



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

BIOLOGÍA

T E S I S

Alteraciones cromosómicas en espermatogonias y médula  
ósea de ratón inducidas por  $V^{+4}$  inhalado.

PRESENTA:

**Estrada Salas Layla Sheccid**

Para obtener el título de

**BIÓLOGA**

Directora

***Dra. Elia Roldán Reyes***

*Linea de Investigación en Citogenética y Mutagénesis*

L-2 pp., UMIEZ C-II.

CDMX, 2022.





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

La presente investigación fue realizada en el *Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis* (L-2 pp.), de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

- Bajo la dirección de la ***Dra. Elia Roldán Reyes***.

### ***Agradecimiento***

El proyecto contó con apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) de la DGAPA, clave **IN-221919**. **Agradezco a PAPIIT la Beca-Titulación, Folio 329120**, proyecto "*Toxicología celular y genética de vanadio. Estudio descriptivo mediante el bioensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias de ratón in vivo*"



*“Antes creíamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.*

*Ahora sabemos que está en nuestros genes”*

*-James Dewey Watson*

Una más....

*“Soy de las que piensa que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”*

*-Marie Curie.*

## AGRADECIMIENTOS

En agradecimiento a mis padres, que día tras día me brindaron su amor, paciencia y tiempo para cumplir cada uno de mis sueños, me hicieron creer en mí misma y enfrentarme a todo tipo de retos.

A mis hermanas, Sarahí y Maricarmen por su apoyo incondicional, por sus consejos durante todos estos años, por no soltarme nunca y siempre tener oídos para mí cuando más lo necesité. A toda mi familia gracias por ser mi constante y uno de los pilares más importantes en mis metas.

A mi Chivigon, que durante 12 años ha sido mi fiel compañero desvelos y proyectos, por amarme y nunca dejarme sola en cada paso, mi ojitos de cielo gracias por nunca abandonarme. A mí Panquecito y Chiquis por su compañía tan fiel en el proceso.

A mis amigas, mis hermanas universitarias, Jess, Ingrid y Gloria, que creyeron en mí desde el día cero, porque durante todo el proceso me tuvieron paciencia, nunca me dejaron sola y siempre tenían las palabras correctas para animarme, con todo mi cariño este paso más también es por ustedes, porque todas vivíamos con empatía nuestros momentos más difíciles y aprendimos que las amistades pueden permanecer aunque tomen caminos diferentes.

Brandon, mi mejor amigo, eres una constante en mi vida y en mi proceso universitario, siempre estuviste tras de mí esperando este momento, confiaste incluso cuando yo misma dudaba de lo que hacía, me diste tiempo cuando a ti te hacía falta, gracias por tu cariño.

Naiby, por llegar cuando menos lo esperaba pero más necesitaba.

Finalmente y no menos importante, a mi asesora la Dra. Elia Roldán, gracias por compartirme de su tiempo y tener la paciencia suficiente para brindar su sabiduría en cada día, por ser la mente brillante de todos sus aprendices, una gran consejera y el abrimme las puertas para realizar todo este proceso de investigación. Porque gracias a usted y a cada uno de los profesores de la FES Zaragoza mi mente se encuentra llena de nuevos conocimientos, de muchos retos y metas a largo plazo.

*Gracias Biología, por elegirme para admirarte y seguir aprendiendo de ti todos los días de mi vida.*

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>Vanadio</b>	<b>1</b>
<i>La química del vanadio</i>	1
<i>Vanadio en el entorno y su exposición</i>	3
<i>Vanadio como agente tóxico</i>	7
<i>Su importancia en los seres vivos</i>	8
<i>¿El vanadio puede afectar la salud?</i>	10
<b>Modelo Biológico</b>	<b>12</b>
<i>Cromosomas</i>	12
<i>El ratón y su cariotipo</i>	14
<i>Anomalías cromosómicas</i>	16
<i>Espermatogonias</i>	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	<b>27</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>58</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO</b>	<b>68</b>

## ABREVIATURAS

▪ AC	Aberraciones Cromosómicas
▪ ACE	Aberraciones Cromosómicas Estructurales
▪ ACN	Aberraciones Cromosómicas Numéricas
▪ ADN	Ácido desoxirribonucleico
▪ IM	Índice Mitótico
▪ IME	Índice Mitótico Espermatogonial
▪ IMe	Índice Meiótico
▪ KCl	Cloruro de Potasio
▪ PTPasa	Proteína Tirosina Fosfatasa
▪ T-	Tratamiento negativo
▪ T+ MMC	Tratamiento positivo de Mitomicina C
▪ tn	Tonelada
▪ SSC	Células Madre de Espermatogonias
▪ V	Vanadio
▪ $V^{+4}$	Vanadio (IV)
▪ $V_2O_4$	Tetraóxido de Vanadio
▪ WHO	World Health Organization

## ♦ LISTA DE FIGURAS

- ♦ **Figura 1.** Nanoestrellas de Óxido de vanadio (IV)
- ♦ **Figura 2.** Infografía. Vanadio. Fuentes de alimentos e influencia en la salud humana.
- ♦ **Figura 3.** Toxicocinética del Vanadio.
- ♦ **Figura 4.** El ciclo celular.
- ♦ **Figura 5.** Cromosomas Homólogos.
- ♦ **Figura 6.** Cariotipo de ratón (*Mus musculus*),  $2n=40$ .
- ♦ **Figura 7.** Barrera Hematotesticular
- ♦ **Figura 8.** Esquema de renovación de SSCs en roedor.
- ♦ **Figura 9.** Espermatogénesis
- ♦ **Figura 10.** Espermiogénesis
- ♦ **Figura 11.** Porcentaje de células con ACE de espermatogonias Tipo B
- ♦ **Figura 12.** Porcentaje de células con ACN en espermatogonias Tipo B.
- ♦ **Figura 13.** Microfotografías de Metafases en espermatogonias tipo B.
- ♦ **Figura 14.** Porcentaje de células con ACE y ACN en espermatocitos I.
- ♦ **Figura 15.** Microfotografía de metafase meiótica normal con 20 bivalentes de espermatocito I de ratón.
- ♦ **Figura 16.** Microfotografía de metafase meiótica de espermatocitos I de ratones CD-1, con poliploidía.
- ♦ **Figura 17.** Porcentaje de células con ACE en linfocitos de médula ósea.
- ♦ **Figura 18.** Porcentaje de células con ACN en linfocitos de médula ósea
- ♦ **Figura 19.** Microfotografías de Metafases en linfocitos de médula ósea.
- ♦ **Figura 20.** Efecto del Óxido de Vanadio (IV) vía inhalatoria sobre el Índice Mitótico en espermatogonias tipo B (IME).
- ♦ **Figura 21.** Efecto del  $V_2O_4$  vía inhalatoria sobre el Índice Meiótico (IMe).
- ♦ **Figura 22.** Efecto del Óxido de Vanadio (IV) vía inhalatoria sobre el Índice Mitótico (IM) en linfocitos de médula ósea.

## LISTA DE TABLAS

- ♦ **Tabla 1.** Representación de las aberraciones cromosómicas estructurales en ratón.
- ♦ **Tabla 2.** Tratamientos por grupo.
- ♦ **Tabla 3.** Evaluación de células en el microscopio.
- ♦ **Tabla 4.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) en espermatogonias tipo B.
- ♦ **Tabla 5.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Numéricas (ACN) en espermatogonias tipo B.
- ♦ **Tabla 6.** Frecuencia de aberraciones Cromosómicas Numéricas y Estructurales (ACN y ACE) en espermatocitos I.
- ♦ **Tabla 7.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) en linfocitos de médula ósea.
- ♦ **Tabla 8.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Numéricas (ACN) en linfocitos de médula ósea.
- ♦ **Tabla 9.** Porcentaje de Índice Mitótico Espermatogonial (IME), Índice Mitótico de médula ósea e Índice Meiótico (IMe).

## RESUMEN

El vanadio es un elemento común que está presente en la naturaleza; se encuentra en la corteza terrestre, las rocas, algunos minerales de hierro y en yacimientos de petróleo crudo, las personas pueden estar expuestas al vanadio al respirar aire, beber agua o comer alimentos que contengan este metal.

Un cromosoma es la estructura que resulta del empaquetamiento del ADN y las proteínas previo a la división celular para su segregación posterior en las células hijas, los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies por las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes. El objetivo de este proyecto es analizar las aberraciones cromosómicas en espermatogonias y médula ósea, Índice Mitótico Espermatogonial, Índice Meiótico en espermatoцитos I, así como Índice Mitótico en médula ósea, en ratones machos de la cepa CD-1 tratados con Óxido de Vanadio (IV), por vía aérea.

Se formaron 5 grupos de 5 ratones cada uno, a los cuales se les administró  $V_2O_4$  por inhalación, en concentraciones de 1.5, 3.0 y 4.5 mg, junto con un testigo negativo, dichos tratamientos fueron subcrónicos, transcurridas 24 horas del último tratamiento se les administró Colchicina al 0.3% y 5 h después se sacrificaron los organismos. Se extrajeron inmediatamente los testículos y fémur del organismo, se incubaron en solución hipotónica KCl 0.075M por 40 minutos a 37 °C, se fijó el botón celular con fijador metanol- acético 3:1 (V/V), y se realizó la técnica de goteo en laminillas frías, posteriormente se realizó tinción de las preparaciones con Giemsa al 10% y se efectuó el análisis del índice mitótico en linfocitos de médula ósea (IM), índice mitótico en espermatogonias (IME), índice Meiótico en espermatoцитos (IME) y de las aberraciones cromosómicas en el microscopio de campo claro.

Para encontrar las diferencias entre el grupo control y los grupos de ratones CD-1 tratados los IME, IM e IMe se analizaron empleando la prueba Z de proporciones. Los resultados en IM e IME muestran que el óxido de vanadio (IV) reduce significativamente ambos índices mitóticos en la dosis baja administrada (1.5 mg) comparada con el control negativo, control positivo y con la dosis media (3.0 mg). No se han observado diferencias significativas al comparar los resultados de índice Meiótico entre los grupos tratados con óxido de vanadio (IV) y el grupo control (-).

En conclusión los resultados demuestran que el Vanadio IV interfiere con el proceso normal de división celular lo que nos indica que es un agente citotóxico y genotóxico.

**Palabras clave:** Aberraciones cromosómicas, citotoxicidad, división celular, evolución, genotoxicidad, vanadio.

## **INTRODUCCIÓN**

De los 92 elementos naturales conocidos, 70 tienen carácter metálico (las tres cuartas partes) formando parte de un importante "territorio" del sistema periódico (González, 1999). Los metales han sido utilizados por el hombre desde la antigüedad como herramientas para la cacería, y en la época moderna en la minería, en la elaboración de baterías para obtener energía, en fertilizantes, pesticidas y en la industria electrónica en conductores o semiconductores (Fergusson, 1990).

Los seres humanos y en general los seres vivos, estamos expuestos a una variedad y cantidad de metales a través del aire, agua, suelo y en los alimentos.

La Organización Mundial de la Salud-WHO- estima que más del 25% total de las enfermedades están ligadas a factores ambientales, incluyendo la exposición a químicos tóxicos. En un análisis reciente, se estimó que alrededor de 4.9 millones de muertes (8.3% de la mortalidad en todo el mundo) se debe a la exposición al medio ambiente y un manejo inapropiado de químicos, incluyendo metales y las consecuencias parecen acentuarse en las comunidades con bajos ingresos (WHO, 1988).

### **Vanadio**

#### ***La química del Vanadio***

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Muchos, como el calcio (Ca), cobalto (Co), cobre (Cu), Hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), son micronutrientes y constituyen parte esencial en los sistemas biológicos. En la célula catalizan reacciones, son mediadores en el metabolismo y en el transporte de oxígeno, estabilizan macromoléculas y están involucrados en la transducción de señales (Lewin 2000, Nelson y Cox 2004). Es de importancia mencionar que en concentraciones altas algunas de ellos tienen propiedades genotóxicas y carcinógenas (Hartwig 1995)

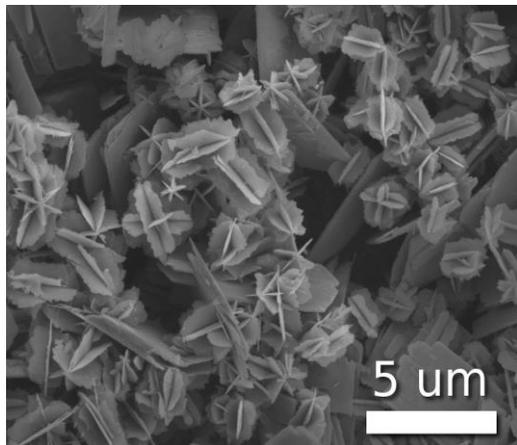


Figura 1. Nanoestrellas de óxido de vanadio (IV) (E.A., 2018)

El vanadio (**Figura 1**) es un elemento químico de número atómico 23 situado en el Grupo V, Período 4 de la tabla periódica de los elementos, tiene la configuración electrónica  $[Ar] 3d^3 4s^2$ . Los principales estados de oxidación son: +2, +3, +4 y +5, que se encuentran en forma de VO,  $V_2O_3$ ,  $VO_2$  y  $V_2O_5$ . Sin embargo, también incluye óxidos de **valencia mixtos** conteniendo dos estados de oxidación, tales como  $V_6O_{13}$  con V+5 y V+4 y una serie de óxidos entre  $VO_2$  y  $V_2O_3$  (ej.  $V_8O_{15}$ ,  $V_7O_{13}$ ,  $V_6O_{11}$ ), que contienen especies V+4 y V+3 (García, 2006).

Su descubrimiento se atribuye al químico sueco Nils Sefstrom , en 1831, quien lo llamó así en honor a la diosa de la belleza de los antiguos arios debido a que sus sales poseen hermosos colores (Chasteen, 1984). Es el 22<sup>o</sup> elemento más abundante en la corteza terrestre, se encuentra en 68 minerales diferentes y se extrae en Sudáfrica (42,2%), Rusia (39,2%) y China (12,7%) donde existen las mayores reservas (García, 2006).

El vanadio es uno de los metales más abundantes, ocupando el lugar número 22, representando del [0.014 – 0.022 %] (Rodríguez y Altamirano, 2006), encontrándose en 68 minerales diferentes. El vanadio es un elemento común, que está presente en la naturaleza. A menudo se encuentra en forma de cristal o en polvo, es de color gris entre blanco y plateado y no tiene olor distintivo.

### ***Vanadio en el entorno y su exposición.***

Para los humanos la principal fuente de exposición al V es la contaminación atmosférica producida principalmente por la quema de combustibles (fuel oil y carbón). Las grandes ciudades pueden tener anualmente en promedio niveles de V en el aire del orden de 20 a 100 ng/m<sup>3</sup> con mayores concentraciones en los meses invernales si utilizan el carbón como combustible para calefacción. Las emisiones de V a la atmósfera se producen también en lugares próximos a las industrias siderúrgicas y refinerías de petróleo. Se estima que se liberan anualmente al medio ambiente cerca de 65000 tn de V de las cuales un 90% se originan por la combustión de petróleo y carbón y en la industria siderúrgica (WHO, 2000).

Los niveles de Vanadio y otros metales en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. En grandes urbes se han detectado concentraciones de Vanadio en el aire que van de 0.15 a 1.4 µg/m<sup>3</sup> y en áreas rurales cantidades menores a 0.024 µg/m<sup>3</sup> (Lagerkvist et al., 1986). Para la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan > 0.114 µg/m<sup>3</sup> en aeropartículas de 10 µm y 0.093 µg/m<sup>3</sup> en las de 2.5 µm (Gutiérrez-Castillo et al., 2006). Gran variedad de compuestos químicos, así como los metales, pueden alterar ciertas etapas del proceso de espermatogénesis, afectando la reproducción en mamíferos, entre otros efectos.

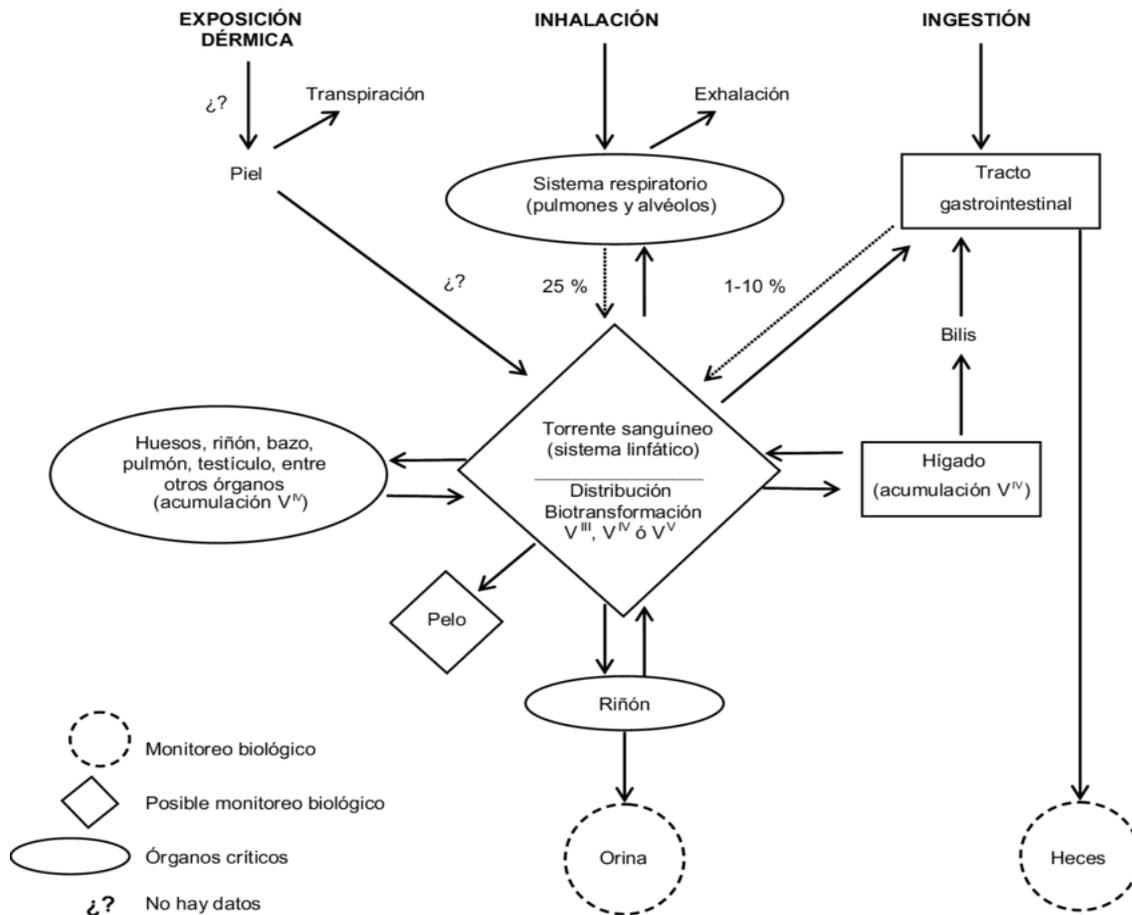
En las aguas de mar, la concentración media de vanadio, presente fundamentalmente como NaH<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>, es del orden de 30 nM, constituyéndose en el segundo elemento de transición más abundante en entornos marinos, superado únicamente por el Molibdeno (Baran, 2017).

