

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“LA PARTICIPACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN
LIPÍDICA EN EL DAÑO HEPÁTICO POR
LA INHALACIÓN DE VANADIO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

SANDRA ACEVEDO NAVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA MELDA FORTOUL VAN DER GOES

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2005

COORDINACIÓN

m342703



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

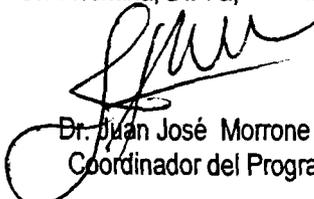
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de marzo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Acevedo Nava Sandra** con número de cuenta **96576281** con la tesis titulada: "La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio", bajo la dirección del(a) **Dra. Teresa Imelda Fortoui van der Goes**.

Presidente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dr. Abel Santamaría del Ángel
Secretario:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Suplente:	Dra. Francisca Pérez Severiano
Suplente:	Dra. Laura Colín Barenque

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 5 de abril del 2005



Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTO

A la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes

Por ser parte fundamental de este proyecto. Por sus enseñanzas, apoyo y confianza, así como por orientarme y ayudarme. Muchas gracias

A la Dra. Laura Colín Barenque

Por su valiosa contribución y su minuciosa revisión de mi tesis y sus acertadas observaciones para mejorarla.

Al Dr. Abel Santamaría Del Angel

La primera persona que me recibió en su laboratorio ofreciéndome su confianza, apoyo profesional y personal y por sus innumerables conocimientos sobre el tema para la presente tesis.

A la Dra. Francisca Pérez Severiano

Por dedicar parte de su valioso tiempo a la revisión de esta tesis y por sus importantes aportaciones a ella.

Al Dr. Luis Felipe Jiménez García

Por su amable aceptación para revisar este trabajo y por sus importantes aportaciones.

Gracias

Por el apoyo recibido por **CONACYT** con el número de registro de becario 172680.

Por el apoyo que la **DGEP** me dio al ser beneficiaria de su beca.

Al programa que financio la tesis **PAPIIT IN210301**

AGRADECIMIENTOS

A la M en C. Patricia Bizarro Nevares

Por su apoyo en la parte técnica para la realización de este proyecto

A la Dra. María Rosa Ávila-Costa

Por su valiosa contribución en la revisión del escrito

A la Biol. Raquel Salvatierra Sánchez

Por su gran apoyo y enseñanzas en el trabajo de laboratorio, los pequeños grandes detalles convividos y por su amistad

Al Dr. Efraín Tovar Sánchez

Por su gran ayuda en la parte estadística de este trabajo

Al Técnico Francisco Pasos

Por su apoyo en la toma de fotografías

Al Técnico Benito Chávez

Por su colaboración en la parte técnica

Al Técnico José Sanabria

Por su colaboración en el cuidado de los animales utilizados en el estudio experimental

Al Técnico Víctor Delgado

Por su ayuda en el desarrollo del experimento

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Por su gran aportación en la parte técnica de este trabajo

RESUMEN

“LA PARTICIPACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL DAÑO HEPÁTICO POR LA INHALACIÓN DE VANADIO”

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha reportado el aumento de vanadio en el ambiente, por lo que este metaloide ha cobrado gran importancia e interés ya que su presencia se refleja en un incremento en el tejido pulmonar de residentes de la Ciudad de México.

Con base en numerosos estudios el vanadio y sus compuestos han demostrado ser capaces de inducir efectos tóxicos en modelos animales en diferentes órganos, aunque estos efectos dependen de variables tales como el compuesto de vanadio utilizado, el estado de oxidación del compuesto, la ruta de exposición, el tiempo y dosis administrada.

El hígado como órgano fundamental en el metabolismo y la detoxificación, se encuentra sometido a daños producidos por una gran cantidad de productos tanto químicos como ambientales.

En este trabajo se cuantificó la capacidad del vanadio inhalado para inducir peroxidación lipídica en el hígado, así como los cambios morfológicos y bioquímicos.

MÉTODOS

Se utilizaron 66 ratones macho CD-1 con un peso promedio de 30 g. Se hicieron 6 grupos, cada uno de 6 animales expuestos y 5 controles. Todos los grupos fueron expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio [0.02M]. Las inhalaciones se realizaron dos veces por semana una hora durante las primeras cuatro semanas y la décima semana. Se tomaron muestras de hígado, las cuales se procesaron para peroxidación de lípidos, microscopía de luz y funcionamiento hepático.

RESULTADOS

Un aumento en los valores de peroxidación lipídica fue encontrado en cada uno de los grupos de inhalación hasta la 4ª semana de exposición tanto en animales expuestos como controles, los cuales estuvieron relacionados con el tiempo de exposición al vanadio. En la décima semana de exposición los valores se redujeron. Desde el punto de vista morfológico se encontró un aumento en el número de hepatocitos binucleados y con meganúcleos. Sin embargo el proceso de infiltrado inflamatorio observado no tuvo diferencias significativas.

Los niveles de glucosa en sangre tuvieron una disminución significativa a partir de la cuarta semana de exposición. Los valores de bilirrubina total y no conjugada aumentaron significativamente en la tercera, cuarta y décima semana de tratamiento. La bilirrubina conjugada aumento significativamente en la tercera semana.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cambio peroxidativo en hígado probablemente es originado a consecuencia de que el vanadio es un metaloide que puede generar radicales libres por medio de la cadena transportadora de electrones. Los cambios morfológicos en hepatocitos como lo son la binucleación y meganúcleos sugieren daño en citoesqueleto y daño genotóxico. El vanadio reduce los niveles de glucosa en sangre debido a su efecto insulinoimético. El aumento de bilirrubina total, no conjugada y conjugada en sangre es resultado de la hemólisis ocasionada por vanadio.

ABSTRACT

“LIPID PEROXIDATION IN THE LIVER CHANGE AFTER INHALATION OF VANADIUM”

INTRODUCTION . There are reports of the increase of vanadium (V) in the environment, as well as in lung tissue of Mexico City residents. In experimental models studies about the toxicity of V have suggest that its effect is related to the oxidation state of the element, as well as the chemical structure of the V compound and the exposure route. Its has been mentioned that one of the mechanisms by which this metalloid indices damage is by lipid peroxidation.

One of the most important organs related to detoxification in mammals, is the liver, and usually this structure is the target of the majority of the xenobiotics in the environment. For previously referred statements, this study was designed to evaluate the morphological, biochemical and oxidative changes induced in the liver by the inhalation exposure to vanadium.

METHODS. Thirty-six CD-1 male mice were exposed to vanadium pentoxide V_2O_5 [0.02M] one hour, twice a week during ten weeks, thirty non- exposed controls were included. Blood samples were obtained by direct heart puncture for biochemical analysis. Tissue samples were collected for morphologic analysis and lipid peroxidation that was evaluated by TBARS technique.

RESULTS. Lipid peroxidation raised in all groups of exposed and control animals until 4th week after exposure. In the 10th week after exposure values decreased. Morphologically, we found an increase in binucleated and meganucleous in hepatocytes. Serum glucose decrease since the 4th week after exposure to the end of the exposure. Total bilirubin and non conjugated bilirubin raised int 3rd, 4th and 10th weeks of treatment. Conjugated bilirubin raised at 3rd week.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS. The peroxidative change of the liver might be related to the generation of free radicals by means of the respiratory chain modification. Vanadium is genotoxic and induces cytoskeletal changes that could explain the binucleated and macronucleated hepatocytes. The change in blood glucose and in bilirubin need more study to be sure of its relation with vanadium exposure.

ÍNDICE

	Pag
A) RESUMEN	1
B) ABSTRACT	3
C) INTRODUCCIÓN	4
I. Contaminación atmosférica en México	4
II. Contaminación por metales	5
III. Vanadio	6
a) Fuentes de emisión	6
b) Exposición ambiental	7
c) Usos	7
d) Toxicocinética	8
e) Toxicidad	9
f) Toxicodinamia	10
IV. Hígado	11
a) Morfología y función del hígado	11
b) Células hepáticas	12
c) Efectos tóxicos del vanadio en el hígado	18
V. Radicales libres y la Peroxidación de lípidos	19
a) Peroxidación de lípidos	19
b) Efecto de la peroxidación en los sistemas biológicos	22
c) Métodos de cuantificación de lípidos peroxidados	22
D) JUSTIFICACIÓN	24
E) HIPÓTESIS	24
F) OBJETIVO GENERAL	24
G) OBJETIVOS PARTICULARES	24
H) MATERIAL Y MÉTODOS	25
I. Animales	25
II. Método de inhalación	25
III. Protocolo de exposiciones y técnica de sacrificio	25
IV. Toma de muestras y prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA)	27
V. Determinación de proteínas	27
VI. Toma de muestras para funcionamiento hepático	28

VII.	Toma de muestras para el procesamiento del tejido por ML	28
I)	RESULTADOS	30
	I. Peroxidación lipídica	30
	II. Cambios morfológicos	31
	III. Pruebas de funcionamiento hepático	39
J)	DISCUSIÓN	43
K)	CONCLUSIONES	48
L)	BIBLIOGRAFIA	49

ABREVIATURAS

ALT	-----	Aminotransferasa de Alanina
AST	-----	Aminotransferasa Aspártica
ATP	-----	Trifosfato de adenosina
FA	-----	Fosfatasa Alcalina
BT	-----	Bilirrubina Total
BC	-----	Bilirrubina Conjugada
BNC	-----	Bilirrubina no Conjugada
GalT	-----	Galactosiltransferasa
MDA	-----	Malondialdehído
NADH	-----	Ácido dinucleótido adenina-nicotinamida
ROS	-----	Especies Reactivas de Oxígeno
TBA	-----	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	-----	Especies Reactivas al ácido Tiobarbitúrico
TNF	-----	Factor de necrosis tumoral
UGT	-----	Uridina difosfato-glucoronosiltransferasa
V	-----	Vanadio
V ₂ O ₅	-----	Pentóxido de vanadio

A) INTRODUCCIÓN

I. Contaminación atmosférica en México

La contaminación atmosférica se define como cualquier cambio en el equilibrio de los componentes del aire, lo cual altera las propiedades físicas y químicas de éste (www.sima.com.mx/sima/df/contamin.html).

