



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Carrera de Biología

**Evaluación de los efectos toxicológicos de la inhalación
de tetraóxido de vanadio en células troncales
(espermatogonias) y diferenciadas (espermatozoides)
en ratón de la cepa CD-1**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Biólogo**

PRESENTA:

CASTILLO VILLANUEVA CLAUDIA JESSICA

Director de tesis: Dra. Elia Roldán Reyes

Ciudad de México, Noviembre de 2021





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.

ÍNDICE

Abreviaturas	7
Lista de figuras	8
Lista de tablas	9
Resumen	10
Introducción	11
Vanadio	12
Tetraóxido de vanadio	13
Vanadio en el medio ambiente	14
Medios de exposición al vanadio	14
Distribución de vanadio en el organismo	15
Beneficios del vanadio en el organismo	17
Estructura del aparato reproductor masculino	19
Espermatogénesis	20
Regulación hormonal durante la espermatogénesis	22
Espermatogonias	24
Barrera hematotesticular	25
Toxicología del aparato reproductor masculino	26
Efectos reprotóxicos	27
Modelo biológico ratón cepa CD-1 (<i>Mus musculus domesticus</i>)	29
Calidad seminal	30
Espermatozoide	30
Justificación	33
Hipótesis	33
Objetivo general	33
Objetivos particulares	33
Métodos	34
Diagramas de flujo	38
Resultados	40
Discusión	46
Conclusiones	64
Perspectivas	65
Referencias	66
Anexo I	80
	2

AGRADECIMIENTOS

A

PAPIIT IN-221919-3.

Financiamiento del Proyecto.

Y

PAPIIT/DGAPA

Beca-Titulación (Tesis)

para

Claudia Jessica Castillo Villanueva

No. de Folio: 329220





Tesis desarrollada en el Laboratorio de *Citogenética y Mutagénesis* (L-2 primer piso, **LI-FESZ-350115**), integrante de la UMIEZ- CII, de la *FES Zaragoza UNAM*, bajo la dirección de la *Dra. Elia Roldán Reyes*.

Agradecimientos

A mis angelitos Bertha y Rubén por el cariño incontable que en vida siempre me dieron, por nunca soltarme, por ser mi refugio y sobre todo mi motor en la vida.

A mis padres por todo su amor, apoyo y paciencia a lo largo de este camino, gracias por todos sus consejos y palabras de aliento que hicieron de mí la persona que soy.

A mi hermano Arturo por estar siempre presente aportando cosas buenas, por los grandes lotes de felicidad y tantas risas que me llenan de vida.

A la Dra. Elia Roldán Reyes por creer en mí, por permitirme formar parte de su laboratorio y por todos sus conocimientos que me ha otorgado.

A Lalo por ser mi persona, por estar conmigo durante toda la carrera y quererme incondicionalmente.

A mis amigas Layla, Ingrid y Gloria por brindarme su cariño y ayudarme a superar los baches de la vida.

A Aldair por ayudarme a encontrar momentos de paz cuando mi mente es un caos y por animarme a seguir siempre adelante.

Dedicatoria

Para mis abuelitos, es muy complejo explicar con palabras lo valiosos que fueron para mí, la enorme falta que me hacen y lo que daría porque hubieran podido estar presentes en este momento de mi vida, sin embargo, desde el cielo ustedes siguen siendo mi principal motor y esta tesis, así como cada uno de mis logros siempre estarán dedicados a ustedes; ojalá la vida les hubiera permitido poder leer esto los amo con mi vida entera.

ABREVIATURAS

V_2O_4	Tetraóxido de vanadio
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
FSH	Hormona Folículo Estimulante
LH	Hormona Luteinizante
ABP	Proteína Fijadora de Andrógenos
KCl	Cloruro de potasio
LD	Dosis letal
M	Molar
MMC	Mitomicina C
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RA	Reacción Acrosómica
VO_3	Vanadato
VO_2^+	Vanadil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contaminación atmosférica por Vanadio

Figura 2. Elemento químico Vanadio

Figura 3. Vanadio en sus diferentes estados de oxidación

Figura 4. Nano estrellas de óxido de vanadio (IV)

Figura 5. Contaminación por las refinerías de petróleo.

Figura 6. Toxicocinética del vanadio

Figura 7. Aparato reproductor de ratón macho

Figura 8. Espermatogénesis

Figura 9. Espermiogénesis

Figura 10. Control del eje hipotálamo-hipofiso-testicular

Figura 11. Tipos de espermatogonias

Figura 12. Barrera hematotesticular

Figura 13. Posibles efectos adversos de la exposición a sustancias mutagénicas

Figura 14. Ratón de la cepa CD-1 *Mus musculus domesticus*

Figura 15. Estructura del espermatozoide de ratón

Figura 16. Proporción de espermatogonias tipo A, INT y B de los grupos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4

Figura 17. Microfotografías de los diferentes tipos de espermatogonias

Figura 18. Densidad espermática de los ratones tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4

Figura 19. Morfología espermática de ratones CD-1 tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4

Figura 20. Microfotografías de la morfología espermática de ratones CD-1

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de compuestos de vanadio de interés toxicológico

Tabla 2. Grupos y tratamientos

Tabla 3. Análisis estadístico

Tabla 4. Proporción de espermatogonias tipo A, INT y B de los ratones CD-1 tratados de forma subcrónica con diferentes concentraciones de V_2O_4

Tabla 5. Calidad seminal de ratones CD-1 tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4

Tabla 6. Análisis de correlación con coeficiente de Pearson (r) entre espermatogonias (Tipo A, INT y Tipo B) y densidad espermática

RESUMEN

El vanadio es un metal ampliamente distribuido tanto en la naturaleza como en los sistemas biológicos y es uno de los elementos traza presentes en los combustibles de tipo fósil. El **tetraóxido de vanadio** (V_2O_4) está presente con mayor frecuencia de manera intracelular y ha ganado mucha importancia debido a su potencial tóxico, mutagénico y genotóxico, tanto *in vitro* como *in vivo*. El vanadio puede cruzar la barrera hematotesticular, e inducir anormalidades y muerte en las células germinales, las cuales son precursoras de los espermatozoides, por lo que causa disfunción reproductiva.

El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto toxicológico producido por la exposición subcrónica vía aérea a V_2O_4 sobre células indiferenciadas y diferenciadas; para esto se evaluó la proporción de espermatogonias, morfología y densidad espermática. También se realizó un análisis estadístico con coeficiente de Pearson para detectar relación entre espermatogonias y densidad.

El estudio se realizó en ratones macho sexualmente maduros de la cepa CD-1, se llevaron a cabo 3 tratamientos subcrónicos por vía aérea con diferentes dosis de V_2O_4 (1.5 mg, 3 mg y 4.5 mg), un grupo control negativo y uno positivo (Mitomicina C).

Se detectó un aumento significativo entre los promedios de las espermatogonias indiferenciadas para la dosis baja y media con respecto al grupo control; en las espermatogonias de tipo intermedio hubo una disminución significativa para las tres dosis de V_2O_4 y en cuanto a las espermatogonias del tipo diferenciadas se vio un aumento significativo para la dosis media y alta con respecto al grupo control negativo.

La morfología espermática, evidenció un aumento significativo en cuanto a las formas anormales del flagelo, en los tres grupos tratados con respecto al grupo control y la densidad indicó disminución en los grupos tratados con la dosis baja y alta, en la dosis media la densidad aumentó significativamente en comparación con los ratones del grupo control.

El V_2O_4 como agente mutagénico fue capaz de ejercer su *efecto citotóxico*, al disminuir de forma considerable la densidad espermática en epidídimos, al aumentar las anormalidades morfológicas de los espermatozoides y alterar la proporción de espermatogonias. Dado que la calidad seminal constituye un factor de pronóstico para la fertilidad masculina, las evidencias indican que el V_2O_4 es capaz de ejercer *efecto reprotóxico* al actuar tanto en células indiferenciadas como diferenciadas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existe preocupación a nivel mundial con relación a la contaminación por transporte atmosférico de **metales** a gran escala causada por la actividad industrial y el tráfico automotor debido a su capacidad de asociación a masas de aire por efectos de la recirculación de los vientos (Imperato *et al.*, 2003).

A partir de estudios epidemiológicos llevados a cabo en las décadas de 1980 y 1990, se han obtenido datos que permiten afirmar que existe una correlación significativa entre la exposición al material particulado atmosférico y diversos efectos adversos sobre la salud (Bascom *et al.*, 1996; Brunekreef *et al.*, 1997; Künzli *et al.*, 2000). A pesar de que en la actualidad aún existe incertidumbre acerca de los efectos provocados por las diferentes especies químicas, la mayoría de los estudios apuntan que el mayor impacto en la salud viene causado por las partículas de carbono elemental (CE), compuestos orgánicos (CO), especialmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), sulfatos y nitratos, y determinados **metales** como As, Cd, Fe, Zn, Cr, Cu, Al, **V**, Ni y Pb (Wichmann y Peters, 2000; WHO, 2003).

Uno de los graves problemas de las grandes ciudades como la Ciudad de México es el elevado tráfico vehicular que genera la quema de combustibles que contaminan el aire. Además, producto de esta combustión se generan partículas suspendidas con distintos metales que tienen algunos efectos sobre la salud humana entre ellos el **vanadio** (Fig. 1). Por lo que en los últimos años han surgido líneas de investigación que trabajan en identificar las distintas alteraciones que se provocan en el organismo por la inhalación de metales (Santillan, 2014).

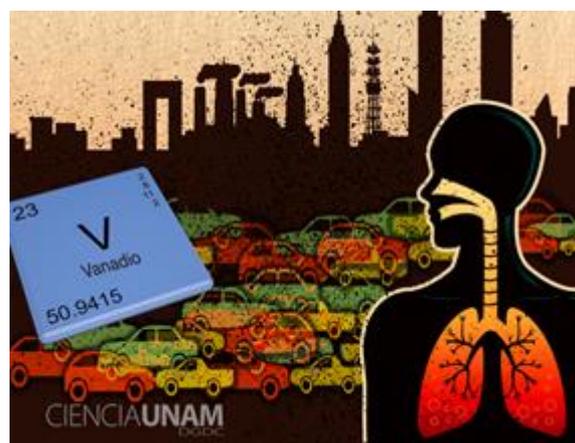


Figura 1. Contaminación atmosférica por Vanadio. Obtenida de Ayala, 2014.

VANADIO

El vanadio es un elemento natural, de símbolo **V**, número atómico 23 y peso atómico 50.942 (Fig. 2).

Está extensamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración de aproximadamente 100 mg/kg. Se encuentra en cerca de 65 minerales diferentes y ocupa el lugar número 22 entre los elementos más abundantes con una presencia que va de 0.014 a 0.02 %. Varios de los compuestos de vanadio se emplean en la industria química,

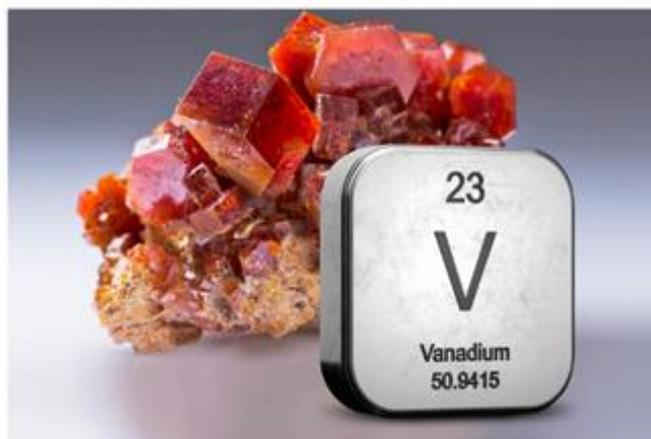


Figura 2. Elemento químico Vanadio. Obtenida de World Energy Trade, 2020.

sobre todo en la fabricación de catalizadores de oxidación, y en la industria de la cerámica como agentes colorantes. También desempeña un papel esencial en la regulación de la fosforilación enzimática; algunas formas de vida están capacitadas para concentrar el vanadio y en otros organismos, el vanadio es parte de la actividad específica de algunas enzimas (Wright, 2003).

En la tabla periódica es el primer elemento de la serie de transición y existe en diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, y generalmente pasa de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de óxido-reducción (Fig. 3). Sin embargo, sólo los tres estados más altos, V (III), V (IV) y V (V), respectivamente, tienen funciones biológicas reconocidas (Rodríguez y Altamirano, 2006).



Figura 3. Vanadio en sus diferentes estados de oxidación. Obtenida de Contreras-Cadena *et al.*, 2014.

TETRAÓXIDO DE VANADIO

El vanadio en estado de oxidación IV (Fig. 4), es el más común en el ambiente intracelular, con fórmula química V_2O_4 , constituye un polvo negro terroso, que se forma cuando se calienta una mezcla formada por trióxido y pentóxido (Tabla 1). Se usa para catalizar varias reacciones a temperaturas elevadas y es muy irritante. Por su dureza y resistencia a la tensión, se usa en la fabricación de muelles, engranajes de transmisión y otras partes de los motores; también se emplea como agente reductor y como desecante en algunas pinturas (Aragón *et al.*, 2005).

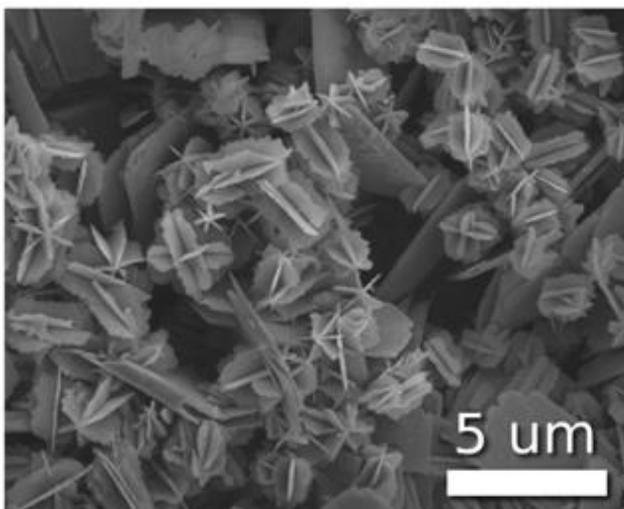


Figura 4. Nanoestrellas de óxido de vanadio (IV). Obtenida de Cuaderno de Cultura Científica, 2018.

TABLA I. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE COMPUESTOS DE VANADIO DE INTERÉS TOXICOLÓGICO

Nombre (fórmula química)	Peso molecular	Estado de oxidación	Densidad (g/cm ³)	Solubilidad
Pentóxido de vanadio (V_2O_5)	181.88	V	3.357	Ligeramente soluble en agua, 8 g/L a 20 °C. Soluble en anhídrido acético, acetato de etilo y acetona
Metavanadato de amonio (NH_4VO_3)	116.98	V	2.326	Soluble en agua, 5.2 g/L a 15 °C, 69.5 g/L a 96 °C. Insoluble en alcohol, éter ó NH_4Cl
Metavanadato de sodio ($NaVO_3$)	121.93	V	Sin datos	Soluble en agua, 211 g/L a 25 °C, 388 g/L a 75 °C
Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4)	183.91	V	Sin datos	Soluble en agua
Oxitricloruro de vanadio ($VOCl_3$)	173.30	V	1.829	Se descompone en solución. Soluble en alcohol, éter y ácido acético
Tetróxido de vanadio (V_2O_4)	165.88	IV	4.339	Soluble en ácidos o bases. De insoluble a poco soluble en agua *
Sulfato de vanadilo ($VOSO_4$)	165.00	IV	Sin datos	Muy soluble en agua fría (20-25 °C)
Tetracloruro de vanadio (VCl_4)	192.75	IV	Sin datos	Se descompone en solución
Oxidicloruro de vanadio ($VOCl_2$)	137.85	IV	2.88	Se descompone en agua fría. Soluble en ácido nítrico diluido
Trióxido de vanadio (V_2O_3)	149.88	III	4.87	Ligeramente soluble en agua fría. Soluble en agua caliente, ácido nítrico, ácido hidrofúorhídrico y bases
Tricloruro de vanadio (VCl_3)	157.30	III	Sin datos	Soluble en alcohol absoluto y éter. Se descompone en agua (de 3 a 18 °C).

Más información de propiedades físicas y químicas de vanadio en: Baroch 1983, Lagerkvist *et al.* 1986, Carson *et al.* 1987, Alessio *et al.* 1988, IPCS 1988, 2001, Budavari *et al.* 1996

* Rodríguez-Mercado *et al.* 2003

VANADIO EN EL MEDIO AMBIENTE

En la naturaleza, el vanadio no se encuentra en forma pura, por sus propiedades intrínsecas es propenso a reaccionar con otros elementos. Sin embargo, su liberación en la atmósfera es principalmente ocasionada por la actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental (Crans *et al.*, 2004).

El vanadio también se encuentra presente en forma de complejos metálicos y organometálicos en todos los petróleos crudos y materiales de origen fósil. La concentración en los petróleos del mundo es muy variable y depende del lugar de origen; en México el contenido es de 243 µg/g de petróleo (Aragón *et al.*, 2005).

Se ha estimado que, de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de petróleo, de carbón y de aceites pesados y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos (IPCS 2001).

MEDIOS DE EXPOSICIÓN AL VANADIO

La mayoría de las personas están expuestas diariamente a cantidades muy pequeñas de vanadio en los alimentos, el agua potable y el aire. Las mayores cantidades ingeridas provienen de los alimentos y se consumen aproximadamente de 10 a 20 microgramos diariamente, se han reportado ingestas diarias de vanadio a través del agua de grifo de 0.001 mg/L y también se puede encontrar vanadio en varios suplementos dietéticos y multivitaminas en cantidades desde 0.0004 a 12.5 mg (ATSDR, 2012).

La presencia del vanadio en estas fuentes se debe al menos parcialmente a la presencia natural en las rocas y el suelo a concentraciones aproximadas de 150 partes de vanadio por millón de partes de suelo (150 ppm) en la corteza terrestre (ATSDR, 2012).

Las personas expuestas a humo de cigarrillo también pueden estar expuestas a niveles de vanadio más altos que lo normal ya que el humo de un cigarrillo libera cerca de 0.0004 mg de vanadio (ATSDR, 2012).

El vanadio combinado con el oxígeno (óxido de vanadio) entra al aire cuando la gente hace arder petróleo combustible o quema carbón por lo que se puede estar expuesto al vanadio si se respira este aire. Las cenizas que resultan cuando arde el petróleo combustible o los productos de desecho que resultan del procesamiento de depósitos minerales que contienen vanadio pueden ser descargados en los vertederos de basura después de seguirse los procedimientos adecuados de tratamiento. Asimismo, la acción de los vientos y la lluvia puede causar que ciertas cantidades de vanadio circulen fuera de los vertederos de basura hacia suelos, cultivos agrícolas y abastecimientos de agua cercanos (Fig. 5) (ATSDR, 2012).



Figura 5. Contaminación por las refinерías de petróleo. Obtenida del Financiero 2015.

DISTRIBUCIÓN DE VANADIO EN EL ORGANISMO

La entrada de vanadio al organismo de los mamíferos 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 y **el 25 % inhalado**, este es absorbido y transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (Fig. 6) (Elinder *et al.*, 1988; Mukherjee *et al.*, 2004).

Una vez que ha sido absorbido, puede encontrarse en estados de oxidación III, **IV** y V. **El V(V) es reducido a V(IV)** por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma (Rehder, 2003). El vanadio es transportado por la albúmina y preferentemente por la transferrina. En el interior de la célula el V(V) puede ser nuevamente reducido a V(IV) por el glutatión y otros sustratos donde permanece unido (Cantley *et al.*, 1978; Yang, 2003).

Algunos estudios de farmacocinética en eritrocitos demuestran que la entrada de vanadio al interior de la célula se da en dos etapas, cada una regida por un mecanismo en particular. En la etapa inicial, V(V) cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, en tanto que en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido, V(IV) y un mecanismo de paso semejante al de los cationes divalentes (Heinz *et al.*, 1982).