Se encuentra en pequeñas cantidades en pimienta, huevo, aceites vegetales, cereales, carne bovina, peces, aves, mariscos, setas, perejil, entre otros. En la actualidad se considera como un micronutriente

esencial para el ser humano y se ha demostrado que su carencia puede provocar alteraciones en la absorción y la degradación de los carbohidratos y lípidos, el deterioro óseo, la disminución en la producción de leche materna, abortos espontáneos y problemas psicológicos (DSHS, 2015).

Se encuentra en la corteza terrestre, las rocas, algunos minerales de hierro y en yacimientos de petróleo crudo, las personas pueden estar expuestas al vanadio al respirar aire, beber agua o comer alimentos que contienen vanadio. La mayoría de los alimentos contienen de manera natural pequeñas cantidades de vanadio. Los mariscos contienen mayores cantidades de este elemento **(Figura 2)**. En general, la exposición a las cantidades de vanadio que se encuentran comúnmente en los alimentos, el suelo y el agua no se considera dañina. La mayoría de la gente no está expuesta a grandes cantidades de vanadio al respirar el aire; sin embargo, las personas que fuman están expuestas a una mayor cantidad de vanadio debido al humo del tabaco (DSHS, 2015).





**Figura 3.** Toxicocinética del vanadio (tomado de Rodríguez y Altamirano, 2006).

Varios estudios han comprobado que el Vanadio es un compuesto genotóxico e incluso carcinogénico. Los agentes genotóxicos son aquellos que afectan a los ácidos nucleicos y alteran sus funciones. Estos agentes pueden unirse directamente al ADN (Ácido desoxirribonucleico), o pueden causar daño indirecto sobre el ADN, afectando a enzimas involucradas en la replicación o, afectar otros participantes involucrados como el huso mitótico, cinetocoros, centrómeros y/o centriolos (Roldán, 2016). Intracelularmente, el vanadio tiene afinidad por el material genético. Sakurai en 1994 demostró que el óxido de vanadio administrado a ratas vía intratraqueal o intraperitoneal, se distribuye

en el núcleo, las mitocondrias, los microsomas y en el citoplasma en células de hígado.

El vanadio en modelos animales puede cruzar las barreras hematotesticular y placentaria e inducir alteraciones en las diferentes células del testículo y en el desarrollo embrionario y fetal (Aragón *et al.*, 2005). La profase meiótica y las dos divisiones de maduración son procesos únicos en la gónada, que pueden requerir el ambiente especial provisto por los complejos de unión de la célula de Sertoli y la barrera hematotesticular (Piqueras, 2002).

### ***El Vanadio como agente tóxico***

Diversas pruebas bioquímicas demuestran que el vanadio en estados de oxidación IV y V, interactúa en concentraciones de micro moles ( $\mu\text{m}$ ) con muchas moléculas orgánicas, incluyendo proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares (Crans *et al.* 1989; Baran, 2017). El vanadio pertenece al grupo de los metales pesados, al haber pocos estudios con  $\text{V}_2\text{O}_4$ , es de importancia en este ensayo observar los daños genéticos a nivel reproductivo ocasionados por este metal vía aérea, recordando que los compuestos de vanadio inhalado persisten y son absorbidos por los pulmones dependiendo su solubilidad, por lo tanto, esta sustancia absorbida se distribuye a todos los órganos. Este compuesto es tóxico para la mayoría de las especies, siendo la vía aérea aquella que absorbe un mayor porcentaje del metal y podemos encontrarlos con facilidad en el ambiente por el uso de combustibles fósiles.

El daño al ADN es inducido por agentes exógenos como los contaminantes ambientales (Taylor, 1994) o los endógenos (Lindahl & Wood, 1999).

En animales de experimentación, la entrada del metal está en función de la ruta de administración, el tipo de tratamiento y las propiedades del compuesto

(Domingo 1996). Debido a esto surge la importancia de analizar los efectos del Vanadio en ratones macho, en estado de oxidación 4+, durante el proceso de la espermatogénesis, pues los compuestos del vanadio parecen tener efectos tóxicos importantes sobre la reproducción, causando un efecto adverso en el ciclo celular y en el material genético, dañando a las futuras crías (generaciones) o al organismo dependiendo del tiempo de exposición al contaminante.

### ***Su importancia en los seres vivos.***

Los compuestos del V han sido objeto de investigación como agente que disminuyen los niveles séricos de glucosa, como antihipertensivos y anticancerígeno. El efecto tipo insulina de compuestos del V sobre células y animales diabéticos (Heyliger, 1985) ha sido estudiado desde hace más de 20 años. Estudios realizados en humanos han demostrado que las sales y los complejos de V mejoran los síntomas de la diabetes (Halberstam, 1996). Este efecto es atribuido a una acción sinérgica sobre la insulina a través de la inhibición competitiva del V sobre fosfatasas regulatorias de proteínas, específicamente la fosfatasa 1B, que es la primera en la cascada regulatoria de la insulina (Valko, 2005). El V altera los niveles de neuropéptido Y en hipotálamo y, como consecuencia, disminuye el apetito y el peso corporal (Wang, 2001). El Sulfato de Vanadilo (en una dosis de 60 mg/día) es utilizado en nuestros días por atletas que realizan levantamiento de pesas para mejorar su rendimiento (Barceloux, 1999).

- *Actividad anti obesidad de los compuestos de Vanadio*

En 2001 se realizaron estudios con el complejo bis-(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV) [VO(maltol)<sub>2</sub>], el cual se suministró vía oral a un grupo de ratas en dosis de 3 mg/día y se comprobó que disminuye el apetito, así como el peso corporal (Wang, 2001). Este hallazgo lo ha colocado como un posible fármaco anti obesidad; sin embargo, un exceso en la dosis de este compuesto genera un descenso en la absorción de selenio en el cuerpo, lo cual puede provocar envejecimiento prematuro, falta de elasticidad, alteraciones cardiovasculares y mayor propensión a infecciones (Baran, 2017).

- *Cáncer de mama*

Köpf-Maier en 1981 junto con su equipo de investigadores establecieron que el *dicloro vanadoceno*, a bajas concentraciones, es capaz de causar una significativa reducción de la proliferación de las células *Ehrlich Ascites Tumor* (EAT). D'cruz (2002), empleó *Metvan* en el tratamiento de ratones con xenoinjertos de cáncer de mama y glioblastoma, y se encontró que retrasa el desarrollo del tumor .

- *Cáncer de hígado*

En 1995, Shaver y su grupo mostraron que algunos compuestos *bisper oxovanadio* se comportan como inhibidores efectivos de la Proteína Tirosina Fosfatasa (PTPasa) (Shaver, 1995). Esto es relevante ya que algunas proteínas fosfatasas han mostrado ser oncogénicas.

- *Cáncer de próstata*

Holko (2008) junto con su equipo han tenido resultados satisfactorios del *Metvan* y el sulfato de vanadilo como anticancerígenos; se sugiere que inhiben a las PTPasa.

### ***¿El vanadio puede afectar la salud?***

Se cree que el vanadio es un nutriente esencial necesario para el crecimiento normal de una persona, y es común que forme parte de los suplementos nutricionales que se venden sin receta (DSHS, 2015). Es posible que esté ligado al crecimiento normal de los huesos; sin embargo, los científicos no están exactamente seguros de qué efectos puede tener el vanadio o cuál podría ser la cantidad adecuada para la salud. Inhalar polvo que contenga grandes cantidades de vanadio puede irritar los pulmones, la garganta, los senos paranasales, causar irritación de los ojos, congestión nasal, estornudos, tos, sibilancia (silbidos al respirar) y dificultad para respirar.

Se ha encontrado que la exposición a largo plazos a pequeñas cantidades de vanadio está ligada a la intoxicación de los riñones, la presión arterial alta y el trastorno bipolar. Si una persona corre el riesgo de estar expuesta a mayores cantidades de vanadio debe tomar las precauciones adecuadas, como el uso de un equipo protector personal a fin de reducir el peligro de inhalación e ingestión de vanadio. Se ha informado que personas que estuvieron expuestas a cantidades excesivas de ciertos compuestos de vanadio presentaron náusea, diarrea leve y cólicos estomacales. En animales a los que se suministraron dosis de compuestos de vanadio por vía oral en sus dietas se observaron diversos efectos, como disminución del número de glóbulos rojos, aumento de la presión arterial y efectos neurológicos leves. Las cantidades de vanadio administradas en estos estudios con animales fueron mucho más grandes que las que suelen presentarse debido a la exposición al vanadio en el medio ambiente (DSHS, 2015).

En testículo de ratón, la Dra. Martha Patricia Bizarro Nevares, perteneciente a la UNAM, en 2015 detectó por la presencia de Vanadio alteración en las células de Leydig (producen la testosterona) y menor generación de espermatozoides (son anormales y muchos mueren). Esto ocasiona

disminución de la fertilidad o, en caso de haber fecundación, se presenten anomalías como menor peso al nacer e incluso la muerte de embriones y fetos, según estudios de otros grupos.

Los datos obtenidos en aquella investigación, pudieran ser representativos de lo que pasa al ser humano expuesto de manera ocupacional. Estudios epidemiológicos de otros países (entre los cuales destaca India) y reportes de empresas que son bancos de semen, indican que hombres en esa condición tienen problemas en sus parámetros reproductivos (Imelda, 2015).

En un estudio realizado por Kucera y col. en 1992, los niveles de V en sangre en niños expuestos (que vivían cerca de una planta metalúrgica) eran significativamente mayores ( $0,078\mu\text{g/l}$ ) que los de niños no expuestos ( $0,042\mu\text{g/l}$ ). En la costa este del lago Maracaibo (Venezuela) donde se llevan a cabo intensas actividades petroleras, algunos estudios clínico-epidemiológicos *han revelado una alta incidencia de malformaciones congénitas del SNC probablemente asociadas al V*. Si bien hasta el momento no hay pruebas definitivas de que los compuestos de V sean los agentes etiológicos de los defectos en el tubo neural, dichos compuestos están presentes en los alimentos producidos en la región en una concentración superior comparada con datos bibliográficos anteriores (Tudares, 1998).

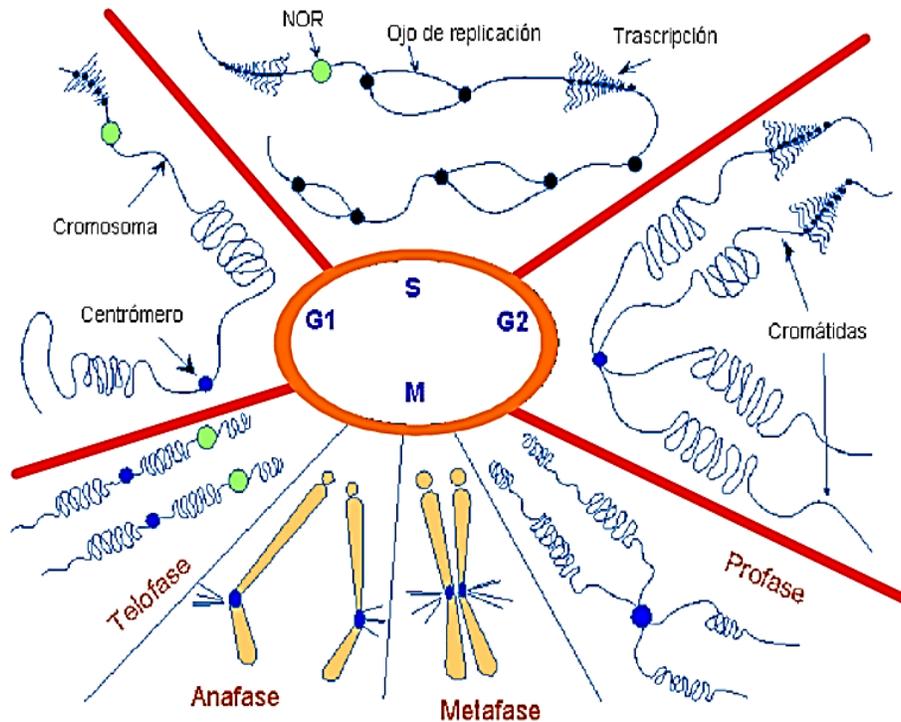
## Modelo biológico

### ***Cromosomas***

El genoma de todos los organismos se encuentra empaquetado en unos corpúsculos intranucleares coloreados llamados cromosomas (cromo=color; soma=cuerpo), visibles principalmente durante el proceso de división celular (mitosis y meiosis; Bowen *et al.*, 1998). Los cromosomas se observan al microscopio durante la metafase, cuando el DNA se ha duplicado y la cromatina está muy condensada. En esta fase, las dos hebras de DNA permanecen unidas por el centrómero formando las cromátidas hermanas.

Un cromosoma está constituido por moléculas de ADN que mantiene su estructura e integridad con la ayuda de otras moléculas. Se encuentra en el núcleo celular y tiene la función de permitir la transmisión de la información genética a la descendencia en forma aleatoria (Aparicio- Rodríguez, 2011). La cromatina es un material microscópico que lleva la información genética de los organismos eucariotas y está constituida por ADN asociado a proteínas especiales llamadas histonas. Este material se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y se visualiza como “una maraña” de hilos delgados. Cuando el núcleo celular comienza el proceso de división (*cariocinesis*), esa maraña de hilos inicia un fenómeno de condensación progresivo que finaliza en la formación de entidades discretas e independientes: **los cromosomas**. Por lo tanto, cromatina y cromosoma son dos aspectos morfológicamente distintos de una misma entidad celular (Piqueras, 2002).

El estudio de la estructura de los cromosomas de cualquier especie eucariótica consiste en analizar la forma, tamaño y número de los cromosomas que posee. El mejor momento para llevar a cabo un estudio citogenético cromosómico es durante la metafase mitótica, cuando el DNA se ha duplicado y la cromatina está muy condensada. En esta fase, las dos hebras de DNA permanecen unidas por el centrómero formando las cromátidas hermanas (Olins, 2003).



**Figura 4.** El ciclo celular consta de dos procesos principales. Uno de crecimiento, donde la célula aumenta de tamaño (fases G1 y G2), y otro de síntesis de ADN, donde la célula duplica su material genético. La duplicación comienza en la fase S donde se replica el ADN, el cual, en G2, se condensa formando cromátidas, las que se siguen condensando durante la fase M, para formar los cromosomas (profase y metafase). En anafase se produce la segregación de los mismos entre las dos células hijas y en la telofase se vuelven a desarrollar para quedar de nuevo en forma de cromatina (Zulma, 2006).

Si bien, los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies por las modificaciones que producen en el número o el ordenamiento de los genes, estos pueden originar también considerables repercusiones como la pérdida de la viabilidad celular, cambios fenotípicos en el organismo o en la descendencia, retraso mental, malformaciones congénitas, infertilidad y cáncer (Gurin, 2004).

En la mayoría de los eucariotas con reproducción sexual, se encuentran dos cromosomas de cada tipo, llamados pares homólogos (**Figura 5**), en donde cada uno de ellos proviene de uno de los parentales de modo que el número de cromosomas es de  $2N$  (esta propiedad se denomina diploidía), y cada homólogo puede portar diferentes alelos. Cuando un organismo posee dos copias idénticas

para un gen específico, se dice que es homocigoto con respecto al gen, lo que significa que los dos parentales eran portadores del mismo alelo (Bueno, 2011).

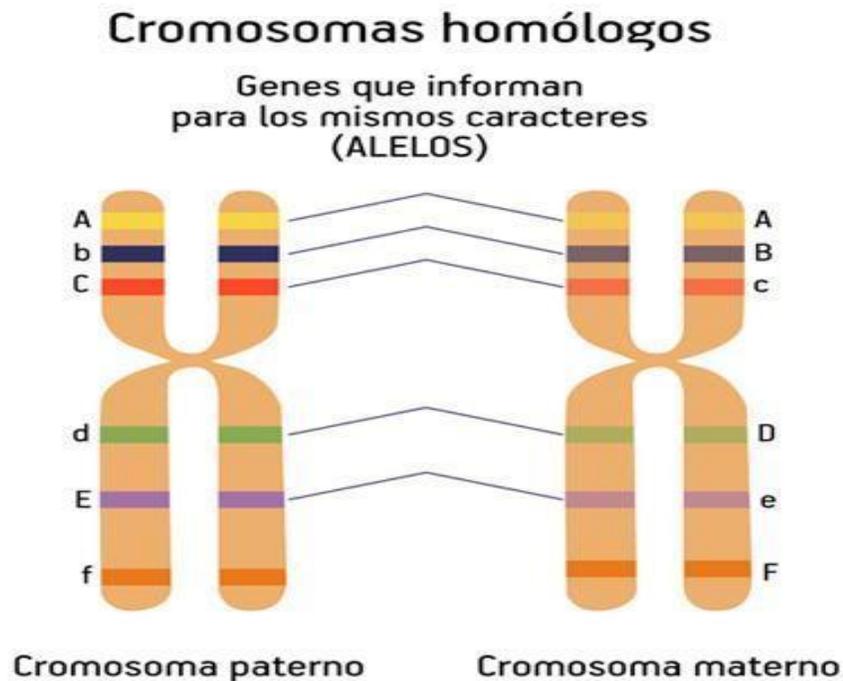


Figura 5. Cromosomas Homólogos (Moreno, 2016)

### ***El ratón y su cariotipo.***

El género *Mus* (familia *Muridae*, subfamilia *Murinae*) abarca entre 30 y 40 especies de pequeños roedores terrestres de hábitos nocturnos cuya área de distribución natural se encuentra en Europa, África y Asia. En la actualidad este género se divide en cuatro grandes taxones a los que se les suele dar categoría de subgénero, cada uno de los cuales presenta caracteres morfológicos, bioquímicos y cromosómicos diagnósticos. El subgénero *Mus* es de lejos el más ampliamente estudiado, ya que contiene la especie comensal *Mus musculus* y otras especies utilizadas habitualmente en los estudios de laboratorio (Sans- Fuentes, 2017).

El cariotipo de ratón (Figura 6), consta de 19 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales  $2n=40$  cromosomas, XY heterogamético para los machos y, XX homogamético para las hembras (Pierce, 2006).