La contaminación del aire es uno de los problemas ambientales más importantes, y una gran parte de esta contaminación es resultado de actividades antropogénicas. (www.mipediatra.com.mx/infantil/contaminacion.htm). Las partículas en suspensión emitidas a la atmósfera proceden de la combustión de la gasolina y el gasóleo en los motores de los coches y camiones, las centrales eléctricas que queman combustibles fósiles, las calderas industriales y las calefacciones. Otras fuentes importantes de contaminación son la siderurgia y las acereras, las fundiciones de zinc, plomo y cobre, las incineradoras municipales, las fábricas de cemento, de ácido nítrico y sulfúrico y las refinerías de petróleo. En México se han mejorado continuamente las técnicas de refinación del petróleo crudo, obteniendo productos más ligeros de cada barril y produciendo un aceite residual, llamado combustóleo de menor calidad, debido fundamentalmente al incremento del contenido de asfaltenos, azufre, vanadio, sodio y níquel, entre otros (www.ile.org.mx/publica/bolmi98/tec2j98.htm).

La contaminación ambiental y la exposición humana a elementos metálicos y a sus compuestos pueden ocurrir naturalmente debido a la erosión de los depósitos de minerales así como de las actividades humanas como la minería, la fundición, la quema de combustibles fósiles y su utilización industrial (Aragón, 2003). La contaminación del aire en la Ciudad de México es consecuencia de las múltiples alteraciones ecológicas sufridas por el acelerado proceso de urbanización e industrialización, propiciando un aumento en los procesos de consumo energético y fuentes de emisión de contaminantes (Bravo *et al*, 1991; Gutiérrez, 1986). En ella habitan aproximadamente 18 millones de personas en donde cada día circulan cerca de tres a cuatro millones de automóviles y existen más de 30 mil industrias, que en conjunto emiten más del 8% de partículas a la atmósfera (polvos, humos, aerosoles y otros (Bizarro, 2002).

Uno de los factores determinantes en el problema de la contaminación en la Ciudad de México es su ubicación geográfica debido a que es una cuenca localizada 2,240 metros sobre el nivel del mar, rodeada por montañas altas, las cuales impiden la salida del aire junto con los contaminantes provenientes del norte, en donde se encuentra la zona industrial (www.innbiomed.com.mx/socped/spv65n6/español/wsp86-06.html).

II. Contaminación por metales

Los metales se encuentran en la naturaleza y se redistribuyen en el ambiente por ciclos biológicos y geológicos (Amdur *et al*, 1991). Se originan desde fuentes naturales continentales como el polvo levantado por tormentas, erupciones volcánicas etc., y desde el mar por la evaporación del agua. Pero la mayor causa de exposición a metales son las emisiones generadas por el hombre, llamadas fuentes antropogénicas (IPCS, 1990).

La mayoría de los metales se emiten como partículas (PST) y algunos como gases. El rango de tamaño de las PST es muy variado, ya que va desde los 0.001 μm hasta los 100 μm o más; dependiendo del tamaño se clasifican en PM10 y PM 2.5. Existen de variadas formas y composición química. La composición elemental incluye diferentes elementos, unos ligeros como el aluminio, silicio, potasio, calcio y otros pesados como el hierro, zinc, vanadio, titanio, plomo (www.sima.df.gob.mx/simat/pnredma.2html).

Las características físico-químicas de los metales presentes en el ambiente (aire, agua, alimentos) son fundamentales para conocer su potencial de absorción y de retención dentro del organismo (Altamirano, 1992). En la mayoría de los casos la principal vía de entrada de los metales es por inhalación, debido a que los metales en gran parte se encuentran en la atmósfera como aerosoles y en algunos casos como vapores (Bizarro, 2002; Mendoza, 2000). El grado de absorción de los metales depende de su concentración en el aire, del compuesto químico inhalado y de las condiciones fisiológicas del sujeto (Fortoul *et al*, 1996).

En el caso particular de vanadio, las partículas suspendidas son lo suficientemente pequeñas (2 μm de diámetro) para ser inhaladas y penetrar al sistema respiratorio y posteriormente a la circulación sanguínea (IPCS, 1990).

III. Vanadio (V)

El vanadio (V) es un elemento ultratraza distribuido extensamente en la naturaleza (Aragón y Altamirano-Lozano, 2001) el cual se ha comprobado presenta numerosas funciones fisiológicas y bioquímicas en los sistemas vivos (Baran, 2000; Domingo, 2002) aunque todavía no se conoce si tiene funciones específicas en los mamíferos (Thompson, 1999; Baran, 2000).

Se considera un elemento altamente tóxico cuando se suministra en altas dosis tanto en animales como en humanos (Upreti, 1995), por lo que ha despertado un gran interés debido a que en los últimos años se ha incrementado gradualmente su acumulación tanto en el ambiente como en los organismos, lo cual aumenta su ya elevado potencial toxicológico (Altamirano-Lozano, 1992).

El V es un metaloide grisáceo que se presenta en la naturaleza en dos isótopos naturales ^{50}V y ^{51}V . Tiene estados de oxidación de -1,0,+2,+3,+4,+5, de estos los +3,+4 y +5 son los más comunes, además de que el +4 es el de mayor estabilidad (Altamirano, 1992; Altamirano-Lozano *et al*, 1998; Tsiani y Fantus, 1997; Barceloux, 1999; WHO, 2000).

a. Fuentes de emisión

El V es un elemento que se presenta naturalmente en el ambiente, se encuentra en una gran cantidad de minerales. También se encuentra en la forma de fosfatos y ciertos minerales de hierro, plomo, cobre y zinc, en arcillas, campos de labrado y petróleo en forma de complejos orgánicos, en las rocas, etc. En la corteza terrestre se localiza en un 0.012%, al igual que en pequeñas cantidades en meteoritos (Altamirano-Lozano *et al*, 1998; Barceloux, 1999; WHO, 2001; www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv21.html).

Durante la primera mitad de los años 80's la producción global de vanadio (V_2O_5 , pentóxido de vanadio) generada por las actividades industriales fue aproximadamente de 30-45 millones de kg. Los países productores más grandes del mundo son China, Finlandia, Sudáfrica y Estados Unidos (Aragón, 2003; WHO, 1988).

b. Exposición ambiental

La población se encuentra expuesta al V por vía aérea debido a la combustión de aceites residuales, petróleo, carbón, etc. (Barceloux, 1999). La emisión de pequeñas partículas en áreas urbanas favorece la presencia de V en el aire (Mahanan, 1992).

Las concentraciones atmosféricas de V en zonas rurales son mucho más bajas que en zonas urbanas. Los rangos de concentración de V en el ambiente van de 40mg/m^3 a 100mg/m^3 . La emisión atmosférica de fuentes naturales (polvos continentales, aerosoles marinos, erupciones volcánicas) ha sido estimada cerca de 66,000 toneladas/año y de fuentes antropogénicas (principalmente la metalurgia) cerca de los 200,000 toneladas/año (<http://www.lenntech.com/español/formulario-de-consulta.html>); ésto nos lleva a la acumulación del vanadio en el ecosistema por lo cual todos los seres vivos estamos diariamente expuestos a él.

Con respecto a la cantidad de V que se encuentra en los derivados del petróleo, ésta va a depender del tratamiento que se le dé (Nriagu, 1998). Algunos reportes mencionan que el petróleo mexicano tipo "Maya" tiene un elevado contenido de V (423 ppm) (Mendoza, 2000).

c. Usos

Su utilización en la industria es amplia y variada, entre ellas están principalmente las actividades metalúrgicas (75-85%), o como un aditivo en varios tipos de aceros (WHO, 1988), para herramientas duras (resistentes a la corrosión) (LaDou, 1999). Alrededor del 80% del vanadio obtenido actualmente lo es para obtener ferrovanadio (www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv21.html). Este metal no ferroso es utilizado para la industria de energía atómica, construcción de aeronaves y tecnología espacial. También es utilizado para la catálisis en las industrias químicas en donde el pentóxido de vanadio y el metavanadato son especialmente importantes en la producción del ácido sulfúrico y plásticos (WHO, 1988). Otras cantidades menores de V son utilizadas para una gran variedad de otras aplicaciones como cerámicas, fertilizantes, fotografía, elaboración de vidrios, etc (Mahanan, 1992; Martí y Desoille, 1993). Se estima que la actividad industrial emite cerca del 53% de partículas de V en la atmósfera (Aragón, 2003).

Por otro lado, algunos compuestos de V presentan actividad farmacológica, por lo que se ha propuesto que este elemento sea utilizado con fines terapéuticos.

Recientemente se propuso como un posible anticonceptivo vaginal (D'Cruz y Uckun, 2001; Aragón y Altamirano-Lozano, 2001). Muchos trabajos muestran el importante papel del vanadio como mimetizador de las acciones de la insulina tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, por lo que puede ser usado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y II en aquellos casos en que la insulina no se puede utilizar (Cam *et al*, 1997; Poucheret *et al*, 1998; Badmaev *et al*, 1999; Thompson, 1999; Goldwaser *et al* 2000; Srivastava, 2000; Sun, 2000; Domingo, 2002; Semiz y McNeill, 2002; Aragón, 2003); desafortunadamente el principal obstáculo en la administración del V es su toxicidad, por lo que recientemente se descubrieron quelantes de compuestos de vanadio los cuales son más potentes y menos tóxicos (Goldwaser *et al* 2000). En humanos el vanadio (IV) es utilizado para mejorar el rendimiento físico de los atletas durante entrenamientos pesados (Aragón, 2003).

d. Toxicocinética

Por inhalación, el vanadio soluble puede absorberse hasta un 25% (Aragón y Altamirano-Lozano, 2001) con un tiempo de eliminación de 1 a 3 días. Por vía oral se absorbe cerca de un 10% (Mukherjee *et al*, 2004) y lo poco que llega a la circulación es eliminado por la orina. Hay datos que indican que el V produce dermatitis cuando es absorbido por la piel, aunque esta vía de exposición no ha sido muy estudiada (IPCS, 1990).

