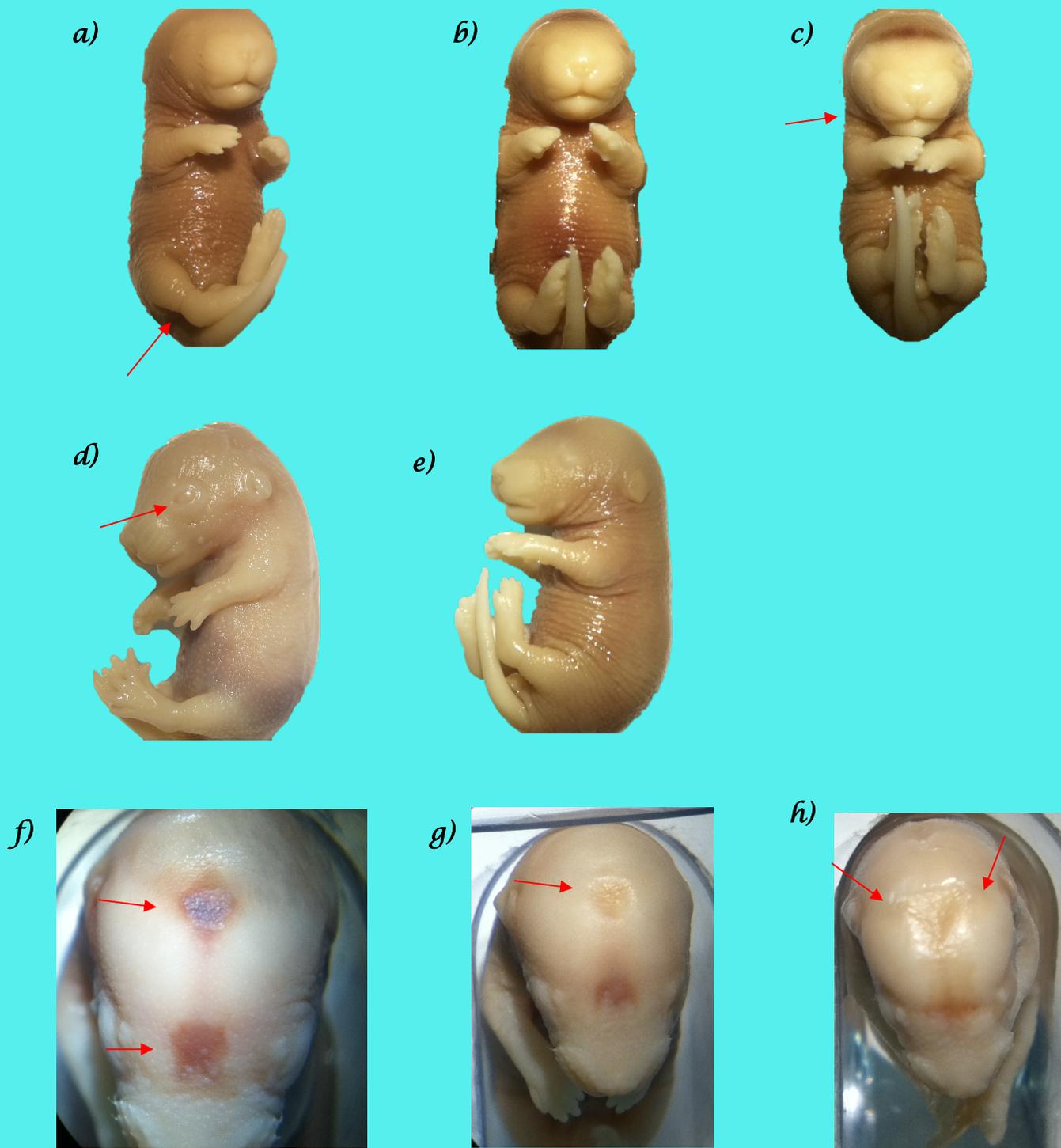


Figura 4. Anormalidades externas observadas en los fetos de hembras tratadas con V_2O_4 durante la gestación. En a) se muestra extremidad inferior rotada del tratamiento con 4.75 mg/kg. En b) feto en posición frontal del testigo. En c) feto con cuello corto o d) ojos sin parpado ambos, del tratamiento con 18.75 mg/kg. En e) feto en posición lateral del testigo negativo. Algunas otras anomalías se muestran en: f) hematomas, g) orificio en la cabeza y h) protuberancias, estas observadas en el tratamiento de 9.3 mg/kg.

En la **Figura 5**, se muestra el porcentaje de fetos que presentan al menos una anomalía externa, para los distintos tratamientos de V_2O_4 , donde se puede apreciar que en 4.7 mg/kg se presentó el mayor número de anomalías externas con 96.7%, seguido por tratamiento de 18.75 y de 9.3 mg/kg.

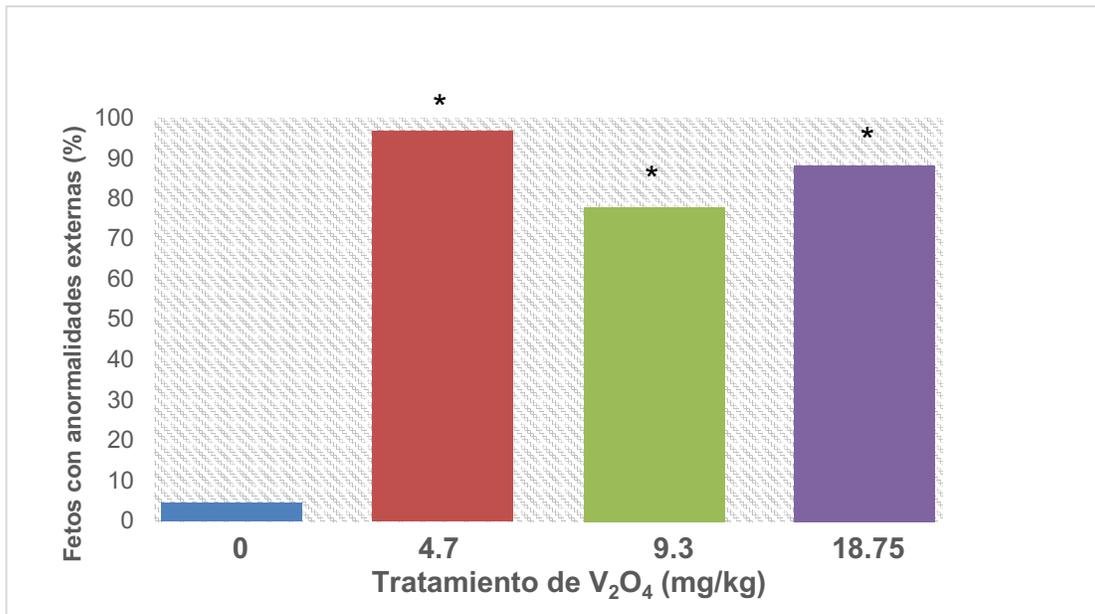


Figura 5. Fetos con al menos una anomalía externa (* $p < 0.05$ vs grupo sin tratamiento, con prueba de χ^2).

Por otra parte, al administrar $CdCl_2$ abarcando el período de organogénesis se obtuvieron 93 fetos observando anomalías como extremidades superiores e inferiores rotadas (14.1%) y hematomas (36.5%).

7.4. Anomalías esqueléticas

Los fetos se diafanizaron y tiñeron para poder evaluar los esqueletos, se utilizó rojo de alizarina para hueso y azul de alciano para cartílago, para facilitar la evaluación se dividió el sistema esquelético en huesos que se encuentran en el cráneo, huesos de tronco y huesos en extremidades superiores e inferiores. Se tomó como osificación incompleta

cuando a los huesos les faltó una porción y parcialmente osificados aquellos con apariencia porosa.

7.5. Cráneo

En el **Cuadro V** se muestran los huesos presentes en el cráneo, los cuales fueron evaluados desde la parte frontal hacia atrás, observando los huesos frontales, parietal, intraparietal, supraoccipital, exocipital y de las partes laterales de este se observan maxilar, mandíbula, hueso temporal, hueso hioides. Para la tinción con rojo de alizarina (solo hueso) se puede observar que en el grupo tratado con 4.7 mg/kg se evaluaron 28 fetos, en el de 9.3 mg/kg un total de 26 fetos y 4 fetos para 18.75 mg/kg, en los tres tratamientos se encontró osificación incompleta en los huesos supraoccipital y exocipital. El tratamiento con 9.3 mg/kg afectó los huesos frontales parietal e interparietal, mientras que el de 18.75 mg/kg causa osificación incompleta para todos los huesos evaluados en el cráneo.

El tratamiento con CdCl_2 se evaluaron 25 fetos en que se observó aumento en el número de huesos supraoccipital con osificación incompleta (**Cuadro V**).

En el **Cuadro VI**, se encuentran los datos obtenidos de la revisión de hueso y cartílago teñidos con rojo de alizarina y azul de alciano. En este cuadro se observa que en todos los tratamientos con V_2O_4 se incrementó significativamente ($p < 0.05$) el porcentaje de fetos que presentaron osificación incompleta en los huesos supraoccipital y exocipital. En particular los fetos del tratamiento de 9.3 mg/kg indujo osificación incompleta (OI) en el hueso interparietal, mientras que para 18.75 mg/kg se observó OI para los huesos del cráneo.

Con respecto al tratamiento de CdCl_2 se encontró OI en parietal, interparietal, supraoccipital, exoccipital y maxilar.