Independientemente de la forma en que se incorpore **el vanadio se acumula exclusivamente como V(IV)**. Los órganos que lo acumulan son hígado, riñón, hueso y bazo, mientras que en pulmones y **testículos** se concentra en menor cantidad; también se ha detectado en corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso (Sharma *et al.*, 1987; Alessio *et al.*, 1988; Elinder *et al.*, 1988; French y Jones, 1993).

Diversas pruebas bioquímicas demuestran que el vanadio en estados de oxidación IV y V, interactúa en concentraciones de micromoles (μM) con muchas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (Crans *et al.*, 1989; Baran, 2000). En la célula, el vanadio tiene preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas; se calcula que el 61 % del total de V(IV) se une a los fosfatos, el 29 % a las proteínas, el 1 % queda libre y el resto a radicales sulfhidrilo y vitaminas, entre otras moléculas (Nechay *et al.*, 1986).

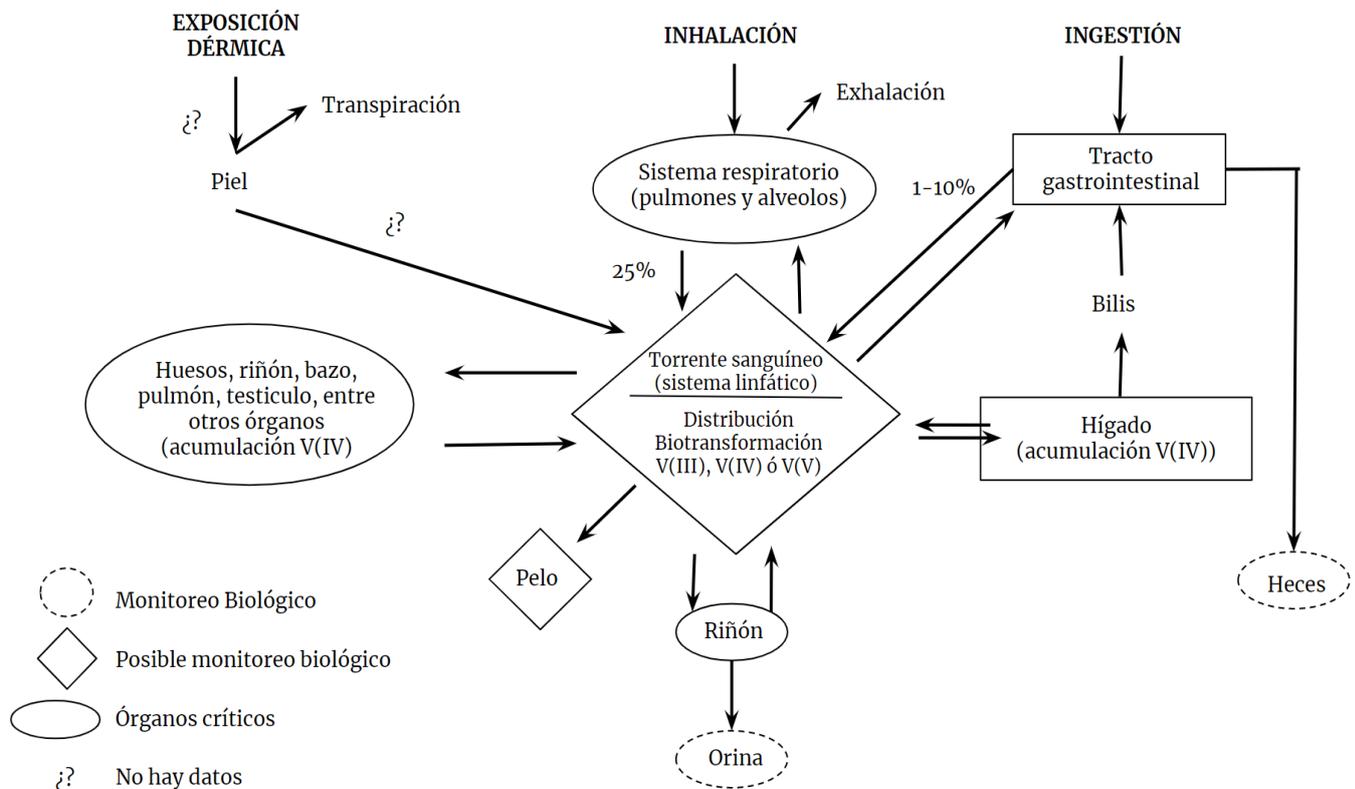


Figura 6. Toxicocinética del vanadio modificado de Elinder *et al.*, 1988.

BENEFICIOS DEL VANADIO EN EL ORGANISMO

Este elemento tiene ciertas actividades benéficas como por ejemplo; previene las caries, la acumulación del colesterol en los vasos sanguíneos, ayuda a prevenir los ataques cardíacos, refuerza el sistema inmunitario, ayuda a la formación de glóbulos rojos y de acuerdo con un artículo en el periódico de la Asociación Americana de Nutrición, el vanadio tiene un papel esencial en la nutrición del humano, los investigadores han demostrado que algunas composiciones del vanadio pueden aliviar los síntomas de la diabetes, ya que este nutriente ayuda a la actividad de la insulina, las dosis requeridas para normalizar los niveles de glucosa y lípidos en sangre son entre 0.1 – 0.7 mM/kg en estados de oxidación IV y V (Alvino *et al.*, 2007; Srivastava, 2000).

DAÑO DEL VANADIO AL ORGANISMO

El Vanadio puede tener un gran número de efectos sobre la salud humana cuando nos encontramos expuestos a dosis muy altas como:

- Daño cardíaco y vascular
- Temblores severos y parálisis
- Inflamación del estómago e intestinos
- Sangrado de la nariz y dolor de cabeza
- Daño en el sistema nervioso
- Mareos
- Sangrado del hígado y riñones
- Cambios de comportamiento
- Irritación de la piel

Las pruebas de laboratorio con animales han mostrado, que el Vanadio puede causar **daño en el sistema reproductivo de machos**, y alteraciones en el **ADN**, en algunos casos (ATSDR, 2012).

Intracelularmente, el vanadio tiene afinidad por el material genético y un dato importante es que **en modelos animales puede cruzar la barrera hematotesticular** y placentaria e inducir alteraciones en las diferentes células del testículo y en el desarrollo embrionario y fetal (Domingo, 1996; Aragón *et al.*, 2005).

ESTRUCTURA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

El sistema reproductor masculino está formado por el pene, el escroto, los testículos, el epidídimo, conducto deferente, la próstata y las vesículas seminales (Fig. 7).

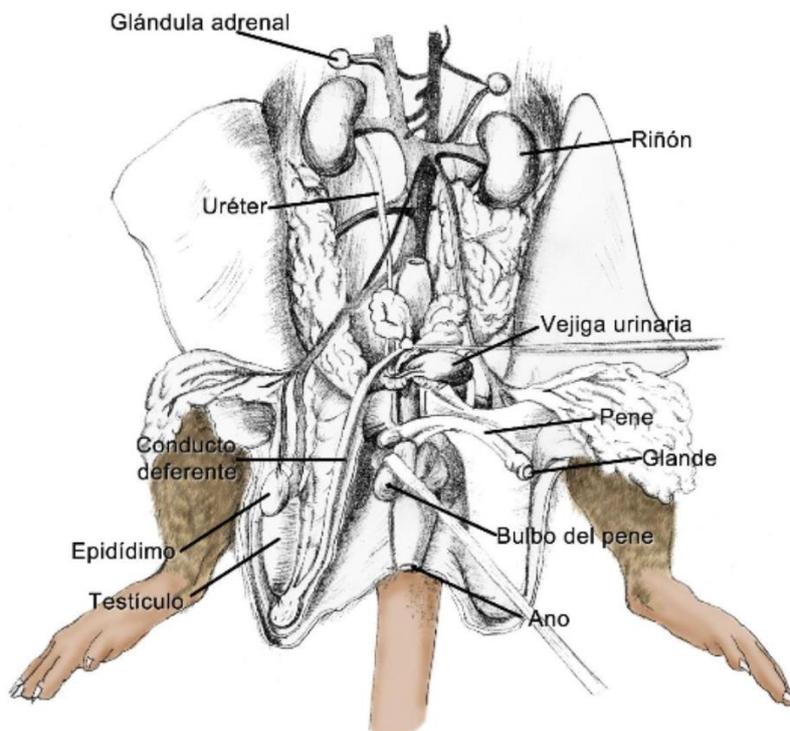


Figura 7. Aparato reproductor de un ratón macho. Modificada de Zúñiga, 2011.

El **pene** consta de la raíz, la parte visible del cuerpo y el glante del pene. El orificio de la uretra (el canal que transporta el semen y la orina) se encuentra en la punta del glante del pene.

El **escroto** es un saco de piel gruesa que rodea y protege los testículos actuando como un sistema de control de la temperatura para los testículos, porque estos necesitan estar a una temperatura ligeramente inferior (35°C) a la corporal (37°C) para favorecer el desarrollo normal de los espermatozoides.

Los **testículos** son cuerpos ovoides y tienen dos funciones principales: producir espermatozoides (que transportan la carga genética del macho) y testosterona (la principal hormona sexual masculina).

El **epidídimo** almacena los espermatozoides y proporciona el entorno adecuado para que maduren y adquieran la capacidad de moverse por el sistema reproductor femenino y fertilizar un óvulo.

El **conducto deferente** es un canal firme, que transporta los espermatozoides desde el epidídimo.

La **uretra** es la parte de las vías urinarias que transporta la orina desde la vejiga y la parte del aparato reproductor por la cual se eyacula el semen.

Las **vesículas seminales** se unen a los conductos deferentes para formar los conductos eyaculadores, que cruzan la próstata. La próstata y las vesículas seminales producen un líquido que nutre a los espermatozoides. Este líquido suministra la mayor parte del volumen del semen, y con él se expulsan los espermatozoides durante la eyaculación (Hirsch, 2019).

ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es el complejo proceso mediante el cual las espermatogonias tras una serie de divisiones y diferenciación celular dan lugar a espermatozoides (Fig. 8). Se distinguen tres etapas o fases.

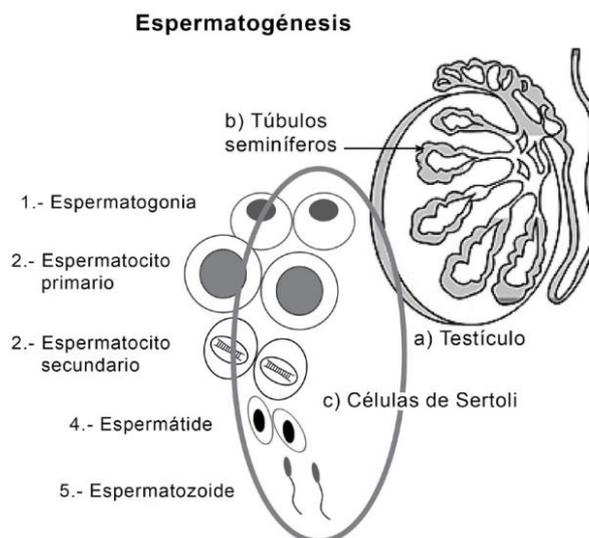


Figura 8. Espermatogénesis, Obtenida de Quintero-Vásquez *et al.*, 2015.

A) Fase proliferativa o espermatogónica. La espermatogonia está en contacto con la membrana basal del tubo seminífero y se divide por mitosis. Se distinguen dos

tipos de espermatogonias: la A que permanece en el compartimento basal del túbulo seminífero y la espermatogonia B que pasa, previa rotura de las *"tight junctions"* al compartimento luminal y se transforma en espermatocito I preleptoténico (Marina, 2003).

B) Fase meiótica o espermatocítica. Comprende dos divisiones celulares; de espermatocito I a espermatocito II y de este a espermátide. De un espermatocito I que tiene 23 cromosomas bivalentes, es decir con cuatro cromátidas cada uno, se forman cuatro espermatozoides. Las divisiones de la etapa espermatocítica son de tipo reduccional o meióticas. Las células resultantes, las espermátidas, tienen una carga cromosómica haploide, solo 23 cromosomas en vez de los 46 cromosomas de las células somáticas.

Durante la meiosis, además de la reducción cromosómica a la mitad, se produce el *"crossing-over"* o intercambio génico entre los cromosomas homólogos heredados del padre y de la madre. El intercambio génico tiene lugar durante la fase paquiténica de la profase I. En la fase anterior, la de zigoteno, se produce el apareamiento de cromosomas homólogos de una forma muy precisa gracias a una estructura, los complejos sinaptonémicos que permiten el intercambio de genes alelos. El intercambio génico, que ocurre durante la profase I, produce diversidad génica en la descendencia respecto a los progenitores (Marina, 2003).

C) Fase espermiogénica. En esta fase no hay división celular, solo diferenciación celular. El espermátide, célula redonda, contiene 23 cromosomas; es por tanto haploide. Procede de la división celular del espermatocito II y se transforma en espermatozoide. Los cambios más evidentes son la transformación del aparato de Golgi en acrosoma, la elongación del núcleo pasando de redondo a elíptico; el desarrollo del flagelo espermático a partir del centriolo distal; y la eliminación del citoplasma. A ello hay que añadir la condensación de la cromatina, cambios metabólicos y la localización de las mitocondrias alrededor de la parte proximal del flagelo, formando *"la pieza intermedia"* (Fig. 9) (Marina, 2003).

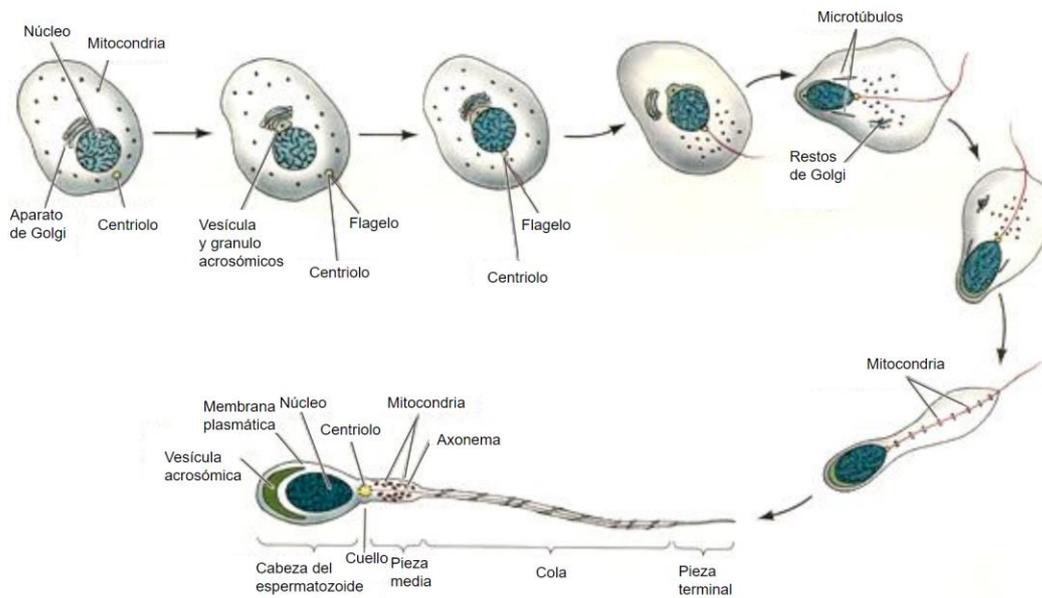


Figura 9. Espermiogénesis. Obtenida de Gilbert, 2005

REGULACIÓN HORMONAL DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

El testículo posee dos funciones básicas: endocrina (producción de hormonas) y exocrina (producción de espermatozoides). La función testicular está controlada por el llamado eje Hipotálamo-hipófisis-testículo (Fig. 10). En el hipotálamo se segrega la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que estimula la producción hormonal por el lóbulo anterior de la hipófisis (la adenohipófisis): la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Morales *et al.*, 2004).

La GnRH es liberada por el hipotálamo de forma pulsátil, este tipo de liberación resulta esencial para el efecto estimulador de la secreción de gonadotropinas. La amplitud y la frecuencia de los pulsos de GnRH condicionan las concentraciones de FSH y LH segregados por la adenohipófisis y, a su vez, la función gonadal.

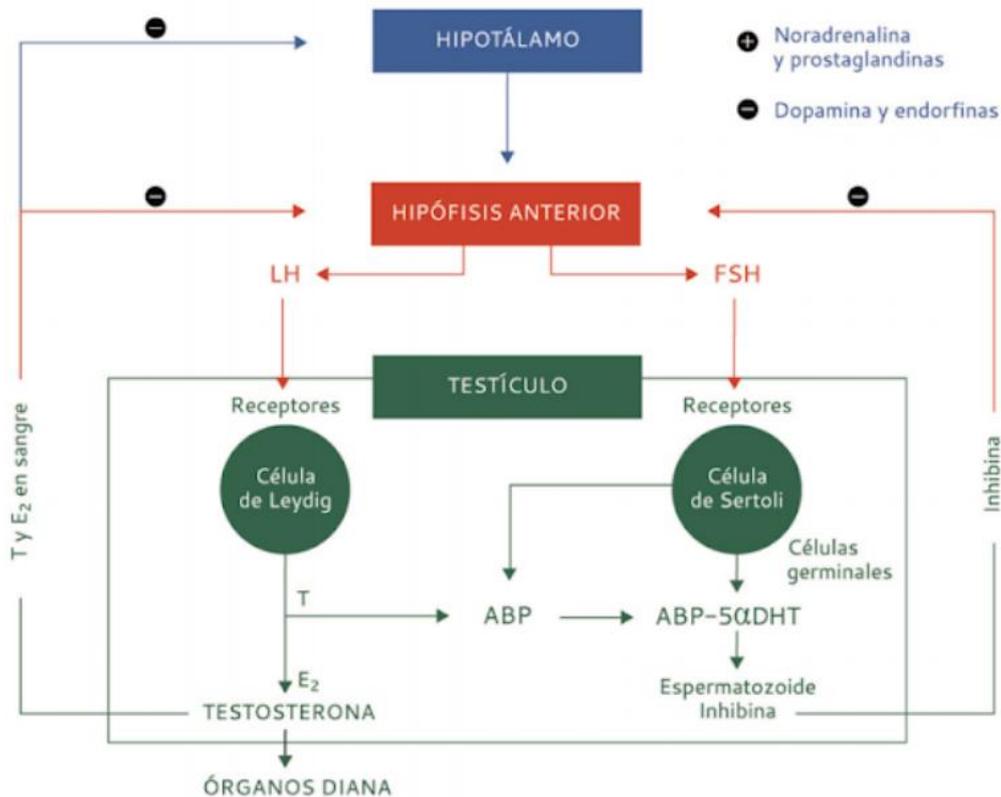


Figura 10. Control del eje hipotálamo-hipófisis-testicular. Obtenida de Arrondo, 2009.

Por otra parte, y debido al proceso de retroalimentación negativa, las hormonas producidas en el testículo ejercen efectos inhibitorios sobre la secreción de la FSH y la LH (Morales *et al.*, 2004)

La FSH hipofisaria actúa sobre los receptores específicos en las células de Sertoli, localizados en los túbulos seminíferos, lo que estimula la producción de espermatozoides (espermatogénesis). Debido a la estimulación de la adenohipófisis (FSH), y por diferentes factores hormonales, esta función se desarrolla durante la vida sexual.

La testosterona también es necesaria para el proceso de la espermatogénesis. Las células de Sertoli sintetizan una proteína fijadora de andrógenos (la ABP: androgen binding protein) que es necesaria para mantener una concentración adecuada de testosterona en el epitelio seminífero y así, se pueda completar el proceso de la espermatogénesis (Morley, 2003).

Un factor importante que actúa sobre la hipófisis inhibiendo la producción de FSH es la hormona llamada **inhibina**, producida por las **células de Sertoli**. En presencia de una dotación de células espermatogénicas en el epitelio seminífero, la inhibina se va liberando de modo continuo y actúa sobre la hipófisis para inhibir la producción de FSH (Hayes *et al.*, 2001).

ESPERMATOGONIAS

Las espermatogonias se consideran las “*células madre*” del sistema reproductor masculino, pues se dividen para mantener el número de células en su población y para producir aquellas células que se diferenciarán en espermatozoides (Zhou y Griswold, 2008).