Una vez dentro del organismo, ya sea que haya ingresado por inhalación o por ingestión, el metal se deposita en las paredes de las vías aéreas o en la mucosa del tracto gastrointestinal. La cantidad de material que puede acumularse varía dependiendo de las características físicas del aerosol o de la forma química del metal presente. Posterior a su depósito, parte es transportado rápidamente (1-1.5 hrs) por la circulación sanguínea a través de su unión con proteínas hacia diferentes tejidos. El vanadato se une a transferrina y el vanadil a albúmina y transferrina (Mukherjee *et al*, 2004). Aproximadamente el 90% de vanadio en la sangre se encuentra en el plasma (Barceloux, 1999). El vanadio absorbido es distribuido en riñón, huesos, pulmón, testículos (IPCS, 2000), hígado, músculos, bazo, glándulas endocrinas (Tsalev y Zaprianov, 1984), y su principal ruta de excreción es por orina (cerca del 90%) (IPCS, 2000) con una vida media de 15-40 horas y el resto es excretado por las heces (Figura 1) (Barceloux, 1999; IPCS, 2000).

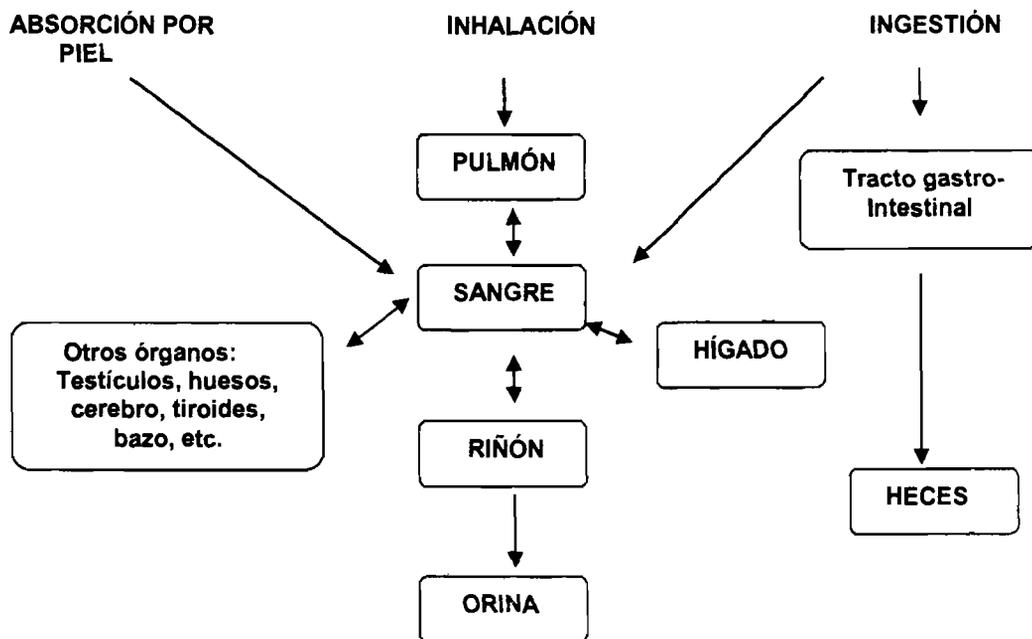


Figura 1. Cinética del vanadio en donde se muestran tres vías de ingreso al organismo (Tomado de Tsalev y Zaprianov, 1984).

e. Toxicidad

La toxicidad del V en animales de experimentación varía con la especie, la ruta de exposición y la concentración. Los animales pequeños como la rata y el ratón son menos sensibles que especies como el conejo y el caballo (WHO, 1988). La toxicidad de este elemento también depende en gran medida de su estado químico ya que el vanadio es tóxico tanto en su forma aniónica como catiónica (D' Cruz y Uckun; 2000) y sus acciones tóxicas aumentan con la valencia, siendo el vanadio⁵⁺ el más tóxico (Guevara, 1996). Entre los óxidos de vanadio, el pentóxido es el más soluble y el más tóxico comparado con el dióxido y el trióxido (WHO, 1988; Altamirano-Lozano, 1992).

La exposición más común es por inhalación por lo que el sistema respiratorio es un sitio muy vulnerable a presentar daño a causa de este elemento; bronquitis y neumonía son las patologías más frecuentes como consecuencia de la exposición (WHO, 1988). La exposición aguda a compuestos de vanadio ha reportado síntomas no específicos tales como: dolores de cabeza, agotamiento y mareos (Martí y Desoille, 1993), tos seca, broncoespasmo, epistaxis, lagrimeo intenso, irritación en los ojos y en la piel (LaDou, 1999; Barth, 2002).

La exposición crónica puede causar efectos negativos en el tracto gastrointestinal como náuseas, vómitos, diarreas y en los riñones ligera proteinuria, hiperfosfaturia, y aminoaciduria inespecífica. En cuanto al sistema nervioso se han observado alteraciones por exposición laboral, presentando cefalea, vértigos, debilidad, náuseas, vómito, y alteración neuromuscular la cual se manifiesta como temblor de dedos y brazos (Mahanan, 1992; Martí y Desoille, 1993; Nriagu, 1998). Se ha observado que altos niveles de vanadio en el SNC se asocian con enfermedades maniaco-depresivas y neuroconductuales afectando las habilidades visuoespaciales y de atención (Naylor, 1983; Barth, 2002). También se han reportado trastornos hemáticos como: anemia, leucopenia, granulaciones basofilia en leucocitos (Martí y Desoille, 1993), así como en la reproducción y desarrollo como: disminución en la fertilidad, muerte embrionaria, fetotoxicidad (Domingo, 1996; Nriagu, 1998; Morgan, 2003), daño testicular, el cual se caracteriza por la presencia de células germinales degeneradas y la alteración del epitelio germinal de los túbulos seminíferos con exfoliación, lisis celular y disminución en el peso del testículo (Nriagu, 1998, Aragón *et al*, 2001) .

Por otro lado, se sabe que el vanadio puede inducir estrés oxidativo por su habilidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y altera el sistema antioxidante de la célula (Lapenna *et al*, 2002). Los ROS son los productos del metabolismo aeróbico, tales como el radical hidroxilo (OH[·]), radical anión superóxido (O^{·-}), los cuales pueden atacar blancos celulares como proteínas, enzimas, y moléculas de DNA mediante peroxidación lipídica que traen como consecuencia el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, enfermedades degenerativas y cáncer (Chen y Tappel, 1996; Boon-Huat *et al*, 1997).

f. Toxicodinamia

El V puede producir una gran variedad de efectos citotóxicos, metabólicos y bioquímicos tanto *in vivo* como *in vitro* (Nriagu, 1998) .

El vanadio ha sido caracterizado como un constituyente de algunos sistemas enzimáticos ya que el V⁵⁺ (vanadato) puede unirse a las enzimas que hidrolizan ATP, y debido a que es mucho más estable que el fósforo, “congela” el estado de transición de la enzima, por lo que su principal mecanismo de acción es el bloqueo de numerosos procesos metabólicos celulares por inhibición de enzimas como las ATPasas de Na⁺K⁺ y Ca⁺, fosfatasa (ATPasa de miosina, ATPasa de dineina) y quinasas (Nechay, 1984; WHO, 1988; Janiszewska *et al*, 1994; Upreti, 1995), y coenzimas como la NAD, en la cual el V

puede afectar el estado de deshidrogenación de la respiración tisular, alterando la incorporación del hierro en los complejos porfirínicos y la síntesis de hemoglobina (WHO, 1988).

Por otro lado, existen numerosos estudios que demuestran la acción metabólica del V como mimetizador de la insulina (Sun *et al*, 2000; Shafrir, 2001; Golwaser, 2000).

Desde el punto de vista de sus potenciales estándar, los estados de oxidación del vanadio se encuentran relativamente cercanos; por lo que el V^{5+} puede ser reducido por reductores biológicos que proporcionen el potencial requerido, como el glutatión, el ascorbato, y el ácido dinucleótido adenina-nicotinamida (NADH), que son moléculas que participan en el ciclo respiratorio de la célula. En cambio, el vanadilo puede autooxidarse a vanadato en presencia de oxígeno (Guevara, 1996).

El interés por estudiar el hígado se debe a la susceptibilidad que presenta este órgano, tanto en condiciones patológicas como experimentales, debido a su gran capacidad metabólica en el organismo. Por otro lado, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se observaron alteraciones morfológicas, lo que nos lleva a pensar que existen alteraciones fisiológicas y bioquímicas inducidas por la exposición a vanadio. Sin embargo, hasta ahora es poca la información que existe acerca de alteraciones en hígado de ratón causado por la inhalación de vanadio.

IV. Hígado

a. Morfología y función

El hígado es la glándula de mayor tamaño del organismo y pesa cerca de 1500 grs. en humanos. Tiene color pardo rojizo. Se encuentra en la porción superior derecha de la cavidad abdominal, justamente por debajo del diafragma (Gartner y Hiatt, 1997), y tiene dos lóbulos principales: el derecho mayor que el izquierdo. La superficie inferior del hígado tiene impresiones que dejan los diversos órganos con los cuales normalmente está en contacto (partes del tubo digestivo y del riñón derecho), por lo cual se denomina superficie visceral. La superficie visceral representa un surco transversal profundo y corto llamado porta (puerta) del hígado (Ham, 1975).