Cuadro V. Datos obtenidos de la revisión de huesos del cráneo de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamientos en mg/kg				
		V ₂ O ₄				CdCl ₂
		0	4.7	9.3	18.75	1
		(testigo)				
Fetos examinados		28	28	26	4	25
Tipos de variación en el cráneo:						
(%)						
• Nasal	Ol	0	0	2 (6.4)	4 ** (100)	0
• Frontal	Ol	0	0	4 ** (12.9)	4 ** (100)	0
• Parietal	Ol	0	0	3 (9.6)	4 ** (100)	0
• InterParietal	Ol	0	0	5 ** (16.1)	4 ** (100)	2(8)
• Supraoxipital	Ol	0	18 ** (64.2)	14 ** (45.1)	4 ** (100)	9 ** (36)
	Au	0	1 (3.5)	3 (9.6)	0	0
• Exoccipital	Ol	0	18 ** (64.2)	5 ** (16.1)	4 ** (100)	2 (8)
	Rud	0	0	1 (3.5)	0	0
	Au	0	1 (3.5)	0	0	0
• Maxilar	Ol	0	0	0	4 ** (100)	2 (8)
• Mandíbula	Ol	0	0	0	4 ** (100)	1 (4)
• Hueso temporal	Ol	0	0	0	4 ** (100)	0
• Anillo timpánico	Ol	0	0	0	4 ** (100)	0
• Hueso iodes	Ol	0	0	0	4 ** (100)	0
Fetos con una o más anomalías en cráneo		0	17 ** (60.7)	16 ** (61.5)	4 ** (100)	11 ** (44)

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (j_i^2).

Osificación incompleta (Ol), ausente (Au) o rudimentaria (Rud).

Cuadro VI. Datos obtenidos de la revisión de huesos y cartílago del cráneo fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

	Tratamientos en mg/kg					
	V ₂ O ₄				CdCl ₂	
	0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1	
Fetos examinados	33	32	31	5	24	
Tipos de variación en cráneo: (%)						
• Nasal	OI	0	0	0	5 ** (100)	0
• Frontal	OI	0	0	0	5 ** (100)	0
• Parietal	OI	0	0	1 (3.22)	5 ** (100)	4 ** (16.6)
• Interparietal	OI	0	0	19 ** (61.29)	5 ** (100)	3 ** (12.5)
• Supraoxipital	OI	0	19 ** (59.37)	25 ** (80.6)	5 ** (100)	5 ** (20.83)
• Exocipital	OI	0	5 ** (15.62)	7 ** (22.58)	5 ** (100)	3 ** (12.5)
• Maxilar	OI	0	0	0	5 ** (100)	3 ** (12.5)
• Mandíbula	OI	0	0	0	5 ** (100)	0
• Hueso temporal	OI	0	0	0	5 ** (100)	0
• Anillo timpánico	OI	0	0	0	0	0
• Hueso oídos	OI	0	0	0	0	0
Fetos con una o más anormalidades en cráneo		0	19 ** (59.37)	25 ** (80.64)	5 ** (100)	15 ** (62.5)

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (χ^2).

Osificación incompleta (OI).

En la **Figura 7**, se muestran que el porcentaje de fetos con anormalidades esqueléticas en el cráneo se incrementó conforme se incrementa la dosis de V₂O₄.

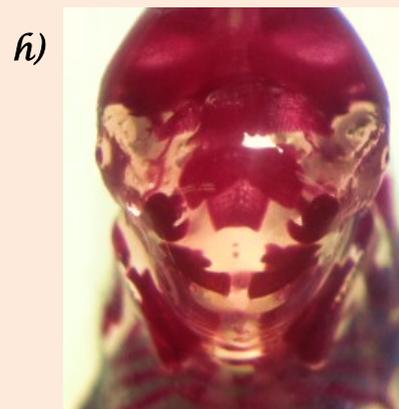
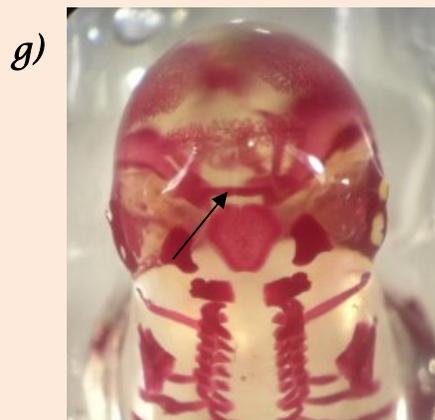
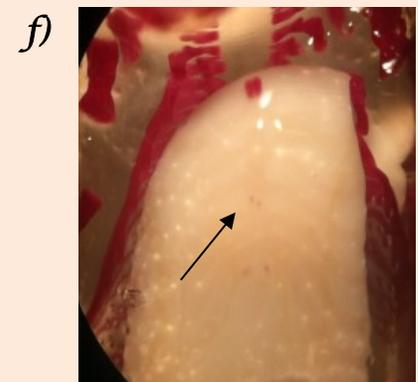
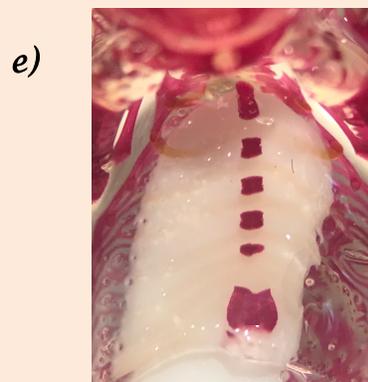
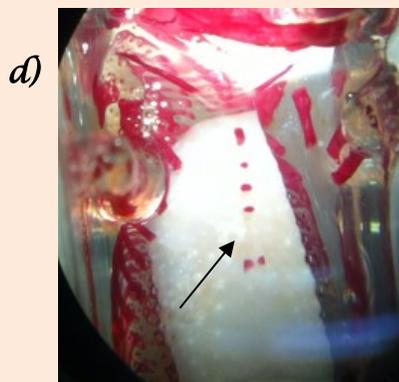
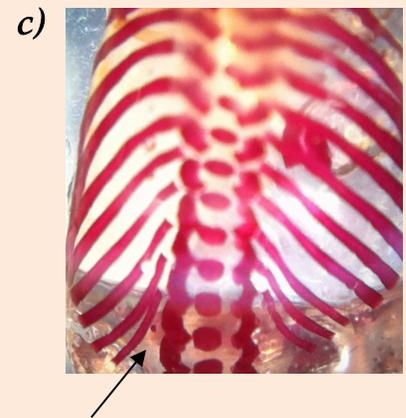
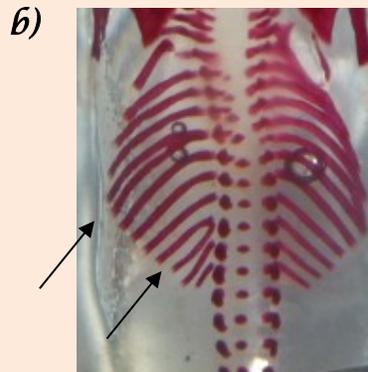
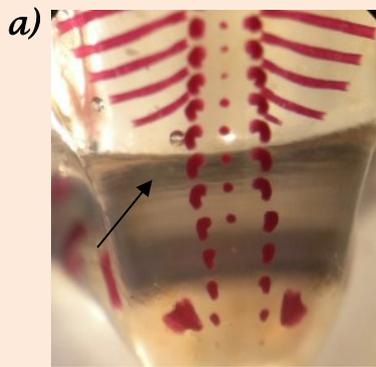


Figura 6. Anormalidades esqueléticas de hueso en fetos de hembras tratadas con distintos tratamientos de V_2O_4 los días 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación. En a) vertebras torácicas con osificación incompleta, b) costillas fusionadas, c) costillas extra y d) esternaebras con osificación incompleta de los fetos de hembras tratadas con 9.3 mg/kg. En e) testigo sin anomalías en esternaebras. En f) esternaebras ausentes, g) huesos de cráneo con osificación incompleta del grupo de 18.75 mg/kg. En h) se muestra testigo con osificación normal del cráneo.

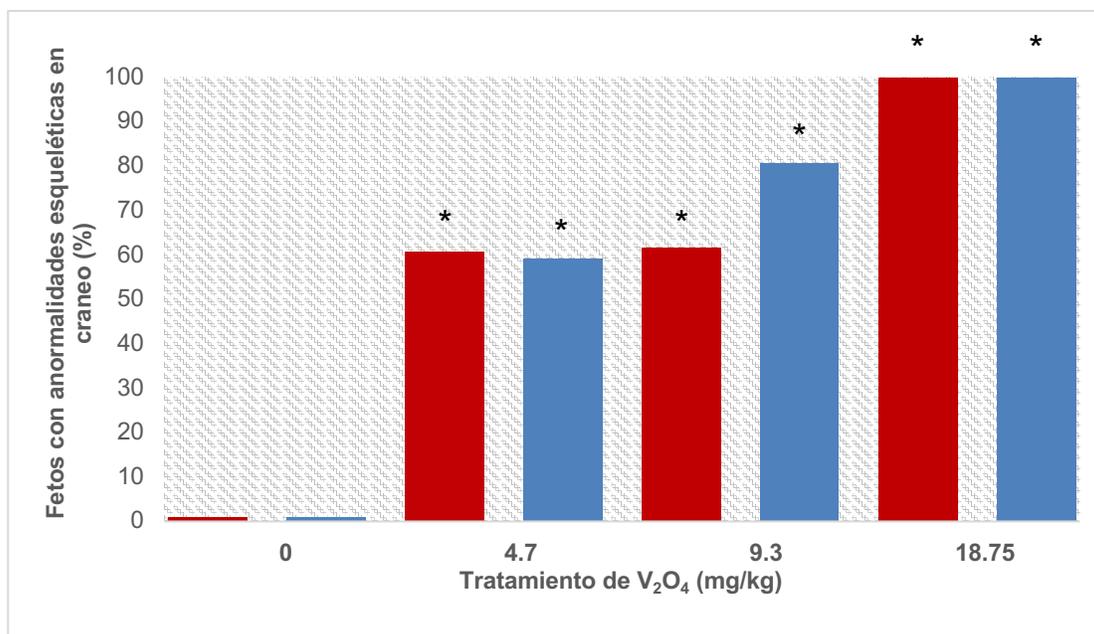


Figura 7. Fetos con al menos una anomalía en cráneo. En rojo tinción con rojo de alizarina (evaluaciones de hueso) y en azul la doble tinción con azul de alciano y rojo de alizarina (evaluaciones de hueso-cartílago) (* $p < 0.05$ vs grupo sin tratamiento, con prueba de ji^2).