Las espermatogonias pueden observarse cerca de la membrana basal. Tienen un tamaño de 12 μm , su núcleo es esférico, rico en cromatina (ADN + proteínas histonas), ocasionalmente elipsoidal y de 6,5 μm , presenta nucléolos adheridos a la membrana nuclear. El citoplasma es homogéneo y pálido (Johnson *et al.*, 2008).

No obstante, existen diferentes tipos de espermatogonias.

Estas células pueden diferenciarse en tres clases:

- Las espermatogonias indiferenciadas o tipo A
- Las espermatogonias intermedias
- Las espermatogonias diferenciadas o tipo B (Fig. 11).

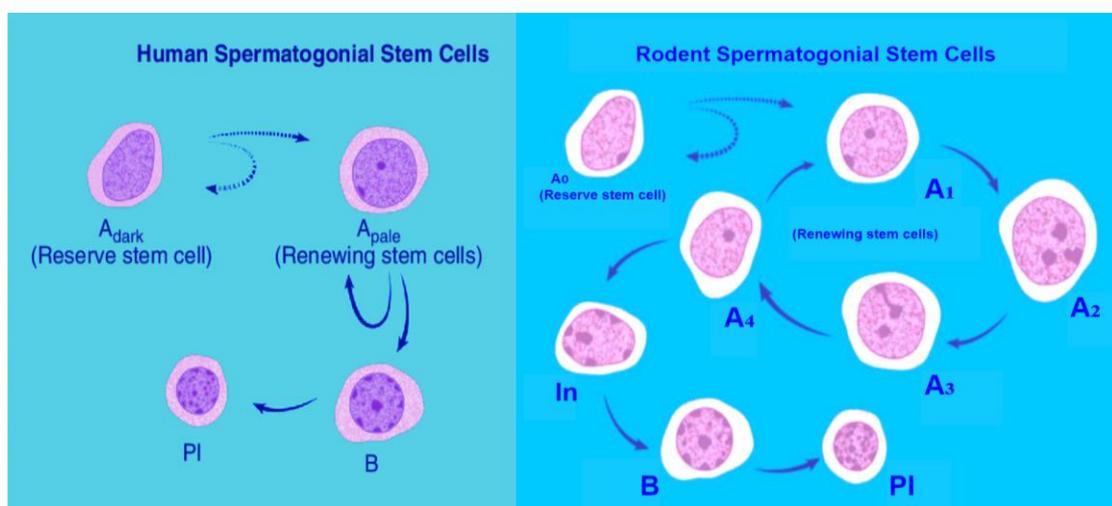


Figura 11. Tipos de espermatogonias en ratón y humano. Modificada de Dym *et al.*, 2009.

Las espermatogonias indiferenciadas e intermedias podrían considerarse de tipo “A”, pues son las responsables de la producción de nuevas espermatogonias y de aquellas espermatogonias que se comprometerán luego a la diferenciación.

Las espermatogonias que se diferenciarán posteriormente en espermatocitos (equivalentes al tipo “B”) sufren numerosas divisiones mitóticas. La mitosis de estas células “*diferenciables*” es, sin embargo, diferente a otros tipos de mitosis, pues la citocinesis es incompleta (las células no se separan unas de otras después de dividirse en dos), por lo que todas las células resultantes, llamadas espermatocitos, se mantienen unidas como en un *sincisio* (Clermont, 1966).

Las espermatogonias tipo A son células con un único núcleo muy redondeado que, muchas veces, cuando se tiñen con tintes especiales, se colorean poco. Desde el punto de vista citológico, muchos autores definen dos tipos de espermatogonias A, los cuales se diferencian por su coloración en:

- Espermatogonias AD, del inglés *dark*, que significa “oscuro”
- Espermatogonias AP, del inglés *pale*, que significa “pálido”

Las espermatogonias de tipo intermedio se caracterizan por presentar de dos a seis nucléolos y **las espermatogonias tipo B**, por otro lado, son células que se caracterizan por tener **más de siete nucléolos**. Los nucléolos son importantes regiones intranucleares que no están delimitadas por una membrana pero que ejercen funciones muy importantes como, por ejemplo, la **síntesis de ribosomas** (Brenner y Miller, 2014).

BARRERA HEMATOTESTICULAR

La barrera hematotesticular (Fig. 12) formada por células de Sertoli es de permeabilidad altamente selectiva, se sitúa entre los vasos sanguíneos capilares y los túbulos seminíferos de los testículos. La presencia de la barrera hematotesticular permite que las células de Sertoli influyan en la composición química del lumen de los túbulos seminíferos y controlen el ambiente en el que se desarrolla la

espermatogénesis. El fluido del lumen de los túbulos seminíferos es rico en andrógenos, estrógenos, inositol, ácido glutámico y ácido aspártico, y a diferencia del plasma es pobre en proteínas y glucosa. La barrera hematotesticular previene el paso de sustancias citotóxicas transportadas en sangre para que no interfieran en la formación de los espermatozoides.

La permeabilidad de los compuestos xenobióticos a través de la barrera hematotesticular dependerá de su tamaño molecular y de su liposolubilidad (Leopardi *et al.*, 2005).

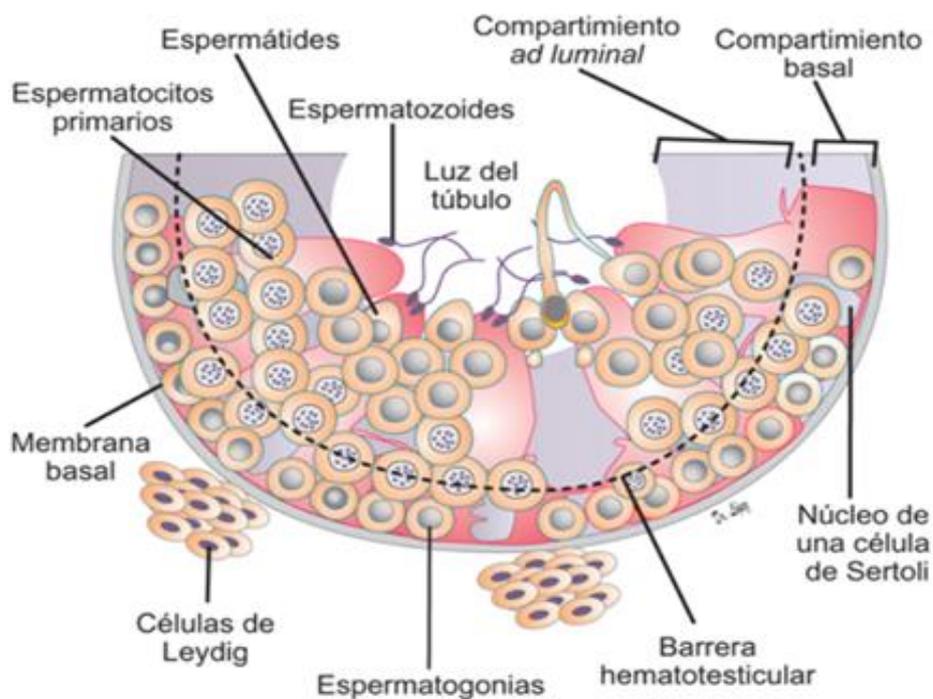


Figura 12. Barrera hematotesticular. Obtenida de López, 2009.

TOXICOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

Las sustancias tóxicas pueden alterar la espermatogénesis en varios puntos. Las más lesivas, debido a su irreversibilidad, son las que matan o alteran genéticamente (fuera del alcance de los mecanismos de reparación) las espermatogonias o las células de Sertoli.

El líquido seminal se puede analizar para determinar la presencia de una sustancia tóxica o de sus metabolitos (Chapin et al., 1984).

La viabilidad y movilidad de los espermatozoides en el líquido seminal representa típicamente la calidad del mismo. Las alteraciones de la viabilidad de los espermatozoides, determinadas mediante exclusión por tinción o por edema hipo osmótico, o las alteraciones de los parámetros de la movilidad del esperma sugieren efectos tóxicos postesticulares. Los análisis de semen pueden indicar también si la producción de espermatozoides ha resultado afectada por una sustancia tóxica (Chapin *et al.*, 1984).

El recuento y la morfología de los espermatozoides ofrecen índices de la integridad de la espermatogénesis y de la espermiogénesis. Así, el número de espermatozoides presentes en la eyaculación es directamente proporcional al de células germinales por gramo de testículo, mientras que la morfología anormal probablemente es consecuencia de una espermiogénesis anormal. Por tanto, el tipo o el momento de un efecto tóxico pueden indicar el destino de la sustancia tóxica (Zuckerman *et al.*, 1978; Charlton 1994).

EFFECTOS REPROTÓXICOS

La biotransformación y posible activación de las sustancias químicas exógenas puede ser importante, ya que durante la espermatogénesis tiene lugar la síntesis de ADN por lo que el material genético es muy sensible a la acción de tóxicos, especialmente de mutágenos. De la efectividad de los sistemas de reparación dependerá que las lesiones producidas por estos en el ADN, resulten o no en cambios en el material genético (Fernández, 2003).

Los trastornos toxicológicos de la fertilidad masculina son la infertilidad y la esterilidad, entendiendo por infertilidad una reducción temporal en la capacidad de procreación, mientras que la esterilidad es un proceso que implica irreversibilidad.

En la reproducción masculina, el proceso diana para las sustancias mutagénicas es la espermatogénesis, pero no todas las células presentan el mismo riesgo ante la acción de un mutágeno, existen tres factores que las hacen diferentes:

- ❖ **Nivel que ocupan en la línea:** las mutaciones en las células madre serán portadas por el espermia desarrollado a partir de ellas durante toda la vida del organismo. Desde este punto de vista las células de mayor riesgo son las espermatogonias; en cambio, los espermatocitos o espermatozoides dañados serán reemplazados al cabo de un tiempo.
- ❖ **Actividad replicativa:** la síntesis de ADN tiene lugar principalmente en las espermatogonias y los espermatocitos primarios que serán las células más sensibles a la acción de los mutágenos.
- ❖ **Actividad de los sistemas de reparación:** las células espermiogénicas son las menos efectivas en la reparación de lesiones y el espermia maduro ya ha perdido esta capacidad reparadora (Huici y Bonilla, 1999).

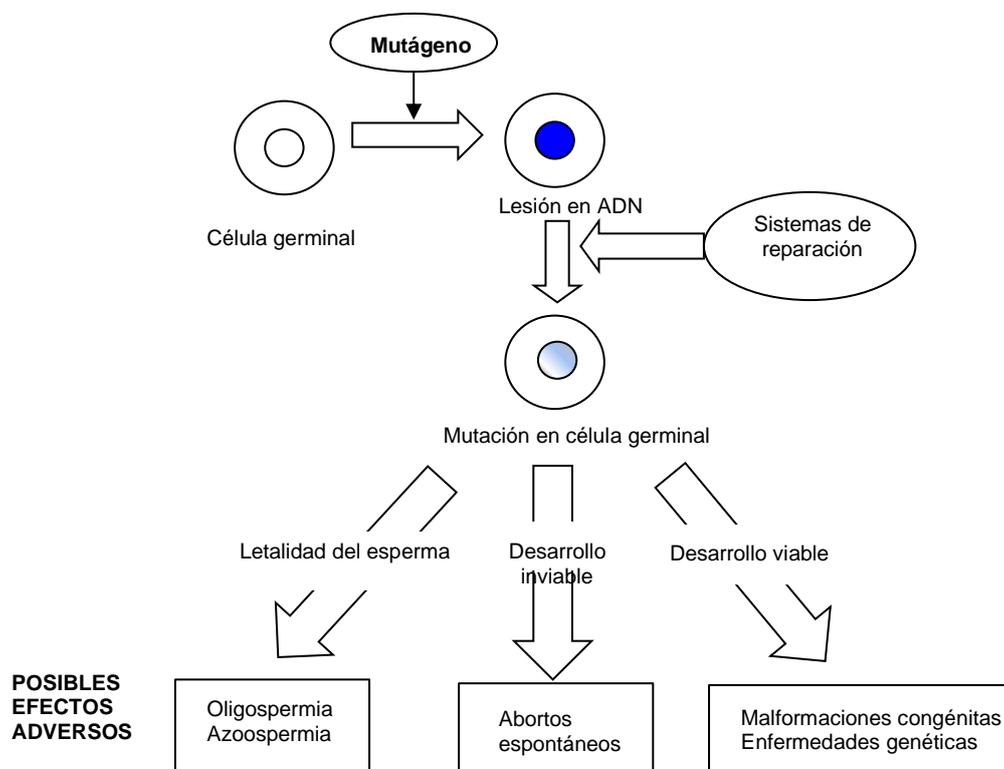


Figura 13. Posibles efectos adversos de la exposición de células germinales a sustancias mutagénicas. Modificada de Huici y Bonilla, 1999.

MODELO BIOLÓGICO RATÓN CEPA CD-1 (*Mus musculus domesticus*)

El ratón *Mus musculus domesticus*, (Fig. 14) es un modelo con muchos atributos para la investigación por su fácil manejo, ya que es apropiado para la crianza y de fácil manipulación.



Figura 14. Ratón de la cepa CD-1 *Mus musculus domesticus*. Obtenida de Taconinc, 2021.

La especie de ratón (*Mus musculus domesticus*) utilizada en el bioterio, es de tamaño pequeño, tiene como medidas externas: 130 a 198 mm de largo total, que va desde la punta de la nariz hasta la punta de la cola. Su cola mide de 63 a 102 mm, es larga, con poco pelo y escamosa. Es una especie que evolucionó taxonómicamente considerada comensal del hombre (Hall, 1981). Para la determinación del género en los neonatos, se determina la distancia entre el ano y la papila urogenital siendo mayor en los machos (tres veces más). En los adultos, los machos pueden diferenciarse de las hembras por el abultamiento testicular notorio en la pared abdominal (Altamirano, 1994).

Su peso corporal al nacimiento es de 0.5 a 1.5 g y de adultos es de 30 a 35 g en hembras y de 38 a 42 g en machos. El período de vida del ratón *M. musculus domesticus* es de 1 a 1.3 años. Los machos de la mayoría de las líneas de ratones de laboratorio son púberes (con actividad espermática establecida) entre 6 y 8 semanas y mantienen la fertilidad prácticamente toda la vida. En ratones un ciclo espermático completo dura 35 días donde teóricamente una espermatogonia es capaz de producir 4096 espermatozoides maduros (Altamirano, 1994).

CALIDAD SEMINAL

Durante la eyaculación se expulsa semen que está constituido de espermatozoides provenientes del epidídimo y de secreciones sintetizadas por las distintas glándulas sexuales accesorias. La capacidad reproductiva del macho está condicionada por el proceso de espermatogénesis (Foote, 2003).

La concentración espermática está relacionada directamente con la tasa de dilución y el número de dosis por eyaculado, y la morfología de los espermatozoides permite identificar reproductores de baja calidad (Rodríguez-Martínez y Ericsson, 2000).

La capacidad reproductiva puede alterarse por factores ambientales. En ratones, la exposición a ambientes hipóxicos, ciertos trastornos nutricionales como la anorexia nerviosa, el consumo crónico de alcohol, la administración de agroquímicos, ocasionan la destrucción del epitelio germinal, modifican la estructura tubular, alteran el transporte de los espermatozoides y la maduración de los gametos, etc., (Van Thiel *et al.*, 1979; Adams *et al.*, 1997; Calleja *et al.*, 1997; Martini *et al.*, 2004; Bustos *et al.*, 2005; Bustos *et al.*, 2007).

ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide es una célula móvil altamente especializada que es fácilmente diferenciable del resto de las células (Fig. 15). En ratones tiene un tamaño aproximado de 123 μm y en humanos de 55 μm .

Pueden diferenciarse tres regiones en su estructura:

I) Cabeza. Es la región apical de la célula. En el grupo de los roedores, la cabeza tiene forma de gancho (falciforme), mide aproximadamente 8 μm de largo por 3 μm de ancho. Contiene al núcleo celular y al acrosoma. El núcleo, que contiene y protege a la cromatina altamente condensada, se encuentra rodeado por una membrana denominada teca perinuclear que consiste en una cubierta rígida formada por diversas proteínas unidas a través de enlaces disulfuro (Sutovsky y Gaurishankar, 2006). El acrosoma es una estructura membranosa que se sitúa por encima del núcleo. Contiene una gran cantidad de enzimas como hialuronidasa, proteasas,

acrosina y tripsina, capaces de degradar las capas que rodean al óvulo (Georgadaki *et al.*, 2016).

II) Pieza media o cuello. En ratones mide aproximadamente 18 μm de largo. En esta región se encuentran aproximadamente 75-100 mitocondrias dispuestas de manera helicoidal alrededor del flagelo, están encargadas de proveer energía para que la célula pueda sobrevivir y moverse (Sutovsky y Gaurishankar, 2006).

A pesar de que la pieza media no es la única región de esta célula donde se produce energía, si aporta la mayor cantidad de energía gracias a que lleva a cabo fosforilación oxidativa (García-Vázquez *et al.*, 2016).

III) Flagelo o pieza principal. Tiene una longitud aproximada de 96 μm en ratones, su estructura filiforme permite a la célula moverse. Se encuentra recubierto en la primera porción por una vaina fibrosa y después solamente por la membrana flagelar. Su estructura, partiendo del centro hacia la periferia, consiste en un axonema formado por dos microtúbulos centrales rodeados por otros nueve pares. Los componentes de cada par se denominan microtúbulos A y B. Se conoce como axonema 9+2 a este tipo de distribución (López-García *et al.*, 2012). Los microtúbulos A poseen dos brazos de **dineína** en forma de gancho que abrazan a cada microtúbulo B, esta proteína es capaz de hidrolizar ATP y producir energía para impulsar al espermatozoide. Hacia la parte terminal del flagelo el grosor disminuye y se aprecia un desarreglo de los microtúbulos del axonema, a esta última porción se le denomina pieza terminal (López-García *et al.*, 2012).

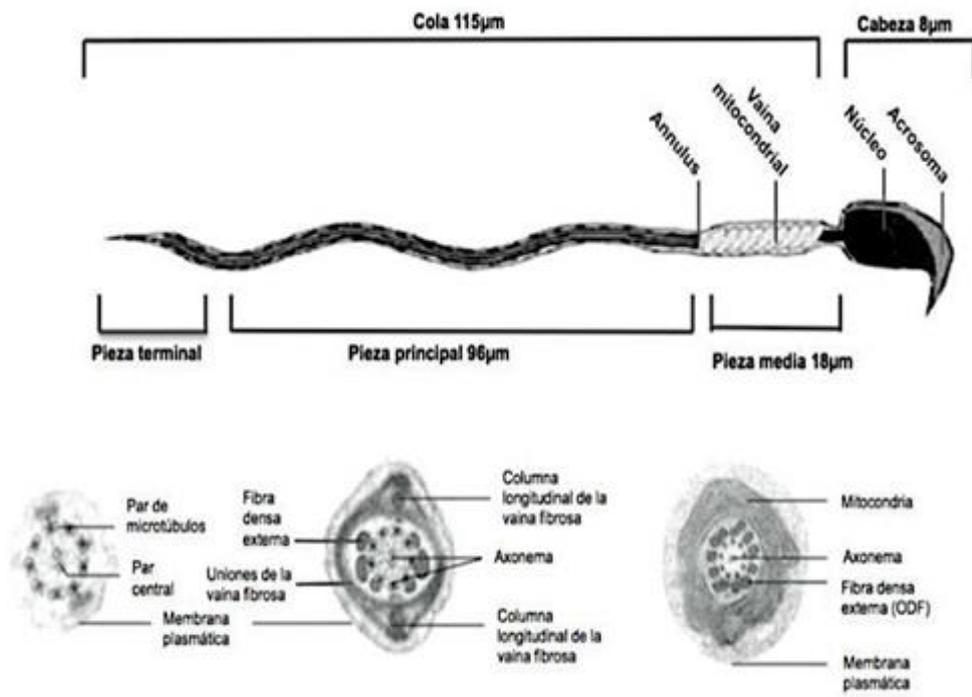


Figura 15. Estructura del espermatozoide de un ratón. Modificada de Delfín, 2020.