La irrigación se realiza a través de la vena porta y la arteria hepática. La vena porta proporciona entre el 65 y el 85% de la sangre que llega al hígado, con una concentración

de oxígeno algo inferior a la de la sangre arterial, pero muy superior a la de la sangre venosa. Por ello, la oxigenación de las células hepáticas depende en un 50% del sistema portal. El 50% restante depende de la arteria hepática, que proporciona al hígado entre el 20 y el 35% de la sangre que llega al hígado. La sangre portal procede del bazo y del intestino, y la sangre arterial del tronco celíaco. Estos grandes troncos sanguíneos penetran en el hígado por el hilio hepático, donde cada uno de ellos se divide en dos ramas, derecha e izquierda, destinadas a la irrigación de ambos lóbulos, en cuyo interior se realiza una dicotomización sucesiva en ramas cada vez más pequeñas que terminan en una red vascular común llamada sinusoides hepáticos. El drenaje venoso se lleva a cabo por las venas suprahepáticas derecha e izquierda, que desembocan en un tronco suprahepático común, el cual desagua en la vena cava inferior, cerca del punto de entrada de ésta en la aurícula derecha (Farreras, 2000).

El hígado, con excepción del hilio, está completamente envuelto por el peritoneo, que forma una cubierta de epitelio escamoso simple sobre el de la cápsula de Glisson de la glándula (Gartner y Hiatt, 1997), el cual es tejido conectivo delgado que contiene fibras colágenas dispuestas regularmente, y fibroblastos dispersos (Ham, 1975). Esta glándula es extraordinaria porque sus elementos del tejido conectivo son escasos, de modo que la mayor parte del órgano está formado por células parenquimatosas uniformes llamadas hepatocitos (Gartner y Hiatt, 1997).

b. Células hepáticas

Las células parenquimatosas o hepatocitos se disponen en una serie de láminas perforadas que se ramifican y se anastomosan para formar una especie de esponja o laberinto, entre las cuales están los espacios sinusoidales. Estas láminas se extienden de la periferia del lobulillo clásico a la vena central en forma radiada. Excepto en los lugares en que se anastomosan y se ramifican, las láminas suelen tener sólo una célula de espesor, aunque es obvio que cualquier célula parenquimatosas está rodeada por varias otras en una lámina. Alrededor de las zonas portales, las células hepáticas se disponen en forma de una hoja de una célula de espesor que se aplica al tejido conectivo periportal, llamada lámina limitante (Lesson *et al*, 1990).

Las células hepáticas son poliédricas, con seis o más caras, y por lo general de 20 a 35 μm de diámetro, con una membrana celular claramente definida (Lesson *et al*, 1990).

Estas células representan alrededor del 80% de la población celular del hígado. Sus caras pueden guardar relación con espacios sinusoidales por donde se transporta la sangre hacia las venas centrales o con las células adyacentes, ya sea que estén unidas íntimamente, o separadas en parte para formar un conductillo biliar. Los sinusoides hepáticos, que por lo regular carecen de lámina basal, tienen numerosos espacios celulares que permiten el libre movimiento de materiales entre el plasma y los hepatocito, por lo que estos espacios presentan microvellosidades cortas; se encuentran revestidos por dos tipos de células: endoteliales y Kupffer (macrófagos) (Banks, 1986). Los núcleos son esféricos u ovoides, con superficie regular, y muestran considerablemente variación en tamaño de una célula a otra, variación relacionada con el estado de poliploidia. En ocasiones se aprecian células binucleadas. Cada núcleo es de tipo vesicular con gránulos evidentes y dispersos de cromatina y uno o más nucleolos, y se tiñe con menos intensidad que los núcleos de las demás células del hígado; también se localizan gran cantidad de mitocondrias, así como aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y liso. Aunque todas las células parenquimatosas muestran una estructura semejante, hay variaciones notables en las diversas regiones y en diferentes momentos con relación a la alimentación. Esto depende del riego sanguíneo. Las células periféricas de un lobulillo tienen un buen riego sanguíneo, pero las que están cerca de la vena central reciben muy poca sangre oxigenada (Gartner y Hiatt, 1997).

El hígado es un órgano muy versátil. Almacena glucógeno, hierro, cobre, vitamina A, muchas de las vitaminas del complejo vitamínico B, y vitamina D. Produce albúmina y otras proteínas, muchas de las cuales son esenciales para la coagulación normal de la sangre (protrombina y fibrinógeno) y una sustancia anticoagulante que es la heparina. Los aminoácidos digeridos son desaminados en el hígado; es decir, su nitrógeno se extrae para que pueda ser utilizado por el cuerpo. El hígado también puede utilizar el nitrógeno para sintetizar proteínas a partir de hidratos de carbono o de lípidos. Además, produce muchas otras sustancias, como hidratos de carbono, a partir de lípidos o de proteínas. El hígado también forma lípidos a partir de hidratos de carbono o de proteínas, lípidos que almacena para verterlos después a la sangre en forma de ácidos grasos libres que pueden ser degradados para obtener energía. El hígado también sintetiza colesterol, depura muchos fármacos y segrega bilirrubina (producto de la degradación de la hemoglobina), y muchas otras sustancias, incluyendo enzimas. Las actividades que el hígado realiza generan una gran cantidad de calor, lo cual influye en la temperatura

corporal. El hígado de los mamíferos contiene depósitos de vitaminas del complejo vitamínico B; una de ellas, la vitamina B12, se utiliza para tratar la anemia perniciosa (Harrison, 1994; Farreras, 2000)

Otro tipo celular en el hígado son las células de Kupffer cuya función más importante y conocida es la fagocitosis. Estas células constituyen el 80-90% del sistema reticulohistiocitario, también denominado sistema fagocítico mononuclear. Los elementos susceptibles de ser fagocitados por las células de Kupffer son bacterias, virus y macromoléculas extrañas al organismo. Además, las células de Kupffer poseen otras funciones: tienen la capacidad de eliminar antígenos solubles circulantes, inmunocomplejos de gran tamaño y poco solubles, y endotoxinas, intervienen en el metabolismo de los esteroides y de diversos fármacos, pueden sintetizar urea y aclarar del plasma quilomicrones y colesterol. Asimismo, pueden secretar proteasas, factores estimulantes de la leucopoyesis, el componente C4 del complemento sérico y eritropoyetina en los individuos anéfricos, así como radicales de oxígeno activos, TNF, etc. (Farreras, 2000).

Existen diferentes parámetros los cuales pueden ser medidos para detectar si existe o no una alteración hepática.

Glucosa: Es el azúcar que se utiliza como fuente de energía. Los azúcares que son productos finales de la digestión de los glúcidos o hidratos de carbono, atraviesan en intestino delgado y llegan al hígado por medio de la vena porta en donde se almacena como glucógeno; cuando éste se requiere se libera a la sangre como glucosa. Ésta se mantiene en la sangre a concentración aproximadamente constante y se cataboliza con facilidad para satisfacer las necesidades energéticas del organismo. En este proceso, la molécula de glucosa se descompone en compuestos de carbono que se oxidan a dióxido de carbono y agua, y a continuación se excretan. La glucosa que no se utiliza inmediatamente para la producción de energía se almacena en forma de glucógeno en el hígado y los músculos. Cuando estas reservas se saturan, la glucosa se convierte en grasa y se deposita en el tejido adiposo (Stein, 1989; Farreras, 2000).

El hígado mantiene la glucosa sanguínea en niveles normales mediante una combinación de los procesos de glucogénesis, glucogenólisis, glucólisis y gluconeogénesis (Harrison, 1994).

Bilirrubina: Producto final del catabolismo del grupo hemo. Su producción diaria (0.2 a 0.3 g/día) se debe principalmente a la destrucción de los eritrocitos viejos por el sistema mononuclear fagocitario efectuada en bazo, hígado y médula ósea. El resto procede del catabolismo de la mioglobina, enzimas (catalasa), hemoproteínas hepáticas como el citocromo P-450, y de la muerte prematura de los eritrocitos recién formados por la médula ósea (Harrison, 1994; Farreras, 2000).

Independientemente de su origen, la hemo-oxigenasa oxida el grupo hemo hasta la formación de biliverdina que, a su vez, es reducida a bilirrubina gracias a la acción de la biliverdina reductasa. Así, la bilirrubina formada fuera del hígado queda libre y se une a la albúmina sérica, haciéndola prácticamente insoluble en las soluciones acuosas. Uno de los procesamientos hepáticos de la bilirrubina es la conjugación con una o dos moléculas de ácido glucurónico gracias a la acción de la bilirrubina UGT.

La bilirrubina, tanto no conjugada como conjugada, puede acumularse en el organismo y depositarse en los tejidos, lo que confiere el color amarillo conocido como ictericia. Entre ambas formas de bilirrubinas existen dos diferencias fisiopatológicas importantes: La bilirrubina no conjugada es casi insoluble a un pH fisiológico y se encuentra unida a la albúmina sérica, por lo que no puede eliminarse por la orina aún cuando sus niveles sanguíneos sean altos. En condiciones normales, el plasma contiene una pequeña cantidad de bilirrubina no conjugada en forma de anión no unida a la albúmina. Por el contrario, la bilirrubina conjugada es hidrosoluble, no tóxica y se une muy laxamente a la albúmina. Debido a su solubilidad y a su débil unión a la albúmina, el exceso de bilirrubina conjugada presente en el plasma se excreta fácilmente en la orina (Robbins, 1999).