7.6. Esqueleto axial

Para el esqueleto axial se evaluaron las vértebras cervicales, torácicas, lumbares, sacras, coccígeas, costillas y esterneras de acuerdo con Fadel *et al.*, (2012) y Bolon (2015). En **Cuadro VII** se aprecia que el V₂O₄ induce osificación incompleta en las vértebras sacras, coccígeas y esterneras (en al menos un centro de osificación), sobre todo en las esterneras 5 y 6 en las que se encontró de forma rudimentaria o ausente, tal como se muestra en la **Figura 6d y 6f**.

En los tratamientos de 4.7 y 9.3 mg/kg encontró un incremento en el porcentaje de fetos con costillas extras y solamente un feto presento costillas fusionadas (no estadísticamente diferente), por otra parte, en el tratamiento de 18.75 mg/kg se observó osificación incompleta en todos los huesos evaluados. En el tratamiento con CdCl₂, los fetos presentaron osificación incompleta en las esterneras.

Cuadro VII. Datos obtenidos de la revisión de huesos del esqueleto axial de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamientos en mg/kg					
		V ₂ O ₄				CdCl ₂	
		0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1	
Fetos examinados		28	28	26	4	25	
Tipos de variación en esqueleto axial: (%)							
•	Vértebras cervicales y atlas	Ol	0	1 (3.5)	0	2 ** (50)	0
•	Vertebras torácicas	Ol	0	1 (3.5)	2 (7.6)	4 ** (100)	0
•	Costillas	Ex	2 (7.1)	6 ** (21.4)	15 ** (57.6)	1 (25)	5 (20)
		Fu	0	0	1 (3.8)	0	0
•	Vértebras lumbares	Ol	0	1 (3.5)	3 (11.5)	4 ** (100)	0
•	Vertebras sacras y vertebras coccígea	Ol	0	14 ** (50)	9 ** (34.61)	4 ** (100)	1 (4)
•	Esternebras	Ol	0	14 ** (50)	24 ** (92.3)	4 ** (100)	15 ** (60)
Fetos con una o más anomalía en esqueleto axial			2 (7.1)	23 ** (82.1)	26 ** (100)	4 ** (100)	18 ** (72)

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (ji^2).

Osificación incompleta (Ol), Extra (Ex), Fusionada (Fu).

En el **Cuadro VIII** se presentan los datos de hueso y cartílago en el esqueleto axial, donde se puede observar que en los tres tratamientos se incrementó el porcentaje de fetos que presentan costillas extras, osificación incompleta en vertebras sacras, coccígeas y esternebras principalmente en la 5 y 6.

Para el tratamiento de 9.3 mg/kg se encontró un incremento en el porcentaje de fetos con vertebras torácicas con osificación incompleta y 4 fetos con costillas fusionadas (esto

último no fue significativo). Con respecto al grupo de 18.75 mg/kg todos los huesos examinados en esta sección presentaron osificación incompleta.

Para el grupo tratado con CdCl₂ los procesos de osificación se vieron afectados en los huesos de las costillas y esternebras extras (siete esternebras).

Cuadro VIII. Datos obtenidos de la revisión de huesos y cartílago del esqueleto axial de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamientos en mg/kg					
		V ₂ O ₄				CdCl ₂	
		0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1	
Fetos examinados		33	32	31	5	24	
Tipos de variación en el esqueleto axial: (%)							
•	Vértebras cervicales y atlas	Ol	0	0	0	5 ** (100)	0
•	Vertebras torácicas	Ol	0	0	6 ** (19.3)	3 ** (60)	0
•	Costillas	Ex	0	11 ** (34.3)	14 * (45.1)	2 ** (20)	5 ** (20.8)
		Fu	0	0	4 (12.9)	0	0
•	Vértebras lumbares	Ol	0	0	1 (3.1)	4 ** (80)	0
•	Vertebras sacras y vertebras coccígeas	Ol	0	16 ** (50)	19 ** (61.2)	5 ** (100)	0
•	Esternebras	Ol	0	24 ** (75)	26 ** (83.8)	5 ** (100)	13 ** (54.1)
Fetos con una o más anomalía en esqueleto axial		0	29 ** (90.6)	28 ** (90.3)	5 ** (100)	15 ** (62.5)	

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (χ^2).

Osificación incompleta (Ol), extra (Ex) o fusionada (Fu).

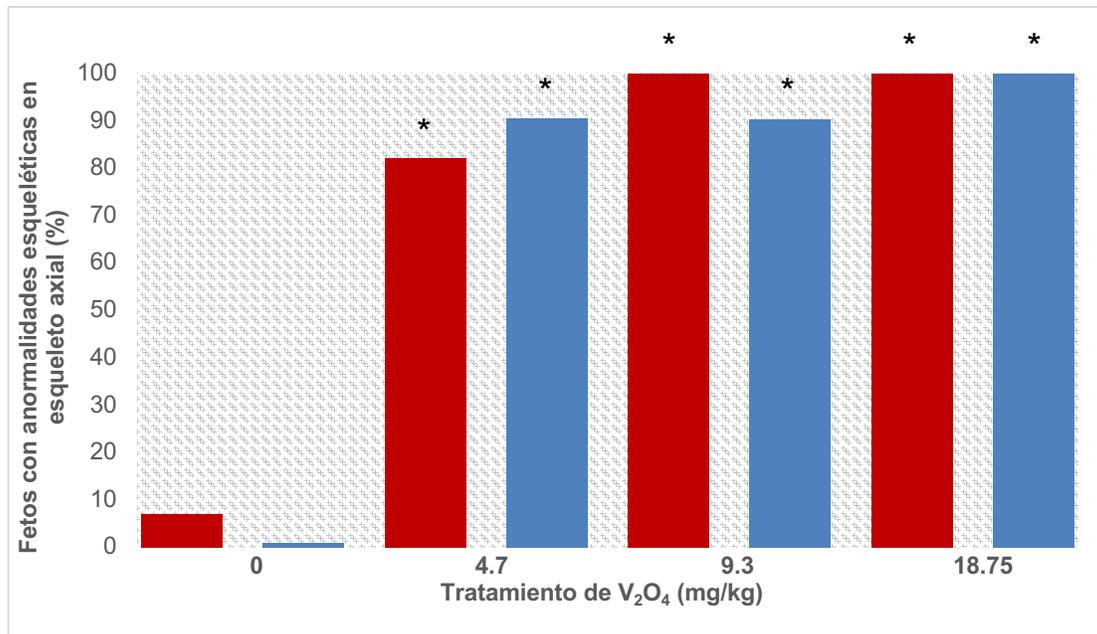


Figura 8. Fetos con al menos una anomalía en esqueleto axial. En rojo tinción con rojo de alizarina (evaluaciones de hueso) y en azul la doble tinción con azul de alciano y rojo de alizarina (evaluaciones de hueso-cartílago) (* $p < 0.05$ vs grupo sin tratamiento, con prueba de ji^2).

7.7. Esqueleto distal

7.7.1. Huesos de las extremidades superiores

En cuanto a los huesos que se encuentran en las extremidades superiores se revisaron clavícula, escapula, humero, cubito, radio, metacarpos y falanges. Los datos se presentan en porcentaje excepto para metacarpos y falanges como el número de huesos (**Cuadro IX**).

Para la tinción con rojo de alizarina (solo hueso), en la dosis de 18.75 mg/kg se incrementó el porcentaje de fetos con osificación incompleta en escapula, humero, cubito, y radio todos con diferencias significativa (**Cuadro IX**) y una disminución en el total de las falanges distales, con respecto al grupo control en las tres dosis de V₂O₄.

Cuadro IX. Datos obtenidos de la revisión de huesos de extremidades superiores de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamiento en mg/kg				CdCl ₂	
		V ₂ O ₄					
		0	4.7	9.3	18.75	1	
		(testigo)					
Fetos examinados		28	28	26	4	25	
Tipos de variación en extremidades superiores:							
(%)							
•	Clavícula	OI	0	0	0	0	
•	Escápula	OI	0	0	0	2 **	
					(50)	0	
•	Húmero	OI	0	0	0	2 **	
					(50)	0	
•	Cubito	OI	0	0	0	2 **	
					(50)	0	
•	Radio	OI	0	0	0	2 **	
					(50)	0	
•	Metacarpos	No. de Huesos	99/112	109/112	89/104	4/16 **	99/100
•	Falanges proximales	No. de Huesos	68/112	67/112	45/104	0/16 **	46/100
•	Falanges distales	No. de Huesos	124/140	26/140 **	70/104 **	0/20 **	120/125
Fetos con una o más anomalía en extremidades superiores			0	0	0	2 **	0
						(50)	

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (χ^2).
Osificación incompleta (OI).