Justificación

Los trabajos sobre el papel biológico del vanadio han ganado mucha importancia en los últimos años debido a su bien conocido potencial tóxico, mutagénico y genotóxico en una amplia variedad de sistemas biológicos. Se ha reportado que el vanadio (V) induce recuentos bajos de espermatozoides y aumenta la frecuencia de anomalías de la morfología espermática. Sin embargo, aún no se han evaluado los efectos de la forma intracelular activa de V_2O_4 sobre la función reproductora masculina. El propósito de este estudio fue analizar el efecto toxicológico del tetraóxido de vanadio por vía aérea en la densidad y morfología espermática, así como la proporción de espermatogonias en el ratón macho adulto.

Hipótesis

El vanadio es reconocido como un mutágeno potencial y uno de los primeros efectos detectables es un descenso en la fertilidad masculina ya que al ser inhalado es capaz de atravesar la barrera hematotesticular producir atrofia del epitelio seminífero con pérdida de espermatogonias, que tienen como consecuencia oligospermia e incluso azoospermia.

Objetivo general

Analizar los efectos toxicológicos producidos por exposición subcrónica vía aérea a V_2O_4 sobre células indiferenciadas, diferenciadas y espermatozoides; reforzando así el efecto reprotóxico en ratones macho.

Objetivos particulares

- Analizar el efecto citotóxico mediante la evaluación de la proporción de los diferentes tipos de espermatogonias de ratón inducido por exposición a V_2O_4 .
- Evaluar el efecto toxicológico en la calidad seminal de ratones con los mismos tratamientos de vanadio V_2O_4 (morfología y densidad).
- Establecer la correlación de los efectos citotóxicos, citostáticos y reprotóxicos del V_2O_4 en las espermatogonias (Tipo A, INT y Tipo B) del testículo de ratón con la densidad espermática.

MÉTODOS

Reactivos

Para llevar a cabo los tratamientos vía aérea se utilizó tetraóxido de vanadio (V_2O_4); Mitomicina C ($C_{15}H_{18}N_4O_5$ MMC, CAS 50-07-7, Sigma-Aldrich, USA) para el control positivo, KCl (CAS 7447-40-7, Hycel, México) para preparar una solución hipotónica 0.075 M (P/V), Metanol absoluto (CH_3OH , CAS 67-56-1, J.T. Baker, USA) y Ácido acético glacial (CH_3COOH , CAS 64-19-7, Golden Bell, México) para preparar un fijador en proporción 3:1 (V/V), ácido acético al 60% (V/V), Colchicina (CCC,C22H25NO6>95%, CAS 64-86-8, Sigma-Aldrich, USA) al 0.3% (P/V) para la obtención de espermátogonias; Giemsa (CAS 51811-82-6, Sigma-Aldrich, USA) al 10% (V/V) para la tinción de espermátogonias, eosina (E8761, Sigma-Aldrich, USA) al 1% (V/V) y nigrosina (V/V) para la evaluación de morfología espermática.

Muestra

Se trabajó con ratones macho sexualmente maduros (de 8 a 12 semanas de edad) de la cepa CD-1 que fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza con un peso entre 37.5 y 45 g (los ratones fueron pesados al inicio del tratamiento y nuevamente cuando fueron sacrificados). Se mantuvieron con fotoperiodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 21°C con una humedad de 40 a 50%. Los animales tuvieron libre acceso al alimento (Rodent diet Tek Lad Global Diets, 18% de proteína) y agua. Cada grupo estuvo conformado por 5 ratones.

Tratamiento

Se realizó un tratamiento subcrónico con tetraóxido de vanadio (V_2O_4) vía inhalatoria o aérea tomando como referencia la **LD₅₀ (150 mg/kg)** del V_2O_4 se prepararon soluciones en volúmenes que contenían $\frac{1}{4}$ LD₅₀, $\frac{1}{2}$ LD₅₀ y $\frac{3}{4}$ LD₅₀ (Tabla 2). El tratamiento se realizó durante 15 días de manera subcrónica, exponiendo a los ratones cada 48 horas durante una hora, vía aérea con ayuda de un nebulizador y una caja hermética. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de recibir el último tratamiento.

Tabla 2. Grupos y tratamientos

Grupos	Tratamientos (mg/g)	No. Ratones
Testigo negativo	0	5
Testigo positivo (MMC)	0.08	5
V₂O₄		
Baja	1.5	5
($\frac{1}{4}$ LD ₅₀ : 37.5 mg/kg)		
Media	3	5
($\frac{1}{2}$ LD ₅₀ : 75.0 mg/kg)		
Alta	4.5	5
($\frac{3}{4}$ LD ₅₀ : 112.5 mg/kg)		

LD₅₀ Vanadio IV = 150 mg/kg (Aragón y Altamirano, 2001).

Obtención del material biológico (espermatogonias)

Se administró Colchicina al 0.3% (P/V) vía intraperitoneal (0.1 mL por cada 10 g), después de 5 horas los ratones fueron sacrificados para extraer testículos y epidídimo. Los testículos se colocaron en tubos de centrifuga con 5 mL de solución fisiológica para evitar que se resecaran y posteriormente fueron macerados en cajas Petri.

Posteriormente se colocaron en tubos de centrifuga y se les agregó solución hipotónica KCl 0.075 M hasta 10 mL, se esperó **5 minutos** a que el material biológico asentará y se retiró el sobrenadante, se agregó nuevamente solución hipotónica 0.075 M previamente incubada a 37 °C hasta 5 mL y se colocaron los tubos de centrifuga **30 minutos** en baño maría.

Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 5 mL de fijador (3:1 metanol: ácido acético) (V/V) y se volvió a centrifugar a 3500 rpm, finalmente se agregaron 5 mL de ácido acético al 60% (V/V)

a cada tubo dejándolos de 5 minutos a 24 horas para posteriormente realizar el goteo en las laminillas; estos fueron refrigerados.

El goteo fue realizado en laminillas frías, se dejaron secar al aire, y posteriormente fueron teñidas con Giemsa al 10%. Las evaluaciones se realizaron en un microscopio (Nikon) en campo claro a 40X.

Calidad seminal

Al extraer los epidídimos estos fueron exprimidos en tubos eppendorf con 1 mL de agua destilada para evaluar los parámetros de calidad seminal (densidad y morfología).

Densidad

Para la evaluación de la densidad se realizó un conteo en la cámara de Neubauer, resuspendiendo la muestra y aplicando una alícuota en la cámara de Neubauer. Se observó en el microscopio (Nikon) en contraste de fases a 40X y se contaron los espermatozoides en ambas cargas, tomando en cuenta únicamente espermatozoides enteros (con cabeza y flagelo). Se compararon los recuentos replicados para verificar si son aceptables y se promediaron los conteos para calcular la concentración de espermatozoides por mL.

Morfología

Para la evaluación de la morfología se realizó una tinción con eosina-nigrosina. Se tomaron 10 µl de muestra y se agregaron 10 µl de eosina, se resuspendió y se dejó reposar por 2 minutos, posteriormente se agregaron 10 µl de nigrosina y se realizó un frotis. Se observó en el microscopio (Nikon) a 40X y se contabilizaron un total de 400 espermatozoides, indicando el número de espermatozoides normales, con defecto en cabeza, pieza media y flagelo.

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba estadística de Z para proporciones para la proporción de espermatogonias y la morfología espermática, con el fin de detectar si hay diferencias significativas en alguno de los grupos tratados con diferentes concentraciones con respecto al control negativo. Posteriormente se realizará una Prueba de *t*-Student para la densidad espermática, si las diferencias estadísticas cumplen con el valor de $p < 0.05$ se consideraron significativas y, finalmente se hizo una Correlación de Pearson entre los tres tipos de espermatogonias (Tipo A, INT y Tipo B) y la densidad espermática (Tabla 3). Los resultados serán presentados como media \pm desviación estándar ($X \pm DE$).

Tabla 3. Análisis estadístico

	Células contadas	Total/trata.	Prueba estadística
Proporción de espermatogonias	2 000 por ratón	10 000	Z para proporciones
Morfología espermática	400 por ratón	2 000	Z para proporciones
Densidad espermática	10 ⁶ espermas/ml	-	<i>t</i> -Student

DIAGRAMAS DE FLUJO

Tratamiento subcrónico con V₂O₅



Obtención del material biológico (espermatogonias)





RESULTADOS

- **Proporción de espermatogonias**

Los resultados obtenidos de la proporción de espermatogonias para probar si existían diferencias atribuibles a las diferentes concentraciones de V_2O_4 se muestran en la Tabla 4 como promedio \pm desviación estándar.

Tabla 4. Proporción de espermatogonias tipo A, INT y B de los ratones CD-1 tratados de forma subcrónica con diferentes concentraciones de V_2O_4

Tratamiento (mg/g)	Ratón (N)	Indiferenciadas (A) (%)	Intermedias (INT) (%)	Diferenciadas (B) (%)
(T-)	1	45.30	37.85	16.85
	2	52.15	32.75	15.10
	3	50.00	30.00	20.00
	4	53.65	28.05	18.30
	5	58.00	28.50	13.50
<i>Media \pm DE</i>		51.82\pm4.67	31.43\pm4.03	16.75\pm2.56
(T+ MMC) [0.08]	1	57.60	25.20	17.20
	2	56.25	30.10	13.65
	3	49.90	28.30	21.80
	4	55.25	27.45	17.30
	5	55.55	26.85	17.60
<i>Media \pm DE</i>		54.91\pm2.63*	27.58\pm1.61*	17.51\pm2.58*
V_2O_4 [1.5]	1	54.90	31.50	13.60
	2	54.80	35.20	10.00
	3	54.75	26.75	18.50
	4	54.75	26.75	18.50
	5	59.00	22.9	18.10
<i>Media \pm DE</i>		55.64\pm1.87*	28.62\pm4.77*	15.74\pm3.81*
V_2O_4 [3.0]	1	58.75	26.00	15.25
	2	55.45	25.85	18.70
	3	56.95	25.35	17.70
	4	55.75	24.55	19.70
	5	58.30	21.55	20.15
<i>Media \pm DE</i>		57.04\pm1.47*	24.66\pm1.82*	18.30\pm1.94*
V_2O_4 [4.5]	1	47.20	30.05	22.75
	2	52.40	28.70	18.90
	3	59.55	24.65	15.80
	4	56.65	26.65	16.70
	5	49.45	24.10	26.45
<i>Media \pm DE</i>		53.05\pm5.06*	26.83\pm2.55*	20.12\pm4.43*

Z para proporciones *p <0.05 con respecto al (T-) (media \pm desviación estándar).

La prueba estadística Z para proporciones evidenció un aumento significativo (p<0.05) en los promedios de las espermatogonias indiferenciadas o tipo A para las tres dosis de V_2O_4 con respecto al control negativo siendo mayor para la dosis media; en las espermatogonias de tipo intermedio se observó una disminución significativa

para las tres dosis de V_2O_4 , siendo nuevamente mayor para la dosis media y en cuanto a las espermatogonias del tipo diferenciadas o tipo B se observó un aumento en el grupo tratado con la dosis media y alta, la dosis baja presentó una disminución significativa con respecto al control negativo.

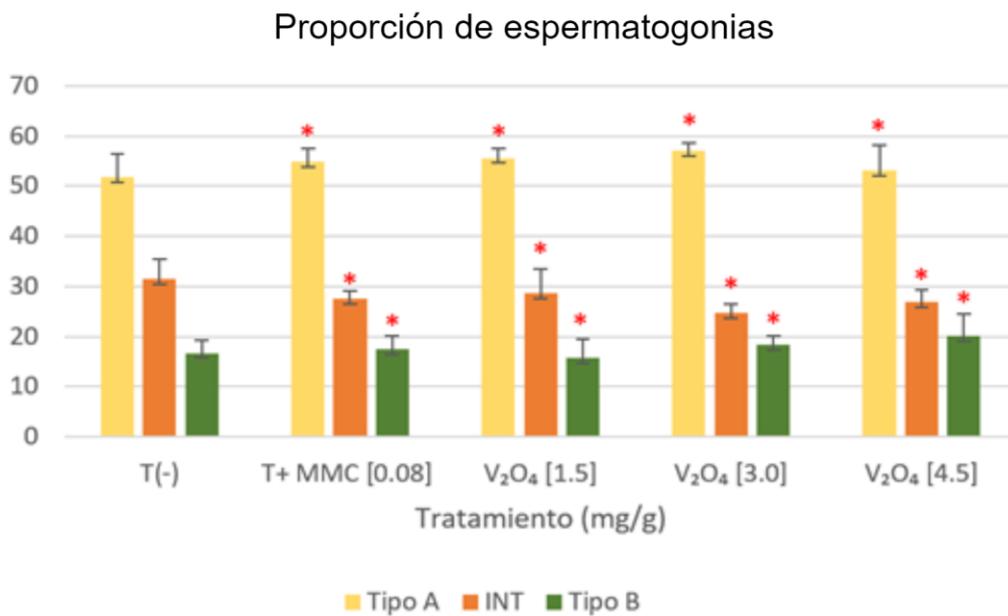


Figura 16. Proporción de espermatogonias **tipo A**, **INT** y **B** de los grupos tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4 . *p < 0.05 (media ± desviación estándar).

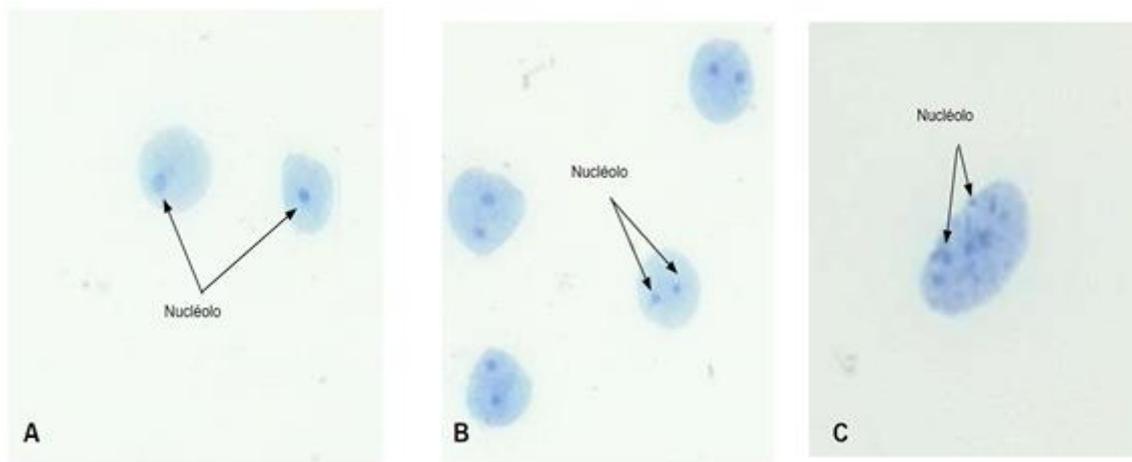


Figura 17. **A** Espermatogonias indiferenciadas, **B** Espermatogonia intermedia y **C** Espermatogonias diferenciadas del grupo control (40X, campo claro, Lab. 2 p.p. UMIEZ-CII, FESZ-UNAM) Roldán *et al.*, 2020, 2021.

- **Calidad seminal**

El recuento de espermatozoides por mililitro de semen se muestra en la Tabla 5. Los ratones del grupo tratado con la dosis baja y alta de V_2O_4 , presentaron una densidad menor significativamente y la dosis media evidenció un aumento significativo ($p < 0.05$, t de Student) en comparación con los ratones del grupo control.

Tabla 5. Calidad seminal de ratones CD-1 tratados con diferentes concentraciones de V_2O_4 vía aérea

Tratamiento (mg/g)	Ratón (N)	Normal (%)	Cabeza (%)	Pza. media (%)	Flagelo (%)	Densidad ($\times 10^6$ cel./ml)
(T-)	1	16.00	28.75	32.25	23.00	68.87
	2	69.00	16.75	02.00	12.25	34.75
	3	74.50	09.75	02.75	13.00	44.50
	4	70.00	06.50	05.75	17.75	72.25
	5	69.25	15.00	03.75	12.00	48.62
<i>Media \pm DE</i>		59.75\pm24.55	15.35\pm8.53	9.30\pm12.9	15.60\pm4.75	59.79\pm19.05
(T+ MMC) [0.08]	1	30.50	04.00	08.00	57.50	73.00
	2	25.75	14.50	12.00	47.75	14.40
	3	15.00	05.50	07.50	72.50	60.37
	4	23.50	06.00	12.50	58.00	41.62
	5	50.25	05.75	06.50	37.50	35.12
<i>Media \pm DE</i>		29\pm13.13*	7.05\pm4.23*	9.3\pm2.75	54.65\pm13.0*	44.90\pm22.7*
V_2O_4 [1.5]	1	50.00	09.75	09.25	31.00	47.62
	2	39.50	09.00	15.50	36.00	45.00
	3	32.00	18.25	07.75	42.00	58.25
	4	49.00	21.00	10.00	20.00	57.37
	5	62.25	14.25	06.50	17.00	71.75
<i>Media \pm DE</i>		46.55\pm11.4*	14.65\pm5.23	9.80\pm3.46	29.20\pm10.5*	55.99\pm10.56*
V_2O_4 [3.0]	1	45.50	10.00	06.60	38.50	92.12
	2	73.75	08.75	05.75	11.75	72.75
	3	57.50	12.50	11.25	18.75	64.50
	4	56.00	15.50	08.25	20.25	56.50
	5	70.25	11.25	05.00	13.50	61.75
<i>Media \pm DE</i>		60.60\pm11.45	11.60\pm2.58	7.25\pm2.54	20.55\pm10.6*	69.52\pm13.93*
V_2O_4 [4.5]	1	37.25	15.00	11.50	36.25	32.37
	2	29.00	10.75	09.00	51.25	25.19
	3	30.50	20.00	07.25	42.25	16.45
	4	11.50	35.75	03.50	49.25	17.06
	5	22.00	04.00	06.75	67.25	16.00
<i>Media \pm DE</i>		26.05\pm9.77*	17.10\pm11.96	07.60\pm2.95	49.25\pm11.68	20.18\pm6.15*

Pza. Pieza media. Z para proporciones morfología * $p < 0.05$, **t-Student densidad**, * $p < 0.05$ con respecto al (T-), (media \pm desviación estándar).

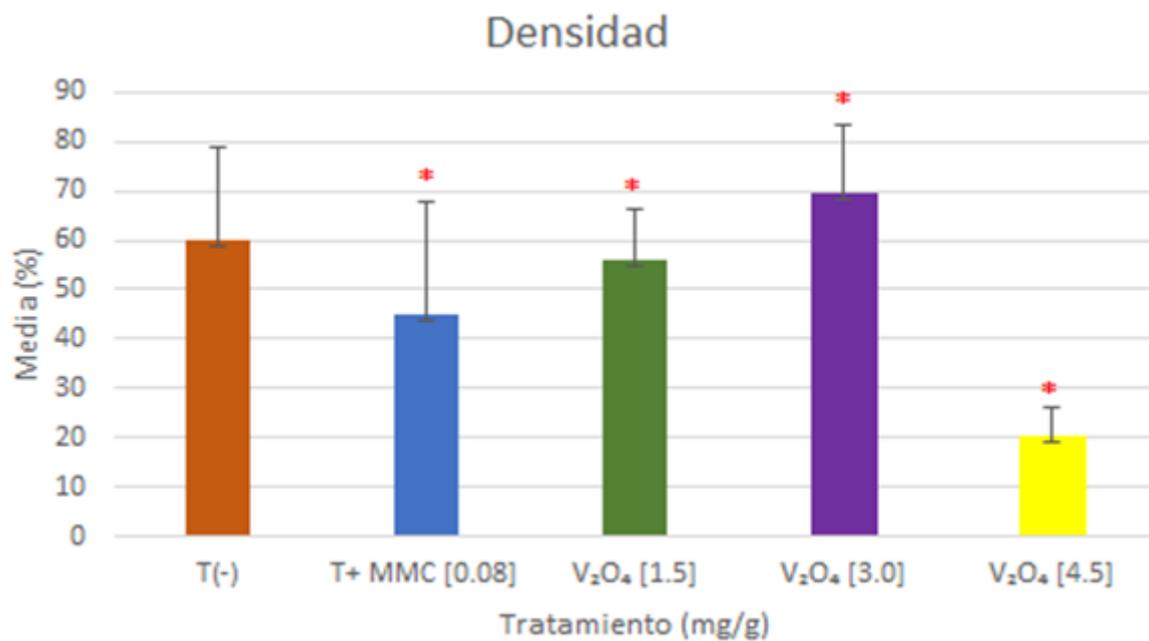


Figura 18. Densidad espermática de los ratones tratados con diferentes concentraciones de V₂O₄.
t-Student *p < 0.05 (media ± desviación estándar).