El cariotipo del ratón doméstico, *Mus musculus domesticus*, consta típicamente de 40 cromosomas acrocéntricos, pero existen ciertas regiones geográficas donde las poblaciones de esta subespecie se caracterizan por presentar cromosomas metacéntricos y números diploides reducidos. Este hecho es debido a un tipo de mutación llamada fusión céntrica o translocación Robertsoniana, en la que dos cromosomas acrocéntricos no homólogos se unen por los respectivos centrómeros para formar un metacéntrico (Evans, 1967).



**Figura 6.** Cariotipo del ratón (*Mus musculus*),  $2n=40$  (Tomado de Robledo, 2014)

## ***Anomalías cromosómicas.***

La información genética tiene un delicado equilibrio, en donde la ganancia o pérdida de un cromosoma, o parte de él, en un organismo diploide conduce a menudo a la letalidad o a un fenotipo anormal. Estos cambios son conocidos como mutaciones cromosómicas o aberraciones cromosómicas, las aberraciones cromosómicas se clasifican en estructurales (ACE) y numéricas (ACN) (Klug *et al.*, 2006).

El ensayo de AC es uno de los más recurridos en la citogenética convencional, se considera práctico y sensible en la detección de agentes mutagénicos, así como en la inducción de rompimientos cromosómicos (clastogénesis) y es usado para evaluar el daño en la estructura del ADN que pueden inducir diversos agentes químicos, físicos y biológicos, por medio del análisis visual de los cromosomas en metafase (Dean y Danford, 1985, Roldán, 2016).

El material genético está sujeto a variaciones de distinto tipo. En los tejidos de proliferación algunas de estas variaciones pueden detectarse como aberraciones cromosómicas, las causas de estas pueden ser intrínsecas, debido a errores en el proceso de duplicación semiconservativa del ADN y/o extrínsecas, a causa de la acción de agentes clastogénicos presentes en el medio ambiente en que el tejido debe proliferar concomitantemente con fallas en los mecanismos de reparación de dichas lesiones (Larramendy & Dulout, 1979).

En ratón se ha señalado la existencia de diferencias entre líneas endocriadas y entre sexos respecto a la respuesta de la acción de agentes mutagénicos (Generoso & Rusell, 1969). En seres humanos se encontraron variaciones individuales significativas en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, lo que puede indicar diferencias en los procesos de reparación del ADN cromosómico (Lezana *et al.*, 1977).

Las modificaciones que se producen en la estructura cromosómica, por cualquier causa y que son o pueden ser transmitidas a la descendencia de manera estable, deben considerarse como macro mutaciones en relación a las micro mutaciones o mutaciones de punto que se producen a nivel molecular. En general, las

aberraciones cromosómicas se estudian como consecuencia de la acción de algún agente clastogénico y no como un fenómeno espontáneo sujeto a todo tipo de variables biológicas (Larramendy & Dulout, 1979).

Los compuestos que causan cambios en el número de cromosomas tienen interferencia directa con estructuras involucradas en la división celular, actúan durante la segregación cromosómica en la meiosis y no interaccionan de manera directa con el ADN, por lo tanto, inducen aberraciones cromosómicas numéricas. Sin embargo, en la actividad clastogénica causan alteraciones cromosómicas, teniendo una acción directa sobre el ADN, induciendo rompimientos de las cadenas del ADN y se originan desplazamientos. Los agentes clastógenos están estrechamente relacionados con la formación de Aberraciones Cromosómicas Estructurales, cambios en la morfología de los cromosomas, que evidencian el reordenamiento del material genético al llevarse a cabo los rompimientos de cadena doble del material genético (Roldán, 2016).

### ***Anomalías cromosómicas estructurales***

Las variaciones cromosómicas estructurales (**Tabla 1**) se han clasificado históricamente en cuatro tipos básicos: deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones (Lacadena, 1996). Mientras que las deleciones y duplicaciones afectan al número de genes y por tanto al tamaño del cromosoma, las inversiones y translocaciones representan cambios en la ordenación del material genético pero sin incremento ni disminución de su cantidad (Muñoz, 2008).

**Tabla 1.** Representación de las aberraciones cromosómicas estructurales en ratón.

Aberración	Diagrama con símbolo	Definición y comentario
<b>A. Tipo Cromosómico</b>		
1. Gap (Brecha)		Involucra a ambas cromátidas de un cromosoma en un mismo lugar ( <i>loci</i> ) Región no-teñida o lesión acromática en un mismo locus en ambas cromátidas con poca desalineación de las cromátidas.
2. Rompimiento		Un cromosoma sufre dos roturas, involucrando ambas cromátidas y los extremos rotos pueden unirse para formar un cromosoma circular, formando un anillo.
3. Intercambio		Involucra 2 o más lesiones en un mismo o diferente cromosoma.
3.1. Intercambio entre cromosomas.		Resulta de un intercambio asimétrico que produce un fragmento el cuál se registra como un solo evento.
	Dicéntrico con un fragmento	
3.2. Intercambio, entre de un cromosoma		
i) Entre brazos (intercambio inter brazos )		El fragmento parte del intercambio y se registra por separado. Un fragmento es asignado a cada anillo (dicéntrico).
	Anillo céntrico con fragmento	
ii) Dentro un brazo (intercambio entre brazos )		La parte céntrica de este intercambio puede no ser identificada. Los anillos acéntricos son pequeños y son llamados minutas o delección intersticial.
	Anillo acéntrico	

## B. Tipo Cromatídico

1. Gap (brecha)



Implica solamente una cromátida del cromosoma excepto la isocromátida rota.

Región no teñida o lesión acromática de menor diámetro que la cromátida, donde hay un mínimo desalineamiento de la cromátida.

2. Rompimiento o deleción.



Región no teñida mayor al diámetro de la cromátida.

Fragmento alineado



Fragmento asociado con el cromosoma original.

3. Rompimiento isocromatídico o deleción



Fragmento desalineado

Reunión incompleta o unión hermana de los extremos rotos.



Reunión incompleta (no unión). Los fragmentos alineados o desplazados se consideran una deleción *isolocus*.

4. Intercambios:

4.1. Intercambio entre cromosomas

i) Asimétricos



Se origina por rompimientos cromatídicos con distintos cromosomas, se forma un dicéntrico cromatídico y los fragmentos resultantes se unen formando figuras cuadriradales.

ii) Simétricos



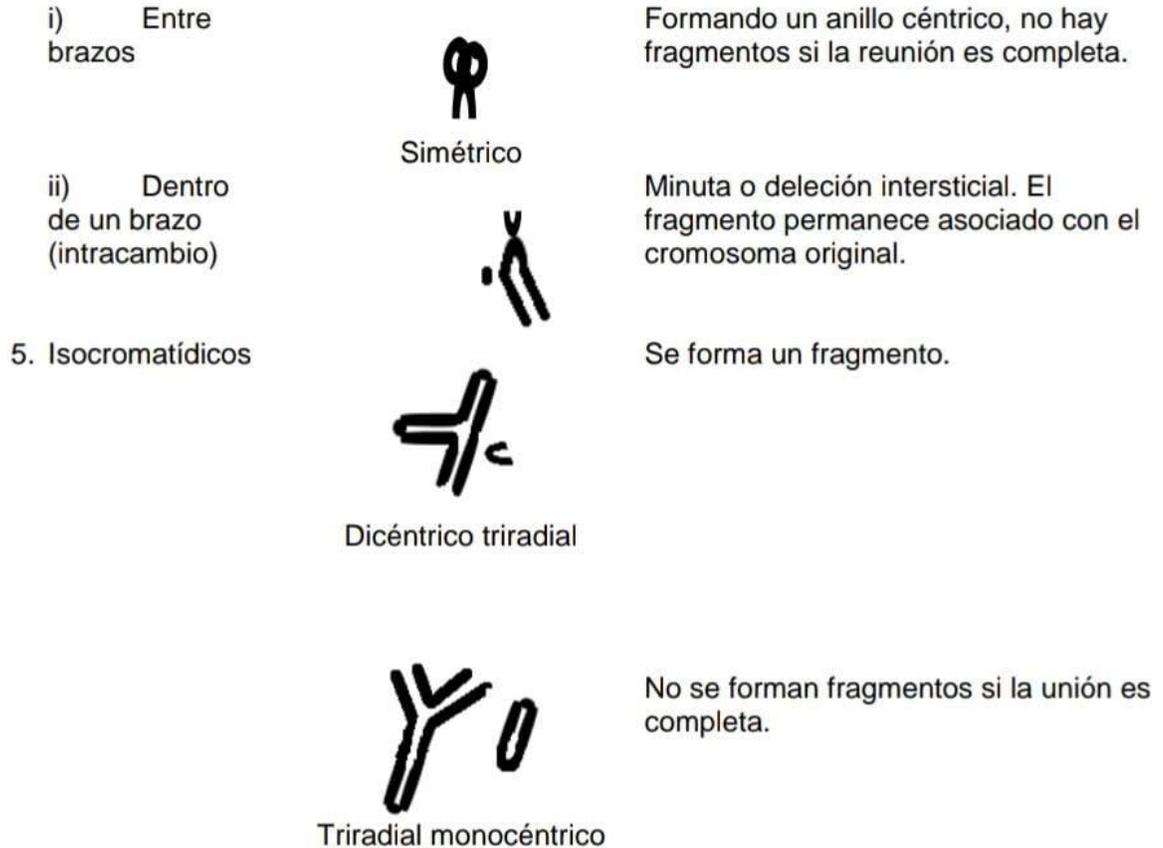
No da lugar a la formación de dicéntricos cromatídicos, ni fragmentos al menos que la unión sea completa, también es llamado cuadriradial.

4.2. Intercambio dentro de un cromosoma



Entre brazos de un mismo cromosoma (intercambio)

Asimétrico: No se producen fragmentos



(Tomado de Buendía, 2013)

### ***Anomalías cromosómicas numéricas***

Es la variación en el número de cromosomas, desde la pérdida de uno o más cromosomas, a la adición de una o más dotaciones haploides de cromosomas. Las variaciones numéricas básicamente de tres tipos: poliploidías, haploidías y aneuploidías.

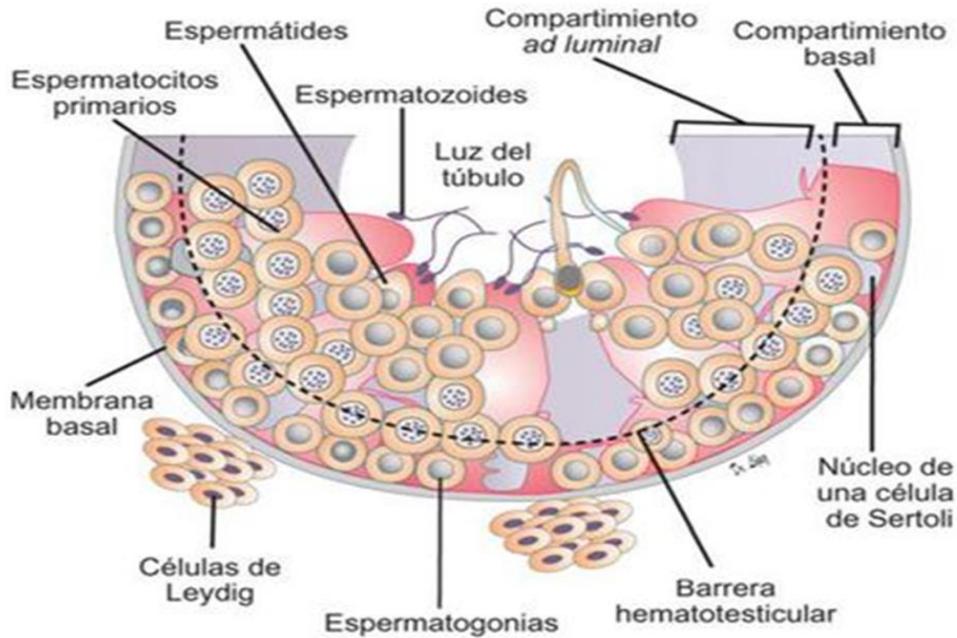
La poliploidía y haploidía suponen cambios en el número de juegos cromosómicos. La haploidía representa la pérdida de la mitad de dotación cromosómica, es decir, cuando las células de un organismo poseen la misma dotación cromosómica que los gametos. La aneuploidía (donde se encuentra la poliploidía) por su lado implica variación en el número de cromosomas pero sin llegar a afectar a juegos cromosómicos enteros (Muñoz, 2008).

- ✓ ANEUPLOIDÍA: El organismo gana o pierde uno o más cromosomas, pero no una dotación completa.
  - Monosomía: Pérdida de un cromosoma ( $2n-1$ ).
  - Trisomías: Ganancia de un cromosoma ( $2n+1$ ).
  - Tetrasomía: Ganancia de dos cromosomas homólogos ( $2n+2$ ).
- ✓ EUPLOIDÍA: Corresponde al número de cromosomas de una célula que es múltiplo exacto del número haploide normal ( $n$ ).
- ✓ -Poliploidía: El número haploide es mayor, a partir de  $2n$ . Ejemplo: en la triploidía el número haploide normal se encuentra triplicado ( $3n$ ).

La variación en el número de cromosomas se origina por una no disyunción (error aleatorio durante la producción de gametos), fallo de los cromosomas o de las cromátidas al separarse y desplazarse a los polos opuestos durante la división celular. Los cambios cromosómicos numéricos y estructurales constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies, debido a que los cromosomas son los vehículos de la herencia (Gurin, 2004).

### ***Espermatogonias***

Las espermatogonias, las cuales pueden observarse cerca de la membrana basal (**Figura 7**), 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).



**Figura 7.** Barrera Hematotesticular (Tomado de López, 2009).

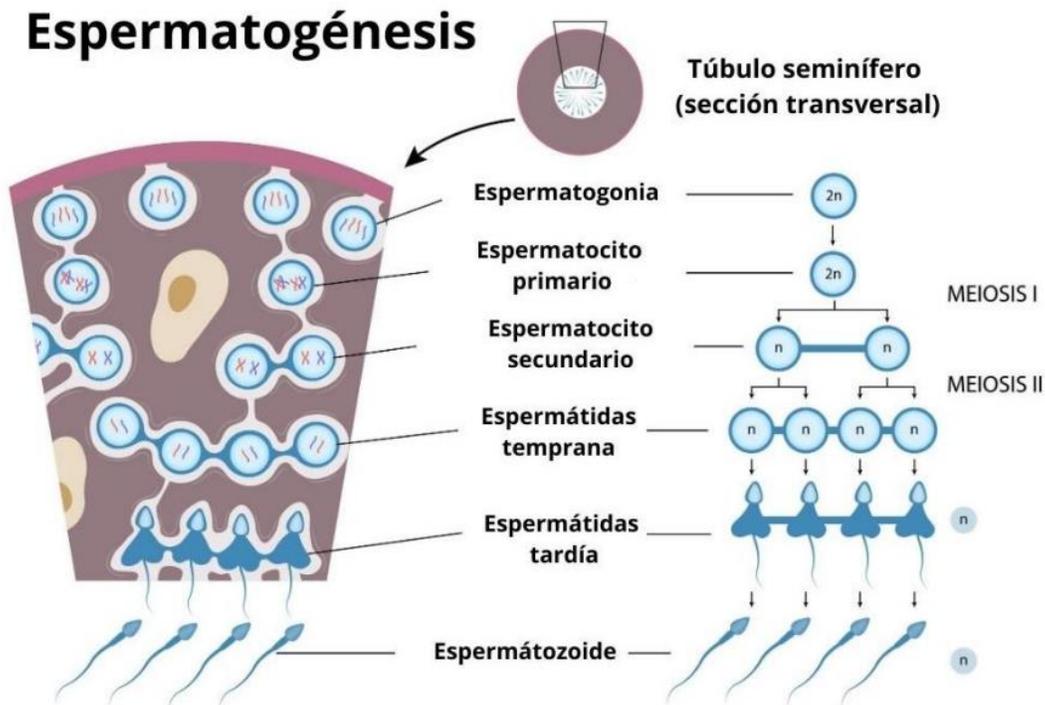
La importancia de alteraciones cromosómicas en espermatogonias, ha sido reconocida en vista de que las espermatogonias constituyen la población celular permanente del testículo y el daño genético inducido en esta etapa, puede ser de gran significado (Dunn, 1981). La posible activación o biotransformación 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 cambios en el material genético (Fernández, 2003).

Los mamíferos aseguran su variabilidad genética mediante los eventos mitóticos y meióticos que se originan en células diploides denominadas Células Madre Espermatogoniales cuya sigla: SSCs, proviene del inglés Spermatogonial Stem Cells. Estas células diploides constituyen el reservorio a partir del cual se producen espermatozoides de manera continua, durante toda la vida de los mamíferos macho. Estas SSCs existen en cantidades muy pequeñas en la periferia de los túbulos seminíferos, contándose en los roedores alrededor de 35.000 SSCs, que



Las propiedades de multipotencia y autorenovación de estas células madre espermatozonales, les permite en condiciones adecuadas dividirse indefinidamente conservando una población estable de SSCs, que en ambientes apropiados y recibiendo los estímulos adecuados pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas de un organismo adulto (Das et al., 2008).

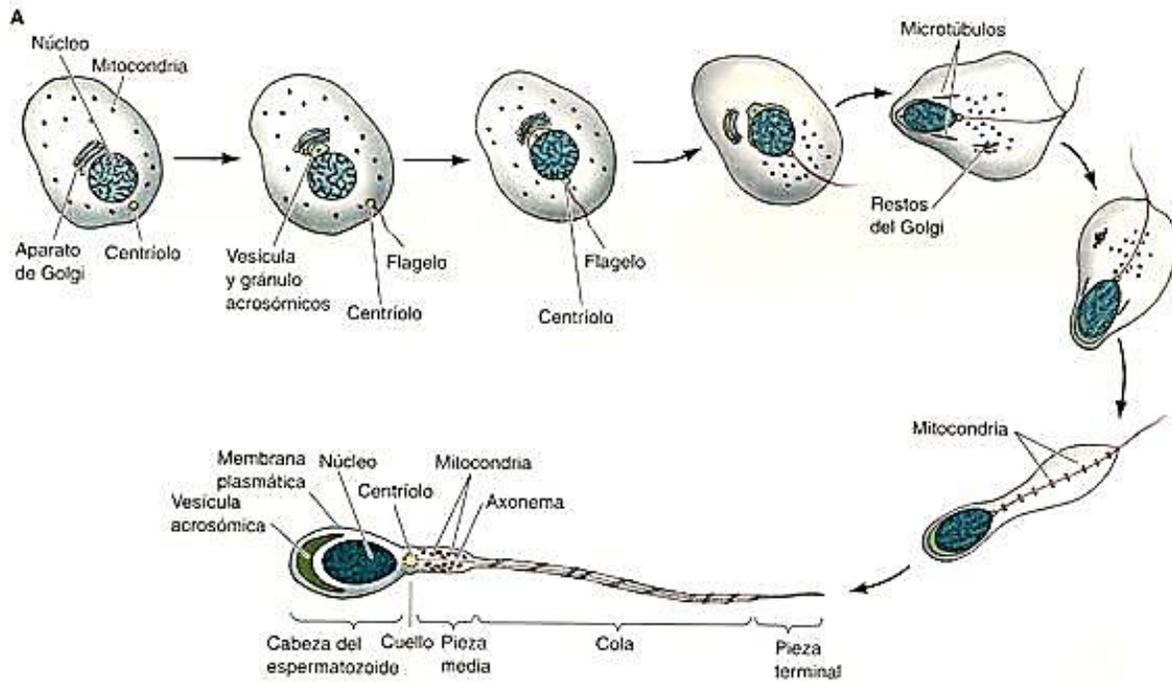
La **espermatozonésis** comienza con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros (**Figura 8**).