Aminotransferasas (transaminasas): Son indicadores sensibles de la alteración celular hepática, y las más útiles para el reconocimiento de las enfermedades agudas hepatocelulares. Las transaminasas están normalmente presentes en el suero en bajas concentraciones (< 40U); las alteraciones que dañan la membrana de la célula hepática permiten la salida de estas enzimas al suero, y cualquier tipo de alteración celular hepática puede causar un pequeño aumento en los niveles de las transaminasas. Las enzimas que se han mostrado más eficaces son la aminotransferasa aspártica (AST) y aminotransferasa de alanina (ALT). Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo amino desde un alfaaminoácido a un alfacetoácido; es decir, de los radicales γ -amino de aspartato y la alanina, respectivamente, al radical γ -ceto del cetoglutarato, dando lugar a

la formación de ácidos oxalacético y pirúvico. La ALT es una enzima casi exclusivamente hepática, mientras que la AST está presente en muchos tejidos además del hígado, tales como cerebro, corazón, riñón, y por lo tanto es un indicador menos específico de la función hepática. En el hepatocito, la ALT está presente únicamente en el citosol, y para la AST existen diferentes isoenzimas en el citosol y en las mitocondrias (Stein, 1989; Harrison, 1994). Las cifras de hasta 300 unidades no son específicas y pueden encontrarse en cualquier tipo de enfermedad hepática, mientras que las elevaciones más significativas son del orden de miles, las cuales aparecen casi exclusivamente en las alteraciones asociadas con un extenso daño hepatocelular (Stein, 1989).

Fosfatasa alcalina: Corresponde a un grupo de enzimas cuya función se centra en la hidrólisis de las uniones éster del ácido ortofosfórico a pH alcalino. Su situación en la membrana celular sugiere que intervienen en el transporte de sustancias a través de ellas. La fosfatasa alcalina sérica tiene varios orígenes (hígado, riñón, placenta, intestino, huesos, leucocitos), aunque las fuentes más importantes son el hígado, los huesos y el intestino (Farreras, 2000). Se definen como ácidas o alcalinas según sean más activas a valores de pH < 6 > 7.

Albumina: El hígado ocupa un papel central en la síntesis de proteínas, por lo que sus alteraciones modifican el espectro seroprotéico (Farreras, 2000).

Un daño hepático importante puede originar un descenso de las concentraciones sanguíneas de albúmina, protrombina, fibrinógeno, y otras proteínas sintetizadas exclusivamente por los hepatocitos. Los niveles de proteínas en el suero reflejan el estado de la función hepática de síntesis más que el daño celular. Las proteínas séricas no son indicadores sensibles de enfermedad hepática (debido a la gran reserva hepática y su tiempo de vida).

La albúmina sérica es una proteína con un peso molecular de 69,000 Da y es la proteína plasmática más abundante; representa el 45% de las proteínas plasmáticas; responsable de la presión osmótica del plasma y también proteína transportadora de muchas sustancias. Los niveles séricos normales oscilan entre 33-55 g/l. La albúmina tiene una larga vida (14-20 días) y diariamente se renueva un poco menos del 5%, por lo que no es un buen indicador de lesión hepática aguda o leve.

El hígado tiene una notable reserva funcional para sintetizar albúmina, de modo que puede mantenerse una síntesis adecuada hasta que el daño hepatocelular ya es grave. Sus niveles plasmáticos se ven influidos por diversos factores extrahepáticos como el estado nutricional y factores hormonales (Stein, 1989; Harrison, 1994).

Urea: La formación de urea a partir del amoníaco es una función hepática importante ya que permite la eliminación de los productos del catabolismo del nitrógeno procedente de los tejidos y de la dieta. La síntesis tiene lugar en el ciclo de Krebs-Henseleit el cual utiliza cuatro aminoácidos específicos (ornitina, citrulina, arginina y ácido aspártico) para transformar el amoníaco en urea. La formación de urea por la arginasa es un proceso irreversible. La urea se excreta principalmente por los riñones (75%), aunque el resto (25%) lo hace por el tubo gastrointestinal. Es un compuesto cristalino incoloro, de fórmula $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, conocido también como carbamida. Se encuentra abundantemente en la orina de los humanos y de otros mamíferos. En cantidades menores está presente en la sangre, en el hígado, en la linfa y en los fluidos serosos. El nitrógeno de la urea, que constituye la mayor parte del nitrógeno de la orina, procede de la descomposición de las células del organismo pero, sobre todo, de las proteínas de los alimentos. Es soluble en agua y en alcohol, y ligeramente soluble en éter (Stein, 1989; Harrison, 1994).

Colesterol: El hígado interviene en la síntesis y el metabolismo de los lípidos. La síntesis del colesterol tiene lugar principalmente en el hígado. El colesterol, junto con los fosfolípidos, son elementos constituyentes de las membranas de los hepatocitos, y en asociación con los triglicéridos, forman lipoproteínas que posteriormente serán secretadas a la circulación sanguínea. El colesterol se utiliza también para la síntesis de los ácidos biliares. El colesterol se sintetiza a partir del acetato el cual está sujeto a una serie de controles metabólicos, la mayor parte de ellos mediados por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), para convertirlo en β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). El colesterol existe en forma libre y combinado con ácidos grasos para formar ésteres de colesterol; ambas formas aparecen en el plasma unidas casi por completo a las β -lipoproteínas. Debido a que se lleva a cabo un intercambio de colesterol libre entre los tejidos, las variaciones en su nivel plasmático reflejan las que se producen en el organismo. Sin embargo, la disminución de la concentración plasmática de los ésteres de colesterol puede reflejar alteraciones hepáticas y/o el deterioro de la esterificación hepática del colesterol (Stein, 1989; Harrison, 1994).

c. Efectos tóxicos del vanadio en el hígado

Estudios en ratas y conejos expuestos a la inhalación de diferentes sales de vanadio (V_2O_5 , VO_3) reportan cambios grasos con necrosis celular parcial en hígado. Este cambio también se ha producido ante la exposición subcutánea de vanadato de amonio (1mgV/kg). La exposición i.p de metavanadato de sodio (1.25-2.5 mgV/kg) en ratas ocasiona pérdida de peso corporal (WHO, 1988).

Borges (2003) realizó un estudio para conocer las posibles alteraciones morfológicas en hígado de sapo (*Halobatrachus didactylus*) ocasionadas por V (metavanadato y decavanadato), en donde observó hepatocitos necróticos siendo el decavanadato el que ocasionó cambios más evidentes.

Dabros y cols (2000) estudió las alteraciones bioquímicas y morfológicas en el aparato de Golgi de células hepáticas de ratas después del tratamiento oral con bis (maltolato) oxovanadium (IV) [BMOV], en donde dicho tratamiento alteró la actividad bioquímica de enzimas como la galactosiltransferasa (GalT), disminuyendo significativamente su función en comparación con los controles. El aparato de Golgi reveló un ligero incremento en su actividad secretora, así como una reducción de tamaño no sólo de las cisternas si no también de vacuolas y las vesículas asociadas a ambos lados de los sacos.

Altamirano y cols. (1999) estudiaron en ratones macho el daño genotóxico del V_2O_5 vía intraperitoneal en hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón y medula ósea, y sus resultados mostraron que el V_2O_5 induce daño al DNA, el cual se observó desde las 24 horas después del tratamiento. El análisis de migración y distribución del daño al DNA indicó que existen diferencias de sensibilidad entre órganos.

En la actualidad se conoce que las células hepáticas (hepatocitos y células no parenquimatosas) secretan citocinas y quimocinas proinflamatorias, las cuales están implicadas en numerosas patologías hepáticas: en particular, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) y la interleucina 8 (IL-8) en humanos, y en roedores la MIP-2, la cual es una proteína inflamatoria de macrófagos. Dichos factores están involucrados en el daño y en la reparación de procesos asociados a diversos hepatotóxicos. Por otro lado, se ha reportado que el vanadil (IV) puede inducir muerte celular programada vía la generación de radical hidroxilo (OH) en células en interfase y en mitosis a consecuencia de un estrés oxidativo (Bay *et al*, 1997).

V. RADICALES LIBRES Y PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

En los últimos años se ha comprobado que la peroxidación de lípidos es un factor crucial en la patogénesis de varias enfermedades, tales como aterosclerosis, asma, daño renal, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Mylonas y Kouretas, 1999), así como de enfermedades producidas en hígado, debido a que son numerosas las toxinas (metales, alcohol, drogas, etc) que tienen efectos hepatotóxicos (Poli, 1993; Britton y Bacon, 1994). Pero sabiendo que el daño celular en varias alteraciones hepáticas probablemente es multifactorial, los radicales libres pueden jugar importantes papeles en la iniciación y/o continuación del daño (Britton y Bacon, 1994). Los primeros estudios realizados para conocer el papel de los radicales libres en la expresión celular y daño tisular han sido hechos principalmente en el hígado (Poli, 1993). Por otra parte, existen estudios que muestran que los compuestos de vanadio inducen estrés oxidativo y peroxidación de lípidos *in vivo* (Byczkowski y Kulkarni, 1998).

Cuando aumenta la producción de radicales libres en el organismo y la capacidad de las defensas antioxidantes es insuficiente es cuando se origina lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual puede llegar a ser tan severo que puede ocasionar muerte celular en los tejidos u órganos afectados (Zentella y Saldaña, 1995; Rivas- Arancibia *et al*, 2001).