Para la morfología espermática, se observó aumento significativo ($p < 0.05$) en cuanto a las formas anormales del flagelo en las tres dosis de V₂O₄ con respecto al grupo control. El grupo tratado con la dosis baja y alta también presentó una diferencia significativa más baja en cuanto a las formas normales de los espermatozoides (Tabla 5).

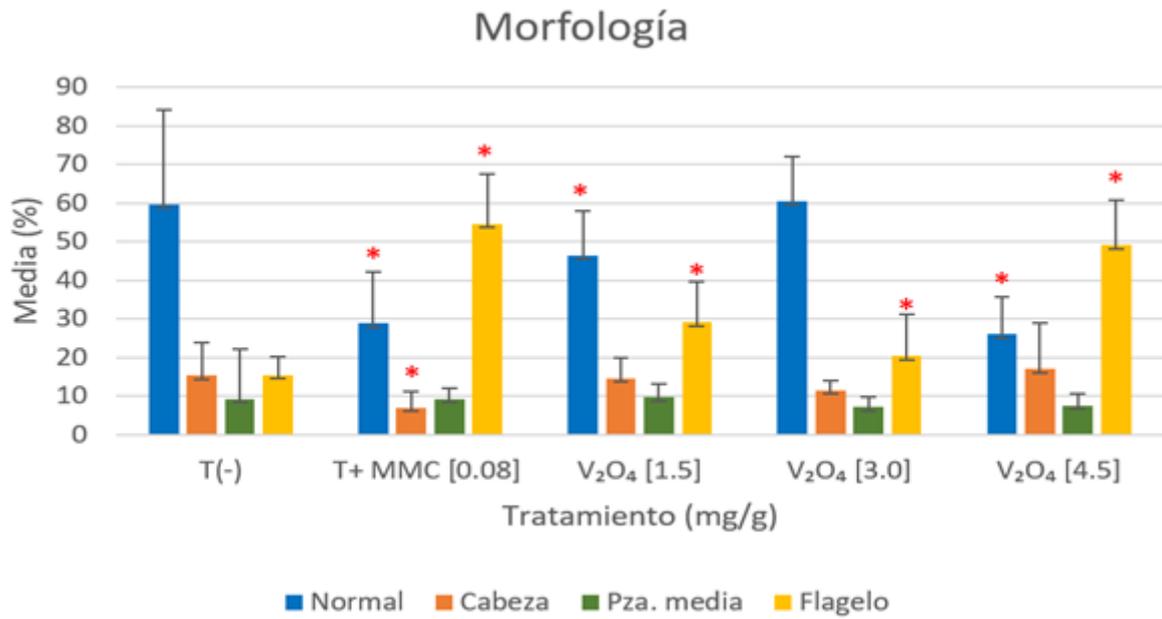


Figura 19. Morfología espermática de ratones CD-1 tratados con diferentes concentraciones de V₂O₄. Z para proporciones *p < 0.05 (media ± desviación estándar).

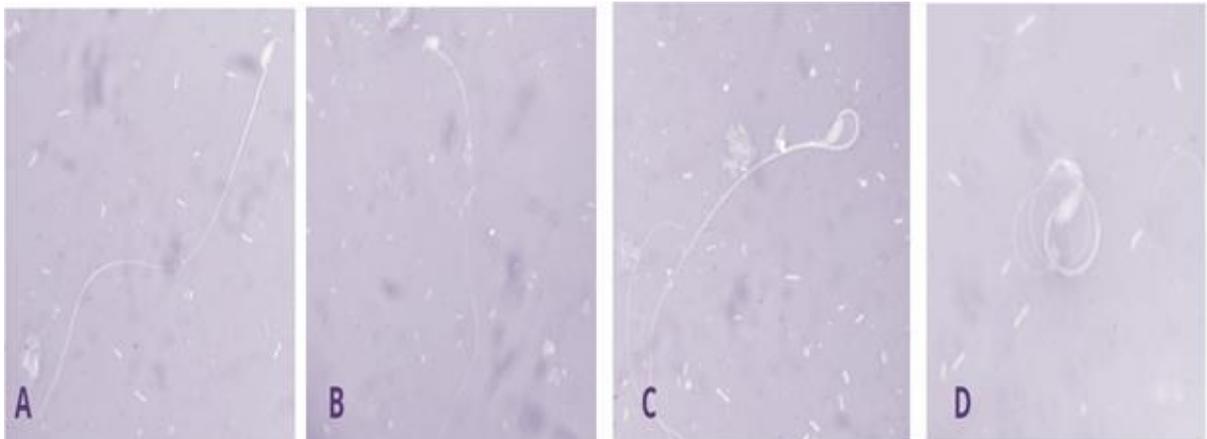


Figura 20. **A** Espermatozoide morfológicamente normal, **B** Espermatozoide con defecto en cabeza, **C** Espermatozoide con defecto en pieza media y **D** Espermatozoide con defecto en flagelo. (40X, campo claro, Laboratorio 2 pp. UMIEZ-CII, FESZ-UNAM) Roldán *et al.*, 2020(A,B).

Tabla 6. Análisis de correlación con coeficiente de Pearson (r) entre espermatogonias (Tipo A, INT y B) y densidad espermática.

Tratamiento (mg/g)	Densidad (x10 ⁶ cel./ml)	Espermatogonias (Tipo)	r	Correlación	Magnitud
Testigo Negativo	59.79	A	0.24	Positiva	Débil
		Intermedias	0.14	Positiva	Débil
		B	0.28	Positiva	Débil
Testigo positivo [MMC]	44.90	A	0.18	Positiva	Débil
		Intermedias	0.82	Positiva	Alta
		B	0.83	Positiva	Alta
V ₂ O ₄ [1.5]	55.99	A	0.82	Positiva	Alta
		Intermedias	0.57	Positiva	Moderada
		B	0.83	Positiva	Alta
[3.0]	69.52	A	0.49	Positiva	Moderada
		Intermedias	0.55	Positiva	Moderada
		B	0.89	Positiva	Alta
[4.5]	20.18	A	0.65	Positiva	Moderada
		Intermedias	0.93	Positiva	Alta
		B	0.20	Positiva	Débil

La correlación de Pearson mostró una relación positiva entre espermatogonias (Tipo A, INT y Tipo B) y densidad espermática en los tres grupos tratados con V₂O₄, demostrando el efecto citotóxico inducido por efecto inhalatorio del V₂O₄ en las espermatogonias generando en consecuencia un efecto reprotóxico, evidenciado por la disminución en **densidad** en dosis baja y alta y aumento en dosis media, eventos que podrían generar problemas como *oligospermia* y *polispermia*; y por tanto una *mala calidad seminal*. El grupo control negativo también presentó una correlación positiva entre densidad y espermatogonias, sin embargo, la correlación en este grupo es débil debido a que no existe alteración en la proporción espermatogonial y por lo tanto tampoco en densidad, en el testigo positivo la correlación positiva fue alta debido a que la Mitomicina C es un compuesto que produce daño celular capaz de afectar a las células germinales.

DISCUSIÓN

La actividad industrial produce sustancias cuyas aplicaciones repercuten positivamente en nuestra calidad de vida, pero cuando dichos compuestos presentes en el medio ambiente alcanzan concentraciones superiores o, se afecta el equilibrio natural puede suponer la aparición de trastornos en la salud de los individuos expuestos, algunos de ellos ligados al proceso reproductivo.

Proporción de espermatogonias

La espermatogénesis desarrollada en el epitelio de los túbulos seminíferos del testículo es un proceso cíclico altamente sincronizado que conlleva la proliferación, diferenciación y maduración de más de 20 tipos celulares distintos, el cual se vio alterado por efecto del V_2O_4 .

En este trabajo se seleccionaron ratones de 8 a 12 semanas de edad que fueron tratados con diferentes dosis de V_2O_4 . Los complejos de vanadio tienen la capacidad de estimular la proliferación celular, inhibirla o en algunos casos, exhibir un comportamiento bifásico, es decir, promover la proliferación celular a bajas concentraciones e inhibir este proceso a dosis altas (Evangelou, 2002).

Es por esto que los metalocompuestos de vanadio poseen efectos contrapuestos y éstos dependerán de la dosis utilizada, este **efecto bifásico** es lo que se pudo observar en los tratamientos realizados con diferentes dosis de V_2O_4 , en el que se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de **espermatogonias del tipo A o indiferenciadas** para los grupos tratados con las dosis baja y media con respecto al grupo control, mientras que en la dosis alta a pesar de también observarse un aumento significativo con respecto al grupo control, este fue menor a las dosis baja y media de V_2O_4 .

Lo que demuestra que el V_2O_4 a dosis bajas tuvo un **efecto mitogénico** sobre las espermatogonias de tipo A. Estos *efectos mitogénicos*, pueden estar mediados por la vía de las MAPKs, que activa indirectamente quinasas como las ERKs y la PI3-K. Las ERKs a su vez estimulan distintos factores de transcripción que promueven el ingreso

de la célula en el ciclo celular y así su proliferación (Pandey *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1999). La activación de la PI3-K activa la vía de las ERKs y la PKB aportando a través de ambas vías a la acción mitogénica del vanadio, aumentando en mayor número las espermatogonias Tipo A para las dosis media y baja (Wilkinson y Millar, 2000).

Por otro lado, en la dosis alta el efecto del V_2O_4 sobre las espermatogonias de Tipo A fue contrario a las dosis baja y media; mostrando un efecto anti proliferativo que ocasiono un menor número de este tipo de espermatogonias. Los efectos anti proliferativos de los compuestos de vanadio son producidos en su mayoría a través del arresto del ciclo celular mediado por la inhibición de PTPasas (Proteína Tirosina Fosfatasas) y generación de estrés oxidativo, por lo que el vanadio en sus diversas formas puede arrestar las distintas fases del ciclo celular y disminuir el número de espermatogonias Tipo A en dosis altas (Morinville *et al.*, 1998; Evangelou, 2002).

La evidencia toxicológica inducida por el V_2O_4 se muestra en el aumento de las espermatogonias del **tipo B o diferenciadas**, en los grupos tratados con la dosis media y alta, ya que son células que proliferan con menor frecuencia y al verse expuestas a componentes mutagénicos y genotóxicos como lo es el V_2O_4 estas comienzan a proliferar con una mayor frecuencia para poder restaurar la población de células que han sido dañadas, el aumento de espermatogonias tipo B en la dosis alta también ocurre como consecuencia de la disminución de las espermatogonias tipo A en esta misma dosis obteniendo así una disminución en número y en proporciones similares de las espermatogonias del tipo intermedias.

Contaminantes ambientales como el Vanadio participan por diferentes mecanismos que incluyen factores intrínsecos que generan anomalías en la espermatogénesis ya sea de origen genético o durante el desarrollo del gameto masculino y un remodelamiento insuficiente de la cromatina. Estos factores además propician la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son inductoras de eventos apoptóticos, alterando de manera directa la proporción de espermatogonias.

Diversos compuestos de vanadio intervienen en la fosforilación de proteínas claves en las vías de señalización relacionadas con la producción de ROS y daño al ADN. Algunas de estas proteínas involucradas en esas vías son la AP-1, MEK-1, ERK-1,

JNK- 1, PI3-K y NF- κ B. (Pandey *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1998; Morinville *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 1999).

La generación de ROS inducida por compuestos de vanadio puede producir daños en la mitocondria y generar la liberación de citocromo c la cual activa a diversas caspasas. Estas caspasas activadas (caspasa-3 y caspasa-8) provocan aún más daños en la mitocondria y activan a sustratos como poli (ADP-ribosa) - polimerasa, conduciendo a la apoptosis (Green y Reed, 1998; Burkle, 2000).

Estas células germinativas al no estar protegidas por la barrera hematotesticular por su localización en el compartimiento basal de los túbulos seminíferos, es decir, que se encuentran entre la membrana basal y las tight junctions, con frecuencia son afectadas por una variedad de agentes mutagénicos que no solo interactúan con el ADN, sino que también interfieren en el equilibrio existente entre la supervivencia y apoptosis durante la espermatogénesis, lo que genera modificaciones tanto en las características morfológicas de las células espermáticas, como un desequilibrio en la población de espermatogonias y en consecuencia producciones alteradas de espermatozoides como muestra el coeficiente de correlación de Pearson en las tres dosis de V_2O_4 donde la densidad espermática se ve alterada en función del número de espermatogonias llegando a ocasionar problemas de infertilidad como lo son la oligospermia y polispermia.

La apoptosis en el proceso de espermatogénesis juega un papel muy importante, ya que se encarga de controlar el número de células germinales eliminando a las que suelen ser afectadas por agentes mutagénicos; por lo que debe de existir un balance entre la apoptosis y proliferación celular, para mantener la homeostasis, sin embargo agentes externos como él V_2O_4 logran romper este equilibrio, generan disminución en algunos tipos de espermatogonias como las de tipo intermedio y aumento en los otros tipos de espermatogonias (Tipo A y Tipo B), evento que se visualizó en el presente trabajo para las tres dosis utilizadas (Shaha *et al.*, 2010).

Una de las causas que desencadenan la apoptosis es la sobreproducción de ROS por parte de la mitocondria debido a un desarreglo de la cadena transportadora de electrones, que genera *lipoperoxidación* de la membrana. Este evento favorece dos procesos, el primero es la salida de los componentes mitocondriales tales como el citocromo C que desencadenaran la apoptosis intrínseca (Aitken y Baker, 2013). La

oxidación del colesterol de la membrana es otro desencadenante, ya que favorece que la membrana de la mitocondria sea más fluida y favorece la cascada intrínseca de la apoptosis (Aitken, 2011).

Durante este proceso se ha visto que la vía intrínseca de la apoptosis es la que lleva la batuta. Bax y Bad, citocromo C, caspasa 2, 8 y 9 se han visto involucradas, mientras que la familia de Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w, también están involucradas en la regulación, como anti apoptóticas (Xu *et al.*, 2016). Sin embargo, la vía de la apoptosis comandada por Fas también se ha visto expresada en testículo y se ha visto implicado en el mecanismo de control de calidad de los gametos, cuando expresan el receptor a través de la activación de caspasa 3 (Galluzzi *et al.*, 2015).

Algunos estudios realizados por Bellvé *et al.* (1977) sobre mutagénesis química indican que ocurre daño en las fases tardías de la espermatogénesis y daño no permanente en la espermatogonia, gracias a este proceso de auto regulación mediado por la apoptosis.

El promedio de espermatogonias Tipo A obtenido en nuestro protocolo experimental concuerda con los valores previamente descritos por otros autores como Bellvé *et al.* (1977) donde demuestra la eficiencia de las columnas de *Percoll* para realizar la obtención de fracciones enriquecidas en espermatogonias indiferenciadas; donde se obtuvo un gran porcentaje de las células germinales localizadas en los túbulos seminíferos correspondiente a la fase celular indiferenciada o espermatogonias tipo A en ratones; ya que el mayor porcentaje de espermatogonias encontradas en este trabajo fueron también las correspondientes al Tipo A.

Con el análisis de los resultados descritos y con respecto a la cantidad de células dañadas, se aprecia que los momentos de mayor susceptibilidad se dan durante la proliferación de espermatogonias de tipo B en la dosis media y alta de vanadio ya que en circunstancias normales no tienen actividad proliferativa, pero entran en mitosis cuando las espermatogonias Tipo A comienzan a descender (Gonzales y Gonzales, 2017), evento que se presentó pero únicamente en la dosis alta de V_2O_4 , lo que generó una disminución en densidad espermática para esta dosis y según el coeficiente de correlación de Pearson existe una estrecha relación entre espermatogonias Tipo A y densidad espermática para esta dosis, recordando que

este tipo de espermatogonias (Tipo A) son las que cumplen la función de reserva y dan origen a los tipos de espermatogonias subsecuentes (INT y Tipo B) (Gonzales y Gonzales, 2017) por lo que un número reducido de espermatogonias Tipo A presenta una correlación positiva con la densidad que fue significativamente menor en comparación con el control negativo; por el contrario en la dosis media podemos observar un efecto mitogénico tanto en espermatogonias Tipo A y Tipo B, es decir que el efecto del V_2O_4 indujo a la proliferación de estos tipos de espermatogonias, el coeficiente de correlación de Pearson mostró una correlación positiva entre los tres tipos de espermatogonias y el aumento en la densidad lo que podría ocasionar problemas de infertilidad como la polispermia (Gonzales y Gonzales, 2017), otro momento donde se logró observar daño celular fue en la disminución de las espermatogonias del tipo intermedias ya que en las tres dosis sus porcentajes disminuyeron considerablemente, probablemente por los eventos apoptóticos inducidos por el V_2O_4 .

Estudios (Oakberg y Diminno, 1960) han demostrado que las poblaciones más sensibles a la acción de contaminantes ambientales, como los metales pesados (ej., vanadio), son las espermatogonias tipo B y los espermatocitos.

Oreallan *et al.* (1983) indican que una desorganización del túbulo indicaría una lesión a nivel de las células espermatogénicas tipo A, lo que no es de extrañar, ya que ellas mediatizan las sustancias que llegan a las células espermatogénicas intermedias y de tipo B. Lo que advierte una alteración de las poblaciones de espermatocitos y espermatidas, esto indicaría daño en espermatogonias intermedias siendo estas las poblaciones más sensibles a la citotoxicidad ya que son las que mostraron disminuciones significativas para las tres diferentes dosis de V_2O_4 , lo que ocasiona alteración en espermatogonias tipo B y como consecuencia en la densidad espermática y el daño en espermatocitos y espermatidas indican alteraciones en la morfología.

Así parece ser que la capacidad de reparación desempeña un papel importante frente a los agentes genotóxicos y desde un punto de vista teleológico es obviamente más importante la capacidad de reparación de células germinales que la de somáticas y, dentro de germinales, las células troncales tendrán una mayor y más efectiva capacidad de reparación ante la acción genotóxica (Russell, 1984; Moran, 2014).

Cuando el efecto mutagénico tiene lugar en las células somáticas produce cambios en la información genética, con la aparición de células potencialmente malignas en el individuo. De manera alterna, si el daño genético tiene lugar en las células germinales, este se manifiesta en malformaciones y afectación fisiológica, alterando la capacidad y/o calidad reproductiva de la especie (Moran, 2014).

Después de las diferentes exposiciones a V_2O_4 , podríamos deducir que la sensibilidad de las células germinales dependería de:

1. La calidad del compuesto tóxico, ya que a diferentes concentraciones se producen diferentes efectos.
2. La sensibilidad para buscar el daño en cada población depende de la capacidad de las células.
3. Y concordante a lo propuesto por Russell (1984), la sensibilidad de cada población estaría en relación inversa a su capacidad de reparación.

El V_2O_4 al considerarse un tóxico reproductivo afecta negativamente al sistema reproductivo masculino **causando una perturbación directamente sobre la espermatogénesis**, como la que se logró observar en los grupos tratados.

Calidad seminal

Densidad

En el grupo tratado con la dosis baja de V_2O_4 la densidad obtenida fue significativamente menor en relación al control negativo; obteniendo también una correlación altamente positiva entre espermatogonias de tipo B y densidad para la dosis ya mencionada en el coeficiente de correlación de Pearson, por lo que la densidad disminuida es una característica que probablemente se relacione con un menor índice de división de las espermatogonias de tipo B que son las células generatrices del linaje espermático, es importante que recordar que el porcentaje de este tipo de espermatogonias para el grupo tratado con dicha dosis fue relativamente menor al control; lo que produjo en un menor número de espermatozoides para esta dosis.

Para el grupo de la dosis media la densidad obtenida fue mayor en comparación con nuestro grupo control negativo, probablemente porque las espermatogonias de tipo B en el grupo tratado con esta dosis aumentó significativamente lo que generó por lo tanto un mayor número de espermatozoides y de igual manera una correlación positiva entre este tipo de espermatogonias y la densidad.