**Figura 9.** Espermatozonésis (Tomado de Parada 2020).

El proceso completo se puede dividir en tres fases: la fase proliferativa, durante la cual algunas Espermatogonias diploides se dividen para restaurar el pool de células madre y otras experimentan divisiones mitóticas hasta estar preparadas para sufrir la diferenciación y producir los *Espermatocitos de primer orden*; la fase meiótica, en la cual los Espermatocitos experimentan la meiosis para dar lugar a las espermátidas haploides ( $n=20$  cromosomas) y por último, la **espermiozonésis**, (**Figura 9**) durante la cual las espermátidas redondas haploides se diferencian en

espermatozoides maduros que son capaces de moverse y fecundar a un ovocito (Kerr, 1992).



**Figura 10.** Espermiogénesis (Tomado de Gilbert, 2005).

## JUSTIFICACIÓN

La distribución de los elementos en el medio ambiente, como la presencia del Vanadio repercute en la salud del ser vivo ocasionando daños tóxicos, mutagénicos y genotóxicos, al ser este metal una de las fuentes más importantes de exposición para el hombre, presente como óxidos de vanadio, liberados al quemar combustibles de petróleo, este se ha convertido en un gran contaminante atmosférico; por lo que es de importancia analizar de qué manera el compuesto de Vanadio IV ( $V_2O_4$ ) ejerce dichos efectos en mamíferos, en diferentes tejido germinal (espermatogonias) y somático (médula ósea), en este estudio destaca el conocer los efectos genotóxicos, así como citotóxico y/o citostático en células madres de espermatozoides , y en linfocitos de médula ósea en un modelo *in vivo* ya que su absorción incluye la vía respiratoria o inhalada, la cual es utilizada en este ensayo.

## HIPÓTESIS

El Tetraóxido de Vanadio ( $V_2O_4$ ) tiende a acumularse en los tejidos como resultado de la exposición a la contaminación industrial y a la quema de combustibles derivados del petróleo, debido a que el vanadio puede ingresar por diversas vías al organismo donde la inhalatoria es la más eficiente, se espera que ante la exposición subcrónica a este metal se ocasione daño en la estructura y número cromosómico de ratones machos de la cepa CD-1 desestabilizando su genoma.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto genotóxico de Tetróxido de Vanadio ( $V_2O_4$ ) a diferentes concentraciones, en cepa de ratones CD-1 por tratamiento subcrónico mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonias y médula ósea.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Analizar en las espermatogonias y médula ósea de los ratones expuestos a las diferentes concentraciones de Tetróxido de Vanadio ( $V_2O_4$ ) las aberraciones cromosómicas y establecer el efecto genotóxico de los tratamientos.

-Analizar el Índice Mitótico Espermatogonial (IME) en espermatogonias tipo B e Índice Meioítico (IMe) en espermatoцитos de cada concentración para determinar el efecto citotóxico de los tratamientos.

-Analizar el Índice Mitótico (IM) en linfocitos de Médula ósea de cada concentración de los grupos de ratones expuestos para establecer el efecto citotóxico de los tratamientos.

## MATERIALES Y MÉTODO

Para el desarrollo de los diferentes métodos se emplearon los siguientes reactivos: Tetróxido de Vanadio ( $V_2O_4$ , pureza del  $\geq 99\%$  Sigma- Aldrich, CAS 12036-21-4) Colchicina (CCC,  $C_{22}H_{25}NO_6$   $>95\%$  CAS 64-86-8, Sigma-Aldrich/EUA), Cloruro de Potasio (KCl, CAS 7447-40-7, Hycel, México), Mitomicina C (MMC, CAS 50-07-7, Sigma-Aldrich/EUA), Giemsa (Sigma- Aldrich, USA, CAS 51811-82-6); Metanol absoluto ( $CH_3OH$ , CAS 67-56-1) y Ácido acético glacial ( $CH_3COOH$ , CAS 64-19-7) de JT Baker México; Solución Cloruro de Sodio (NaCl, 0.9%) PiSA México.

### I. TRATAMIENTO CON ( $V_2O_4$ ) POR VÍA AEREA

Se realizaron 5 grupos de estudio conformado cada uno por 5 ratones machos de la cepa CD-1, con 30-42 gramos de peso y 8 a 12 semanas de edad. Cada grupo fue expuesto a una disolución de  $V_2O_4$   $\geq 99\%$  (Sigma- Aldrich) y  $H_2O_d$  (P/V) a tres distintas concentraciones (en mg) a partir de la LD50 (150 mg/kg) en relación al peso de cada ratón en un sistema cerrado con un nebulizador (Omron/Japón) ubicado en la campana de extracción prendida. Los ratones permanecieron en este sistema durante 1 hora, posterior a ese tiempo el nebulizador fue apagado y se abrió el sistema de manera mínima para evitar la salida de los mamíferos, dándose un tiempo extra de 30 minutos antes de retirarlos del sistema. El tratamiento se realizó de manera subcrónica, por lo cual se realizaron 8 sesiones por tratamiento (1 cada tercer día) durante un periodo de 15 días para cada concentración (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Tratamientos por grupo.**

No. De ratones	Tratamiento/grupo	Dosis [mg/Kg ratón]
5	Testigo negativo (T <sup>-</sup> )	0.0
5	Testigo positivo Mitomicina C (T <sup>+</sup> MMC)	0.08 mg/kg
5	V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Baja (1/4 LD50 = 37.5 mg/kg)	1.5
5	Media (1/2 LD50 = 75 mg/kg)	3.0
5	Alta (3/4 LD50 = 112.5 mg/kg)	4.5

mg, miligramos.

## **OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Para la obtención de espermatogonias se siguió el procedimiento descrito en el Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en Espermatogonias de Mamíferos (OECD, 2016).

Para la obtención de Médula ósea se siguió el procedimiento presente en el Ensayo Aberraciones Cromosómicas en Médula Ósea de Mamíferos 1997-2016 (OECD, 2016).

### ***Espermatogonias.***

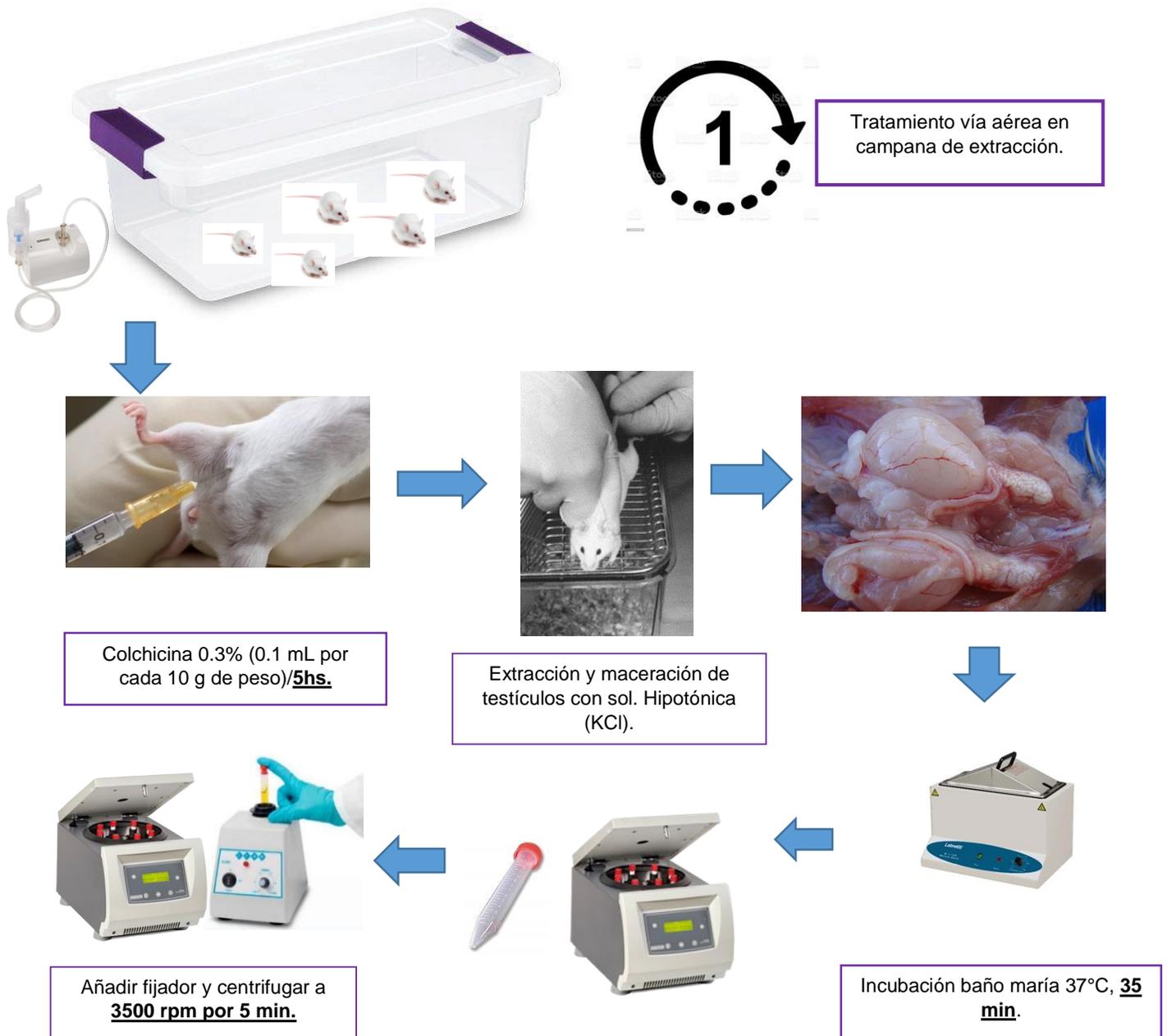
Transcurridas las 24 horas del último tratamiento de cada concentración se administraron 0.1 ml de Colchicina (P/V) por cada 10 gr de peso, vía intraperitoneal con una jeringa, y se dejó que esta actuara en los organismos durante 5 horas. Posterior a ese tiempo se sacrificaron mediante dislocación cervical, se realizó un corte en forma de Y, y se hizo la disección, extrayendo los testículos y fémur del

organismo. Los testículos fueron pesados y macerados de manera individual en cajas Petri con solución hipotónica KCl 0.075M (P/V), se llevó el contenido de cada testículo disgregado a 10 ml en un tubo de centrifuga, y se dio tiempo a que el tejido descendiera en un aproximado de 10 minutos, transcurrido este tiempo se retiró el sobrenadante teniendo cuidado de no absorber el contenido celular y de nuevo se llevó a 10 ml de solución hipotónica incubando los tubos a 37° C por 30 minutos ; al concluir este tiempo se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos, y se retiró el sobrenadante, se adicionaron 5 ml de fijador metanol- acético 3:1 (V/V), reposó por 10 minutos y se centrifugó a 3500rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante, finalmente se añadió 5 ml de Ácido acético 60% (V/V) y transcurrieron 20 minutos antes de llevar a cabo la técnica de goteo en laminillas frías.

### ***Médula Ósea***

Para médula ósea, al extraerse el fémur del organismo se retiró músculo y piel, dejando solo los huesos libres, a ambos huesos se les cortó la epífisis y se hizo un arrastre de la médula ósea con 5 ml de solución hipotónica KCl 0.075M (P/V) a 37°C; en ambos fémur en un tubo de centrifuga, y se mantuvieron en incubación a 37°C por 35 minutos, posterior a este tiempo se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos , se retiró el sobrenadante conservando el paquete celular, se agregó lentamente fijador metanol- acético 3:1 (V/V), se dio un reposo de 10 minutos y se centrifugó a 1500rpm durante 10 minutos, se hicieron 3 lavados sucesivos con el fijador y el botón celular se llevó a 0.5 ml con fijador, previo al goteo en laminillas frías.

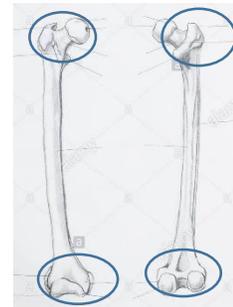
## Diagrama de Flujo. Obtención de material biológico espermatozoidal.



## Diagrama de Flujo. Obtención de material biológico, Médula Ósea.



Colchicina 0.3% (0.1 mL por cada 10 g de peso)



Extracción fémur, corte de epífisis



Centrifugar **10 min a 1500rpm**, retirar sobrenadante.



Incubación baño maría **37°C, 35 min.**



Arrastre de médula ósea con Sol. Hipotónica (5 mL)



Añadir fijador y centrifugar a **1500 rpm por 10 min.**

### III. OBSERVACIÓN DE CROMOSOMAS METAFÁSICOS Y ANÁLISIS DE AC.

Para la observación de los cromosomas, las laminillas fueron teñidas con Giemsa al 10% (V/V) durante 8-10 minutos. La observación se realizó en un microscopio con enfoque a 10X, 20X, 40X y 100X; se llevaron a cabo conteos de 2000 células por ratón, para obtención de Índices Mitóticos, así como Meiótico.

Se utilizó la siguiente fórmula para la obtención de los IM y se modificó para las diferentes variantes:

$$\text{Índice Mitótico (IM)} = \frac{\text{Células en metafase}}{\text{Células en interfase}} (100)$$

**Tabla 3. Evaluación de células en el microscopio**

Parámetros		No. células analizadas
<b>Aberraciones Cromosómicas</b>	Estructurales y Numéricas	50 metafases espermatogoniales. 100 metafases en médula ósea.
<b>Índice Mitótico Espermatogonial</b>	<b>IME</b> = Espermatogonias en metafase / espermatogonias en interfase x 100	2000 / ratón = 10 000 por grupo
<b>Índice Meiótico Espermatogonial</b>	<b>IMe</b> = No. Metafases meióticas / total de células x 100	2000 / ratón = 10 000 por grupo
<b>Índice Mitótico en Médula Ósea</b>	<b>IM</b> = No. Metafases / total células x 100	2000 / ratón = 10 000 por grupo

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para establecer las diferencias entre el grupo control y los grupos de ratones CD-1 tratados los IME, IM e IMe se analizaron empleando la prueba Z de proporciones. Para el caso de las ACE y ACN se utilizó la prueba de homogeneidad (*Chi cuadrada con corrección de Yates*). En todos los casos se considera  $\alpha$  menor o igual a 0.05.

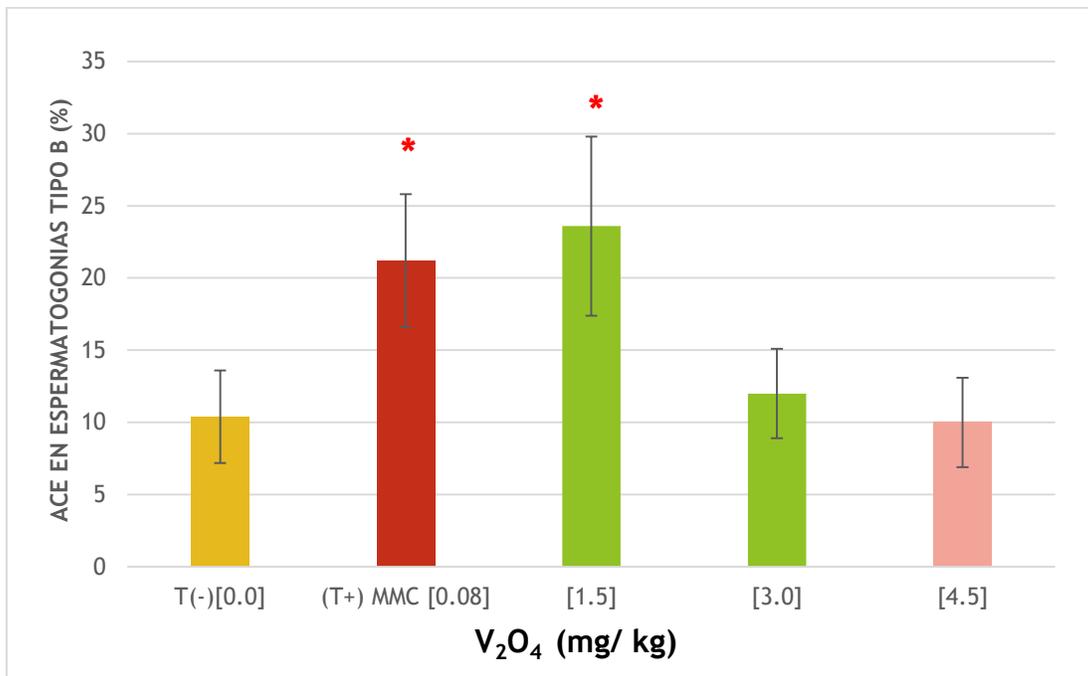
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Efecto del $V_2O_4$ sobre el porcentaje de células con ACE en espermatogonias tipo B.

**Tabla 4.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) en espermatogonias tipo B de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía aérea con  $V_2O_4$ .