Para la tinción con azul de alciano y rojo de alizarina de las extremidades superiores (**Cuadro X**), en dosis de 18.75 mg/kg se aumentó el porcentaje de fetos con osificación incompleta en escapula, humero, cubito y radio con respecto al grupo control, además de la disminución de falanges distales en las tres dosis.

El comportamiento es el mismo en los fetos teñidos solo con rojo y en los de azul y rojo, ya que la dosis más alta de 18.75 mg/kg produjo osificación incompleta en los huesos escapula, humero, cubito y radio y de algunas falanges.

Cuadro X. Datos obtenidos de la revisión de huesos y cartílago de extremidades superiores de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamiento en mg/kg					
		V ₂ O ₄				CdCl ₂	
		0	4.7	9.3	18.75	1	
		(testigo)					
Fetos examinados		33	32	31	5	24	
Tipos de variación en extremidades superiores (%)							
•	Clavícula	OI	0	0	0	0	
•	Escápula	OI	0	0	4 ** (80)	0	
•	Húmero	OI	0	0	5 ** (100)	0	
•	Cubito	OI	0	0	5 ** (100)	0	
•	Radio	OI	0	0	5 ** (100)	0	
•	Metacarpos	No. de huesos	124/132	12/128	109/124	2/20 **	95/96
•	Falanges distales	No. de Huesos	159/165	67/160 **	55/155 **	0/25 **	115/120
Fetos con una o más anomalía en extremidades superiores		0	0	0	5 ** (100)	0	

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (χ^2).
Osificación incompleta (OI).

En la **Figura 9**, se muestra el porcentaje de fetos con anomalías en extremidades superiores (hueso y cartílago), para las tres dosis de V₂O₄, donde se observa que la dosis 18.75 mg/kg causó el mayor porcentaje de anomalías.

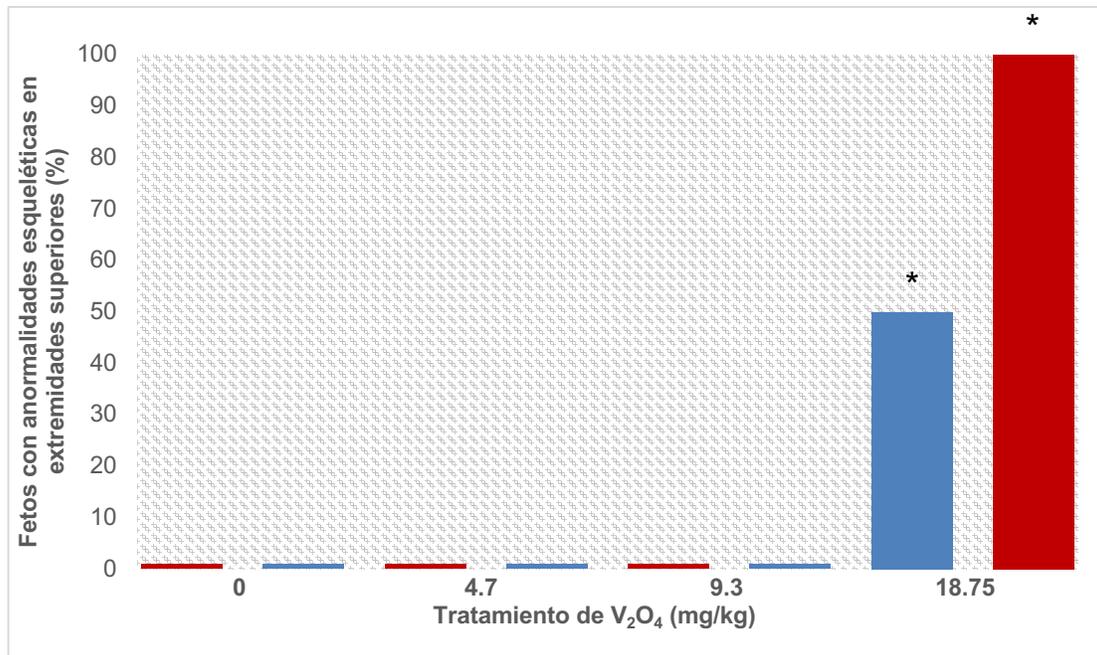


Figura 9. Fetos con al menos una anomalía en extremidades superiores. En rojo tinción con rojo de alizarina (evaluaciones de hueso) y en azul la doble tinción con azul de alciano y rojo de alizarina (evaluaciones de hueso-cartílago) (* $p < 0.05$ vs grupo sin tratamiento, con prueba de ji^2).

7.7.2. Huesos de las extremidades inferiores

En cuanto a los huesos que se encuentran en las extremidades inferiores, se revisaron el ilion, isquion, pubis, fémur, tibia, fíbula (peroné), metatarsos o metacarpianos y falanges. También en esta sección se sumaron el número de huesos encontrados en las falanges por feto para tener un total para compararlo con el grupo testigo negativo (**Cuadro XI**).

Para la dosis de 18.75 mg/kg se encontró la presencia de osificación incompleta en ilion, isquion y pubis, así como la disminución de centros de osificación de metacarpianos y falanges proximales además de la ausencia de falanges distales con respecto al grupo testigo negativo.

Cuadro XI. Datos obtenidos de la revisión de huesos de extremidades inferiores de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamiento en mg/kg				
		V ₂ O ₄				CdCl ₂
		0 (testigo)	4.7	9.3	18.75	1
Fetos examinados		28	28	26	4	25
Tipos de variación en extremidades inferiores (%)						
• Ilion	OI	0	2 (7.1)	0	4 ** (100)	0
• Isquion	OI	0	2 (7.1)	0	4 ** (100)	0
• Pubis	OI	0	2 (7.1)	0	4 ** (100)	0
• Fémur	OI	0	0	0	0	0
• Tibia	OI	0	0	0	0	0
• Peroné	OI	0	0	0	0	0
• Metacarpianos o metatarsos	No. de huesos	109/140	110/140	108/130	1/20 **	92/125
• Falanges proximales	No. de huesos	33/112	30/140	34/104	0/16 **	29/100
• Falanges distales	No. de huesos	122/140	110/140	70/130 **	0/20 **	115/125
Fetos con una o más anomalía en extremidades inferiores		0	4 (14.2)	0	4 ** (100)	0

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (j^2).

Osificación incompleta (OI).

En el **Cuadro XII** se observan los huesos y cartílago evaluados en las extremidades inferiores con tinción de azul de alciano y rojo de alizarina, para la dosis de 4.7 mg/kg de V₂O₄ se encontró aumento en el porcentaje de fetos con osificación incompleta en ilion, isquion y pubis, para 9.3 mg/kg Isquion y pubis y en la dosis más alta presentaron osificación incompleta todos los huesos, así como la ausencia de metatarsos y falanges distales con respecto al grupo control.

Cuadro XII. Datos obtenidos de la revisión de huesos y cartílago de extremidades inferiores de los fetos obtenidos de hembras preñadas tratadas vía ip con V₂O₄ en el día 6, 8, 10, 12, 14 y 16 de gestación.

		Tratamiento en mg/kg				
		V ₂ O ₄				CdCl ₂
		0	4.7	9.3	18.75	1
		(testigo)				
Fetos examinados		33	32	31	5	24
Tipos de variación en extremidades inferiores:						
(%)						
• Ilion	OI	0	11 ** (34.3)	0	5 ** (100)	5 ** (20.8)
• Isquión	OI	0	13 ** (40.6)	6 ** (19.3)	5 ** (100)	5 ** (20.8)
• Pubis	OI	0	9 ** (28.1)	6 ** (19.3)	5 ** (100)	1 (4.1)
• Fémur	OI	0	0	0	5 ** (100)	0
• Tibia	OI	0	0	0	5 ** (100)	1 (4.1)
• Peroné o fíbula	OI	0	0	0	5 ** (100)	1 (4.1)
• Metacarpianos o metatarsos	No. de huesos	133/165	130/160	124/155	0/25 **	100/120
• Falanges proximales	No. de huesos	10/132	16/128	24/124 **	0/20	16/96
• Falanges distales	No. de huesos	165/165	35/160 **	20/155 **	0/25 *	110/120
Fetos con una o más anomalía en extremidades inferiores		0	16 ** (50)	7 ** (22.5)	5 ** (100)	5 ** (20.8)

** $p < 0.05$ vs. grupo testigo (χ^2).
Osificación incompleta (OI).

Al comparar las evaluaciones de las extremidades inferiores para la tinción de hueso se observó retardo de la osificación en todos los huesos de las extremidades y para hueso-cartílago se encontraron daños para las tres dosis en isquion, pubis y falanges distales, además para las dosis de 4.7 mg/kg se halló daño en ilion para la dosis de 9.3 mg/kg falanges distales.

En la **Figura 10** se muestra el porcentaje de fetos con anomalías en los huesos y cartílago de las extremidades inferiores, para las tres dosis de V_2O_4 , donde se puede observar que el 100% de fetos presentaron alguna anomalía en la dosis de 18.75 mg/kg.