En la dosis alta la densidad disminuye significativamente en comparación con nuestro grupo control, en este grupo las espermatogonias de tipo A también disminuyeron significativamente viéndose más dañadas por lo que la disminución en densidad podría estar relacionado con la disminución de este grupo de espermatogonias teniendo en cuenta que las espermatogonias de Tipo A son las células madre de la espermatogénesis.

Estudios realizados en ratas demuestran que la exposición a sulfato de vanadio ocasiona disminución de la movilidad espermática por inhibición de la síntesis de fructosa, así como disminución de la densidad espermática y atrofia de los túbulos seminíferos (Jain *et al.*, 2007), tal y como se observa en la dosis baja y alta de V_2O_4 en donde se vio afectada la calidad seminal al disminuir la densidad, lo que demuestra y refuerza la idea de que el Vanadio es capaz de alterar los procesos de la espermatogénesis al disminuir la calidad seminal de los individuos; algunos autores como Pastor *et al.*, 2011 indican que estas alteraciones están causadas por una disminución en el número de espermatogonias proliferantes por alteración del microambiente de las espermatogonias que afecta directamente a la actividad proliferativa de las mismas, lo que se corrobora con el coeficiente de correlación de Pearson calculado en el presente trabajo donde se obtuvo una correlación positiva entre espermatogonias y densidad para todas las dosis de V_2O_4 .

Resultados similares se han encontrado en trabajos relacionados con la exposición a diferentes agentes mutagénicos, autores como Whorton *et al.*, 1997 determinaron que la exposición a *1,2-dibromocloropropano (DBCP)* redujo la concentración de espermatozoides en los eyaculados desde un valor medio de 79 millones células/ml a 46 millones células/ml, la biopsia testicular reveló que el objetivo del DBCP eran las espermatogonias, así como sucedió en el presente estudio donde el objetivo del V_2O_4 también fueron las espermatogonias.

Mattison *et al.*, 1990 demostraron que varones que trabajaban en la fabricación del nematocida 1,2-dibromocloropropano (DBCP) experimentaron un ascenso de los niveles séricos de LH y FSH y una reducción del número de espermatozoides y por lo tanto de la fertilidad; estos efectos parecen ser secuelas de las acciones sobre las espermatogonias lo que altera la producción o la acción de los espermatozoides. A diferencia del trabajo de Mattison *et al.*, 1990, en este estudio no se cuantificaron las concentraciones de hormonas, sin embargo, explican la gravedad del efecto resultante cuando el objetivo de los agentes mutagénicos como el V_2O_4 , son las células madre de los espermatozoides o espermatogonias.

Otro ejemplo sobre la acción de los compuestos metálicos es el trabajo de Akinloye *et al.*, 2016 donde se reporta la relación entre la exposición a cadmio e infertilidad en hombres nigerianos normozoospermicos, oligozoospermicos y azoospermicos. Hombres con altas concentraciones de cadmio en plasma seminal presentaron valores más bajos en densidad espermática; es importante destacar que en el tratamiento realizado con la dosis alta de V_2O_4 fue donde se obtuvo en promedio la densidad más baja, *por lo que nuestros resultados coinciden con Akinyole, es decir exposición a altas dosis de metales pesados ocasionan efectos más dañinos para la densidad, que las dosis bajas.*

Investigadores de la Universidad de Rosario en Argentina plantean que los factores que comprometen la densidad y la morfología espermática se asocian con un mayor número de células espermáticas inmaduras. Se ha supuesto que estos compuestos se asocian a la disminución de gonadotropinas liberadas por la hipófisis, lo que estimula el desarrollo de los testículos. Se ha comprobado que la exposición al aire contaminado con metales pesados se asocia también a la disminución de hormonas necesarias en la espermatogénesis (Balitán *et al.*, 2015).

La contaminación química producida por metales pesados puede resultar nocivos o tóxicos a corto, medio o largo plazo ocasionando daños a la salud pública; razón por la que elementos como el mercurio, plomo, cadmio, níquel y el **vanadio** son muy relevantes desde el punto de vista toxicológico y con frecuencia son estudiados, Hernández-Ochoa *et al.*, 2005 evaluaron los efectos medioambientales del plomo sobre la calidad y cromatina espermática en hombres mexicanos. Las

concentraciones de plomo fueron medidas, en este caso, en fluido seminal y en sangre, como biomarcadores de exposición urbana. En este caso se encontró una alteración de determinados parámetros como una disminución en la densidad espermática, pero solo a concentraciones bajas de plomo en fluido seminal; estos resultados fueron similares a los del presente trabajo, *donde también se observó disminución en la densidad, a bajas concentraciones de V_2O_4 .*

Los trabajos realizados por Hernández-Ochoa *et al.* (2005) ya mencionados rectifican que los metales tienen niveles óptimos de concentración y por encima de estos resultan ser tóxicos, hecho que también se observó en los tratamientos realizados con V_2O_4 ; este y los metales que han sido mencionados hasta ahora como el plomo y el cadmio tienen como características similares que su toxicidad depende de su vía de administración, que la concentración puede aumentar o disminuir sus efectos tóxicos sobre las células espermáticas y sobre todo el que este tipo de metales son fundamentales para la industria y que suelen afectar directamente la función reproductiva de los individuos; razón que justifica la revisión este tipo de trabajos y su consecuente comparación con nuestro trabajo.

Ya que la espermatogénesis puede alterarse como consecuencia de diversas lesiones del epitelio germinal ocasionadas por agentes mutagénicos, este tipo de lesiones generan alteraciones en la producción de espermatozoides según la severidad de la alteración espermatogénica y existen tres tipos de lesiones del epitelio germinativo (ausencia de epitelio germinal, hipo espermatogénesis y bloqueo madurativo de la espermatogénesis) (Vendrell, 2003).

Todas estas lesiones generan una disminución de la producción de espermatozoides, causando alteraciones clínicas como oligozoospermia o azoospermia según la severidad de la alteración; en nuestros resultados se vio alterada la proporción de espermatogonias Tipo A y Tipo B produciendo aumentos y descensos en la densidad espermatogénica por el comportamiento bifásico del V_2O_4 que estimula e inhibe la proliferación a diferentes dosis, motivo por el cual la densidad también se ve alterada de distintas maneras como se muestra en el coeficiente de correlación de Pearson.

El conteo promedio de cada tipo celular germinal permite caracterizar estas diversas alteraciones en el epitelio germinativo (Vendrell, 2003).

La *hipo espermatogénesis* se refiere a una producción de cifras anormalmente bajas de espermatozoides causada por una disminución global y proporcional del número de espermatogonias, esto puede ser congénita o adquirida por factores externos y medioambientales como la contaminación por metales pesados como ocurrió con los grupos tratados con vanadio, donde la densidad se vio alterada en función de las proporciones espermatogoniales.

El análisis estadístico de correlación con coeficiente de Pearson (r) establece que hay una estrecha correlación positiva entre densidad y los tres tipos de espermatogonias (**Tipo A, Intermedias y Tipo B**) para las tres dosis de V_2O_4 , por lo que la densidad depende totalmente de manera directa del aumento o disminución del porcentaje espermatogonial.

El bloqueo madurativo de la espermatogénesis ocurre en cualquier estadio de la línea celular germinal (**espermatogonia**, espermatocito primario, espermatocito secundario, espermátidas redonda o inmadura), afectando a todas o algunas líneas celulares germinales. Se caracteriza por un bloqueo en la maduración de un determinado tipo celular **con disminución de los tipos celulares subsiguientes**; como ocurrió en los grupos tratados con V_2O_4 donde la disminución de algunos porcentajes de espermatogonias se vio reflejado en la densidad; debido a que un *bloqueo espermatogénico conlleva a una disminución de la producción de espermatozoides* llegando a causar oligozoospermia o azoospermia (Vendrell, 2003, Castillo y Roldán, 2021).

Las alteraciones en la densidad de los espermatozoides nos sugieren efectos tóxicos posttesticulares ocasionados por la acción del V_2O_4 , por lo tanto, el tipo o el momento de exposición a un compuesto tóxico pueden indicar el destino de la sustancia tóxica, en este caso las espermatogonias y los análisis seminales de individuos que han sido expuestos inadvertidamente a estos compuestos aportan información valiosa sobre las lesiones genéticas en los espermatozoides; además varios estudios indican que la exposición paterna puede generar resultados adversos en el embarazo (Ehling *et al.*, 1978).

Por lo que las alteraciones en la densidad espermática detectadas podrían tener sus causas en el periodo embrionario, (es decir, originarse antes incluso del nacimiento de esos varones) y presentarse en poblaciones cercanas a zonas altamente industrializadas donde el embrión se encuentre fácilmente expuesto a los **disruptores endocrinos** a través del cordón umbilical, estas alteraciones se han encontrado en jóvenes y hombres mayores, en zonas con mayor índice de industrialización (Balitán *et al.*, 2015).

La producción de espermatozoides es un proceso complejo y precisa el funcionamiento normal de los testículos, así como del hipotálamo y de la hipófisis, órganos que se encuentran en el cerebro y que producen hormonas que desencadenan la producción de esperma; como ya se ha revisado en otros estudios mencionados en este escrito el daño por acción de los compuestos mutagénicos, genotóxicos y citotóxicos comienza desde la función endocrina, a diferencia de ellos este trabajo se centró en el daño ocasionado en la fase proliferativa o espermatogónica que es de gran importancia ya que son las espermatogonias las que aseguran que la dotación genética sea correcta para que no haya problemas en etapas posteriores.

Problemas con cualquiera de estos sistemas pueden afectar la producción de espermatozoides; las alteraciones de hormonas, al igual que las de otros sistemas, como las glándulas tiroideas y suprarrenal.

Morfología

El análisis de la estructura de los espermatozoides descrito en el presente trabajo reveló aumentos significativos en los ratones tratados con las tres diferentes dosis de V_2O_4 y el grupo control en las formas del flagelo. Si bien el grupo tratado con la dosis media no presentó diferencias significativas en cuanto a las formas normales de los espermatozoides; para los machos de los grupos tratados con la dosis baja y alta sí se observó una disminución significativa.

Varios estudios han demostrado que el análisis de la morfología espermática puede resultar útil para predecir la tasa de fertilización en programas de fertilización *in vitro*

(FIV), ya que el porcentaje de formas normales está altamente relacionado con la capacidad fecundante *in vivo* (Marnet *et al.*, 2000) y con la capacidad de desarrollo de los embriones, por lo cual **es de gran importancia contar con una buena concentración de espermatozoides morfológicamente normales**, por lo que factores como la densidad y morfología juegan un papel muy importante a la hora de evaluar calidad seminal (Castillo y Roldán, 2021).

De hecho, Ron *et al.* (1991) y Parinaud *et al.* (1996) han demostrado que un porcentaje elevado de formas espermáticas anormales, se asocian con fallos en la fertilización, una mala morfología embrionaria y un bajo número de embarazos, las principales causas de aparición de estas anomalías morfológicas suelen ser, ***alteraciones citogenéticas por exposición a genotóxicos.***

Por lo que la relación entre infertilidad masculina y la proporción de formas anormales en el eyaculado, es objeto de estudio de muchos investigadores, pues el porcentaje de espermatozoides normoformos es una de las variables que mejor se relaciona con la fertilidad masculina.

Las anomalías morfológicas ya sea en cabeza, pieza media o flagelo son de gran relevancia ya que pueden tener un **origen genético**, de ahí la importancia de presentar una correcta morfología ya que un espermatozoide cuya información genética, la mitad del futuro embrión, no esté bien codificada y organizada no dará lugar a un embrión viable (Mestre, 2015).

En el presente trabajo predominó un aumento en el porcentaje de anomalías en flagelo para los grupos tratados con las dosis baja, media y alta. La presencia de este tipo de alteración a nivel del flagelo del espermatozoide es de gran relevancia, ya que contiene una proteína llamada dineína, siendo la proteína más importante asociada a los microtúbulos. La dineína es clave para el movimiento de flagelos y además es un generador de fuerza para el movimiento de cromosomas durante la mitosis (Eshel *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993; Carminati y Steams, 1997; Lee *et al.*, 2005) *por lo que un flagelo irregular podría generar problemas en el reparto de cromosomas, y ante todo, su movimiento no podrá competir con el bateo de un espermatozoide normoformo lo que se vería reflejado en la movilidad de los espermatozoides* (Mestre, 2015).

Ligado a esto se ha descrito que la mayoría de los metales pesados ejercen su efecto directamente sobre la espermatogénesis dando lugar a la alteración de la calidad seminal en parámetros como la morfología, ya sea por la generación de *radicales libres (ROS)* incrementando el estrés oxidativo o la producción de anticuerpos en individuos susceptibles.

Las especies reactivas de oxígeno son subproductos del metabolismo aeróbico, producidos durante la actividad normal mitocondrial y cuya acción se contrarresta por el sistema antioxidante endógeno. En el espermatozoide se producen radicales libres constituyendo parte normal de reacciones adaptativas como el proceso de capacitación. Sin embargo, un número de tóxicos externos puede contribuir a una producción incrementada de **ROS** e inflamación en el testículo y epidídimo, aumentando el estrés oxidativo y dando lugar a alteraciones en la calidad seminal, y por tanto un aumento del factor de infertilidad masculina, ya que dichos efectos negativos se han relacionado con los principales parámetros espermáticos: **densidad, morfología**, movilidad, volumen, alteración de **ADN espermático** así como alteración en las hormonas reproductivas masculinas.

Este estrés oxidativo se ha identificado como factor crucial en la infertilidad masculina debido a la peroxidación lipídica en la membrana de las células espermáticas.

Uno de los principales mecanismos de toxicidad directa de los metales pesados es la inhibición mediante mecanismos moleculares. Por ejemplo, la enzima creatina quinasa (CK) se distribuye ampliamente en células que requieren grandes cantidades de energía, como el espermatozoide, siendo su principal función la de proporcionar un sistema de taponamiento de ATP. Para su actividad, la enzima requiere la presencia de magnesio (Mg⁺²) y grupos sulfhidrilo (-SH) en su lugar de activación. Los metales pesados podrían reducir su actividad en el espermatozoide de humano a través del desplazamiento del Mg⁺² en su sitio activo e incluso podrían también actuar como inhibidores competitivos de dicha enzima en el espermatozoide.

Los iones son importantes en la regulación de mecanismos fisiológicos animales como por ejemplo la fecundación. Para que se produzca la unión entre el

espermatozoide y el ovocito debe producirse una serie de procesos como la reacción acrosómica (RA) del espermatozoide.

La RA se induce por la unión del espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito que se requiere para la penetración de este hasta el oolema del ovocito y se produzca la fecundación y el posterior desarrollo embrionario.

Esta reacción envuelve la activación secuencial en la cabeza del espermatozoide del canal de K^+ dependiente de energía VGKG y los canales iónicos de Ca^{+2} dependientes de energía L-VDCC. Estos canales por tanto están involucrados en los eventos tempranos de la RA, y es de crucial importancia señalar que **los canales de calcio (Ca^{+2}) y potasio (K^+) son sensibles al envenenamiento por metales pesados**. Cada tipo de canal se compone de múltiples subunidades y se han identificados multitud de isoformas de canales de K^+ y Ca^{+2} tanto en testículo como en espermatozoides. Las diferentes isoformas son el resultado de cambios en las secuencias genómicas e influyen en las características del poro de conducción iónico. Los polimorfismos genéticos en estos canales iónicos podrían regular la resistencia o susceptibilidad individual a la exposición ambiental a metales pesados (Mendiola *et al.*, 2007).

Los cambios morfológicos y funcionales en las células testiculares que provocan la muerte celular sugieren alteraciones del citoesqueleto producidas por el Vanadio, Rodríguez *et al.*, 2013 asociaron que la inhalación de Vanadio en ratones produce cambios en la actina del citoesqueleto de células testiculares, lo que podría desencadenar una calidad seminal disminuida (morfología, densidad y motilidad) efecto que también se observó en nuestro grupo tratados con V_2O_4 y la posible asociación entre la infertilidad y la contaminación del aire (Laragione *et al.*, 2003).

El flagelo del espermatozoide puede presentar varios defectos que afectan a su movimiento principalmente. Entre ellos, encontramos el flagelo corto, el flagelo doble o múltiple, el flagelo en horquilla, flagelo roto, doblado (ángulo mayor de 90°), enrollado y el flagelo de espesor irregular.

El porcentaje aumentado de anomalías a nivel del flagelo descritos en el trabajo consisten en un gran número de flagelos enrollados. La mayoría de estas anomalías

podrían ocasionar un problema de infertilidad conocido como **astenoteratozoospermia** porque estos espermatozoides no se mueven de manera adecuada; estudios han observado directamente la acción molecular de la **dineína**, una sustancia proteínica que se encuentra en las células que dan movilidad al espermatozoide, formada por tubos estrechos y huecos, en casos similares ocasionando problemas en la movilidad del esperma (Vernos, 2016).

Rodríguez *et al.* (2013) sugieren que la causa probable de alteración de la motilidad progresiva es por defectos en la pieza principal del flagelo y, probablemente, un exceso de citoplasma residual provocada por la interacción y exposición a agentes contaminantes como lo suele ser el Vanadio.

Por otra parte, los espermatozoides con alteraciones morfológicas podrían generar especies reactivas de oxígeno por la exposición a metales pesados, que están asociadas a daños al ADN, en el genoma nuclear y mitocondrial, lo cual se relaciona con una disminución de la capacidad de fertilización de los espermatozoides involucrados.

Telisman *et al.* (2000) llevaron a cabo un estudio para analizar la calidad seminal y los niveles de hormonas reproductivas en trabajadores sanos que se encontraban expuestos a Cadmio; en este estudio se encontró una alteración de la morfología espermática (con mayor afectación en el flagelo del espermatozoide) como sucedió con los grupos tratados con V_2O_4 , incluso a bajas concentraciones de cadmio medidos en sangre total, por lo que se podría deducir que las alteraciones a nivel del flagelo podrían estar ocasionadas por una mala espermiogénesis consecuencia de la exposición a metales pesados como el Cadmio y **Vanadio**, los cuales aumentan considerablemente la generación de ROS y por ende una mala morfología en el flagelo como sucedió en el presente trabajo.

Las anomalías de la cabeza del espermatozoide fueron las segundas que se presentaban con mayor frecuencia en los tres diferentes grupos tratados con V_2O_4 , con una mayor predominancia en el grupo de ratones que recibió la dosis alta, reportan algunos autores como Kably-Ambe *et al.* (2013) que dichas anomalías están fuertemente vinculadas a la fragmentación del ADN.

Durante la citodiferenciación se produce un recambio de **histonas** principalmente H1 por **protaminas**, estudios confirmaron la relación entre un contenido anormal de protaminas y alteraciones en los parámetros seminales como la morfología (Mengual et al., 2003; Aoki et al., 2005).

Otro ejemplo de efecto tóxico que repercute en la morfología es la exposición al dibromuro de etileno (EDB), cuya acción es directamente sobre la espermatogénesis/**espermioogénesis** en donde se presentaban más espermatozoides con cabeza fusiforme y un menor número de espermatozoides en la densidad, resultados similares a los de este trabajo en donde como ya se mencionó la densidad fue uno de los parámetros que se vio afectado por la acción del vanadio (Ratcliffe *et al.*, 1997).

Existe un considerable consenso en que la exposición a concentraciones altas de metales pesados, e incluso moderadas, en fluidos biológicos podrían estar relacionadas con problemas de fertilidad.

El molibdeno está presente en agua potable y alimentos a bajas concentraciones, como lo está también el Vanadio. Meeker *et al.* (2009) llevaron a cabo un estudio, para explorar la relación entre exposiciones ambientales a metales y su función reproductiva masculina. En este caso se encontraron asociaciones significativas, dependientes de la dosis entre las concentraciones de molibdeno en sangre y baja concentración y porcentaje de formas normales espermáticas, el molibdeno puede tener un efecto bifásico en el que al igual que el vanadio tenga diferentes efectos a distintas dosis, razón por la que nuestros resultados no se comportan de manera lineal.