Un radical libre se define como una especie química que tiene uno o más electrones desapareados, como por ejemplo el átomo de hidrógeno, muchos metales de transición y la propia molécula de oxígeno, característica que los vuelve inestables y reactivos ya que tratan de completar sus electrones tomándolos de moléculas estables (Halliwell y Chirico, 1993; Kehrer, 1993; Santamaría, 1993; Rivas-Arancibia *et al*, 2001). La reactividad de un radical está determinada por la fuerza con la cuál el electrón desapareado necesita participar en un enlace covalente. La formación de radicales libres es un proceso que sucede normalmente en los sistemas vivos, pues cumplen funciones biológicas importantes ya que intervienen en procesos tales como el transporte de electrones, mecanismos de fagocitosis, entre otros (Zentella y Saldaña, 1995).

a. Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos involucra tres distintas etapas que son: la etapa de iniciación, de propagación, y de término. El proceso de peroxidación de lípidos se inicia por el ataque

de una especie lo suficientemente reactiva para sustraer un átomo de hidrógeno de un grupo metil (-CH₂-) de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso insaturado. Entonces, la remoción de un átomo de hidrógeno deja al átomo de carbono (el cual fue originalmente atacado), con un electrón desapareado, dando origen a un radical alquilo, el cual tiende a estabilizarse con un rearrreglo molecular para producir un dieno conjugado, el cual fácilmente reacciona con una molécula de oxígeno para formar un radical peróxido (R·COO·). Los radicales peróxidos pueden combinarse con otros radicales o pueden atacar a moléculas proteicas, las cuales pueden ser dañadas; también tienen la capacidad de sustraer átomos de hidrógeno de otras moléculas lipídicas adyacentes, dando así origen a la etapa de propagación de la peroxidación de lípidos, y por lo tanto, una vez que el proceso ha iniciado, se extiende, por lo que podemos decir que es una reacción en cadena. La extensión de la etapa de propagación depende de muchos factores, entre éstos está la relación lípido/proteína que hay en la membrana, la composición de los ácidos grasos, la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidantes dentro de la membrana que interrumpan la reacción en cadena, cediendo átomos de hidrógeno que sean fácilmente tomados por los radicales peróxido presentes. Un destino alternativo de los radicales peróxido es que reciban un átomo de hidrógeno y formen los hidroxiperóxidos lipídicos, los cuales sufren fragmentación y producen aldehídos (incluyendo el malondialdehído, el cual puede reaccionar con los grupos -SH de las proteínas e hidrocarburos gaseosos). Los hidroxiperóxidos lipídicos son moléculas muy estables a temperaturas fisiológicas, pero en presencia de complejos con metales de transición su descomposición se cataliza. La etapa de término se refiere a los sistemas que poseen las células para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y para protegerse del efecto destructivo de sus reacciones (Figura. 2) (Santamaría, 1993; Moore y Jackson, 1998; Palacios, 2002).

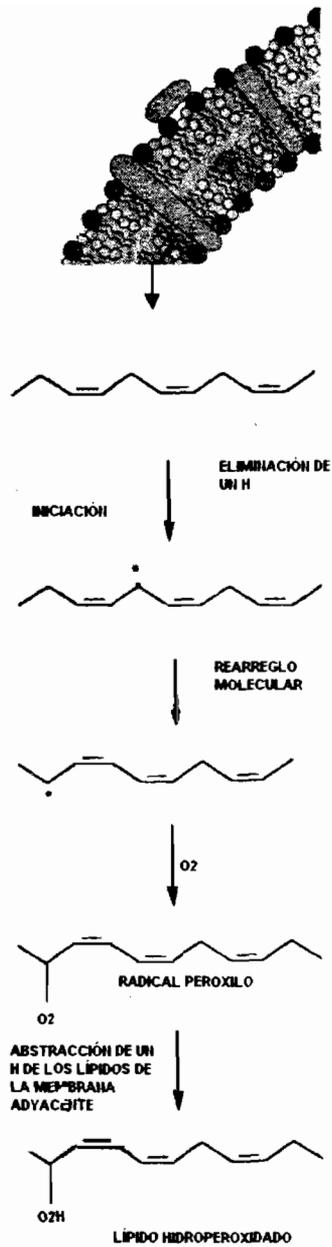


Figura 2. Representación del mecanismo de peroxidación lipídica. Se muestra la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso con tres dobles enlaces formando una estructura de dienos conjugados (tomado de Halliwell, 1991)

b. Efectos de la peroxidación en los sistemas biológicos

Los principales componentes celulares (proteínas, lípidos membranales, ácidos nucleicos) tienen un alto riesgo al ser atacados por radicales libres (Santamaría, 1993; Quintanilha, 1988).

- I. **Proteínas:** Los radicales libres producen modificaciones de los aminoácidos, fragmentación de la proteína, incorporación de segmentos de otras proteínas. Los aminoácidos más susceptibles a los procesos oxidativos son el triptofano, tirosina, y la fenilalanina, así como también la cistina y cisteína por su alto contenido de azufre.
- II. **Lípidos membranales:** Debido a la gran cantidad de enlaces insaturados (poliinsaturados), como el colesterol y los ácidos grasos entre otros, éstos pueden reaccionar con radicales libres y conducir a la peroxidación de lípidos. Como cada peróxido lipídico es un radical que puede reaccionar con más lípidos, la peroxidación se vuelve autocatalítica y puede involucrar a otros organelos cercanos. La peroxidación de lípidos altera la estructura y función de la membrana y puede producir la entrada de iones calcio, sodio, potasio.
- III. **Ácidos nucleicos:** El ADN es sensible a los radicales libres ya que éstos pueden modificar las bases de los ácidos nucleicos y de las cadenas azúcares-fosfato, dando como resultado la pérdida de las funciones biológicas de los nucleótidos, que finalmente se traduce en una expresión genética aberrante que conduce a la muerte celular.

c. Métodos de cuantificación de lípidos peroxidados

Existe un gran número de técnicas para evaluar la tasa de peroxidación de las membranas lipídicas. Cada una de las técnicas mide índices diferentes, por lo que no existe un sólo método que por sí sólo sea totalmente confiable para tal fin (Halliwell y Gutteridge, 1985; Moore y Jackson, 1998).

Los lípidos peroxidados pueden ser medidos en diferentes niveles (Gutteridge y Halliwell, 1990):

- ✓ Por la pérdida de los ácidos grasos insaturados
- ✓ Midiendo productos primarios de peroxidación
- ✓ Midiendo carbonilos secundarios y gases hidrocarbonados

La composición química de los productos terminales de la peroxidación depende de la composición de los ácidos grasos del sustrato lipídico analizado y de los metales presentes. Los iones de cobre y hierro generan diferentes productos terminales, por lo que la evaluación de la peroxidación por un sólo método puede dar resultados subjetivos (Tabla 1) (Santamaría, 1993).

Tabla 1. Métodos utilizados para medir la peroxidación lipídica en muestras biológicas (tomado de Palacios, 2002)

Método	Parámetros a medir	Observaciones
Dienos conjugados	Estructuras con dienos conjugados	La oxidación de ácidos grasos insaturados es acompañada por un aumento en la absorción de luz UV a una longitud de onda entre 230 y 235 nm.
Ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Derivados de malondialdehído (MDA)	El material de prueba se calienta a pH ácido con TBA, se obtiene un cromógeno rosado que es medido por su absorbancia a una longitud de onda de 532 nm.
Fluorescencia	Aldehídos	Los aldehídos tales como el malondialdehído pueden reaccionar con grupos aminos para formar bases de Schiff (sólo a pH ácido). Los aldehídos pueden formar polímeros para producir productos fluorescentes en ausencia de grupos amino. Los productos fluorescentes formados in vivo son productos finales de la peroxidación.
HPLC/Técnicas con anticuerpos	Aldehídos citotóxicos	Hidroalcanoles tales como el 4-hidroxinonenal son productos de la peroxidación de lípidos que son citotóxicos a concentraciones nanomolares y son medidos por HPLC. Los anticuerpos son usados para medir proteínas modificadas por productos de la descomposición de lípidos.
Ciclooxigenasas	Lípidos peroxidados	La estimulación de la actividad de las ciclooxigenasas puede ser usada para medir cantidades trazas de peróxidos en fluidos biológicos. Es sensible a picomoles de peróxido.
Gases hidrocarbonatos	Etano y pentano	La cromatografía de gases es utilizada para medir los gases formados durante la descomposición de lípidos peroxidados.
Cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de gas líquido por sus siglas en inglés (HPLC y GLC)	Pérdida de ácidos grasos insaturados	Es muy útil para medir los lípidos peroxidados por estimulación de complejos metálicos dando diferente distribución de productos.

En este trabajo se utilizó el método de TBA, ya que como anteriormente se mencionó, el malondialdehído (MDA) es producto de los lípidos peroxidados que se produce de manera constante. A un pH bajo (3.5) y a una temperatura elevada (ebullición), el MDA fácilmente participa en reacciones dando lugar a una variedad de productos condensados. En este caso, el MDA y el TBA forman una condensación con relación de una molécula de MDA por dos moléculas de TBA, formando un producto de color rosado en donde la absorbancia de esta coloración se mide a 532 nm de longitud (Salvatierra, 2004; Halliwell y Gutteridge, 2000).

JUSTIFICACIÓN

Los altos niveles del vanadio en el ambiente son el resultado de la utilización de combustibles fósiles, tales como el petróleo y el carbón, para la producción de energía y calor. Por otro lado Fortoul y cols. (2002) realizaron un estudio en tejido pulmonar de necropsias de individuos residentes de la Ciudad de México que murieron alrededor de los años 90's, comparados con las muestras de aquellos individuos fallecidos durante los años 60's, en donde expresa de forma indirecta que el vanadio aumentó en el aire cerca de un 23%. Aunado a lo anterior, un estudio previo realizado en modelo por inhalación, mostró alteraciones morfológicas en el hígado de ratón, como electrodensidad de mitocondrias, dilatación de retículo endoplásmico rugoso y aumento en la cantidad de lípidos acumulados (Acevedo, 2002), por lo cual es importante estudiar en un modelo experimental en ratones los cambios bioquímicos y fisiológicos en hígado, para contribuir así al conocimiento referente a la toxicidad de este contaminante.