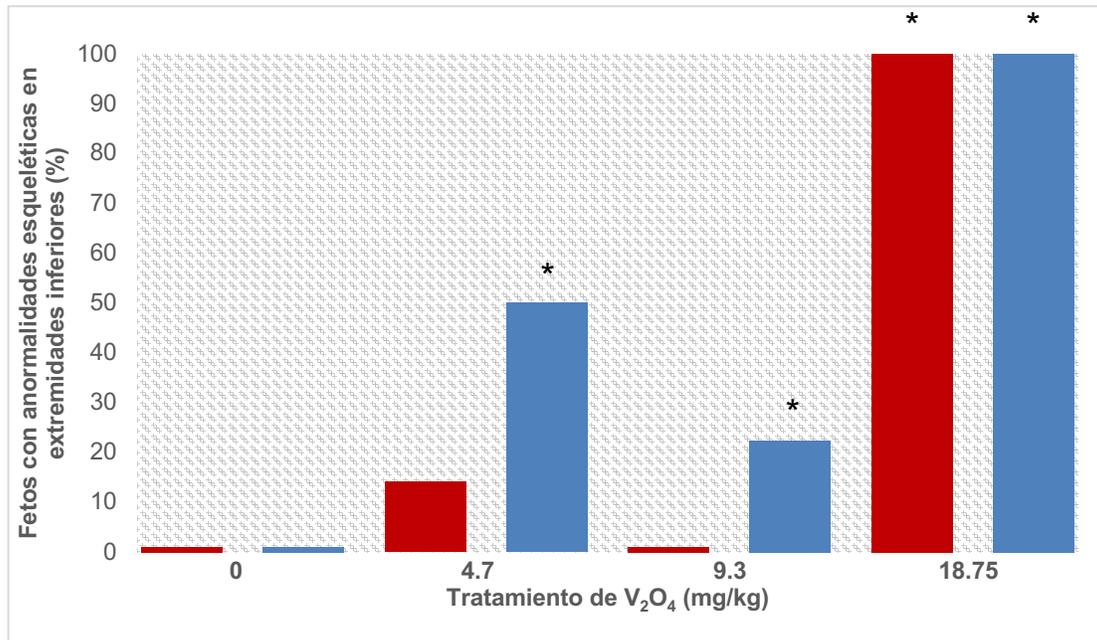


Figura 10. Fetos con al menos una anomalía en extremidades inferiores. En rojo tinción con rojo de alizarina (hueso) y en azul la doble tinción con azul de alciano y rojo de alizarina (hueso-cartilago) (* $p < 0.05$ vs grupo sin tratamiento, con prueba de χ^2).

8. Discusión

El uso de combustibles fósiles ha provocado en el ambiente el incremento de varios metales pesados, hidrocarburos orgánicos y pesticidas, por mencionar algunos (Imtiaz, *et al.*, 2015). La exposición a estas sustancias especialmente en el periodo de crecimiento y desarrollo embrionario es de gran interés por las repercusiones que puede tener en la salud, ya que es una etapa muy sensible debido al alto grado de división y diferenciación celular fetal (Al-saleh, *et al.*, 2011).

Ya que el vanadio pertenece al grupo de los metales pesados y hay pocos estudios de los efectos de este con los compuestos de estado oxidación 4+ es importante conocer los efectos del óxido de vanadio IV (V_2O_4), sobre el desarrollo embrionario y fetal de ratones de la cepa CD-1, expuestos durante la organogénesis, así como toxicidad materna de las hembras tratadas.

8.1. Toxicidad materna

La toxicidad materna es definida como cualquier alteración en la homeostasis de la madre, esta puede reconocerse por presentar reducción del peso ganado de la hembra durante la gestación, mostrar signos clínicos adversos como cambios en la respiración, estado de alerta, postura, actividad motora espontánea, color de las membranas mucosas, comportamiento (agresivo, aletargado), apariencia del pelo, color de la orina, número y consistencia de las heces fecales. Otros signos son secreción nasal, diarrea, salivación, sangrado vaginal, tumores, convulsiones, estado de coma y muerte (Mackenzie y Hoar, 2001; SGA, 2006; Danielsson, 2013; Bolon, 2015).

En este trabajo los tratamientos con V_2O_4 mostraron signos de toxicidad materna, se registraron muertes de hembras, se observó la presencia de sangrado vaginal, contracciones abdominales, agitación o letargo y disminución significativa del peso principalmente en la dosis de 18.75 mg/kg. Resultados similares han sido observados por compuestos de vanadio en estado de oxidación 4+ ($VOSO_4$, en dosis de 37.5, 75 o 150

mg/kg) y 5+ (Na_3VO_4 o NaVO_3 en dosis de 30 y 60 mg/kg o de 8 y 16 mg/kg) administrados vía oral o ip a ratones Swiss en los días 6 al 15 de preñez (Paternain, *et al.*, 1990; Sánchez, *et al.*, 1991; Gómez, *et al.*, 1992).

En otros modelos murinos el vanadio también provoca toxicidad materna, tal es el caso del ortovanadato de sodio (Na_3VO_4 , estado de oxidación 5+) administrado vía oral a ratas Sprague-Dawley normales y diabéticas durante todo el periodo de gestación, en dosis de 0.25 o 0.5 mg/kg donde se observó que los animales tratados presentaron falta de apetito, letargo, diarrea y decaimiento, además disminución de la capacidad de sostener la preñez en un 30% y 90% respecto a la dosis, efecto que se acentuó en el grupo de ratas diabéticas que fue de 84% y 100% respectivamente (Ganguli *et al.*; 1994).

Lo anterior son evidencias de que el vanadio y sus compuestos, incluyendo el V_2O_4 , administrados durante el periodo de organogénesis son capaces de provocar toxicidad materna ya que se conoce que los metales pueden afectar al organismo a nivel digestivo, cardiovascular, neurológico o hepatorrenal y la falla de alguno de estos sistemas o en conjunto, provocan el mal funcionamiento que puede culminar con la muerte (Ferrer, 2003).

Es interesante mencionar que los síntomas encontrados en sistemas experimentales como el ratón coinciden con los encontrados en humano. Tal es el caso de una mujer de 24 años que presentó síntomas como dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea por consumir metavanadato de amonio y donde los análisis mostraron niveles de 6.2 mg/L del metal en sangre, mayores a lo establecido (0.07-1.1 $\mu\text{g/L}$) (Boulassel, *et al.*, 2011).

8.2. Toxicidad embrionaria y fetal

La toxicidad embrionaria y fetal frecuentemente ocurre junto con la toxicidad materna, ya que factores que puedan interrumpir la homeostasis en la madre pueden afectar el desarrollo de la progenie o disminución del peso fetal (Bolon, 2015) y en este trabajo se observaron ambos efectos.

La toxicidad prenatal puede darse en la etapa embrionaria y en la fetal. En el ratón, la embriotoxicidad producida por los agentes tóxicos abarca en tiempo desde la fecundación hasta la formación de tejidos y órganos, en tanto que la fetotoxicidad se produce al término de la organogénesis y hasta el momento de su nacimiento (aproximadamente a los 19 días de gestación) (Derelanko y Hollinger, 2002; Bolon, 2015). Los indicadores de éste efecto son el número de implantes, reabsorciones tempranas (toxicidad embrionaria), tardías (toxicidad fetal), fetos vivos, muertos (toxicidad fetal) el peso y longitud de la camada (OECD, 2016).

En este trabajo los tratamientos con V_2O_4 provocaron toxicidad embrionaria y fetal. Para el tratamiento de 9.3 mg/kg se incrementó el número de fetos muertos, mientras que 18.75 mg/kg fue la más tóxica, registrando disminución del número de fetos vivos por camada, disminución de peso y talla de los fetos, así como aumento de la presencia de reabsorciones tempranas. Estos mismos efectos se han observado al utilizar diferentes compuestos de vanadio en el modelo murino de ratón Swiss (con $VOSO_4$ y $NaVO_3$) o rata Sprague-Dawley ($NaVO_3$ y NH_4VO_3), cuando se administraron vía oral o ip (Domingo, 1986; Paternain, *et al.*, 1990; Gómez, *et al.*, 1992; Morgan y El-Tawil, 2003).

Los posibles mecanismos de inducción de la toxicidad sobre el embrión o el feto involucran la toxicidad materna, ya que al alterar la homeostasis de la madre el producto también es afectado (Bolon, 2015) y el contacto del metal con el feto mediante los fluidos o sangre de la madre o por medio de la placenta, ya que se sabe que el vanadio posee afinidad por los tejidos fetales en desarrollo. Lo anterior debido a que los tejidos en desarrollo son blanco de varios agentes químicos esto a causa de la inmadurez de los sistemas de protección de los mismos tejidos y órganos, además se ha observado que metales, como el vanadio se acumulan en los embriones o fetos debido a que en esta etapa no tienen un sistema propio de excreción y dicha función se realiza mediante la placenta (Eddel y Sabbioni, 1988).

Una de las posibles explicaciones por la cual encontramos reabsorciones y fetos muertos, es la muerte celular, donde la necrosis es uno de los mecanismos sugeridos (Timbrell, 2009). A nivel celular se sabe que los compuestos de V, incluyendo el V_2O_4 , reducen la viabilidad celular e inhibe la proliferación celular en sistemas *in vitro* (Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2010), si esto sucede después de la implantación, cuando las hembras son tratadas, entonces esto conduciría suspender el desarrollo y consecuentemente a la muerte del producto.