Tratamiento [mg/kg]	Ratón (N)	Frecuencia de ACE					Tot. De ACE [F]	Tot. Célula con ACE (%)
		Cromatídicas		Cromosómicas				
		Metafasas analizadas	Rompimiento [F]	Gap [F]	Rompimiento [F]	Pulverización [F]		
<b>T (-)</b> <b>0.0</b>	1	50	3	0	1	0	4	8
	2	50	4	0	2	0	6	12
	3	50	5	0	2	0	7	14
	4	50	5	0	0	1	6	12
	5	50	2	0	1	0	3	6
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.8	0.0	1.2	0.2	5.2	10.4±3.2
<b>T + MMC</b> <b>(0.08)</b>	1	50	6	0	3	0	9	18
	2	50	6	1	3	2	12	24
	3	50	9	0	4	1	14	28
	4	50	7	0	1	1	9	18
	5	50	4	1	1	3	9	18
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			6.4	0.4	2.4	1.4	10.6	<b>21.2± 4.6*</b>
<b><math>V_2O_4</math></b> <b>[1.5]</b>	1	50	7	0	4	0	11	22
	2	50	9	1	4	2	16	32
	3	50	7	1	3	3	14	28
	4	50	6	0	2	1	9	18
	5	50	5	1	2	1	9	18
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			6.8	0.6	3.0	1.4	11.8	<b>23.6± 6.2*</b>
<b>[3.0]</b>	1	50	5	0	2	1	8	16
	2	50	1	1	2	2	6	12
	3	50	4	0	1	0	5	10
	4	50	4	0	0	0	4	8
	5	50	5	0	2	0	7	14
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.8	0.2	1.4	0.6	6.0	12± 3.1
<b>[4.5]</b>	1	50	4	0	2	1	7	14
	2	50	2	0	1	1	4	8
	3	50	2	0	1	0	3	6
	4	50	3	0	2	1	6	12
	5	50	5	0	0	0	5	10
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.2	0.0	1.2	0.6	5.0	10± 3.1

F (Frecuencia) \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $X^2$  -Yates.



**Figura 11.** Porcentaje de células con ACE en espermatogonias Tipo B, de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía inhalatoria con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ , X<sup>2</sup>-Yates.

La **Tabla 4.** Muestra las frecuencias de ACE, así como el porcentaje total de células con presencia de estas mismas AC. Se observa que en mayoría son rompimientos de tipo cromatídico.

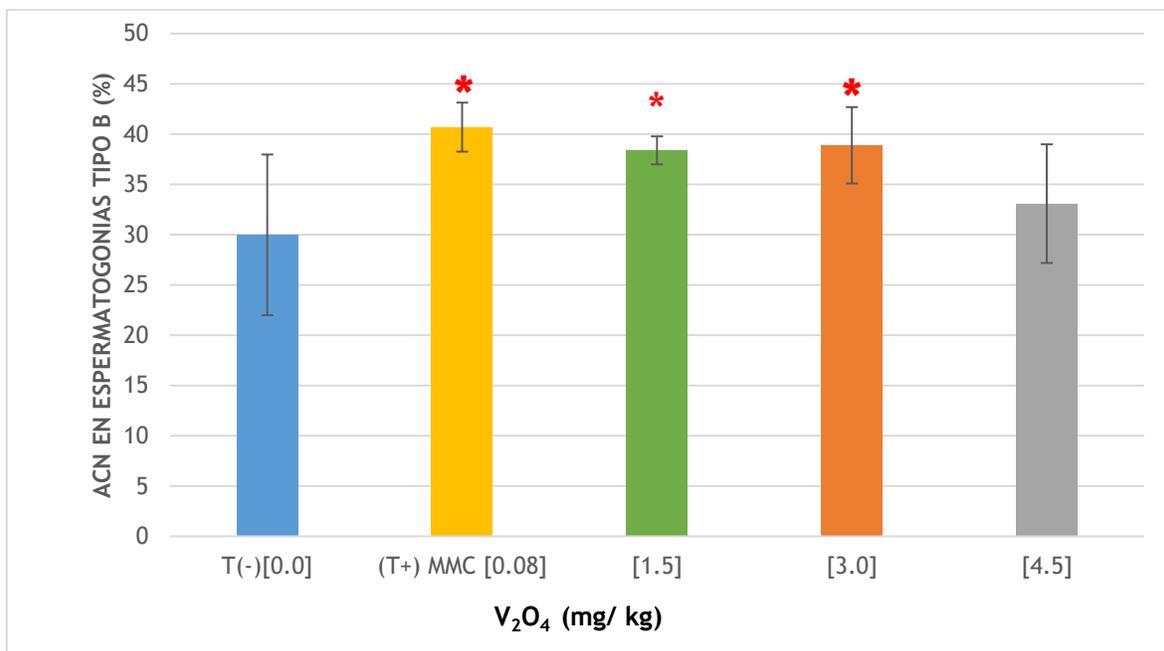
De acuerdo a Rodriguez & Altamirano en 2006, los reportes relacionados con la actividad genotóxica y mutagénica en sistemas de mamíferos expuestos a Vanadio *in vivo* no son suficientes, la mayoría de ensayos son destinados al Pentóxido de vanadio, pero para el Tetraóxido de vanadio son pocos.

Las rupturas Cromatídicas o Cromosómicas, son evidencia del efecto genotóxico del V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ya que las alteraciones cromosómicas son consecuencias directa o indirecta del daño a nivel del ADN. De acuerdo a Farombi en 2006, la presencia de alteraciones cromosómicas encontradas permite relacionar el mecanismo de acción del compuesto que produce rupturas en el ADN con imposibilidad de la célula para reparar correctamente estos daños, lo cual se tornaría irreversible por saturación en los daños en los sistemas de reparación del DNA y control del ciclo celular que a futuro podría ocasionar entre otras enfermedades, diversos tipos de cáncer.

**Tabla 5.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Numéricas en espermatogonias tipo B de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía aérea con  $V_2O_4$ .

Tratamiento [mg/kg]	Ratón (N)	Frecuencia de ACN				Total Cél. Con ACN [F]	Tot. Células con ACN (%)
		Normal (2n)	Euploide [F]	Aneuploide [F]	Haploide [F]		
<b>T (-)</b> <b>0.0</b>	1	21	8	0	0	8	27.5
	2	15	10	0	0	10	40.0
	3	17	6	2	1	9	34.6
	4	19	6	1	1	8	29.6
	5	22	4	1	0	5	18.5
<b><math>\bar{x} \pm DS</math></b>		18.8	6.8	0.8	0.4	8.0	30.0±8.0
<b>T + MMC</b> <b>(0.08)</b>	1	31	16	2	0	18	36.7
	2	25	11	4	2	17	40.4
	3	27	15	4	1	20	42.5
	4	20	10	2	2	14	41.1
	5	23	13	1	1	15	42.8
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		25.2	13.0	2.6	1.2	16.8	<b>40.7±2.4*</b>
<b><math>V_2O_4</math></b> <b>[1.5]</b>	1	30	17	2	0	19	38.7
	2	22	10	1	1	12	27.2
	3	27	11	0	1	12	30.7
	4	18	18	3	0	21	53.8
	5	18	11	2	1	13	41.9
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		23.0	13.4	1.6	0.6	15.4	<b>38.4±10.4*</b>
<b>[3.0]</b>	1	22	12	2	0	14	38.8
	2	19	10	1	1	12	38.7
	3	15	8	1	1	10	40.0
	4	18	8	1	0	9	33.3
	5	14	10	0	1	11	44.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		17.6	9.6	1	0.6	11.2	<b>38.9±3.8*</b>
<b>[4.5]</b>	1	22	10	1	0	11	33.3
	2	21	11	4	0	15	41.6
	3	22	9	2	1	12	35.2
	4	28	7	1	0	8	22.2
	5	26	11	1	1	13	33.3
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		23.8	9.6	1.8	0.4	11.8	33.1±6.9

F (Frecuencia) \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $\chi^2$  -Yates.



**Figura 12.** Porcentaje de células con ACN en espermatogonias Tipo B, de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía inhalatoria con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ , X<sup>2</sup>-Yates.

Los resultados muestran efectos tóxicos al observar la presencia de Aberraciones Cromosómicas Numéricas (**ACN**) y Estructurales (**ACE**) en todos los grupos tratados en un diferente porcentaje cada uno, haciendo énfasis que en la última concentración no hubo diferencia significativa, pero igualmente hubo una respuesta o reacción al compuesto.

Anteriormente Rodríguez y Altamirano en 2006 mencionaron que no quedaba claro si el vanadio induce AC estructurales y daño sobre el ADN. El V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en los tratamientos presentes mostró un débil efecto positivo en la formación de AC estructurales, con mayor énfasis en la dosis baja [1.5 mg] administrada. En este ensayo se contribuye a los estudios faltantes, ya que se observaron aberraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas en las diversas dosis administradas

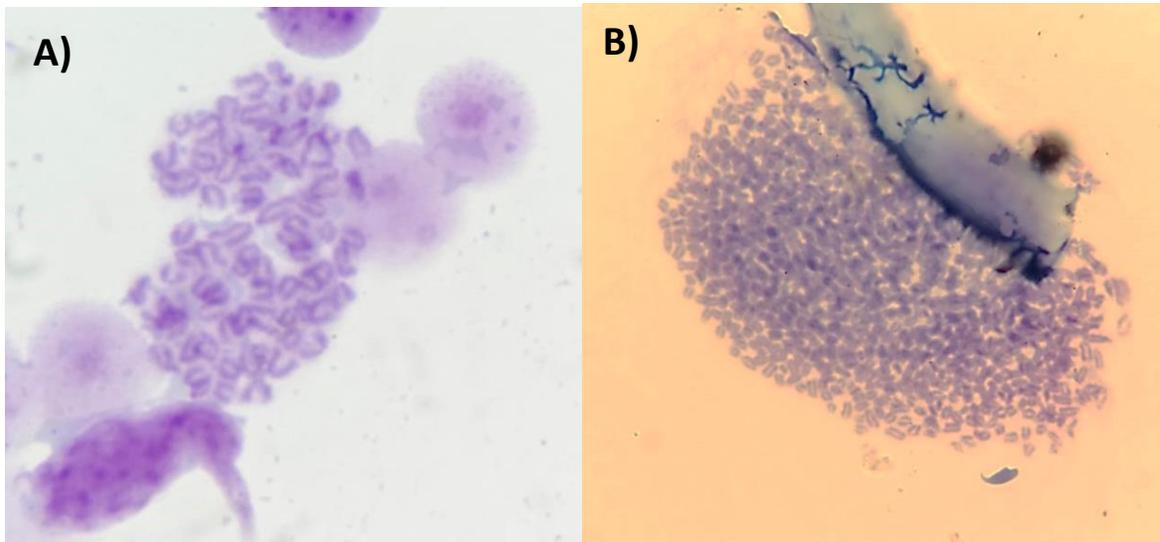
Las AC son evidencia del efecto genotóxico del Vanadio, ya que las alteraciones cromosómicas son consecuencias directa o indirecta del daño a nivel del ADN, las rupturas cromosómicas pueden ocurrir como consecuencia de la acción de

inhibidores de la Topoisomerasa II, por lo que podría relacionar al vanadio como uno de ellos para futuras investigaciones a profundidad. Es de mencionar que Topoisomerasa es la enzima nuclear que interviene en procesos de segregación cromosómica. La presencia de alteraciones cromosómicas encontradas nos permite relacionar el mecanismo de acción del compuesto que produce rupturas en el ADN con imposibilidad de la célula para reparar correctamente estos daños (Larramendy & Dulout, 1979).

Si consideramos la complejidad de los sistemas genéticos eucarióticos, es indudable la existencia de una serie de factores que pueden inducir aberraciones cromosómicas en el individuo o permitir la continuidad de lesiones cromosómicas a través de un ciclo celular, por lo menos (Larramendy & Dulout, 1979).

El  $V_2O_4$  en la concentración baja muestra un mayor efecto, con la presencia de AC, tanto numérica como estructural. Enfocándonos prioritariamente en las ACN, se sabe que los cambios en el número cromosómico conduce a desbalances en la información genética, y la presencia de al menos dos células multivalentes, nos indica posible translocación, de acuerdo a Sans (2004), la posible presencia de translocaciones puede tener efecto deletéreos sobre la fertilidad, pero es necesario tener más estudios para aceptar la hipótesis, de acuerdo con Gregorová, 1977, la presencia de translocaciones afecta negativamente la supervivencia del espermatozoido, reduciendo la fertilidad.

Las ACE se utilizan para evaluar la genotoxicidad, ya que son indicadoras del efecto clastógeno (Evans, 1982). Un mayor porcentaje en ACE en ciertos grupos tratados con  $V_2O_4$  puede deberse a que independientemente de la forma en que se aplique este metal, el vanadio se acumula exclusivamente como  $V^{4+}$  ( $VO_2^+$ ) (Sharma *et al.*, 1987; Alessio *et al.*, 1988; Elinder *et al.*, 1988; French y Jones, 1993).



**Figura 13.** Microfotografías de Metafases en espermatogonias tipo B. **A)** Normal ( $2N=40$ ), **B)** ACN (*Euploidia*). Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Estrada y Roldán, (2021) FES Zaragoza, UNAM (Campo claro 100X).

Las observaciones realizadas en este ensayo confirma la idea de Rabello de 1991, la cual nos dice que los organismos están expuestos a mutaciones como resultado de las operaciones celulares normales o de alteraciones aleatorias con el ambiente; la frecuencia de mutaciones se puede aumentar por agentes mutagénicos biológicos, físicos y químicos, que directa o indirectamente ingresan al ser vivo, constituyendo un riesgo para su salud, en este caso empleando el Tetraóxido de Vanadio para comprobar su efecto toxicológico, en el organismo.

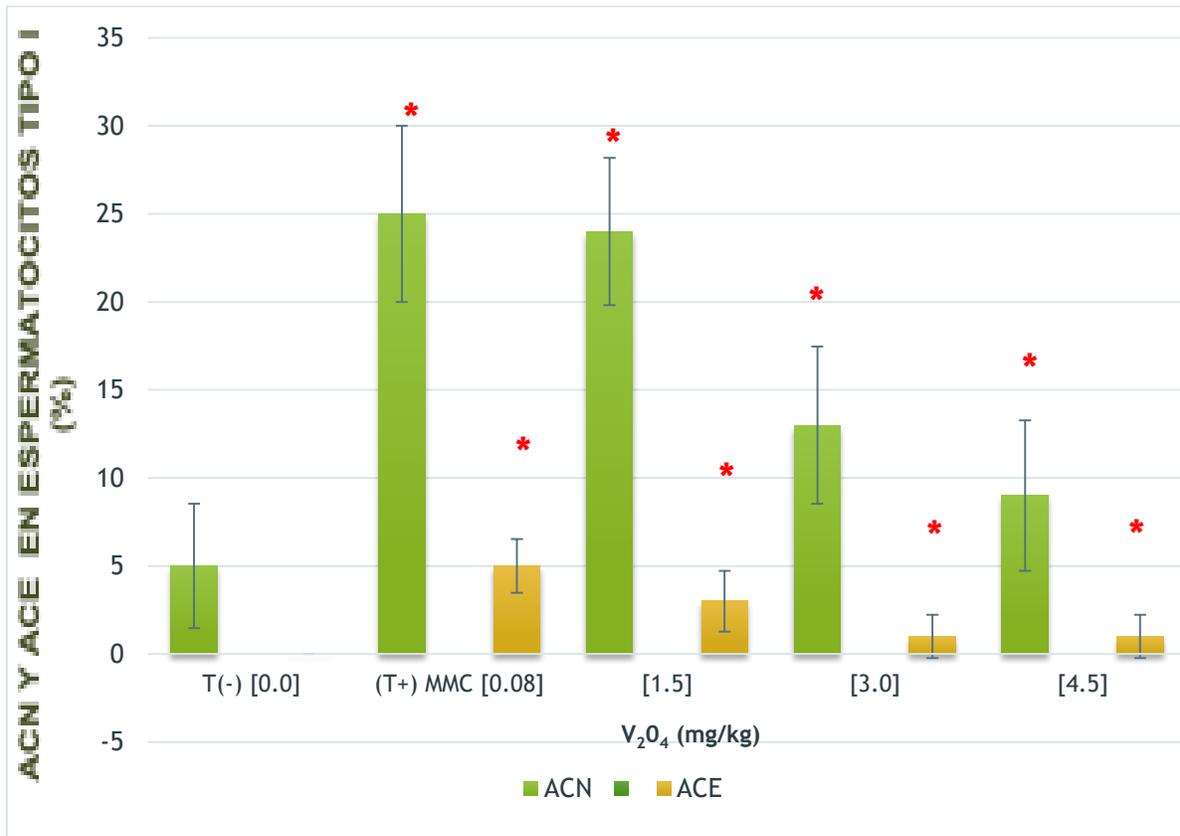
En apoyo a los resultados obtenidos generalizando al V, de acuerdo a Roldán y Altamirano en 1990 el Vanadio incrementa las células poliploides, en el sistema *in vitro*, es de importancia resaltar que se refieren al Pentóxido de Vanadio, el cual es otro compuesto, pero podría ser de significancia en este ensayo para contrastar con los efectos de Tetroxido de Vanadio y saber si es un efecto en general del metal o si la toxicidad es dependiente a cada compuesto. Ya que la toxicidad de los metales depende de la estructura química del compuesto, de la solubilidad, del estado de oxidación y de la biotransformación que ocurra por el metabolismo.

Díaz Mejía en 2021 en un estudio realizado con Pentóxido de Vanadio encontró un aumento significativo en el porcentaje de ACN para la presencia de euploidias en

los grupos tratados, para las euploidías y haploidías no hubo diferencias significativas, por lo que se apoya a los resultados obtenidos. A pesar de que fue otro compuesto derivado del mismo metal es de relevancia mencionar que el sistema trabajado (vía aérea) fue el mismo.

### **EFFECTO DEL $V_2O_4$ EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS CON ACN EN ESPERMATOCITOS TIPO I**

En la **Tabla 6** se observa que en los grupos de ratones tratados con  $V_2O_4$  en cada dosis presentaron un incremento en el porcentaje de ACN, y para las ACE se observa aumento significativo únicamente en la dosis baja. En la dosis alta para las ACN se observa un menor porcentaje, el cual dentro de la dosis-respuesta nos indica un efecto hormesis, la cual en 2009 Rattan definió como el proceso por el cual la exposición a una dosis baja de un agente químico o bien un factor ambiental, que es dañino a dosis altas, induce una respuesta adaptativa y/o un efecto benéfico en la célula o el organismo. Calabrese en 2011 describió este efecto como un fenómeno de dosis-respuesta caracterizado por una estimulación a dosis baja y una inhibición a dosis alta. Es decir, es una relación dosis-tiempo-respuesta en la cual hay una dosis inicial dependiente de una respuesta tóxica, seguida por una respuesta compensadora/ rebote. Por lo que es considerado un tipo de respuesta en células y organismos para mantener la homeostasis y adaptarse como lo es en este caso a un agente tóxico o de igual manera este menor porcentaje podría deberse a apoptosis celular, debido al daño de la célula (Diazguerrero *et al.*, 2013).



**Figura 14.** Porcentaje de células con ACN y ACE en espermatoцитos I, de ratones la cepa CD-1 tratados vía inhalatoria con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ , X<sup>2</sup> –Yates.

**Tabla 6.** Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Numéricas y Estructurales en espermatocitos I de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía aérea con  $V_2O_4$ .