Eggert-Kruse *et al.* (1996) demostró que la morfología espermática tiene una gran influencia en la interacción entre los espermatozoides y el moco cervical, y, de igual manera, Bianchi *et al.*, 2004 demostraron que también actúa como barrera frente al paso de espermatozoides con anomalías estructurales en la cromatina y en el DNA.

Este proceso de selección se basa en el diferente patrón de movilidad que muestran los espermatozoides con una morfología normal frente a los de morfología anormal, recordando que las anomalías en flagelo son las responsables de la disminución

en la movilidad, ya que éstos son incapaces de nadar correctamente a través del moco, y por ese motivo el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales es mayor en el moco cervical que en el eyaculado. Son muchos los estudios que demuestran que los parámetros de motilidad y morfología de la muestra seminal influyen en la tasa de gestación (Van Voorhis *et al.*, 2001; Karabulut y Tekin, 2013).

Parinaud *et al.* (1996) en un estudio observó una fuerte relación entre la motilidad y el porcentaje de formas normales. Además, al relacionar la morfología con la motilidad, observaron que, de entre las anomalías morfológicas estudiadas, el acrosoma es el que tiene una mayor influencia sobre la motilidad progresiva, mientras que las anomalías en el flagelo serían las segundas en tener influencia sobre la motilidad del espermatozoide, en el presente trabajo no se evaluó la motilidad, sin embargo al haber obtenido un porcentaje elevado de anomalías en el flagelo seguidas por anomalías en la cabeza del espermatozoide y con la información revisada del estudio de Parinaud se puede deducir que la motilidad de los ratones se vería severamente afectada disminuyendo su calidad reproductiva.

En el estudio de Karabulut y Tekin (2013) también se observó que los espermatozoides morfológicamente anormales tienen una motilidad inferior. También relacionaron estos parámetros con la densidad espermática, observándose que también existe una relación entre la densidad y la morfología ya que se han encontrado varones con recuentos inferiores a 5 millones de espermatozoides/ml que presentaron un porcentaje de espermatozoides normales inferior al 4%, en los grupos tratados con V_2O_4 también se observó que la densidad y la morfología tenían cierta relación, ya que los grupos tratados con la dosis baja y alta presentaron densidades más bajas que la dosis media y de igual manera sucedió con las formas normales de los espermatozoides donde en estas mismas dosis el porcentaje de dichos espermatozoides fue relativamente menor que en la dosis media.

Las anomalías del flagelo observadas en los grupos tratados con V_2O_4 y según los estudios revisados resultaran en una disminución del batido flagelar que incide directamente sobre la capacidad de desplazamiento del espermatozoide a lo largo del tracto genital femenino y sobre el proceso de capacitación, imposibilitando el proceso de fecundación; efecto que puede ser mediado por la inhibición de la $ATPase Na^+/K^+$, dineína o de enzimas que participan en la glucólisis (Mendiola *et al.*, 2007).

El vanadio entra a las células en forma de vanadato (VO_3^-), y bajo un pH fisiológico, es reducido a Vanadil (VO_2^+), catión que interactúa con diversas moléculas. Dicho metal pesado es capaz de inhibir enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), provocando la acumulación de intermediarios metabólicos de la vía glucolítica, así como la disminución de la concentración de ATP (Mendiola *et al.*, 2007).

El vanadio, en sus distintos compuestos químicos, es capaz de interactuar con múltiples moléculas en sistemas biológicos, alterando el comportamiento de los mismos de diversas maneras. El potencial reproductivo masculino resulta afectado por este metal; sin embargo, el mecanismo bajo el que el vanadio ejerce su efecto deletéreo sobre los distintos parámetros espermáticos apenas comienza a ser elucidado.

CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos se concluye que las espermatogonias son células susceptibles a la acción del V_2O_4 por su constante proliferación, estos desórdenes a nivel de las espermatogonias se manifiestan en el semen con alteraciones en los parámetros vinculados a la capacidad fecundante del espermatozoide, entre ellos la densidad y morfología; por lo tanto, se logró observar un efecto citotóxico inducido por exposición a V_2O_4 .
- La densidad espermática se vio alterada en función de la proporción espermatogonial, corroborando el efecto citotóxico y reprotóxico inducido por V_2O_4 . El número de espermatozoides anormales son consecuencia de una espermiogénesis anormal por efecto del compuesto metálico V_2O_4 , sin embargo, la morfología espermática alterada, también está asociada con daño al ADN del núcleo (cabeza) del esperma.
- La correlación con coeficiente de Pearson (r) muestra que el número de espermatozoides presentes en la eyaculación es directamente proporcional al de células germinales, lo que demuestra que el efecto citotóxico en espermatogonias inducido por V_2O_4 se ve reflejado en la densidad espermática, siendo que esta ofrece índices de la integridad de la espermatogénesis.

Perspectivas

En el modelo murino:

- ☞ Evaluar apoptosis en espermatogonias Tipo B o diferenciadas.
- ☞ Analizar estrés oxidativo en líquido seminal.
- ☞ Cuantificar las concentraciones de hormonas (FSH, LH y testosterona).
- ☞ Evaluar movilidad y viabilidad espermática en líquido seminal.
- ☞ Monitorear la integridad del ADN nuclear tanto de espermatogonias como de espermatozoides.

REFERENCIAS

- Adams, M. L., Meyer, E. R. y Cicero, T. J. (1997). Interactions between alcohol- and opioid-induced suppression of rat testicular steroidogenesis in vivo. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(4): 684-90.
- Aitken, R. J. (2011). The Capacitation-Apoptosis Highway: Oxysterols and Mammalian Sperm Function. *Biology of Reproduction*, 85(1): 9–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.092528>
- Aitken, R. J., y Baker, M. A. (2013). Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(2–3-4): 265–272. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130146ja>
- Alessio L., Marinoni M. y Dell'Orto A. (1988). Biological monitoring of vanadium. Biological monitoring of toxic metals. W.T.Clarkson, L.Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds. Plenum Press, Nueva York, pp. 427-436.
- Altamirano B. (1994). Manual de manejo de animales de laboratorio. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México, pp. 97.
- Alvino De La Sota N., Pacheco Calderón J. y Galli Rigo-Righi C. (2007). Diseño de agentes antidiabéticos de vanadio: Desarrollo y avances recientes. Departamento de Ciencias, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima. *Revista de Química* (32): 37-48.
- Aoki VW, Liu L, Carrell DT. (2005). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod*. 20:1298-1306.
- Aragón, A. M., y Altamirano-Lozano, M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, 15(2): 145–151. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(01\)00117-4](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(01)00117-4).
- Aragón, M., Ayala, M., Fortoul, T., Bizarro, P., y Altamirano-Lozano, M. (2005). Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproductive Toxicology*, 20(1): 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.11.016>

- Arrondo, J. L. (2009). Control del eje hipotálamo-hipófisis-testicular. [Figura 10]. Recuperado de <https://www.aeu.es/userfiles/muestramaterialdocentecfsh.pdf>
- ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2012). Reseña Toxicológica del Vanadio. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Recuperado 17 de junio de 2021, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts58.html
- Akinloye O, Arowojolu AO, Shittu OB y Anetor JI. (2016). Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reproductive Biology*. 6(1):17-30
- Ayala Jareni. (2014). *Contaminación atmosférica por Vanadio*. *Ciencia UNAM* [Figura 1]. Recuperado de http://ciencia.unam.mx/leer/367/Respiramos_vanadio_un_contaminante_danino
- Balitán Amoretty A, Carlos Bryan; Blanco Knotek, Sabina Antea; Cabrera, Alejandro y Hernández Yeral Alexander. (2015). Factores asociados a la baja calidad del esperma. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua Nicaragua. 8 (12) 13-26.
- Baran, E. J. (2000). Oxovanadium (IV) and oxovanadium (V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 80(1–2): 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(00\)00032-5](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(00)00032-5)
- Baroch E.F. (1983). Vanadium and vanadium alloys. *Encyclopedia of chemical technology*. John Wiley y Sons, Inc., Nueva York. 673-710.
- Bascom R., Bromberg A., Costa A., Devlin R., Dockery W., Frampton W., Lambert W., Samet M., Speizer E. y Utell M. (1996). Health effects of outdoor air pollution. Committee of the Environmental and Occupational Health Assembly of the American Thoracic Society. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 153(1): 3–50. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.153.1.8542133>
- Bellve, A., Cavicchia, J., Millette, C., O'Brien, D., Bhatnagar, y Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology*, 74(1): 68–85. <https://doi.org/10.1083/jcb.74.1.68>.
- Bianchi, P.G.; De Agostini, A.; Fournier, J.; Guidetti, C.; Tarozzi, N.; Bizzaro, D. y Manicardi, G.C. (2004). Human cervical mucus can act in vitro as a selective

- barrier against spermatozoa carrying fragmented DNA and chromatin structural abnormalities. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 21(4): 97-102.
- Brenner, S., y Miller, J. H. (2014). *Brenner's encyclopedia of genetics*. Elsevier Science. 51(08): 51–4188. <https://doi.org/10.5860/choice>.
 - Brunekreef, B., Janssen, N. A. H., de Hartog, J., Harssema, H., Knappe, M., y van Vliet, P. (1997). Air Pollution from Truck Traffic and Lung Function in Children Living near Motorways. *Epidemiology*, 8(3): 298. <https://doi.org/10.1097/00001648-199705000-00012>
 - Budavari S., O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E. y Kinneary J.F. (1996). *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biological*. Edition 12. Whitehouse Station, Merck, Nueva Jersey.
 - Burkle, A. (2000). Poly(ADP-Ribosyl) action, Genomic Instability, and Longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1): 126–132. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06641.x>.
 - Bustos-Obregón, E.; Riveros, J. L. y Maurer, I. (2005). Función Espermatógena Post-Hipoxia Simulada en Ratón. *Ciencia y Trabajo*, 7(16):56-60.
 - Bustos-Obregón, E.; Costa del Río, F. y Sarabia, L. (2007). El análisis morfométrico de los túbulos testiculares de ratones después de la administración de Malatión y Maca. *International Journal Morphology*, 25(2):245-8.
 - Calleja, J. (1997). Alteraciones testiculares producidas por el alcohol. *Actas Urológicas Españolas*, 21(4):337-42.
 - Cantley, L.C., Resh, M. D., y Guidotti, G. (1978). Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature*, 272(5653), 552–554. <https://doi.org/10.1038/272552a0>
 - Carminati Janet L. y Stearns Tim. (1997). Los microtúbulos orientan el huso mitótico en la levadura a través de interacciones dependientes de dineína con la corteza celular. *Journal of Cell Biology*. 138 (3): 629-641; <https://doi.org/10.1083/jcb.138.3.629>
 - Carson B.L., Ellis H.V. y McCann J.L. (1987). Toxicology and biological monitoring of metals in humans. *Journal of Applied Toxicology*, Lewis Publishers, Nueva York, 7(1): 276-289.
 - Castillo Villanueva Claudia Jessica y Roldán Reyes Elia. (2021). "Índice Acrosómico en hombres con mala calidad seminal". XXVII Foro de Investigación Escolar en Biología. Viernes 5 de marzo, 2021, pp155.

- Chapin, R. E., Dutton, S. L., Ross, M. D., Sumrell, B. M., y Lamb, J. C. (1984). The Effects of Ethylene Glycol Monomethyl Ether on Testicular Histology in F344 Rats. *Journal of Andrology*, 5(5): 369–380. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1984.tb00803.x>
- Charlton, A. (1994). Children and passive smoking. *The Journal of Family practice* 38 (3): 267-277.
- Chen, F., Demers, L. M., Vallyathan, V., Ding, M., Lu, Y., Castranova, V. y Shi, X. (1999). Vanadate Induction of NF- κ B Involves I κ B Kinase β and SAPK/ERK Kinase 1 in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29), 20307–20312. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20307>.
- Clermont, Y. (1966). Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*, 118(2): 509–524. <https://doi.org/10.1002/aja.1001180211>
- Contreras-Cadena, D. A., Gómez-Pech, C., Rangel-García, M., Ruiz-Hernández, A., Martínez-Bulit, P., y Barba-Behrens, N. (2014). La importancia del vanadio en los seres vivos. *Educación Química*, 25: 245–253. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(14\)70564-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(14)70564-6)
- Crans, D. C., Bunch, R. L., y Theisen, L. A. (1989). Interaction of trace levels of vanadium(IV) and vanadium(V) in biological systems. *Journal of the American Chemical Society*, 111(19): 7597–7607. <https://doi.org/10.1021/ja00201a049>
- Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E. y Yang L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*, 104(2): 849–902. <https://doi.org/10.1021/cr020607t>
- Cuaderno de Cultura Científica. (2018). *Nanoestrellas de óxido de vanadio (IV)* [Figura 4]. Recuperado de <https://culturacientifica.com/2018/02/07/oxido-vanadio-iv-material-una-revolucion-ciencia-ficcion/>
- Delfín, Azuara Sandra. (2020). Efecto de diferentes concentraciones de biotina sobre la motilidad del espermatozoide de ratón durante el proceso de capacitación *in vitro*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad Universitaria, Cd.
- Ding, M., Li, J.J., Leonard, S.S., Ye, J.P., Shi, X., Colburn, N.H. y Vallyathan, V. (1999). Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*, 20(4): 663–668. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.4.663>.

- Domingo, J.L. (1996). Vanadium: A review of reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*, 10(3): 175–182. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00019-6](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00019-6)
- Dym, M., Kokkinaki, M., y He, Z. (2009). Spermatogonial stem cells: Mouse and human comparisons. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 87(1): 27–34. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20141>
- Eggert-Kruse, W.; Reimann-Andersen, J.; Rohr, G.; Pohl, S.; Tilgen, W. y Runnebaum, B. (1996). Sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril*, 63, (3): 612-624
- Ehling, U.H. (1978) Specific locus mutation in mice, en A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens*, Plenum, New York, 5: 233-256.
- Elinder C.G., Gerhardsson L. y Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. *Biological monitoring of toxic metals* (W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds.). Plenum Press, Nueva York, pp. 1-71.
- El Financiero. (2015). *Contaminación por las refinerías de petróleo* [Figura 5]. Recuperado de <https://www.elfinanciero.com.mx/opinion/salvador-garcia-linan/contaminacion-por-las-refinerias/>
- Eshel D, Urrestarazu LA, Vissers, Jauniaux JC, van Vliet-Reedijk JC, Planta RJ y Gibbons IR. (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 (23): 11172-11176 <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11172>
- Evangelou, A. M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(3): 249–265. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(01\)00221-9](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(01)00221-9).
- Fernandez, Arjona M. (2003). Relationship between gonadotropin secretion, inhibin B and spermatogenesis in oligozoospermic men treated with highly purified urinary follicle-stimulating hormone (FSH-HP): a preliminary report. *European Journal of Obstetrics y Gynecology and Reproductive Biology*, 107(1): 47–51. [https://doi.org/10.1016/s0301-2115\(02\)00313-5](https://doi.org/10.1016/s0301-2115(02)00313-5)
- Foote, R. H. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*, 75(1–2): 119–139. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(02\)00233-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(02)00233-6)

- French, R. J. y Jones, P. J. (1993). Role of vanadium in nutrition: Metabolism, essentiality and dietary considerations. *Life Sciences*, 52(4): 339–346. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90146-t](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90146-t)
- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., y Kroemer, G. (2015). Ferroptosis in p53-dependent oncosuppression and organismal homeostasis. *Cell Death y Differentiation*, 22(8): 1237–1238. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.54> .
- García-Vázquez, F.A., Gadea, J., Matás, C. y Holt, W.V. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals (Review). *Asian Journal Andrology*. 18(6):844–850. Doi:10.4103/1008-682X.186880.
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4): 979–986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>.
- Gilbert, (2005). Biología del Desarrollo. 7a ed, Ed. M. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. p. 199.
- Gonzales Figueroa, Hugo y Gonzales Molfino Hugo Muaricio. (2017). Las espermatogonias de mamíferos. Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. *Revista Biotiempo*, 14 (2):233-243.<http://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/article/view/1359/1304> .
- Green y Reed, D.R. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science*, 281(5381): 1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>.
- Hall, E.R. (1981). The Mammals of North America. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1181 pp.
- Hayes, F. J., DeCruz, S., Seminara, S. B., Boepple, P. A., y Crowley, W. F. (2001). Differential Regulation of Gonadotropin Secretion by Testosterone in the Human Male: Absence of a Negative Feedback Effect of Testosterone on Follicle-Stimulating Hormone Secretion¹. *The Journal of Clinical Endocrinology y Metabolism*, 86(1): 53–58. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7101>
- Heinz A., Rubinson K.A. y Grantham J.J. (1982). The transport and accumulation of oxovanadium compounds in human erythrocytes in vitro. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 100, 593-612
- Hernández-Ochoa, I., García-Vargas, G., López-Carrillo, L., Rubio-Andrade, M., Morán-Martínez, J., Cebrián, M. E., y Quintanilla-Vega, B. (2005). Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin

condensation in northern Mexico. *Reproductive Toxicology*, 20(2): 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.007>

- Hertelendi, Z., Tóth, A., Borbély, A., Galajda, Z., van der Velden, J., Stienen, G. J. y Papp, Z. (2008). Oxidation of Myofilament Protein Sulfhydryl Groups Reduces the Contractile Force and Its Ca²⁺Sensitivity in Human Cardiomyocytes. *Antioxidants y Redox Signaling*, 10(7): 1175–1184. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.2014>
- Hirsch Irvin H. (2019). Estructura del aparato reproductor masculino. Manual Merck. Merck Sharp y Dohme Corp., Inc., Kenilworth, NJ., USA. Obtenido de <https://www.merckmanuals.com/es-us/hogar/salud-masculina/biolog%C3%ADa-del-aparato-reproductor-masculino/estructura-del-aparato-reproductor-masculino>
- Huang, C., Chen, N., Ma, W. y Dong, Z. (1998). Vanadium induces AP-1- and NFκB-dependent transcription activity. *International Journal of Oncology*. Published. 13:711–715 <https://doi.org/10.3892/ijo.13.4.711>.
- Huici Montagud, A., y Bonilla Hidalgo, M. (1999). Tóxicos para la reproducción masculina. Ministerio de trabajo y asuntos sociales España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo: Recuperado de https://www.cso.go.cr/legislacion/notas_tecnicas_preventivas_insht/NTP%2041%20-%20Toxicos%20para%20la%20reproduccion%20masculina.pdf
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D. y Violante, P. (2003). Distribución espacial de metales pesados en suelos urbanos de la ciudad de Nápoles (Italia). *Contaminación Ambiental*, 124(2): 247–256. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00478-5](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00478-5)
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (1988). Vanadium. Environmental Health Criteria, World Health Organization, Ginebra, No. 81.
- IPCS. International Programme on Chemical Safety. (2001). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organization, Ginebra, No. 29
- Jain, G. C., Pareek, H., Sharma, S., Bhardwaj, M., y Khajja, B. S. (2007). Reproductive Toxicity of Vanadyl Sulphate in Male Rats. *Journal of Health Science*, 53(1): 137–141. <https://doi.org/10.1248/jhs.53.137>
- Johnson, L.; Thompson, D. L., Jr. y Varner, D. D. (2008). "Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis." *Animal Reproduction Science*, 105 (1-2): 23-51.