8.3. Anormalidades

Los embriones de todos los mamíferos se encuentran vinculados al sistema materno, de tal forma que el embrión depende del entorno donde se desarrolla la madre. Naturalmente, la edad, el estado físico y nutricional materno pueden tener efecto significativo durante el crecimiento en el útero y cuando la integridad del sistema materno es modificada por la exposición a agentes físicos, químicos como los metales que pueden causar alteraciones en el desarrollo embrionario-fetal y producir malformaciones (Altamirano-Lozano, 2006).

Expertos internacionales acordaron durante una reunión de toxicología del desarrollo que las anomalías presentes en los descendientes pueden dividirse en dos categorías: variación, la cual es una característica que puede distinguir a un individuo de otro y malformación, la cual es un cambio estructural permanente que afecta adversamente la supervivencia o la salud de la especie bajo investigación que se presenta en el nacimiento y que persiste postnatalmente (Chahoud, *et al.*, 2015).

Por lo que es importante distinguir las variaciones, de las malformaciones. El análisis de las características externas del feto permite identificar los rasgos propios presentes en el día 17 de gestación en el grupo control (Bolon, 2015; Taylor, 1986), con la finalidad de distinguir malformaciones inducidas por agentes químicos que se sospechen que son teratógenos, tal como el V_2O_4 .

El presente trabajo la administración de V_2O_4 en tratamientos de 4.7, 9.3 y 18.75 mg/kg a hembras preñadas en el periodo de organogénesis, es capaz inducir hematomas y daños en la cabeza (protuberancia y orificio), sin mostrar efectos relacionados con la dosis. Las anomalías observadas con mayor frecuencia fueron extremidades inferiores rotadas en el tratamiento de 4.7 mg/kg, protuberancia en cabeza en 9.3 mg/kg y, ojos sin parpado y cuello corto en 18.75 mg/kg.

El vanadio y sus compuestos inducen diferentes tipos de anomalías externas. Por ejemplo, Paternain en 1990 al administrar vía oral a ratones hembras preñadas sulfato de vanadilo ($VOSO_4 \cdot 5H_2O$), en dosis de 37.5, 75 o 150 mg/kg en los días 6 a 15 de gestación, encontro hematomas en todas las dosis, y anoftalmia en la dosis baja, así como hidrocefalia, paladar hendido y micrognatia en las otras dosis. En ratones la administracion ip de pentóxido de vanadio (V_2O_5) en dosis única (8.5 mg/kg) del día 6 al 15 de gestación, indujo la formación de hematomas y extremidades cortas (Altamirano-Lozano *et al.*, 1993).

Por otro lado, Carlton (1982) también encontró ojo sin parpado al administrar 0.47, 1.88, 3.75 mg/kg de metavanadato de amonio (NH_4VO_3) vía ip en los días 6 al 10 de gestación a hámster Syrian Golden. Además, encontraron fetos con micrognatia, meningocele y craneorraquisquis; no obstante, los autores concluyen que el número de fetos con anomalías es pequeño para considerar al metavanadato de amonio como teratógeno. Además, Gómez *et al* (1992), encontraron incidencia de paladar hendido cuando administraron 8 mg/kg de metavanadato de sodio ($NaVO_3$) por la misma ruta a ratones hembras preñadas en el día 6 al 15 de gestación.

Lo anterior muestra que el vanadio puede causar anomalías o malformaciones dependiendo de la estructura química del compuesto, número de oxidación, periodo de aplicación, tiempo de exposición y la dosis empleada.

Autores asocian que el vanadio es un potente inhibidor de ADN y de la síntesis de proteínas y que esto puede afectar severamente los procesos metabólicos, es probable

que estos efectos puedan ser los responsables de que el vanadio induzca el acortamiento de las extremidades (Altamirano-Lozano *et al.*, 1993).

En este trabajo al revisar los fetos se encontró que presentaban en la cabeza un hundimiento parecido a un “orificio” en la parte superior de la cabeza y que en algunos casos se continuaba con la espalda sin llegar a ser espina bífida, esta anomalía puede deberse a que existe un retardo en la formación de hueso, hecho que fue confirmado cuando se realizó la tinción de los huesos, al presentarse osificación incompleta o retardo en la osificación como se muestra en la **Figura 6e**.

En relación con los antecedentes y lo encontrado en este trabajo, se puede asumir que el V_2O_4 , al igual que otros compuestos de V, es capaz de producir alteraciones sobre la descendencia. Sin embargo, se necesitan corroborar estos resultados con otros en los que se revise si la anomalía externa permanece o si la osificación incompleta se corrige después del nacimiento.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, se debe tomar en cuenta que en este trabajo las hembras se sacrificaron el día 17 de preñez (debido a que en estudios preliminares las hembras tratadas tenían partos adelantados), por lo tanto los fetos analizados corresponden al día 17 de gestación, cuando todavía el sistema óseo no ha terminado su desarrollo, por lo que se propone que se realicen estudios posteriores en el que los descendientes lleguen al día 19 para un mayor desarrollo y comprobar si este orificio persiste. Con los datos obtenidos podemos decir que el V_2O_4 produce anomalías externas en la cabeza, las cuales están relacionadas con retardo o falta de osificación.

La importancia de evaluar el esqueleto es por sus funciones mecánicas, que ayuda a la configuración corporal, a los rasgos faciales, a que ofrece protección a órganos vitales. Además, a que el cartílago tiene funciones de soporte para otros tejidos, permite la formación de cavidades de algunos conductos u órganos huecos (fosas nasales, laringe, tráquea y bronquios), reviste ciertas superficies óseas que se ponen en contacto con

otras, como las articulares e interviene como molde para que a partir de él se origine tejido óseo (Montalvo, 2010). De aquí que la tinción del esqueleto fetal es un método importante en los estudios de toxicología del desarrollo, la cual permite la observación rápida y detallada de los huesos. La tinción con rojo de alizarina se ha usado comúnmente durante muchos años como una técnica simple y confiable; con el inconveniente de la inmadurez del esqueleto (que no está completamente osificado) puede permanecer sin teñir (cartílago) haciendo imposible su evaluación (Menegola, *et al.*, 2001; Chahoud, *et al.*, 2015).

En conjunto, la técnica de azul de alciano y rojo de alizarina permiten identificar cartílago y hueso, respectivamente. La combinación de ambas tinciones también permiten evaluar al mismo tiempo anomalías morfológicas del esqueleto en organismos de edad temprana o prenatal (Cortés-Delgado, *et al.*, 2009).

En este trabajo en el tratamiento de 18.75 mg/kg se encontró menor peso y tamaño (**Cuadro III**) y también falta de osificación en extremidades (**Cuadro X** y **Cuadro XI**), esto concuerda con lo que dice Chahoud *et al.*, (2015) "Los fetos con bajo peso y menor tamaño frecuentemente también presentan una osificación tardía de los huesos de desarrollo tardío estructuras distales de las extremidades, columna vertebral, caja torácica y esternón". Aunque las dosis más bajas en éste trabajo no produjeron reducción en el peso y el tamaño si encontramos osificación tardía.

Se ha reportado que la aplicación de compuestos de vanadio que tienen estado de oxidación 5+, como el V_2O_5 administrado a ratones hembras vía ip con dosis de 0.9 (sin especificar unidades) y 8.5 mg/kg, produce retraso de la osificación en el esqueleto, daño en la columna vertebral y osificación incompleta en las extremidades superiores e inferiores (Wide, 1984; Altamirano-Lozano, *et al.*, 1993). Sánchez *et al* (1991) utilizando el mismo modelo biológico y Na_3VO_4 , encontraron disminución en el número de vertebrae coccígeas y retraso en la osificación de falanges proximales, extremidades anteriores y posteriores.

Asimismo, al administrar NH_4VO_3 vía ip u oral a hámster Syrian Golden y a ratas hembra Sprague-Dawley respectivamente se observó aumento en la frecuencia de costillas supernumerarias o curvas, separación de los huesos parietales, reducción del número de esternebras, falta de osificación en las esternebras, hueso parietal y ausencia de carpos, metacarpos, tarsos, metatarsos, falanges y huesos caudales (Carlton, 1982; Morgan y El-Tawil, 2003).

Finalmente, con el estado de oxidación 4+ (VO_4) al ser administrado de forma oral a ratones hembra Swiss los días 6 al 15 de gestación con dosis de 37.5, 75 y 150 mg/kg, se reportó osificación incompleta (Paternain, 1990), lo que demuestra que sin importar el estado de oxidación los compuestos de vanadio tienen la capacidad de causar alteraciones durante los procesos de osificación.

Se puede observar que los compuestos con número de oxidación 5+ causan osificación tardía u osificación incompleta, lo mismo está pasando con los de número de oxidación 4+ como el V_2O_4 .

El efecto producido por la aplicación de vanadio con estado de oxidación 4+ en hueso podría ser comparado y explicado con estudios *in vitro*, donde se ha reportado que, dependiendo del tratamiento, del tipo celular y tiempo de exposición puede retrasar o favorecer la proliferación celular, el retraso de la proliferación podría estar vinculado con la osificación incompleta y el favorecimiento de la proliferación con la presencia de costillas extra (Zhang, *et al.*, 2004; Rodríguez-Mercado, *et al.*, 2010; Mateos-Nava, *et al.*, 2017).