TRATAMIENTOS [MG/KG]	RATÓN (N)	BIVALENTE NORMAL (N) [F]	MULTIVALENTES [F]	ACE [F]	ESPERMATOCITOS CON	
					ACN (%)	ACE (%)
<b>T (-)</b> <b>0.0</b>	1	17	0	0	0.0	0.0
	2	19	1	0	5.0	0.0
	3	19	1	0	5.0	0.0
	4	19	1	0	5.0	0.0
	5	18	2	0	10.0	0.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		18.4	1.0	0.0	<b>5.0±3.53</b>	<b>0.0</b>
<b>T + MMC</b> <b>(0.08)</b>	1	14	6	1	30.0	5.0
	2	15	5	2	25.0	10.0
	3	16	4	1	20.0	5.0
	4	16	4	0	20.0	0.0
	5	14	6	1	30.0	5.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		15.0	5.0	1.0	<b>25.0±5*</b>	<b>5.0±3.53*</b>
<b><math>V_2O_4</math></b> <b>[1.5]</b>	1	13	6	1	30.0	5.0
	2	15	4	1	20.0	5.0
	3	15	5	0	25.0	0.0
	4	14	5	1	25.0	5.0
	5	16	4	0	20.0	0.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		14.6	4.8	0.6	<b>24.0±4.18*</b>	<b>3.0±2.73*</b>
<b>[3.0]</b>	1	17	3	0	15.0	0.0
	2	18	2	0	10.0	0.0
	3	18	2	0	10.0	0.0
	4	15	4	1	20.0	5.0
	5	18	2	0	10.0	0.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		17.2	2.6	0.2	<b>13.0±4.47*</b>	<b>1.0±2.23*</b>
<b>[4.5]</b>	1	19	1	0	5.00	0.0
	2	18	2	0	10.0	0.0
	3	17	3	1	15.0	5.0
	4	18	2	0	10.0	0.0
	5	19	1	0	5.00	0.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		18.2	1.8	0.2	<b>9.0±4.18*</b>	<b>1.0±2.23*</b>

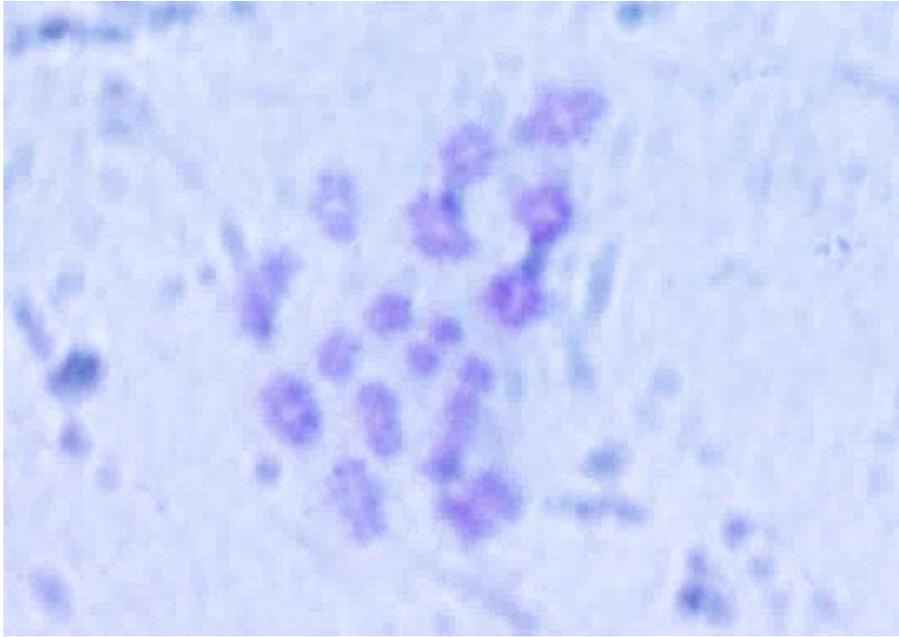
F (Frecuencia) \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $X^2$ -Yates.

La **Figura 15** nos muestra una metafase meiótica con 20 bivalentes, esto nos indica un estado cromosómico normal, es decir una metafase I bien desarrollada sin presencia de ACE y ACN, en contraste con las células multivalentes que se observa

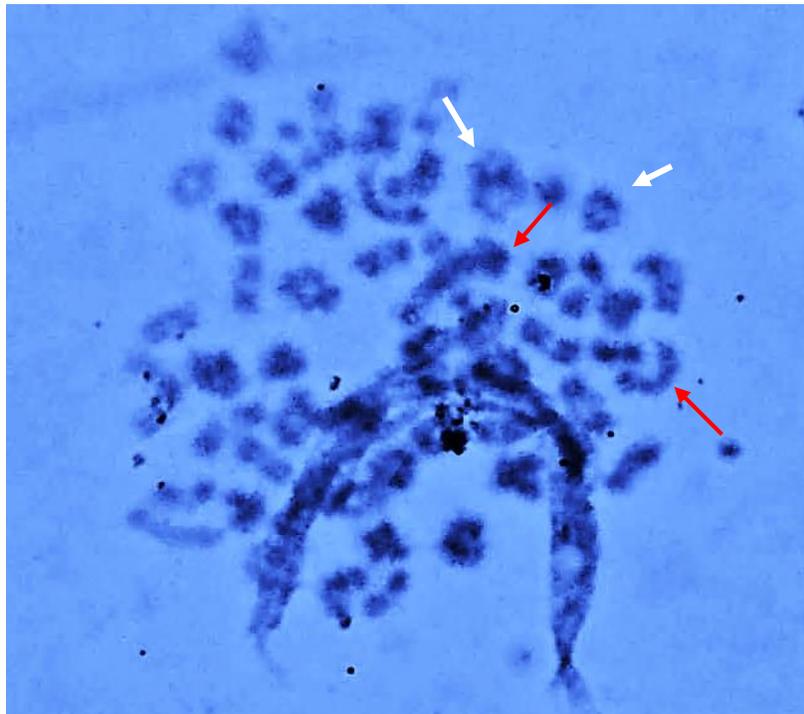
en la **Figura 16**, nos indica anomalías cromosómicas numéricas y estructurales, este tipo de metafases meióticas (las que darán paso a una translocación en los futuros espermatozoides que de esa célula deriven) si no son eliminadas aquellas células que porten la translocación por algún mecanismo como la Apoptosis, estarán presente en los gametos del organismo. Es de importancia recordar que los errores en la meiosis causan infertilidad masculina, abortos espontáneos o descendencia afectada.

Del cigoteno al paquiteno se lleva el verdadero entrecruzamiento genético, seguido de la diacinesis-metafase I, en donde los cromosomas se vuelven a condensar para unirse a la fibras del huso y se preparan para la segregación cromosómica de manera correcta, *aquí es el momento adecuado para dar origen a entrecruzamientos que involucren desde un bivalente hasta cuatro, y así originar aberraciones cromosómicas estructurales (ACE)*, las cuales surgen por un mal ordenamiento o roturas del material genético, por lo tanto pueden originarse translocaciones durante la meiosis. En la metafase observada con ACE encontramos entrecruzamientos de 2 bivalentes, en la posición de ambos extremos distales, y al haber presencia de un anillo se considera el caso de 1 cuadrivalente, el cual es formado por cuatro cromosomas homólogos.

Como consecuencia de una mala segregación cromosómica en la meiosis durante el *crossing over*, en el cual se presenta entrecruzamiento entre dos bivalentes, durante la meiosis se pueden producir gametos portadores de anomalías cromosómicas, de tal manera que se aumenta el riesgo de una descendencia afectada.



**Figura 15.** Microfotografía de **metafase meiótica normal** con 20 bivalentes de **espermatoocito I** de ratón, *Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis*, Estrada y Roldán, 2020. FES Zaragoza, UNAM (Campo claro 100X).



**Figura 16.** Microfotografía de metafase meiótica de espermatoocitos I de ratones CD-1, con poliploidía. Bivalentes en anillo (flecha blanca), dos cadenas multivalentes, (flecha roja). *Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis*, Estrada y Roldán, 2021. FES Zaragoza, UNAM. (Campo claro 100X).

## **EFFECTO DEL V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS CON ACE y ACN EN LINFOCITOS DE MÉDULA ÓSEA.**

Los cambios que ocurren en la célula son importantes para la identificación de daño que puede inducirse en cualquier sistema biológico (Schwarz y Watkins, 2008). El ensayo de aberraciones cromosómicas de médula ósea de roedores, son ensayos incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios, este es un ensayo fácilmente reproducible y brinda información clara sobre la proliferación celular en médula ósea (Cox, 1999).

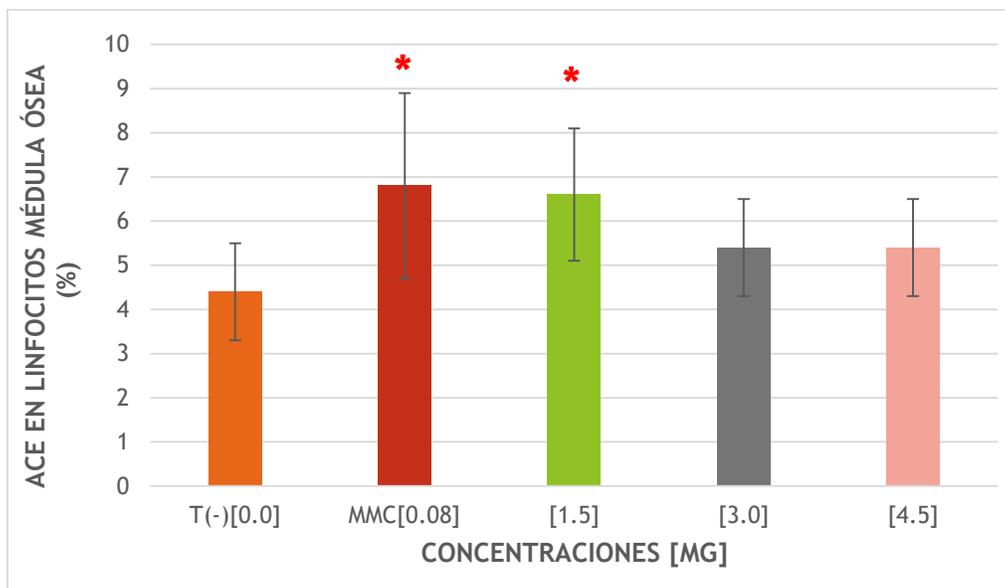
Los estudios sobre clastogénesis ponen en evidencia en muchas ocasiones resultados contradictorios o no concluyentes. Solamente en aquellos casos en que la acción del agente clastogénico es muy severa, las diferencias con respecto a los controles aparentemente normales tienen cierta contundencia. Por este motivo algunos autores cuestionan métodos empleados para testificar la acción de sustancias clastogénicas (Schinzel & Schmid, 1976).

En la **Tabla 7** y **Figura 17**, podemos observar el efecto del compuesto en células con ACE en linfocitos de médula ósea, se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ), en la dosis baja [1.5 mg] ( **$6.6 \pm 1.5^*$  VS  $4.4 \pm 1.1$** ), en la cual se identificaron las AC de tipo cromatídico y cromosómico. Evans en 1984 y Buendía en 2013, mencionaron que las ACE son empleadas para evaluar la genotoxicidad, ya que son indicadores de daño clastógeno, las aberraciones tipo cromatídico se generan por daño al material genético y errores en la reparación del ADN en la fase S e inicios de G2 del ciclo celular, en tanto, las de tipo cromosómico son provocadas en G1 y en algunos casos en fase de S.

**Tabla 7.** Frecuencia de aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) en linfocitos de médula ósea, de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía aérea con  $V_2O_4$ .

Frecuencias de ACE								
Tratamiento [mg/kg]	Ratón (N)	Metafasas Analizadas	Tipo Cromatídicas		Tipo cromosómicas		Total ACE [F]	Total Células con ACE (%)
			Rompimiento [F]	Gap [F]	Rompimiento [F]	Pulverización [F]		
<b>T (-)</b> <b>0.0</b>	1	100	4	0	0	0	4	4
	2	100	3	0	0	0	3	3
	3	100	5	0	1	0	6	6
	4	100	4	0	1	0	5	5
	5	100	4	0	0	0	4	4
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			4.0	0.0	0.4	2	4.4	4.4±1.1
<b>T + MMC</b> <b>(0.08)</b>	1	100	6	0	3	0	9	9
	2	100	4	1	4	2	11	11
	3	100	1	1	3	0	5	5
	4	100	2	0	1	0	3	3
	5	100	4	0	2	0	6	6
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.4	0.4	2.6	0.4	6.8	<b>6.8±3.19*</b>
<b><math>V_2O_4</math></b> <b>[1.5]</b>	1	100	4	1	2	1	8	8
	2	100	4	0	3	1	8	8
	3	100	5	0	2	0	7	7
	4	100	3	1	1	0	5	5
	5	100	3	1	1	0	5	5
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.8	0.6	1.8	0.4	6.6	<b>6.6±1.5*</b>
<b>[3.0]</b>	1	100	4	0	1	0	5	5
	2	100	5	0	2	0	7	7
	3	100	1	1	3	1	6	6
	4	100	4	0	1	0	5	5
	5	100	3	0	0	1	4	4
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3.4	0.2	1.7	0.4	5.4	<b>5.4±1.1*</b>
<b>[4.5]</b>	1	100	3	0	4	0	7	7
	2	100	2	0	1	1	4	4
	3	100	4	0	0	1	5	5
	4	100	3	0	1	1	5	5
	5	100	3	0	2	1	6	6
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>			3	0.0	1.6	0.8	5.4	<b>5.4±1.1*</b>

F (Frecuencia) \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $X^2$  -Yates.



**Figura 17.** Porcentaje de células con ACE en linfocitos de médula ósea de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía inhalatoria con  $V_2O_4$ . \* $p < 0.05$  VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $X^2$  -Yates.

Rodríguez- Mercado en 2006 menciona que los reportes relacionados con la actividad genotóxica y mutagénica en sistemas de mamíferos expuestos a vanadio *in vivo* son insuficientes. No queda claro si el vanadio induce AC estructurales y daño sobre el ADN. Pero el V+4 muestra un débil efecto positivo en la formación de AC estructural, en este estado de oxidación sí induce ACE, por lo cual se apoyan los resultados obtenidos.

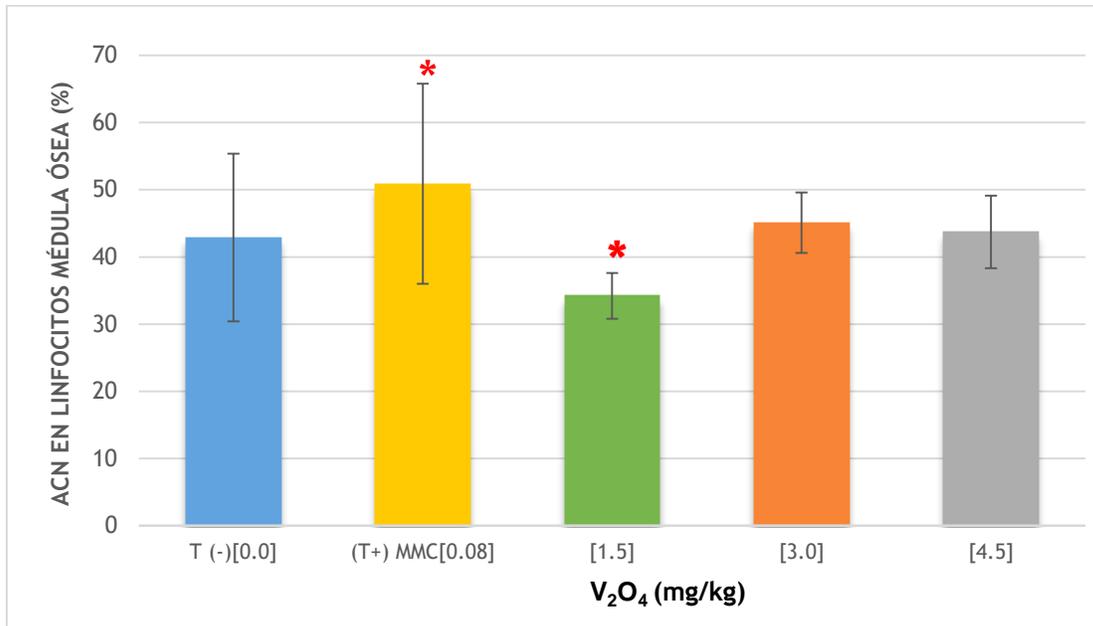
La Tabla 7 nos muestra la presencia de ACN en linfocitos de médula ósea, en la cual podemos observar que predominan las euploidias, esta anomalía es referente al estado celular en el que la célula tiene uno o más juegos completos de cromosomas haploides( $n=40$ ) de su especie, en este caso de ratones CD-1.

Como podemos observar la frecuencia es elevada en el tratamiento de la dosis baja [1.5 mg], esto nos habla de un efecto hormesis.