HIPOTESIS

Si un mecanismo de toxicidad del vanadio es el estrés oxidativo, entonces se puede esperar que un aumento en la peroxidación lipídica esté asociado con alteraciones morfológicas en hígado.

OBJETIVO GENERAL

Relacionar los cambios morfológicos hepáticos con la peroxidación lipídica después de la inhalación aguda, subaguda y subcrónica de vanadio.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Cuantificar la peroxidación lipídica en el hígado después de la inhalación aguda, subaguda y subcrónica de V_2O_5 [0.02M] mediante la técnica de determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

- ❖ Cuantificar cambios morfológicos en células parenquimatosas hepáticas, expresado como:
 - Número de células binucleadas
 - Número de meganúcleos
 - Número de focos de infiltrado inflamatorio
- ❖ Evaluar el funcionamiento hepático a través de las pruebas de función hepática: Albúmina, Glucosa, Colesterol, Urea, BT, BNC, BC, ALT, AST, FA.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Animales

Se utilizaron 66 ratones macho de la cepa CD-1 con un peso promedio de 35 ± 5 gramos, los cuales fueron sometidos a un modelo por inhalación de pentóxido de vanadio al 0.02 M (Acevedo, 2002) por una hora dos veces por semana durante diez semanas.

En el modelo por inhalación, 36 animales pertenecieron a los grupos expuestos y 30 a los grupos controles. Los animales control inhalaron solamente el vehículo (agua bidestilada y desionizada) con el mismo esquema que los expuestos.

II. Método de inhalación

Los ratones se colocaron en una caja de acrílico transparente de 0.0308 m^3 a la que se le conectó un ultranebulizador (Ultra Neb 99 DeVilbis), con un flujo de 10 litros/min. Para hacer la solución de V_2O_5 (Sigma) [0.02M], se pesó 0.9095 g disuelto en 250 ml de agua bidestilada y desionizada. Después de cada inhalación, los animales fueron colocados en sus cajas, con libre acceso de agua y de alimento comercial (Purina).

III. Protocolo de exposiciones y técnica de sacrificio

Las inhalaciones se realizaron 2 días a la semana y los sacrificios se llevaron a cabo una vez por semana. Los sacrificios se realizaron 24 horas después de que los animales concluyeran su tiempo de inhalación. Semanalmente se sacrificaron 11 ratones de los cuales 6 fueron expuestos y 5 controles, excepto en la primera semana en la que hubo

dos sacrificios (12 expuestos y 10 controles); de esta manera obtuvimos muestras para la evaluación de la exposición aguda, subaguda y subcrónica (Tabla 2).

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.15 ml) por vía intraperitoneal; posteriormente, se fijó el ratón en una plancha de parafina y se hizo una incisión desde el abdomen hasta el cuello, haciendo la perfusión por vía intracardiaca a través del ventrículo izquierdo, lavando con solución salina a pH 7.4. Se tomaron muestras de hígado del animal para ser procesado por la técnica de TBARS, microscopía de luz y muestras de sangre para la bioquímica de funcionamiento hepático.

Tabla 2. Protocolo de exposiciones

		Controles (no. de animales) Exposición a agua deionizada	Expuestos (no. de animales) Exposición a pentóxido de vanadio
Exposición aguda (1 día de exposición)	1ª exposición	30	36
	Sacrificio	5	6
Exposición subaguda (hasta 15 días de exposición)	2ª exposición	25	30
	Sacrificio	5	6
Exposición subcrónica (Menos de 3 meses de exposición)	3ª exposición	20	24
	4ª exposición	20	24
	Sacrificio	5	6
Exposición subcrónica	5ª exposición	15	18
	6ª exposición	15	18
	Sacrificio	5	6
Exposición subcrónica	7ª exposición	10	12
	8ª exposición	10	12
	Sacrificio	5	6
Exposición subcrónica	19ª exposición	5	6
	20ª exposición	5	6
	Sacrificio	5	6

IV. Toma de muestras y técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA)

Cada semana se trabajo con dos grupos de muestras, I controles y II experimentales. El hígado fué removido y cortado en porciones de aproximadamente 1gr. Posteriormente, el tejido se homogenizó 1:10 ml de solución salina (pH 7.4), empleando un homogenizador de vidrio y un mazo de teflón, dando 10 golpes para cada muestra; a partir del homogenado de cada una de las muestras se tomaron 3 alícuotas de 250 μ l cada una. Cada alícuota se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml y una alícuota restante de 0.5 ml se almacenó y se preservó en congelación para su posterior evaluación del contenido de proteínas por el método de Lowry y cols. (1951). A cada uno de los tubos se les agregó 250 μ l de solución salina y se agitaron durante 20 minutos para posteriormente recibir un volumen de 500 μ l del reactivo de TBA (Ac. Tiobarbitúrico 0.5% (Sigma) + Ac. tricloroacético 16% (Merck) + Ac. clorhídrico 2.5% (Merck)), colocándolos inmediatamente en baño maría (92°C) por 30 min. Posteriormente, se dejaron enfriar durante 5 minutos y se centrifugaron todas las muestras a 5600 rpm durante 30 minutos (Eppendorf 5417R). Por último, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Lambda 20 Perkin-Elmer con lámpara de luz visible a una longitud de onda de 532 nm. Tres tubos adicionales, con un contenido de 500 μ l de solución salina + 500 μ l de TBA cada uno, fueron destinados como tubos-blanco o testigos experimentales de peroxidación.

Los resultados de la peroxidación se calcularon a partir de las lecturas de absorbancia comparados contra una curva de oxidación continua de 2- desoxirribosa (Salvatierra, 2004). Los resultados finales se expresaron como nanomoles de sustancias reactivas al TBA por miligramo de proteína.

V. Determinación de proteínas

Cada muestra se analizó por duplicado, de acuerdo al método de Lowry y cols. (1951). Los homogenados de hígado se diluyeron 1:20, se tomaron 20 μ l de la muestra y a cada tubo se les agregó 980 μ l de agua destilada; posteriormente se tomaron 400 μ l de esta dilución y se le agregaron 2 ml de la siguiente mezcla: 49 ml de Na₂CO₃ (Sigma) al 2% en NaOH (Baker) (0.1N), 0.5 ml de Tartrato de Na⁺ y K⁺ (Sigma) al 2% en agua y 0.5 ml de CuSO₄ (Merck) al 1%. Después de diez minutos, se adicionó el reactivo Folin-fenol (Sigma) 1:1 (200 μ l de la muestra diluida en 200 μ l de agua destilada), manteniéndolos a temperatura ambiente durante 30 minutos para que reaccionaran. Concluidos los 30

minutos, se realizó una segunda dilución 1:10 (100 µl de la muestra en 900 µl de agua destilada) debido a que las muestras sobrepasaban la cantidad de proteína aún de la curva patrón. Por último, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Lambda 20 Perkin-Elmer con lámpara de luz visible a 550 nm.

Se realizó una curva de referencia o curva estándar, en la cual se conoce la concentración de proteína (Tabla 3). Dichos valores se compararon con los valores experimentales para así determinar la concentración de proteína total de nuestras muestras.

Tabla 3. Curva estándar de proteína

	H ₂ O (ml)	Albúmina (ml) (Sigma)	250 µg/ml
A	0.4	0.0	0
B	0.3	0.1	25
C	0.2	0.2	50
D	0.0	0.4	100

VI. Toma de muestras para las pruebas de funcionamiento hepático

Una vez que los animales fueron anestesiados, se procedió a la toma de 1 ml de sangre en un tubo Eppendorf de 1.5ml, haciendo un corte en el ventrículo izquierdo del corazón. Cada muestra de sangre fue centrifugada a 3500 rpm para separar el suero del paquete globular en el suero separado se determinaron los niveles de: albúmina, urea, colesterol, glucosa, BT, BC, BNC, AST, ALT, FA, mediante técnicas colorimétricas.

VII. Toma de muestras para el procesamiento del tejido por microscopía de luz

Se tomó un fragmento de hígado y se procedió a realizar la inclusión en parafina para la técnica histológica ordinaria de hematoxilina y eosina. La técnica consiste en fijación (formol 10%), deshidratación (alcohol), aclaración (xilol), inclusión (parafina), corte, tinción (H-E) y montaje. Para determinar el daño morfológico causado por la inhalación aguda, subaguda y subcrónica de pentóxido de vanadio en el parénquima hepático, se hizo un conteo en cada una de las muestras, de la siguiente manera: Con un microscopio óptico

Olympus CH30, utilizando el objetivo de 40X y en un área de 152.05 mm², se eligieron 5 campos al azar de cada una de las muestras de hígado correspondiente a cada grupo de inhalación (6 muestras para cada uno de los grupos experimentales y 5 muestras para el grupo control). En cada uno de los campos se contó el número de focos de infiltrado inflamatorio, células binucleadas y células con meganúcleos. Una vez teniendo los resultados de todos los animales de cada grupo, se obtuvo el promedio para cada parámetro. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey, donde los valores de $p \leq$ de 0.05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

I. Peroxidación lipídica

El V_2O_5 indujo un aumento significativo en los valores de TBARS de los animales experimentales durante las primeras cuatro semanas de inhalación. También existieron diferencias significativas entre los animales control y experimentales a los diferentes tiempos de exposición. En la décima semana de inhalación, los valores de TBARS disminuyeron significativamente en ambos grupos (Figura 3 y Tabla 3)