También se sabe que el vanadio puede reducir la absorción de calcio causando cambios morfológicos como el raquitismo (falta de calcio y fosforo), caracterizado por la deformación de los huesos, osteomalacia (adelgazamiento de los huesos) y cambios biológicos como el secuestro de calcio en la dieta (Haschek, *et al.*, 2013).

Además, es importante mencionar que Rodríguez y colaboradores en 1988 encontraron que el vanadio alteró el contenido de glicosaminoglicanos de los descendientes tratados con metavanadato de amonio (Morgan y Tawil, 2003). Por lo que el contenido de glicosaminoglicanos podría tener una relación con la falta de osificación de huesos ya que, estos tienen un papel importante junto con otras proteínas que son esenciales en la formación de tejido conectivo, como los fibroblastos, condroblastos que darán origen a cartílago y osteoblastos, estos últimos encargados del desarrollo y crecimiento de los huesos (Carillo-Farga, *et al.*, 1997).

9. Conclusiones

- La administración ip de V_2O_4 en tratamientos de 4.7, 9.3, 18.75 mg/kg a ratones hembras preñadas, del día 6 al 16, induce toxicidad materna evidenciada por el letargo, contracciones abdominales, diarrea, sangrado vaginal, disminución del peso y muerte materna.
- Los tratamientos con 9.3 y 18.75 mg/kg de V_2O_4 durante la organogenesis causa toxicidad embrionaria y fetal.
- La administración de V_2O_4 en las dosis provadas provoca anomalías externas en cabeza, hematomas, extremidades inferiores rotadas, cuello corto y ojos sin parpado.
- La revisión del sistema esquelético mostro que los tratamientos de V_2O_4 induce retraso y falta de la osificación en huesos de cráneo, vertebrae sacras, coccígeas, esternones, falanges distales, isquion, pubis y costillas supernumerarias.
- El V_2O_4 en concentraciones de 4.7 9.3 y 18.75 mg/kg administrado durante la organogénesis induce efecto teratógeno.

10. Referencias

- Alessio L, Marinoni M, Dell'Orto A. (1988). Biological monitoring of vanadium. En: Biological monitoring of toxic metals (Clarkson WT, Friberg L, Nordberg F, Sanger R). *Plenum Press*, Nueva York. 427-436.
- Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, Mohamed GED, Rabah A. (2011). Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women. *Int J Hyg Environ Health*. 214:79-101.
- Altamirano-Lozano MA, Álvarez-Barrera L., Mateos-Nava R.A., Fortoul T.I. y Rodríguez-Mercado J.J. (2014). Potential for genotoxic and reprotoxic effects of vanadium compounds due to occupational and environmental exposures: An article based on a presentation at the 8yh International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15-18, 2012. *J. Immunotoxicol*. 11:19-27.
- Altamirano-Lozano M.A. (2006). Alteraciones reproductivas y del desarrollo inducidas por metales: el vanadio como ejemplo. En: Tópicos de Genética (Pimentel-Peñaloza A.E., Ortiz-Muñoz A.R. y Breña-Valle M.) *UAEM y SMG. México*. 393.
- Altamirano-Lozano M.A., Álvarez-Barrera L. y Roldán-Reyes E. (1993). Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice. *Med. Sci. Res*. 21:711-713.
- Altamirano M., Ayala M.E., Flores A., Morales L. y Dominguez R. (1991). Sex differences in the effects of vanadium pentoxide administration to pre-pubertal rats. *Med. Sci. Res*. 19:825-826.
- Ara C., Asmatullah., Andeleeb S., Tahir M., Khan R.A. y Khalli M.K.A. (2016). Cadmium induced teratogenic effects in developing *Mus musculus*. *Pakistan J. Zool*. 48:73-81.
- Aragón A.M. y Altamirano-Lozano M.A. (2001). Sperm and testicular modifications induced by sub-chronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reprod. Toxicol*. 15:145-151.
- Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I., Bizarro P. y Altamirano-Lozano M. (2005). Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod. Toxicol*. 20:127-134.

- Bell M.L., Belanger K., Ebisu K., Gent J.F., Lee H.J., Koutrakis P. y Leaderer B.P. (2010). Prenatal exposure to fine particulate matter and birth weight: variations by particulate constituents and sources. *Epidemiology*. 21:8814-891.
- Benavides F.J. y Guénet J.L. (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Universidad de Alcala de Henares y SECAL. 59-83.
- Bermejo E. (2010). Valoración de teratógenos y pautas a seguir ante el niño prenatalmente expuesto a un teratógeno. *Protoc. Diagn. Ter. Pediatr.* 1:107-115.
- Bolon B. (2015). Pathology of the Developing Mouse: A Systematic Approach. CRC Press. EUA New York. 446.
- Boulassel B., Sadeg N., Roussel O., Perrin M. y Belhadj-Tahar H. (2011). Fatal poisoning by vanadium. *Forensic. Sci. Int.* 206:79-81.
- Branch S. (2004). Teratogenesis. A text book of modern toxicology, Tercera edición. John Wiley Hoboken, New Jersey. 672.
- Byrne A.R. y Kosta L. (1978). Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci. Total. Environ.* 10:17-30.
- Carlton B.D., Beneke M.B. y Fisher G.L. (1982). Assesment of teratogenicity of ammonium vanadate using Syrian golden hamsters. *Environ Res.* 29:256-262.
- Carrillo-Farga J., Acosta A., Gómez M.A., Monterrubio E., Pérez R. (1997). El diagnóstico de enfermedades lisosomales hereditarias por morfología de células hemtopoyeticas. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 44:222-232.
- Callan A.C., Hinwood A.L., Ramalingam M., Boyce M., Heyworth J., McCafferty P. y Odland J. (2013). Maternal exposure to metals-concentrations and predictors of exposure. *Environ. Res.* 126:111-117.
- Chahoud I., Talsness C., Walter A. y Grote K. (2015). Postnatal investigation of prenatally induced effects on the vertebral column rats reduces the uncertainty of classifiacation of anomalies. *Reprod Toxicol.* 58:15-23.
- Chandra K.A., Ghosh R., Chatterjee A. y Sarkar M. (2007). Amelioration of vanadium-induced testicular toxicity and adrenocortical hyperactivity by Vitamin E acetate in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 306:189-200.
- Cortés-Delgado N., Pérez-Torres J. y Hoyos J.M. (2009). Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents. *Int. J. Morphol.* 27:1163-1167.

- Danielsson B.R. (2013). Maternal Toxicity. En: Barrow P. Teratogenicity Testing. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 947. *Humana Press*, Totowa, NJ. 587
- Derelanko M.J. y Hollinger M.A. (2002). Handbook of Toxicology. CRC Press. Boca Raton EUA. 1440.
- Domingo J.L. (1986). Effects of vanadium on reproduction, gestation, parturition and lactation in rats upon oral administration. *Life Sci.* 39:819-824.
- Domingo J.L. (1996). Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.* 10:175–182.
- Eddel J. y Sabbioni E. (1988). Vanadium transport across placenta and milk of rat to the fetus and newborn. *Biol. Trace. Elem. Res.* 22:265-275.
- EFSA. European Food Safety Authority. (2004). 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 J.* 33:1-22.
- Ehrlich V.A., Nersesyan A.K., Hoelzl C., Ferk F., Bichler J., Valic E., Schaffer A., Schulte-Hermann R., Fenech M., Wagner K.H. y Knasmüller S. (2008). Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple endpoint study. *Environ. Health. Perspect.* 116:1689-1693.
- Elinder C.G., Gerhardsson L. y Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. En: Biological monitoring of toxic metals (Clarkson W.T., Friberg L., Nordberg F. y Sanger R.). *Plenum. Press.* Nueva York. 71.
- EPA. Environmental Protection Agency. (2011). Toxicological review of vanadium Pentoxide (V₂O₅). Washington, D.C. 1-103.
- Espinosa-Zurutuza M., González-Villalva A., Albarrán-Alonso J.C., Colín-Barenque L., Bizarro-Neves P., Rojas-Lemus M., López-Valdéz N. y Fortoul T.I. (2017). Oxidative stress as a mechanism involved in kidney damage after subchronic exposure to vanadium inhalation and oral sweetened beverages in a mouse model. *Int J Toxicol.* 37:45-52.
- Evangelou A.M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42:249-265.

- Fadel R.A., Sequeira R.P., Abu-Hijleh M.F., Obeidat M. y Salem A.H.A. (2012). Effect of prenatal administration of therapeutic doses of topiramate on ossification of ribs and vertebrae in rat fetuses. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 53:321-327.
- Ferrer A. (2003). Intoxicación por metales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* 26:141-153.
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López I.E., Bizarro P., Mendoza M.L., Osorio L.S., Espejel-Maya G., Avila-Casado M. del C., Avila-Costa M.R., Colin- Barenque L., Villanueva D.N. y Olaiz-Fernandez G. (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health.* 57:446-449.
- Fortoul T.I., Rojas-Lemus M., Rodriguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Ustarroz-Cano M., Cano-Gutierrez G., Gonzalez-Rendon S.E., Montañó L.F. y Altamirano-Lozano M. (2013). Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: An article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15-18, 2012. *J. Immunotoxicol.* 11:13-8.
- Fort M., Cosín-Tomás M., Grimalt J.O., Casas M. y Sunyer J. (2014). Assessment of exposure to trace metals in a cohort of pregnant women from an urban center by urine analysis in the first and third trimesters. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21:9234-9241.
- French R.J. y Jones J.H. (1993). Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif. Sci.* 52:339-446.
- Ganguli S., Reuland D.J., Franklin L.A. y Tucker M. (1994). Effect of vanadate on reproductive efficiency in normal and streptozin-treated diabetic rats. *Metabolism.* 43:1344-1348.
- Gómez M., Sánchez D.J., Domingo J.L. y Corbella J. (1992). Embryotoxic and teratogenic effects of intraperitoneally-administered metavanadate in mice. *J. Toxicol. Environ. Health.* 37:47-56.
- Guénet J.L. y Bonhomme F. (2004). Origen of the Laboratory Mouse and Related Subspecies. *The laboratory Mouse.* Elsevier. 841.