**Tabla 8.** Frecuencia de aberraciones Cromosómicas Numéricas (ACN) en linfocitos de médula ósea, de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía aérea con V<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Frecuencias de ACN							
Tratamiento [mg/kg]	Ratón (N)	Normal (2n) [F]	Euploide [F]	Aneuploide [F]	Haploide [F]	Total Células con ACN [F]	Células con ACN (%)
<b>T (-)</b> <b>0.0</b>	1	36	9	0	1	10	21.7
	2	29	14	0	2	16	35.5
	3	32	13	2	0	15	53.5
	4	28	13	0	1	14	51.8
	5	30	12	1	0	13	52.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		31.0	12.2	0.6	0.8	13.6	42.9±12.4
<b>T + MMC</b> <b>(0.08)</b>	1	56	22	8	4	34	37.7
	2	49	14	8	6	28	66.6
	3	46	19	6	3	28	59.5
	4	52	16	4	5	25	32.4
	5	55	15	5	1	21	58.3
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		51.6	17.2	6.2	3.8	27.2	<b>50.9±14.9*</b>
<b>V<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b> <b>[1.5]</b>	1	53	14	6	3	23	30.2
	2	47	20	8	3	31	39.7
	3	45	16	3	5	24	34.7
	4	49	19	6	0	25	33.7
	5	55	22	4	1	27	32.92
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		49.8	18.2	2.4	2.4	26.0	<b>34.2±3.4*</b>
<b>[3.0]</b>	1	18	10	4	0	14	43.7
	2	21	12	4	4	20	48.7
	3	16	13	2	5	14	46.6
	4	23	12	0	2	14	37.8
	5	20	15	1	3	19	48.7
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		49.0	12.4	2.2	2.8	16.2	45.1± 4.5
<b>[4.5]</b>	1	19	9	3	3	15	44.1
	2	22	9	4	2	15	40.5
	3	15	10	5	2	17	53.1
	4	20	8	1	5	14	41.1
	5	18	12	2	0	12	40.0
<b><math>\bar{x} \pm EE</math></b>		18.8	9.6	3.0	2.4	14.6	43.7±5.4

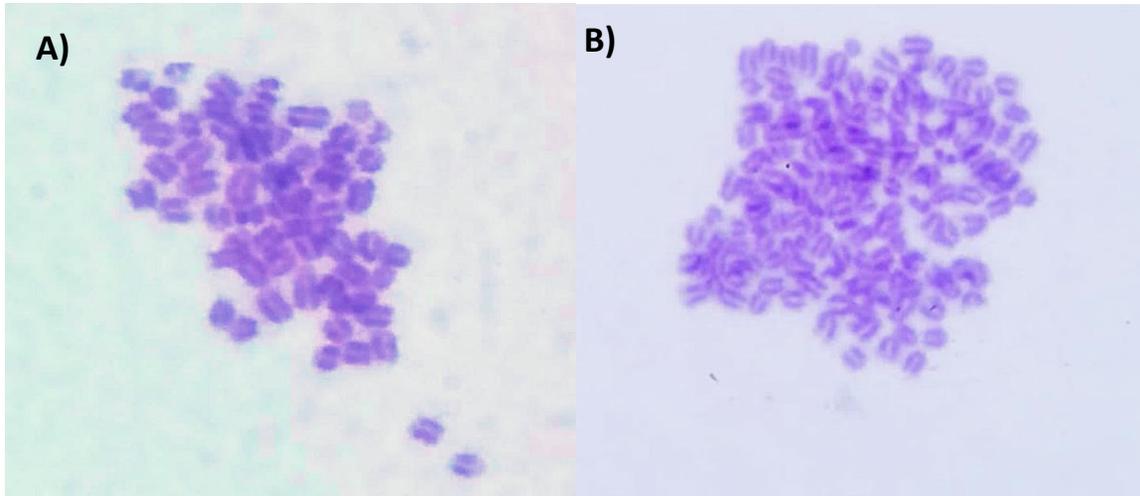
F (Frecuencia) \*p < 0.05 VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ , X<sup>2</sup> -Yates.



**Figura 18.** Porcentaje de células con ACN en linfocitos de médula ósea de ratones macho de la cepa CD-1 tratados vía inhalatoria con  $V_2O_4$ . \* $p < 0.05$  VS control negativo,  $\bar{x} \pm EE$ ,  $X^2$  -Yates.

En apoyo a los resultados obtenidos Rodríguez- Mercado y Altamirano- Lozano en 2006, en una recopilación de datos dan a notar que el V en estados de oxidación +4 y +5 inducen efectos aneuploidogénicos, que incluyen hipoploidías, hiperploidías y euploidías.

Es de importancia mencionar que los grupos tratados con Mitomicina C muestran diferencias significativas debido a que la Mitomicina C se activa en los tejidos, comportándose como un agente alquilante que desorganiza el ADN e inhibe su síntesis, y en menor grado, inhibe la síntesis de ARN y proteínas. La Mitomicina- C es capaz de crear radicales libres de oxígeno, que dañan el ADN y causa roturas cromosómicas que conducen a aberraciones cromosómicas (Vardaro, 2016).



**Figura 19.** Microfotografías de Metafases en linfocitos de médula ósea de ratón. **A)** Normal ( $2N=40$ ), **B)** ACN (Euploidía). *Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis*, Estrada y Roldán, (2021), FES Zaragoza, UNAM. (Campo claro, 100X).

Langman en el 1996 menciona que la causa principal de las euploidías, las cuales podemos notar en su mayoría como frecuencias de ACN en médula ósea, se deben a la no disyunción o no separación de los cromosomas homólogos en la primera división de la meiosis, no obstante el proceso de citocinesis no debe ocurrir sino hasta que la separación de los cromosomas se ha completado.

Muchas de las euploidías pueden surgir por errores meióticos o en la citocinesis. Es importante recordar que la citocinesis es la subetapa en que culmina la división celular y consiste en la repartición del citoplasma y los organelos celulares para formar dos células hijas.

De acuerdo con Korbecki en 2012, el DNA también puede ser dañado por el Vanadio y las ROS que genera, ya que causa la oxidación de bases pirimidicas, rompimientos de cadena sencilla y micronúcleos, lo que tendría como consecuencia el arresto mitótico, inducción de la transcripción, errores de la replicación e inestabilidad genética.

## EFEECTO DEL V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> EN EL IME, IMe y el IM

Se obtuvo el Índice Mitótico Espermatogonial (IME) en espermatogonias tipo B e Índice Meiótico (IMe) en espermatoцитos I, así como el Índice Mitótico (IM) en linfocitos de Médula Ósea de los 3 grupos, los cuales se muestran en la **Tabla 9**.

Los datos del promedio en IM e IME muestran que el óxido de vanadio (IV) reduce significativamente ambos índices mitóticos en todas las dosis administradas, la dosis baja, la dosis media [3.0 mg/ kg], así como con la dosis alta [4.5 mg/kg]. Los índices mitóticos nos permiten identificar la progresión del ciclo celular de G2 a M.

**Tabla 9.** Porcentaje de Índice Mitótico Espermatogonial (IME), Índice Mitótico (IM) de médula ósea e Índice Meiótico (IMe), en ratones CD-1 tratados con Tetróxido de vanadio vía aérea.

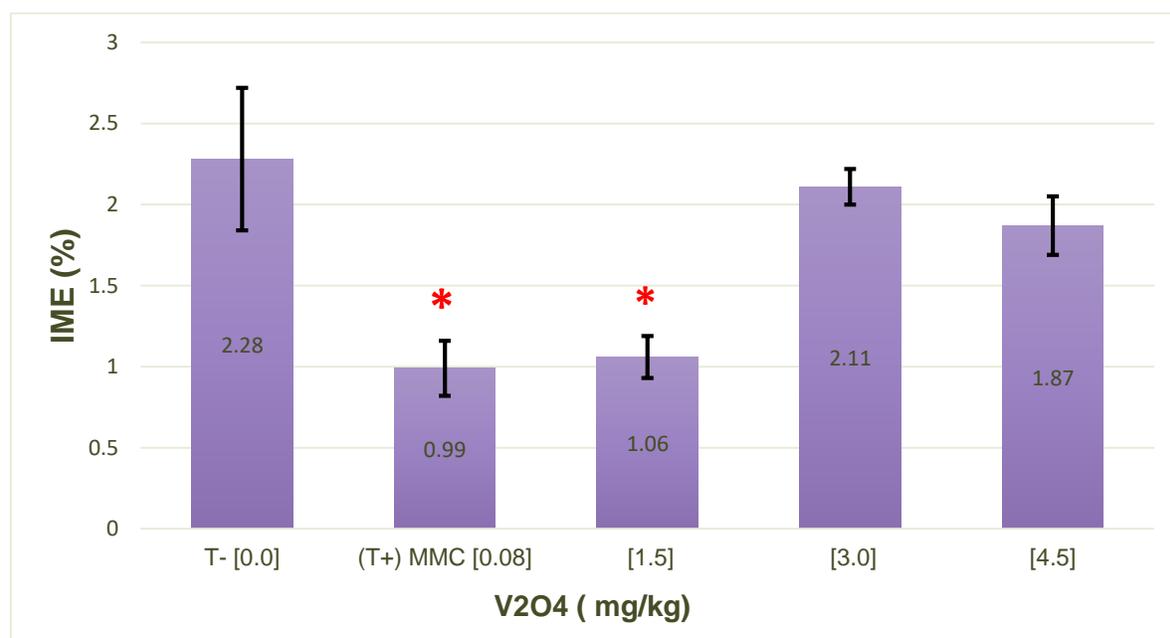
TRATAMIENTOS mg [/kg]	IME (%)	IMe (%)	IM (%)
T(-)	2.28±0.44	0.87±0.08	4.07±0.39
T (+) MMC [0.08] V <sub>2</sub> O <sub>4</sub> [1.5]	0.99±0.17	0.36±0.07	3.03±0.26
[3.0]	1.06±0.13*	0.81±0.08	1.53±0.23*
[4.5]	2.11±0.11	0.65±0.1	4.18±0.21
	1.87±0.18	0.61±0.12	4.14±0.4

Los datos están representados por la media ± EE, \*p <0.05, Z para proporciones.

Los datos del promedio del IME e IM muestran que el óxido de vanadio (IV) reduce significativamente ambos, en el tratamiento de dosis baja [1.5 mg], comparado con

el grupo testigo (-), la dosis media y dosis alta. El IME se redujo significativamente ( $1.06 \pm 0.13$  contra  $2.28 \pm 0.44$  del testigo negativo) ( $p < 0.05$ ), (Figura 17, Tabla 9). El IM se redujo significativamente ( $1.53 \pm 0.23$  VS  $4.07 \pm 0.39$  de testigo negativo) ( $p < 0.05$ ), (Figura 19, Tabla 9).

## INDICE MITOTICO ESPERMATOGONIAL



**Figura 20.** Efecto del  $V_2O_4$  vía inhalatoria sobre el IME (%) de ratones CD-1. Media  $\pm$  EE, \* $p < 0.05$ , Z para proporciones.

Se reafirma la *Citotoxicidad* del Vanadio, evidenciada por la disminución de los **IME** en el primer grupo tratados. Los resultados mostrados dan una clara evidencia de que este metal induce toxicidad celular.

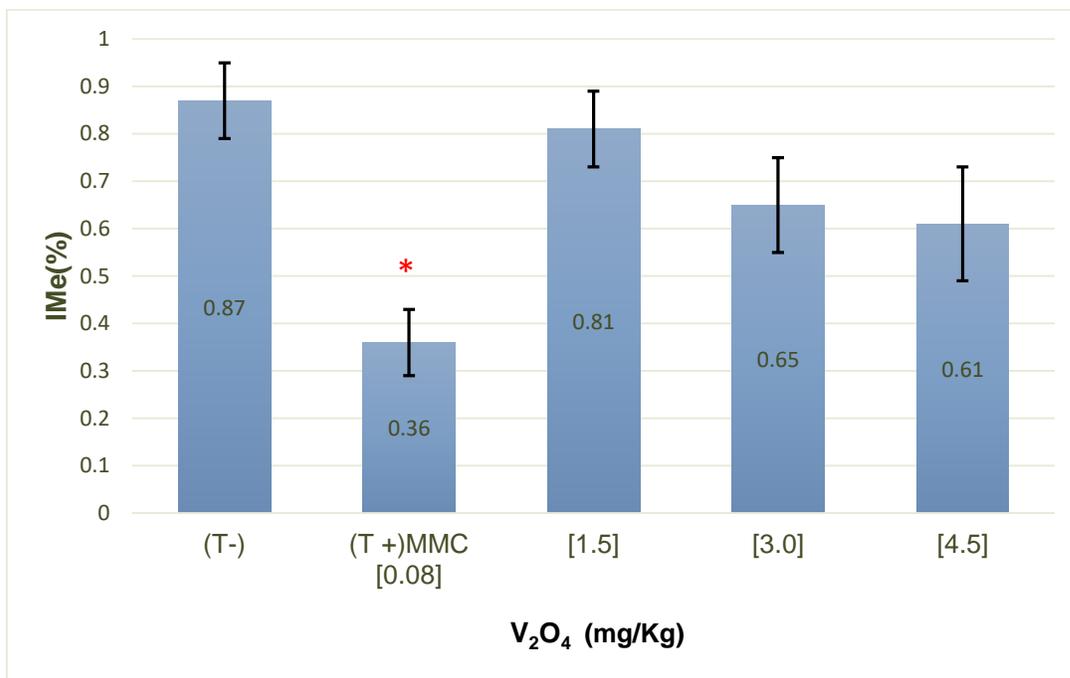
En cuanto a los **IM**, incluyendo el **IME**, es de importancia recordar que son parámetros que se utilizan para evaluar la proliferación en ciertos grupos de células, por lo que, al presentarse una disminución, nos podría indicar que el ciclo celular se ve afectado por efecto del compuesto, ya sea retardando el mismo o incluso deteniéndolo. Russell y colaboradores en 1987, confirmaron que el estudio de las

proporciones celulares es una forma efectiva de cuantificar la muerte celular. Se apoya así la idea de que hay *checkpoints* que están implicados en el control de la maquinaria génica o bioquímica de la profase I, el correcto apareamiento de los cromosomas homólogos puede estar controlado por estos *checkpoints* que son capaces de predisponer a la apoptosis, a aquellas células que presentan errores durante la metafase I (Garagna *et al.*, 2001), por lo tanto, la disminución celular podría deberse a apoptosis.

Un estudio conducido con Tetraóxido de Vanadio, con la finalidad de conocer los efectos clastogénicos del vanadio en leucocitos humanos de sangre periférica mostró que este agente químico inhibe el IM y modifica el índice de replicación (IR) en concentraciones de 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Rodríguez- Mercado 2001, Rodríguez. Mercado *et al.* 2003), lo cual apoya nuestros resultados obtenidos en la disminución de los IME.

### **Índice Meiótico (IMe) en espermatocitos I.**

Los porcentajes de IMe se presentan en la **Figura 21 y tabla 9**. Los datos del promedio no muestran diferencias significativas al comparar los resultados entre los grupos tratados con  $\text{V}_2\text{O}_4$  y, el control o testigo negativo (T-) lo que nos indica que posiblemente no afecta el ciclo celular de estas células. El testigo positivo (T+) nos muestra una diferencia significativa en contraste con el T- , lo cual significa que el sistema está funcionando adecuadamente.



**Figura 21.** Efecto del  $V_2O_4$  vía inhalatoria sobre el Índice meiótico (IME) de espermatoцитos I de ratones CD-1. Media  $\pm$  EE, \*p <0.05, Z para proporciones.

### EFFECTO DEL $V_2O_4$ EN EL IM.

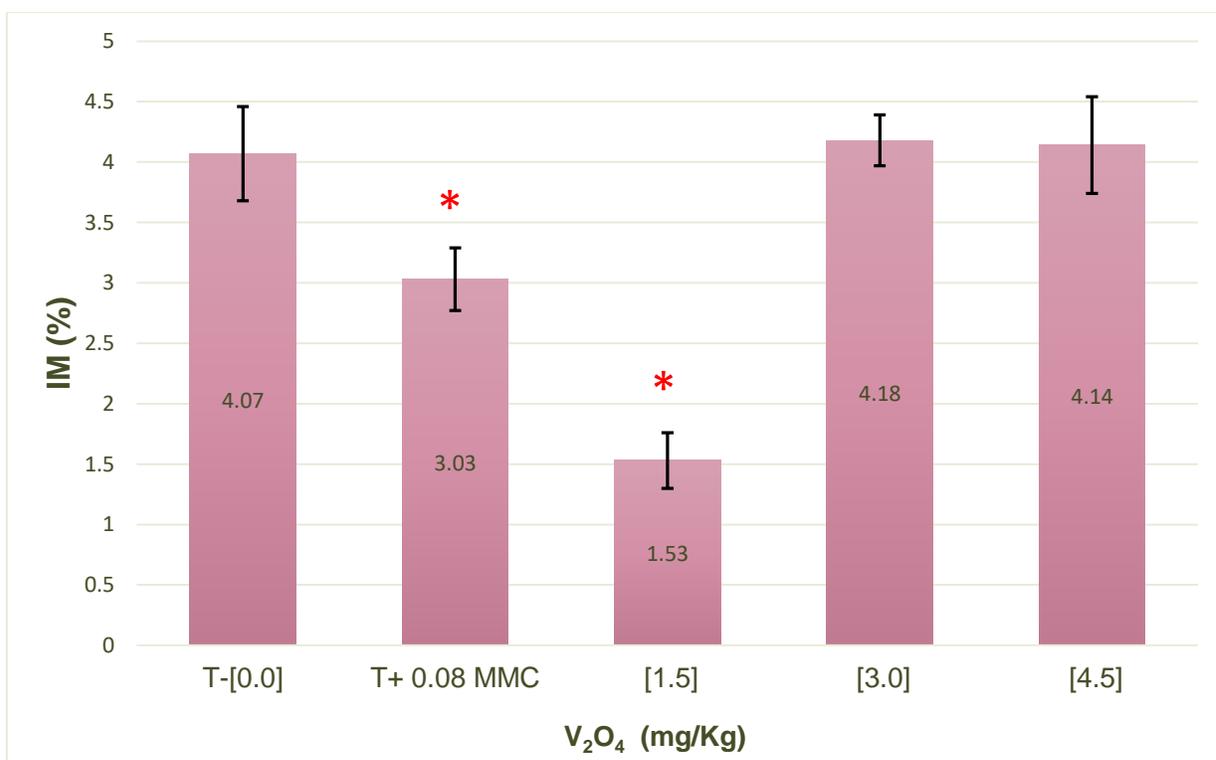
La médula ósea es un tejido en constante proliferación por lo que los cambios en el IM son indicadores de toxicidad sobre el tejido (Alamone, 1994). Al administrar 1.5 mg, 3.0 mg y 4.5 mg de Óxido de Vanadio (IV) vía aérea en ratones CD-1 los resultados muestran que este elemento disminuye el IME en espermatoгонias e IM de linfocitos de médula ósea, en ambas dosis administradas. Rodríguez- Mercado en 2010 reporta que la reducción de IM puede ser consecuencia de una tasa reducida de proliferación celular, esta reducción significativa de IM puede observarse de forma más clara en la concentración baja (1.5 mg) comparación de nuestro tratamiento negativo ( $4.07 \pm 0.39$ ), en cuanto a las otras dosis administradas aunque la diferencia fue mínima los resultados de los grupos estudiados nos permiten observar la toxicidad en el tejido.

El porcentaje o frecuencia de células podría estar influenciado por la eliminación celular selectivamente por apoptosis, ya que el reconocimiento de las células no

viables se producen gracias a los checkpoints que velan por la calidad cromosómica de los gametos que se formen.

Es de importancia mencionar que las alteraciones producidas por este metal en un organismo se deben a su capacidad oxidativa, el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) causan peroxidación de los lípidos de la membrana dañándola y por consiguiente a la célula, lo que permite que se libere Citocromo C e inicie la apoptosis mediada por caspasas 3 y 9 (Fortoul *et al.*, 2011).

La apoptosis juega un papel determinante en la eliminación de células dañadas o peligrosas para el organismo (células infectadas con virus, células del sistema inmune, células con daño en el ADN, células cancerígenas) y también es necesaria para un adecuado proceso de división celular (mitosis) en estructuras en desarrollo, ya que al remover células no deseadas permite un adecuado balance para mantener el número celular óptimo.