- Kably-Ambe, Alberto; Campos-Cañas, Jorge A; Gonzalez, Gustavo E; Carballo, Esperanza y Roque, Armando. (2013). Influencia del estudio seminal en el éxito de la inseminación intrauterina y en las complicaciones perinatales. *Ginecología y Obstetricia de México*, 81 (7): 365-369.
- Karabulut, A., y Tekin, A. (2013). Alterations in the morphology and motility of spermatozoa: relation with total sperm count. *Pamukkale Medical Journal*, 6(1): 1–4. <https://doi.org/10.5505/ptd.2013.92905>
- Künzli, N., Kaiser, R., Medina, S., Studnicka, M., Chanel, O., Filliger, P., Herry M. Jr F, H., Puybonnieux–Texier V., Quénel P., Schneider J., Seethaler R., Vergnaud, C. y Sommer, H. (2000). Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *The Lancet*, 356(9232): 795–801. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02653-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02653-2)
- Lagerkvist G., Nordberg G.F. y Vouk V. (1986). Vanadium. Handbook on the toxicology of metals. *Elsevier Science Publishing*, Amsterdam, 2, 638-663.
- Laragione, T., Bonetto, V., Casoni, F., Massignan, T., Bianchi, G., Gianazza, E., y Ghezzi, P. (2003). Redox regulation of surface protein thiols: Identification of integrin $\alpha 4$ as a molecular target by using redox proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25): 14737–14741. <https://doi.org/10.1073/pnas.2434516100>
- Lee Wei-Lih , Kaiser Michelle A. y Cooper John A. (2005). El modelo de descarga para la función dineína : función diferencial de las subunidades motoras. *Journal of Cell Biology*. 68 (2): 201-207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407036>
- Leopardi, P., Villani, P., Cordelli, E., Siniscalchi, E., Veschetti, E. y Crebelli, R. (2005). Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicology Letters*, 158(1): 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.02.009>
- Li Y.Y. , Yeh E., Hays T. y Bloom K. (1993). Interrupción de la orientación del huso mitótico en un mutante de dineína de levadura. *Departamento de Biología, Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill*. 90 (21) 10096-10100; <https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10096>
- López-García, M.J., Urbano-Felices, A. y Cárdenas-Povedano, M. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. Recuperado de:<http://dx.doi.org/10.3926/oss.5>

- López, Norberto. (2009). Barrera hematotesticular. Biología del desarrollo. [Figura 12] Recuperado de <https://compartircelular.blogspot.com/2019/02/nombre-que-recibe-la-celula-germinal.html>
- Marina, S. (2003). Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. Instituto de Reproducción CEFER, Barcelona. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 20(4): 213–225. Recuperado de <http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert-Jul-Agost03-Trabajo1.pdf>
- Marnet B., Vietez G., Milhet P., Richoilley G., Lesourd F. y Parinaud J. (2000). Computer-assisted assessment of sperm morphology: comparison with conventional techniques. *International Journal of Andrology*, 23: 22-28
- Martini, A. C.; Stuz, G.; Vincenti, L. M.; Santillán, M. E.; Carlini, V.; Rubiales de Barioglio, S. y Fiol de Cuneo, M. (2004). Evaluación de Parámetros Morfométricos, Reproductivos y Conductuales en Ratones Macho Hiponutridos. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 41:66.
- Mattison, Donald R., Plowchalk David R., Meadows, M. Jane, Amer Z. Al-Juburi, Jay Gandy y Antoine Malek. (1990). Reproductive Toxicity: Male and Female Reproductive Systems as Targets for Chemical Injury, *Medical Clinics of North America*, 74, (2): 391-411, [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30569-7](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30569-7).
- Meeker JD, Calafat AM y Hauser R. (2009). Urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate are associated with decreased steroid hormone levels in adult men. *Journal of Andrology*; 30(3):287-97.
- Mendiola, J., Ten, J., Araico, F., Martín-Ondarza, C., Torres-Cantero, A. M., Moreno-Grau, J. M., y Bernabeu, R. (2007). Metales pesados y calidad seminal en humanos. *Revista Internacional de Andrología*, 5(2): 173–180. [https://doi.org/10.1016/s1698-031x\(07\)74051-7](https://doi.org/10.1016/s1698-031x(07)74051-7)
- Mengual L, Balleca JL, Ascaso C, Oliva R. (2003). Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl*. 24:438-447.
- Mestre Ferrer, Cristina. (2015). Análisis de la morfología de los espermatozoides. Reproducción humana asistida. Obtenido de: <https://www.asproin.com/analisis-de-la-morfologia-de-los-espermatozoides/>

- Morales, A., Buvat, J., Gooren, L. J., Guay, A. T., Kaufman, J., Tan, H. M., y Torres, L. O. (2004). Endocrine Aspects of Sexual Dysfunction in Men. *The Journal of Sexual Medicine*, 1(1): 69–81. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2004.10111.x>
- Morán Martínez, J. (2014). La contaminación ambiental y ocupacional por plomo y sus efectos en la salud reproductiva masculina, evidencia de daño al ADN. *RICS Revista Iberoamericana de las Ciencias de la Salud*, 1(2): 1. <https://doi.org/10.23913/rics.v1i2.14>
- Morinville, A., Maysinger, D., y Shaver, A. (1998). From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19(11): 452–460. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(98\)01257-7](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(98)01257-7).
- Morley, J. E. (2003). Testosterone and behavior. *Clinics in Geriatric Medicine*, 19(3): 605–616. [https://doi.org/10.1016/s0749-0690\(02\)00106-4](https://doi.org/10.1016/s0749-0690(02)00106-4)
- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., y Chatterjee, M. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2): 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.009>
- Nechay, B.R., Nanninga, L.B., y Nechay, P.S. (1986). Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(1): 128–138. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90059-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90059-7)
- Oakberg, E. y Diminno, R. (1960). X-ray Sensitivity of Primary Spermatocytes of the Mouse. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 2(2): 196–209. <https://doi.org/10.1080/09553006014550211> .
- Orellana, M.; Ellahuene, M. y Lafuente-Indo, N. (1983) Citotoxicidad de ciclofosfamida sobre las poblaciones celulares del testículo de *Schistocerca cancellata*. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales* 16 (2): 174.
- Pandey, S. K., Chiasson, J. L., y Srivastava, A. K. (1995). Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 153(1–2): 69–78. <https://doi.org/10.1007/bf0107592>.
- Pandey, S. K., Théberge, J. F., Bernier, M., y Srivastava, A. K. (1999). Phosphatidylinositol 3-Kinase Requirement in Activation of the ras/C-raf-

1/MEK/ERK and p70s6k Signaling Cascade by the Insulinmimetic Agent Vanadyl Sulfate. *Biochemistry*, 38(44): 14667–14675. <https://doi.org/10.1021/bi9911886>

- Parinaud, J., Vieitez, G., Moutaffian, H., Richoilley, G., y Milhet, P. (1996). Relationships between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(6): 1240–1243. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019364>
- Pastor LM, Zuasti A, Ferrer C, Bernal-Mañas CM, Morales E, Beltrán-Frutos E y Seco-Rovira V. (2011). Proliferation and apoptosis in aged and photoregressed mammalian seminiferous epithelium, with particular attention to rodents and humans. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(1): 155-164.
- Quintero–Vásquez, Bermudez Gabriela y Castillo-Cadena. (2015). Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: Un problema actual. Centro de Investigación en Ciencias Médicas, Departamento de Genética y Biología Molecular, UNAM. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 18(2), 144-151. <https://goi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>.
- Rehder, D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*, 6(5): 604–617. [https://doi.org/10.1016/s1387-7003\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s1387-7003(03)00050-9).
- Rodríguez-Martínez, H. y Ericsson, B. (2000). Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad en inseminación artificial en cerdos. Flores da Cunha –RS- Brasil, III Simposio Internacional MINITUB, 1:11-33.
- Rodríguez-Mercado Juan José y Altamirano-Lozano Mario Agustín. (2006). Vanadio: Contaminación, Metabolismo Y Genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22, (4): 173-189.
- Rodríguez-Mercado J.J., **Roldán-Reyes E.** y Altamirano Lozano M. (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*, 144(3): 359-369. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00255-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00255-8)
- Rodríguez Pendás, Bertha Victoria, Toledo Sánchez, Carlos Alfredo, Gómez Alzugaray, Manuel, Santana Pérez, Felipe, y Domínguez Alonso, Emma. (2013). Alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos por microscopía electrónica de barrido. *Revista Cubana de Endocrinología*, 24(2): 153-160. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532013000200005&lng=es&tlng=es.

- Roldán Reyes Elia; Castillo Villanueva Claudia Jessica y Estrada Salas Layla Sheccid. (2020 **A**). "Toxicología de V_2O_4 en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1". XXVI Foro de Investigación Escolar en Biología. 10 de noviembre de 2020.
- Roldán Reyes Elia; Castillo Villanueva Claudia Jessica y Estrada Salas Layla Sheccid. (2021 **B**). "Toxicología de V_2O_4 en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1". 16° Congreso de Investigación de la FES Zaragoza. *TIP, Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*, Vol 23. pág. 34. 23-27 de noviembre de 2020.
- Ron-El, R.; Nachum, H.; Herman, H.; Golan, A.; Caspi, E. y Soffer, Y. (1991). Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertility and Sterility*, 55: 338-344
- Russell, W.M.S., R.L. Burch. (1959). The principles of humane experimental technique. UFAW Research Fellow, Department of Zoology and Comparative Anatomy, University College, Methuen y Co LTD, London, UK, pág. 92.
- Russell, W.L.; Kelly, E.M.; Hunsicker, P.R.; Bangham, J.W.; Maddux, S.C. y Phipps, E.L. (1984) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 76: 5818-5819.
- Santillán, M. L. (2014). Respiramos vanadio, un contaminante dañino. Ambiente y Naturaleza. DGDC UNAM. Recuperado 16 de junio de 2021, de http://ciencia.unam.mx/leer/367/Respiramos_vanadio_un_contaminante_dañino
- Shaha, C., R. Tripathi, y D.P. Mishra. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365(1546): 1501-1515.
- Sharma, R. P., Flora, S. J., Drown, D. B., y Oberg, S. G. (1987). Persistence of Vanadium Compounds in Lungs after Intratracheal Instillation in Rats. *Toxicology and Industrial Health*, 3(3): 321–329. <https://doi.org/10.1177/074823378700300304>
- Srivastava, A. K. (2000). Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206(1/2): 177–182. <https://doi.org/10.1023/a:1007075204494>
- Sutovsky, P. y Gaurishankar, M. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. Jonge y C. Barratt

(Eds.) *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, and Regeneration* Cambridge, England. Cambridge University Press. (pp. 1-30).

- Taconinc. Models for life. (2021). *Ratón de la cepa CD-1 Mus musculus domesticus*. [Figura 14]. Recuperado de <https://www.taconic.com/mouse-model/hunog-exl>
- Telisman, S., Cvitković, P., Jurasović, J., Pizent, A., Gavella, M., y Rocić, B. (2000). Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental Health Perspectives*, 108(1): 45–53. <https://doi.org/10.1289/ehp.0010845>
- Van Voorhis, Bradley J; Barnett, Mitchell; Sparks, Amy E. T.; Syrop, Craig H.; Rosenthal, Gary y Dawson, Jeffrey. (2001). Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 75, (4): 661-668.
- Van Thiel, D. H.; Gavaler, J. S.; Cobb, C. F.; Sherins, R. J. y Lester, R. (1979). Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology*, 105(4):888-895.
- Vernos Isabelle. (2016). “La distribución de las modificaciones post-traduccionales de la tubulina identifica la región final de la cola del espermatozoide como un posible marcador de calidad espermática”. Eugin. Barcelona. Obtenido de: <https://www.eugin.es/la-cola-del-espermatozoide-podria-determinar-la-calidad-del- semen/>
- Vendrell Sala, José M. (2003). Patrones espermatogénicos basales y desarrollo embrionario temprano tras ICSI en Oligoastenoteratozoospermia secretora severa. Tesis Doctoral en Medicina por la Universidad Autónoma de Barcelona, obtenida de: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/4592/jmvs1de3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- WHO. (2003). Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. World Health Organization, Health Documentation Services WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Ginebra, pp 22-23.
- Whorton D, Milby TH, Krauss RM y Stubbs HA. (1997). Testicular function in DBCP exposed pesticide workers. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 21(3):161-6.
- Wichmann, H. E., y Peters, A. (2000). Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Philosophical Transactions of the Royal Society*

of London. *Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 358(1775): 2751–2769. <https://doi.org/10.1098/rsta.2000.0682>

- Wilkinson, M. G., y Millar, J. B. A. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The FASEB Journal*, 14(14): 2147–2157. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0102rev>.
- World Energy Trade. (2020). *Elemento químico vanadio* [Figura 2]. Recuperado de <https://www.worldenergytrade.com/metales/otros-metales/el-mercado-del-vanadio-ve-una-nueva-demanda-en-el-estimulo-de-la-ue>
- Wright, J. (2003). *Química ambiental* (1.^a ed.). Serie de introducciones de Routledge al medio ambiente. Routledge. 432 pp. Recuperado de https://books.google.co.cr/books?id=WLCBAgAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Xu, Y. R., Dong, H. S., y Yang, W. X. (2016). Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or guards? *Gene*, 582(2): 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.02.007>.
- Yang, X. (2003). Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chemistry Reviews*, 237(1–2): 103–111. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00247-3](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00247-3)
- Zhou, Q., y Griswold, M. D. (2008). Regulation of spermatogonia. In Stem Book. Harvard Stem Cell Institute. Cambridge <https://doi.org/10.3824/stembook.1.7.1>
- Zukerman, Z., Rodriguez-Rigau, L. J., Weiss, D. B., Chowdhury, A. K., Smith, K. D., y Steinberger, E. (1978). Quantitative Analysis of The Seminiferous Epithelium In Human Testicular Biopsies, and The Relation of Spermatogenesis to Sperm Density. National Institutes of Health Center Grant. *Fertility and Sterility*, 30(4): 448–455. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)43581-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)43581-8)
- Zúñiga, E. E. (2011). *Aparato reproductor de un ratón macho*. [Figura 7]. Recuperado de <https://es.slideshare.net/escalera69/organos-sexuales-resumen>.

Anexo I

- XXVI Foro de Investigación Escolar en Biología participación en la modalidad oral con el tema “Toxicología de V_2O_4 en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1” (2020).
- 16° Congreso de Investigación de la FES Zaragoza con el tema “Toxicología de V_2O_4 en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1” (2021).
- XXVII Foro de Investigación Escolar en Biología con el tema “Índice Acrosómico en hombres con mala calidad seminal” (2021).



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Constancia

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Unidad de
Formación Integral

A Layla Sheccid Estrada Salas, Claudia Jessica
Castillo Villanueva y Elia Roldán Reyes

Por su participación en la modalidad **Exposición oral**, con el Tema:
*"Toxicología de V204 en células gaméticas y somáticas de ratones
macho de la cepa CD-1"*, en el marco del **XXVI Foro de
Investigación Escolar en Biología**; organizado por la Carrera de
Biología, el día 24 de septiembre del año en curso.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, 10 de noviembre del 2020.

3548061617142055031660109

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Director





UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Reconocimiento

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la División de
Estudios de Posgrado e
Investigación

A *Claudia Jessica Castillo Villanueva*

Como **asistente** del 16° Congreso de Investigación de la
FES Zaragoza, realizado del 23 al 27 de noviembre del
2020, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, a 22 de enero de 2021

Dr. David Nahum Espinosa Organista

Jefe de la División



Constancia provisional



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



Reconocimiento

Que otorga la
**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**
a través de la División de
Estudios de Posgrado e
Investigación

A *Elia Roldan Reyes, Claudia Jessica Castillo
Villanueva, Layla Sheccid Estrada Salas*

Como ponentes del trabajo **Toxicología de V2O4 células
gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-
1 (BIO-30)**, en el marco del *16° Congreso de Investigación
de la FES Zaragoza*, los días 23 al 27 de noviembre del
2020, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, a 22 de enero de 2021

Dr. David Nahum Espinosa Organista

Jefe de la División



Constancia provisional



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Constancia

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Unidad de
Formación Integral

A Claudia Jessica Castillo Villanueva y Elia
Roldán Reyes

Por su participación en la modalidad de **Ponencia oral**, con el trabajo titulado: *“Índice acrosómico en hombres con mala calidad seminal”*, en el marco del **XXVII Foro de Investigación Escolar en Biología, en Tiempos de Pandemia**, el día 5 de marzo del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, 6 de abril del 2021.

3558061622005055153660109

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Director



BI-30**TOXICOLOGÍA DE V2O4 CÉLULAS GAMÉTICAS Y SOMÁTICAS DE RATONES MACHO DE LA CEPA CD-1****Elia Roldán Reyes, Claudia Jessica Castillo Villanueva, Layla Sheccid Estrada Salas**

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II, UNAM, Batalla del 5 de Mayo esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Alcaldía de Iztapalapa, 09230, Ciudad de México. E-mail: 415jessicacv@gmail.com

Introducción

El vanadio es un metal distribuido en la naturaleza y los sistemas biológicos; se ha demostrado que sus efectos producen daño celular y cambios genéticos en diferentes tejidos, además cruza la barrera hematotesticular, causando interferencia en la división celular, y disfunción reproductiva.

Metodología

Se llevaron a cabo tratamientos subcrónicos vía aérea de V2O4 (1.5 mg, 3 mg y 4.5 mg/kg), a ratones CD-1, se utilizó un nebulizador y una caja hermética, se trataron durante 15 días, cada 48 horas durante 1 hora. Se sacrificaron 24 horas después del último tratamiento. Se contó con un grupo control negativo.

Resultados

Se observó aumento significativo en el porcentaje de espermatogonias indiferenciadas para la dosis baja y media; en las de tipo intermedio, una disminución (con 3 mg/kg). En la morfología espermática, aumentaron las anomalías del flagelo en todos los grupos tratados, la densidad mostró disminución en la dosis alta, en comparación al grupo control. Los IME e IM disminuyeron en la dosis baja en relación con el grupo control y las otras dosis administradas.

Conclusiones

El V2O4 es capaz de ejercer efecto reprotóxico, al disminuir la concentración espermática en epidídimo, y el número de espermatozoides normales; alterar la diferenciación celular, al modificar las proporciones de espermatogonias (células troncales de los espermatozoides), e interferir con el proceso normal de división celular (citostático-citotóxico) tanto en células somáticas como gaméticas, evidenciando por disminución en IM e IME, en la dosis baja administrada.

Financiamiento

PAPIIT-UNAM IN-221919.

Palabras Clave

Reprotóxico, citostático-citotóxico, diferenciación celular.

Referencias

Altamirano Lozano, M. A. & Rodríguez Mercado, J. J. (2006). Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. Recuperado el 01 de Agosto de 2020, de <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/21681>



Índice acrosómico en hombres con mala calidad seminal

Claudia Jessica Castillo Villanueva. Asesora: Elia Roldán Reyes

El índice acrosómico (IA) es una indicación del porcentaje de espermatozoides con acrosomas morfológicamente normales presentes en una muestra de semen y puede considerarse como evidencia de la capacidad funcional de los espermatozoides, se basa en la apariencia morfológica de los acrosomas con respecto al tamaño, propiedades y forma de tinción. Se ha determinado que la densidad está directamente afectada por factores ambientales, hormonales, toxicológicos o genéticos que influyen directamente en un conjunto de defectos en la biogénesis del acrosoma durante la espermiogénesis, teniendo como consecuencia espermatozoides con acrosomas amorfos o ausentes. Por lo que se espera que el IA se vea disminuido en individuos con polispermia y oligospermia, afectando su capacidad para fecundar. Establecer un método de tinción para evaluar el IA en individuos con problemas de densidad para establecer la relación entre IA y calidad seminal. Se realizaron tres tinciones (eosina, eosina-nigrosina y Esperma-form) para determinar la más apropiada para evaluar el IA de 13 muestras con polispermia y 7 con oligospermia, los cuales fueron comparadas con 15 muestras normozoospermicas como control se realizó una prueba estadística de Z para proporciones y t de Student para evidenciar diferencias significativas. Para detectar relación entre el IA y la mala calidad seminal se realizó una Correlación de Pearson (r). La tinción Esperma-form (kit), fue la más indicada para poder llevar a cabo una evaluación detallada del acrosoma, el IA disminuyó significativamente en las muestras con problemas de densidad en comparación con el grupo control. Así mismo, se estableció una correlación positiva entre densidad e IA, mediante coeficiente de Pearson. El IA se evaluó exhaustivamente con la tinción Esperma-form. La disminución del IA en las muestras con polispermia y oligospermia demostraron la importancia de la inclusión de este parámetro en la evaluación seminal no sólo en individuos con teratozoospermia sino también donde se presenten alteraciones en densidad u otro valor, debido a que son muy importantes para guiar los estudios que determinen la causa de fecundación fallida, por lo que los espermatozoides de apariencia morfológicamente normal también deben evaluarse más exhaustiva para determinar la funcionalidad e integridad.

Palabras clave: Acrosoma, normozoospermia, oligospermia, polispermia, teratozoospermia.

Modalidad: Oral