- Hackett P.L. y Kelman B.J. (1983). Availability of toxic trace metals to the conceptus. *Sci. Total. Environ.* 28:433-442.
- Harlan Laboratories S. A. de C.V. (2012). cic.ugr.es/descargas/ListaPreciosHarlan2012.pdf. 25/12/18.
- Haschek W.M., Rousseaux C.G., Wallig M.A., Bolon B. y Ochoa R. (2013). Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, 3rd edition. Academic. Press. San Diego EUA. 3054.
- Heinemann G., Fichtl B. y Vogt W. (2003). Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. *J. Clin. Pharmacol.* 55:241-245.
- Imtiaz M., Rizwan M.S., Xiong S., Li H., Ashraf M., Shahzad S.M., Shahzad M., Rizwan M. y Tu S. (2015). Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. *Environ. Intern.* 80:79-88.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (1988). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. *World Health Organisation, Ginebra*, No. 81.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. World Health Organisation, Ginebra, No. 29.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2015). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. World Health Organisation, Ginebra, No. 29.
- Jiang P., Ni Z., Wang B., Ma B., Duan H., Li X., Ma X., Wei Q., Ji X., Lui Q., Xing S. y Li M. (2017). Acute toxicity, twenty-eight days repeated dose toxicity and genotoxicity of vanadyl trehalose in kunming mice. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 85:86-97.
- Kamboj V.P. y Kar A.B. (1964). Anti-testicular effect of metallic and rare earth salts. *J. Reprod. Fertil.* 7:21-28.
- Kucera J., Byrne A.R., Mravcová A. y Lener J. (1992). Vanadium levels in hair and blood of normal and exposed persons. *Sci. Total. Environ.* 15:191-205.
- Levina A. y Lay P.A. (2017). Stabilities and biological activities of vanadium drugs: what is the nature of the active species? *Chem. Asian. J.* 12:1692-1699.

- López-Rodríguez G., Galván M., González-Unzaga M., Hernández Ávila J. y Pérez-Labra M. (2017). Blood toxic metals and hemoglobin levels in Mexican children. *Environ. Monit. Evalua.* 4:189-179.
- Mackenzie K.M. y Hoar R.M. (2001). Developmental Toxicology. Handbook of Toxicology. En: Handbook of Toxicology. (Derelanko M.J. y Hollinger M.A.) CRC Press. Boca Raton EUA. 1440.
- Mateos-Nava R.A., Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A. (2017). Premature chromatid separation and altered proliferation of human leukocytes treated with vanadium (III) oxide. *Drug. Chem. Toxicol.* 40:457-462.
- Menegola E., Broccia M.L. y Giavini E. (2001). Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology.* 64:125-133.
- Montalvo E. (2010). Tejido Cartilaginoso. UNAM. Facultad de Medicina. México. 15
- Morgan A.M. y El-Tawil O.S. (2003). Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacol. Res.* 47:75-85.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A. y Chatterjee M. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.* 21:135-143.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development (2016). GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental *Toxicity Screening Test.* 422.
- Paternain J.L., Llobet J.M. y Corbella J. (1987). Embryotoxic effects of sodium metavanadate administered to rats during organogenesis. *Rev. Esp. Fisiol.* 43:223-328.
- Paternain J.L., Domingo J.M., Gómez M. y Corbella J. (1990). Developmental toxicity of vanadium in mice after oral administration. *J. Appl. Toxicol.* 10:181-186.
- Paz-Miño C., Creus A., Cabré O. y Leone P.E. (2002). Genética toxicológica y carcinogénesis. Universidad Católica de Ecuador. 297.
- Rehder D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg. Chem. Commun.* 6:604-617.
- Roberts G.K., Stout M.D., Sayers B., Fallacara D.M., Hejtmancik M.R., Waidyanatha S. y Hooth M.J. (2016). 14-day toxicity studies of tetravalent and pentavalent vanadium

- compounds in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice via drinking water exposure. *Toxicology. Reports.* 3:531-538.
- Rodríguez-Mercado J.J. y Altamirano-Lozano M.A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J., Álvarez-Barrera L. y Altamirano-Lozano M.A. (2010). Chromosomal damage induced by vanadium oxides in human peripheral lymphocytes. *Drug. Chem. Toxicol.* 33:97-102.
- Roshchin A.V., Ordzhonikidze E.K. y Shalganova I.V. (1980). Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 24:377-38.
- Sakurai H. (1994). Vanadium distribution in rats and ADN cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ. Health. Perspect.* 102:35-36.
- Salazar-Montes A.M., Sandoval-Rodríguez A.S. y Armendáriz-Borunda J.S. (2011). *Biología Molecular.* McGrawHil. México 322.
- Sánchez D.J., Ortega A., Domingo J.L. y Cobella J. (1991). Developmental toxicity evaluation of orthovanadate in the mouse. *Biol. Trace. Elem. Res.* 30:219-216.
- SGA, Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos. (2006). *United Nations.* United Nations Publications. 187
- Sharma R.P., Flora J.S., Drown D.B. y Oberg S.G. (1987). Persistence of vanadium compounds in lungs after intracheal instillation in rats. *Toxicol. Ind. Health* 3:321-329.
- Society of Toxicology. (2002). Guiding principles in the use of animals in toxicology. Adopted by the Society of Toxicology in July 1989. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1:178-182.
- Taylor P. (1986). *Practical Teratology.* Academic Press. Universidad de Michigan. 171.
- Tiboni G.M., Marotta F., Del Corso A. y Giampietro F. (2006). Defining critical periods for itraconazole-induced cleft palate, limb defects and axial skeletal malformations in the mouse. *Toxicol. Lett.* 167:8-18.
- Timbrell J.A. (2009). *Principles of Biochemical Toxicology.* Informa Healthcare. New York EUA. 464.

- Underwood E.J. (1977). Trace Elements in Human and Animal Nutrition. *Academic Press. New York.* 545.
- Vimalraj S., Sumantran V.N. y Chatterjee S. (2017). MicroRNAs: Impaired vasculogenesis in metal induced teratogenicity. *Reprod. Toxicol.* 70:30-48.
- Wide M. (1984). Effect of short-term exposure to five industrial metals on the embryonic and fetal development of the mouse. *Environ. Res.* 33:47-53.
- WHO, World Health Organization. (1988). Vanadium in: Environmental Health Criteria. 81. *Technical report series, Geneva.*
- WHO, World Health Organization. (2000). Air quality guidelines for Europe. Copenhagen, No. 91.
- Woodin M.A., Liu Y., Neuberg D., Hauser R., Smith T.J. y Christiani D.C. (2000). Acute respiratory symptoms in workers exposed to vanadium-rich fuel-oil ash. *Am. J. Ind. Med.* 37:353-363.
- Zhang Z., Gao N., He H., Huang C., Luo J. y Shi X. (2004) Vanadate active Akt and promoted S phase entry. *Mol. Cell. Biochem.* 255:2227-2237.
- Zheng G., Zhong H., Zhong., Guo Z., Wu Z., Zhang H., Wang C., Zhou Y. y Zuo Z. (2014). Levels of heavy metals and trace elements in umbilical cord blood and the risk of adverse pregnancy outcomes: a population-based study. *Biol. Trace. Elem. Res.* 160:437-444.

11. Anexo

Éste trabajo fue presentado parcialmente en:

Evento: Congreso Nacional de Genética

Título de ponencia: “Efectos causados por la administración de tetraóxido de vanadio a ratones hembra preñadas de la cepa CD-1”

Autores: Ocampo-Aguilera N.A., Rodríguez-Mercado J.J., Mateos-Nava R.A., Altamirano-Lozano M.A. y Álvarez-Barrera L.

uac Universidad Autónoma de Campeche

SMG SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA A.C.

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2017

“90 años del descubrimiento de la acción mutagénica de los rayos X”

LA SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA A.C. Y LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CAMPECHE

otorgan la presente **CONSTANCIA** a:

Ocampo-Aguilera N A, Rodríguez-Mercado J J, Mateos-Nava R A, Altamirano-Lozano M A, y Álvarez-Barrera L

Por la presentación de su trabajo titulado:

“EFECTOS CAUSADOS POR LA ADMINISTRACIÓN DE TETRAÓXIDO DE VANADIO A RATONES HEMBRA PREÑADAS DE LA CEPA CD-1”

Dentro del Congreso Nacional 2017 de la Sociedad Mexicana de Genética, efectuado del 2 al 5 de octubre del 2017 en San Francisco, Campeche, Campeche

Agradeciendo su valiosa participación en el evento

Atentamente

Lic. Gerardo Montero Pérez
RECTOR
Universidad Autónoma de Campeche

María G. Maldonado V.
Directora
Facultad de Ciencias Químico-Biológicas
Universidad Autónoma de Campeche

M. en C. Guillermo Bojórquez Rangel
Presidente SMG (2015-2017)