**Figura 22.** Efecto del del  $V_2O_4$  vía inhalatoria sobre el Índice Mitótico (IM) en linfocitos de médula ósea de ratones CD-1. Media  $\pm$  EE, \* $p < 0.05$ , Z para proporciones.

Se ha reportado que en pequeñas dosis de mutágenos, específicamente la radiación y algunos de los metales más tóxicos como el Vanadio (V), el Torio (Th), el Litio (Li) y el Talio (Tl), inducen respuestas homeostáticas conocidas como hormesis (Hickey & Glelland, 1983). Esta idea puede ser corroborada con el hecho de que la dosis más baja de  $V_2O_4$  sea capaz de inhibir la proliferación celular debido al efecto hormesis.

El índice mitótico (IM) es un parámetro que ha sido utilizado ampliamente para evaluar la proliferación de linfocitos en niños, adultos y ancianos (Palma y col., 1993), así como en células normales y tumorales. Este parámetro es considerado como un biomarcador temprano en la exposición a xenobióticos (Ostrosky, 1993).

## CONCLUSIONES

Se realizó la prueba *in vivo* de Aberraciones Cromosómicas siguiendo el procedimiento de la OECD (2016) descrito en el “*Ensayo de Aberraciones Cromosómicas en Espermatogonias de Mamíferos*” lo cual permitió analizar el efecto citotóxico y genotóxico de los compuestos de Vanadio encontrados en el ambiente.

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- La presencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales y Numéricas, evidencian el efecto genotóxico, tanto de tipo directo como indirecto. Es decir de amplio espectro. En los tejidos y germinal somático.
- Los errores en la meiosis conducen a desbalances en la información genética, evidenciados por la presencia de ACN. Lo que señala que el tetraóxido de Vanadio, afecta al huso meiótico.
- De las Aberraciones Cromosómicas en meiosis, se observaron células multivalentes en espermatocitos I, evidencia de translocaciones (por heterocigosidad), lo que permite concluir que el Vanadio afecta la fase proliferativa de la espermatogénesis.
- La presencia de ACE y ACN en las espermatogonias y en los espermatocitos I, muestran que el Tetraóxido de Vanadio es un agente reprotóxico.
- Los Índices Mitótico en médula ósea, como el Índice Mitótico Espermatogonial, disminuidos, indican un marcado potencial citotóxico (en bajas dosis).

## PERSPECTIVAS

- ✓ Pueden realizarse otros ensayos como es la prueba de FISH y/o asociarla a un ensayo Cometa para así poder detectar y cuantificar las roturas de ADN en secuencias específicas o, en todo el genoma.
- ✓ Considerar el incremento del número de organismos por grupo, así como las dosis administradas para obtener un mayor rango de resultados y de esta forma comprobar los efectos producidos a dosis más bajas o más altas, esto haría que se amplié nuestro panorama en cuanto a Tetróxido de Vanadio.
- ✓ De igual manera es recomendable cruzar a los machos tratados con este compuesto ( $V_2O_4$ ) antes de ser sacrificados con hembras en estado sano para así monitorear los efectos teratogénicos (parentales) en las crías descendientes, y comprobar si estos daños genéticos afectan a la descendencia de manera fenotípica o si hay letalidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aparicio-Rodríguez JM, Hurtado-Hernández MD, Marroquín García I, Rojas-Rivera G, Barrientos-Pérez M, Gil-Orduña NC et al. (2011). Main chromosome aberrations among 4617 chromosomal studies at a third level pediatric Mexican hospital in 19 years period of time. *Int J Genet Mol Biol.* 3: 161-184.
- Aragón M. A., Ayala M. E., Fortoul T. I., Bizarro, P y Altamirano- Lozano M. (2005). Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod. Toxicol.* 20: 127- 134.
- Baran, E. J. (2017). Model studies related to vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14: 878-888.
- Barceloux D.G. (1999) "Vanadium". *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 37(2): 265-278.
- Bowen I., Bowen S., Jones A. The Cell Cycle. En: Mitosis and Apoptosis: matters of life and death. (Eds. Bowen ID, Bowen SM). London, New York: Chapman & Hall; 1998. 28-59.
- Buendía, M. (2003). Evaluación *in vivo* del efecto genotóxico inducido por exposición al acetato de talio (CH<sub>3</sub>COOTl) en ratón hembra CD-1 mediante la prueba de aberraciones cromosómicas. Tesis para obtener el título de Bióloga, UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Bueno, M. (2011). Cromosomas, vehículos en la organización y transmisión de los caracteres. Bogota. *Acta biol. Colom.*16: 43-60
- Chasteen N.D. (1984) "The biochemistry of vanadium". *Structure and Bonding* 53:105-208.
- Das, S.; Bonaguidi, M.; Muro, K.; Kessler, J.A. (2008). Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurgery Focus.* 24: 1-12.

- D’Cruz O.J9. Uckun F.M. Metvan (2002). A novel oxovanadium (IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 11: 1829-36.
- Dean BJ y Danford N. (1985). Assays for the detection of Chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. En: Venitt S y Parry JM (Eds). *Mutagenicity testing a practical approach*. IRL PRESS Oxford-Washington. EUA.187-231.
- Diazguerrero, L. E, González, P. A, Luna, L. A & Konigsberg, F. M. (2013). Hormesis: lo que no mata, fortalece. *Gaceta Médica de México*. 24. 438-447.
- Díaz-Mejía S.A. (2021). Efectos toxicológicos en espermatogonias y espermatozoides de ratón por exposición aérea a Vanadio. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- DSHS (2015). Programa de Evaluación y Consulta de Salud Pública. Austin, TX: Lo que debe saber sobre el Vanadio. Recuperado el 18 de diciembre 2021 desde <file:///C:/Users/TOSHIBA/Downloads/VanadiumSp.pdf>
- Dulout, F. y Olivero, O. (1984). Anaphase-telophase analysis of chromosomal Damage induced by chemicals. *Environ Mutagen*. 6: 299-310.
- Dunn, G. R. y H. I. Kohn. (1981). some comparisons between induced and spontaneous mutation rates in mouse sperms and spermatogonia. *Mut. Res.*80: 159-164.
- Dym, M. (1973). The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli Cells and its role in maintaining the blood- testis barrier. *Anat. Rec.*175: 639-655.
- Eaker, S., Pyle, A., Coblo, J. & M. A. Handel (2001), Evidence for Meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian Chromosome heterozygous mice. *Journal of Cell Science*. 114: 2953-2965.
- Evans, E. P., Lyon, M. F. & M. Daglish (1967). A mouse translocation giving a metacentric marker chromosome. *Cytogenetics*. 6: 105-119.
- Fergusson, J.F. (1990). The heavy Element. Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. Pergamon Press. Oxford. 211-212

- Fernández Piqueras, J.; Fernández Peralta, A.M.; Santos Hernández, J.; González Aguilera, J.J. 2002. *Genética*. Ed. Ariel Ciencia. Madrid, España. 65-76.
- Fernández, Arjona M. (2003). Relationship between gonadotropin secretion, inhibin B and spermatogenesis in oligozoospermic 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).
- Fortoul T., Rodríguez V., González A., Rojas M., Cano C., Ustarroz M., Colin L., Montañó L., García, I., Bizarro, P., (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J. Biom. Biotechnol.* Doi: 101155/2011)951043.
- García, G. (2006). El vanadio- Un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent.* 14: 32-36.
- Generoso, W.M. and Russell, W. L. (1969). Stain and sex variations in the sensitivity of mice to dominant lethal induction with ethyl methanesulfonate. *Mutation Res.*, 5: 589-598.
- Gonzales, H., & Gonzales, H. (2017). Mammalian Spermatogonial Cells- Espermatogonias de mamíferos. *Biotempo Lima.*, 14(2):233-243.
- González, P.A. (1999). Química de los metales. *Alambique*. 21. España. 1-5.
- Gurin S. (2004) *Genética clásica y molecular*. *Rev Ciencia.Com.* 2:1-27.
- Gutiérrez-Castillo M.E., Roubicek D.A., Cebrián-García M.E., De Vizcaya-Ruíz A., Sordo-Cedeño M. y Ostrosky-Wegman P. (2006). Effect of chemical composition on the induction DNA damage by airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 199-211.
- Halberstam M., Cohen N., Shlimovich P., Rossetti L., Shmoon H. (1996) "Oral vanadyl sulfate improves insulin sensitivity in NIDDM but not in obese nondiabetic subjects". *Diabetes*. 45: 659-666.
- Hartwig, A. (1995). Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, Vol. 8(1).

- Heyliger C.E., Tahiliani A.G., Mc Nelly J.H. (1985) "Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats". *Science*.227: 1474-1477.
- Hickey, R. J., Bowers, E. J., y Clelland, R. C. (1983). Radiation Hormesis, Public Health, and public policy a commentary. *Health Physics*. Massachusetts. 44-207.
- Holko P., Ligeza J., Kisielewska J., Kordowiak A.M., Klein A. (2008) The effect of vanadyl sulfate (VOSO<sub>4</sub>) on autocrine growth of human epithelial cancer cell lines. *Polish Journal of Pathology*. 59: 3-8.
- Imelda Fortoul (2015). Inhalación de Vanadio produce daños a la salud. *Boletín UNAM-DGCS*, México. Recuperado desde [https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2015\\_415.html](https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2015_415.html)
- Kerr, J. B. (1992) Functional cytology of the human testis. *Bailliere Clin Endocrinol Metab*. 6:235- 250.
- Korbecki J., Baranowska I., Gutowstia I., Chlubek D. (2012), Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochimica Polonica*. 59: 1-6.
- Kucera J., Byrne A.R., Mravcová A., Lener J. (1992) "Vanadium levels in hair and blood of normal and exposed persons". *Sci. Total Environ*. 15: 191-205
- Klug WS, Cummings MR y Spencer CA. (2006). Conceptos de genética. Octava edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España. 883.
- Lacadena, J. R. (1986). La Genética: Una narrativa histórico- conceptual. Editorial Alambra, S.A., Madrid. 171.
- Lagerkvist, G. Nordberg, G.F. y Vouk, V. (1986). Vanadium. En: *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 1: 638-663.
- Langman. J., Sadler, T. W., & Lorenzo, L. (1996). Langman: Embriología médica en orientación clínica. Panamericana. Buenos Aires, 3-7.

- Larramendy, M. & Dulout, F.N. (1979). Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas en dos cepas endocriadas de ratón (*Mus musculus*). Instituto Multidisciplinario de Biología Celular. Sección Ecogenética. 273-279.
- Lehninger, A. L., Nelson D. L., Cox, M. M. y Cuchillo C. M. (2004). Principios de bioquímica. Barcelona: Ediciones Omega.
- Lewin, B. (2002). Genes: VII. New York, Oxford University Press. 250-65.
- Lezana, E. A.; Bianchi, N.O; Bianchi, M. S. and Zabala Suárez, J. (1977). Sister chromatid exchanges in Down Syndromes and normal human beings. *Mutation Research*. 1-10.
- Liang, J. & B. Brinkley, (1985), Chemicals probes possible targets for the induction of aneuploidy, in: V. L. Dellarco, P. Voytec and A. Hollander (Eds.), Aneuploidy, Plenum Press, New York. 491-506.
- Lindahl, T. & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*. 1999. 286: 1897-1905.
- López, Norberto (2009). Barrera Hematotesticular. Biología del desarrollo. Recuperado de <https://compartircelular.blogspot.com/2019/02/nombre-que-recibe-la-celula-germinal.html>
- Moreno, A. (2016). *La Célula*. Teoría Cromosómica de la herencia. Recuperado el 19 de junio de 2021 desde <http://augustoamador.blogspot.com/2016/>.
- OECD. Guideline for the testing of chemical. Directrices de OECD TG 475 (1997). Genetic Toxicology: *In vivo* Mammalian Chromosome Aberration Test, in bone marrow cells. 5-6.
- OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014- 2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

- Olins, D.E.; Olins, A.L. (2003), « Chromatin history: our view from the bridge ([http://academic.bowdoin.edu/faculty/A/aolins/dissemination/Nature\\_rev.pdf](http://academic.bowdoin.edu/faculty/A/aolins/dissemination/Nature_rev.pdf)) », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4: 809–813.
- Ostrosky, W.P., Santiago, P., Rojas, E. (1993), Alterations in frequency of SCE and cell proliferation kinetics by cysticercosis. *Env. Mol. Mut.* 21-25.
- Parada Puig, Raquel (2020). Aparato reproductor masculino. Lifeder. Recuperado el 19 de mayo 2020 desde <https://www.lifeder.com/aparato-reproductor-masculino/>.
- Pierce B. (2006) *Genética: Un enfoque conceptual*. Ed. Médica Panamericana. 2a Edición. España.
- Piqueras, J.F., Fernández Peralta, A.M., Hernández, J.S., González Aguilera, J.J. (2002). *Genética*. Ariel Ciencia, España, 474 pp. ISBN: 84-344-8056-5.
- Print, G.G. & K. L. Loveland (2000). Germ Cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays*. 22: 423-430.
- Rabello- Gay M.N., Rodrigues MA. (1991). Mutagenése, carcinogénese e teratogénese: métodos e criterios de avaliação. *Rev. Brás. Genet.* 246.
- Robledo, R. (2014). Cromosoma. *Genética Técnicas para Bioterio*. Recuperado el 19 de junio del 2021 desde <https://geneticabioterio.wordpress.com/cromosomas/>
- Rodríguez, J. y Altamirano, M. (2006). VANADIO: CONTAMINACIÓN, METABOLISMO Y GENOTOXICIDAD. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 173- 189, dec. 2010. ISSN 01884999. Disponible en: <<https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/21681>>.
- Rodríguez-Mercado J.J. (2001). Evaluación de los efectos genotóxico y citotóxico inducidos en cultivos de células de sangre periférica expuestos a Tetraóxido de vanadio. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Rodríguez-Mercado J.J., Roldán-Reyes E., Altamirano Lozano M. (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol. Lett.* 144, 359-369.

- Rodríguez, G. A & Frías, V. S. (2013). La mitosis y su regulación. Laboratorio de Citogenética, Departamento de Investigación en Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría (INP). 35. 55 – 68.
- Roldán Reyes Elia (2016). *Introducción a la toxicología*. Ed. UNAM- FES- Zaragoza. ISBN: 978-607- 02-8172-3. Fecha consulta: 23 de febrero 2020.
- Roldán, R. E., Altamirano, L.M. (1990). Chromosomally aberrations, sister-chromatid exchanges, cell- cycle kinetics and satellite associations in human lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat Res* 144 (3): 359- 69 pp. doi: 10.1016/50378-4274(03)00255-8.
- Sadovnikova, O. (2020). *Infographics Del contenido Del vanadio en productos alimenticios de alimento biológico naturales*. Dreamstime. Recuperado en octubre 2020 desde <https://es.dreamstime.com/infographics-del-contenido-vanadio-en-productos-alimenticios-de-alimento-biol%C3%B3gico-naturales-image122078863>.
- Sakurai H. (1994). Vanadium distribution in rats and ADN cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ. Health Perspect*, 102: 35-36.
- Sans-Fuentes, M. A. (2017). Ratón casero – *Mus musculus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Barja, I. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Shaver A., Hall D.A., Ng J.B., Lebuis A.M., Hynes R.C., Posner B.I. (1995). Bisperoxovanadium compounds: synthesis and reactivity of some insulin mimetic complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 229: 160-253.
- Schinzal, M. & Schmid, W. (1976). Lymphocyte chromosome studies in humans exposed to chemical mutagens. The validity of the method in 67 patients under cytostatic therapy. *Mutat Res*. 40: 139-166.
- Tagelenbosch, R. A. y Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 290: 193-200.

- Travis, A.; Kim, Y. & Meyer-Wallen, V. (2009). Development of new stem cell-based technologies for carnivore reproduction research. *Reproduction in Domestic Animals*. 44: 22-28.
- Tudares C. (1998) "Physical and chemical properties of vanadium and its compounds" *Invest. Clin.* 39: 3-16.
- Tudares C.M. and Villalobos H.D. (1998) "Determination of vanadium concentration in foods produced on the Eastern Coast of Lake Maracaibo". *Invest. Clin.* 39: 29-38.
- Valko M., Morris H. and Cronin M.T.D. (2005) "Metals, toxicity and oxidative stress". *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161-1208.
- Venitt S, y Parry JM. (1984). Mutagenicity testing a practical approach. IRL Press Limited. Inglaterra. 187-232.
- Wang J., Yuen V.G., McNeil J.H. (2001). Effect of vanadium on insulin sensitivity and appetite. *Metabolism*. 50 (6): 667-673.
- WHO (1988). "Vanadium" in: Environmental Health Criteria. Technical Report Series, Geneva: WHO.
- World Health Organization (WHO) (2000). "Vanadium pentoxide and other Inorganic vanadium compounds". Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 29.
- World Health Organization (WHO) (2001). Air quality guidelines for Europe. Copenhagen, No. 91.
- 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>
- Zulma, A. (2006). Luces y sombras en el uso de quinasas dependientes de Ciclinas como dianas terapéuticas en cáncer. *Biocancer*. 3: 1-6.

## ANEXO

- ✓ 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.** “Toxicología de  $V_2O_4$  en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1” (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 *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**

## **Toxicología de V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en células gaméticas y somáticas de ratones macho de la cepa CD-1**

\*Roldán Reyes Elia, Estrada Salas Layla Sheccid y Castillo Villanueva Claudia Jessica.

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, (L-2 pp.), UMIEZ-CII, Investigación y Posgrado. Carrera de Biólogo Ciclo Terminal (Biología del Desarrollo/Genética), FES-Zaragoza, UNAM. \*eliar@unam.mx

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.

**Hipótesis:** Se espera que el efecto de V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> sobre la gónada masculina de ratón cause atrofia del epitelio seminífero con alteraciones en los diferentes tipos de espermatogonias, alteraciones cromosómicas y la proliferación celular. **Objetivos:** determinar los efectos **reprotóxicos** del V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en ratones CD-1, tratados vía aérea, mediante la cuantificación de los diferentes tipos de espermatogonias, morfología y densidad espermáticas, y **citostático-citotóxico** en tejidos somático y germinal, mediante los índices: Mitótico (IM) en células de médula ósea, Mitótico Espermatogonial (IME) y Meiótico (IME) en espermatoцитos primarios.

**Método:** Se llevaron a cabo 3 tratamientos subcrónicos vía aérea de V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (1.5 mg, 3 mg y 4.5 mg/Kg), a ratones CD-1, se utilizó nebulizador y 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 V<sub>2</sub>O<sub>4</sub> fue capaz de ejercer su efecto citotóxico, disminuyendo la concentración espermática en epidídimos, así mismo el número de espermatozoides normales y alterando la proporción de espermatogonias e interfiere con el proceso normal de división celular reduciendo significativamente el IM e IME en la dosis baja administrada.