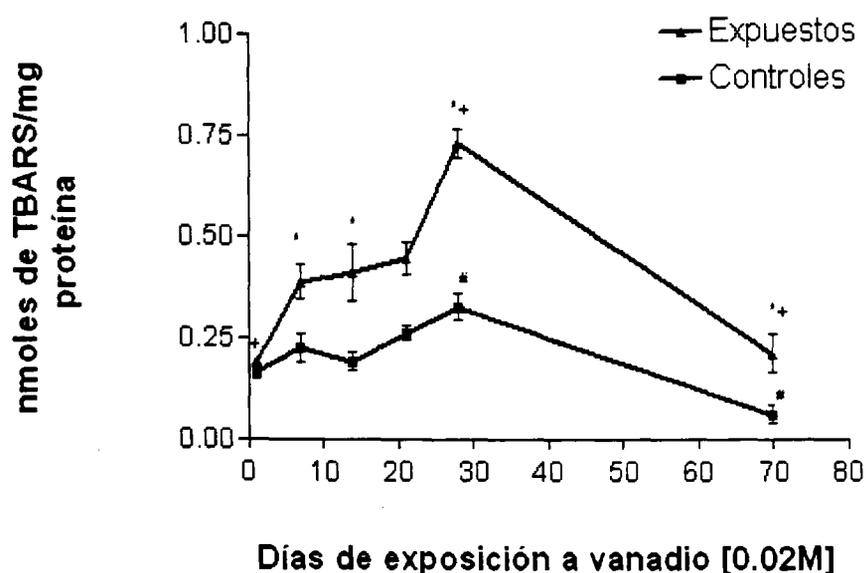


Figura 3. Peroxidación de lípidos en hígado de ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 [0.02M]. El Δ representa la media \pm e.e de los animales expuestos, $n= 5-6$. El \square representa la media \pm e.e de los animales control, $n= 5$. * $p \leq 0.05$ expuesto vs control; # $p \leq 0.05$ controles; + $p \leq 0.05$ expuestos (ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey).

Tabla 3. Valores de TBARS en los homogenados de hígado de ratón

Tiempo de inhalación	Controles n= 5			Expuestos n= 6		
	\bar{x}	\pm	e.e.	\bar{x}	\pm	e.e.
1 día	0.168	\pm	0.019	0.191	\pm	0.009
7 días (1 semana)	0.225	\pm	0.034	0.387	\pm	0.042
14 días (2 semanas)	0.192	\pm	0.023	0.409	\pm	0.07
21 días (3 semanas)	0.262	\pm	0.017	0.446	\pm	0.039
28 días (4 semanas)	0.326	\pm	0.032	0.731	\pm	0.036
70 días (5 semanas)	0.063	\pm	0.023	0.213	\pm	0.048

\bar{x} = media

e.e = error estándar

II. Cambios morfológicos

Los animales control mostraron un parénquima hepático de características normales, con hepatocitos de bordes poliédricos, y la presencia de uno o dos núcleos prominentes de cara abierta formando columnas. Se observan venas centrales y espacios porta (triada hepática), y dispersos focos de infiltrado inflamatorio, los cuales se identifican por el cúmulo de células fagocíticas (Figura 4).

A partir de la primera inhalación (24 horas), se observó un aumento en el número de focos de infiltrado inflamatorio ubicados en todo el parénquima hepático con predominancia en el espacio porta. Este infiltrado se mantuvo hasta la décima semana de exposición (Figura 5 y 6).

De igual forma, a partir de la primera semana se observó un aumento en el número de hepatocitos binucleados, encontrando diferencia significativa en la cuarta semana de exposición con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$, ANOVA), (Figura 7 y 8).

En cuanto a la presencia de células que mostraron núcleos de gran tamaño ($> 30 \mu\text{m}$), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tercera y cuarta semana de exposición con respecto al grupo control ($p \leq 0.05$, ANOVA), (Figura 9 y 10).

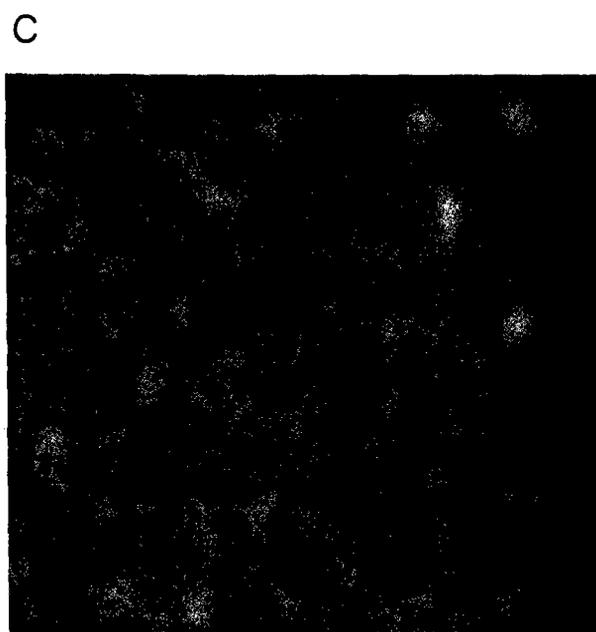
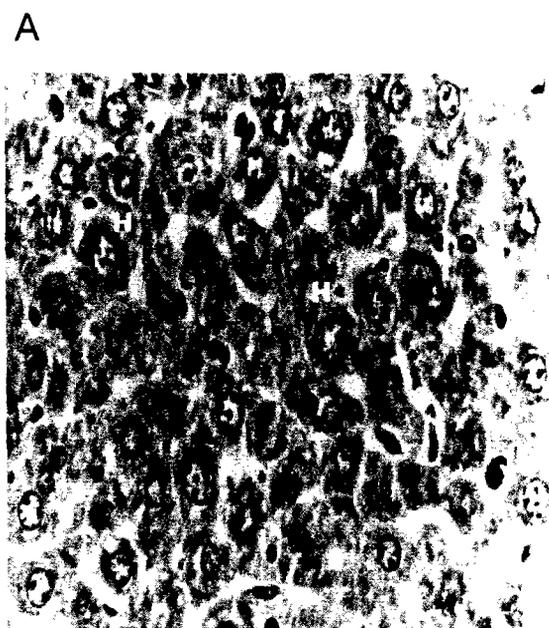


Figura 4. Parénquima hepático de animal control. (A) Estructura normal de hepatocitos (H) 400X. (B) Amplificación del panel A, 1000X. (C) Triada hepática donde se observa vena porta (V) y canalículo biliar (CB) 400X.

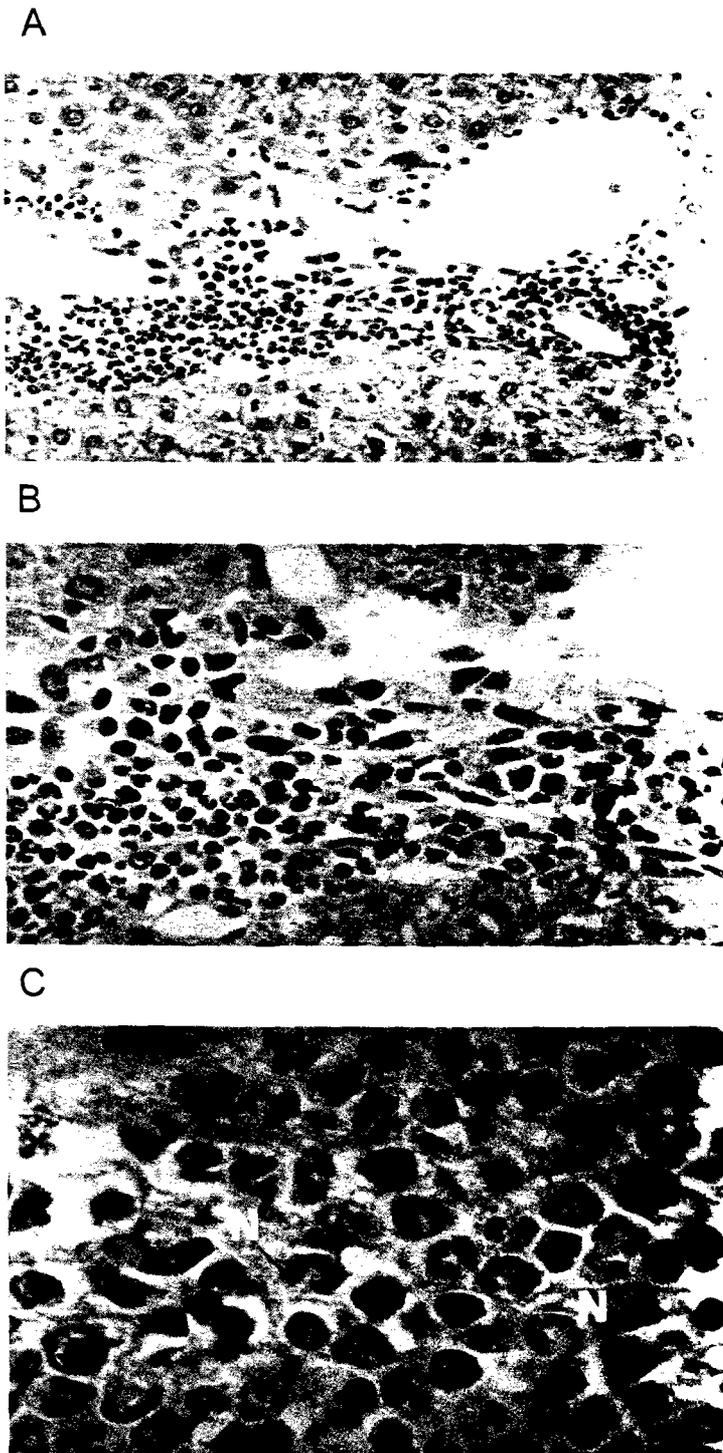


Figura 5. Foco de infiltrado inflamatorio en la zona periportal del parénquima hepático constituido predominantemente por neutrófilos (N). Animal expuesto a una inhalación. (A) Aumento de 200X. (B) Aumento de 400X. (C) Aumento de 1000X. Técnica H-E

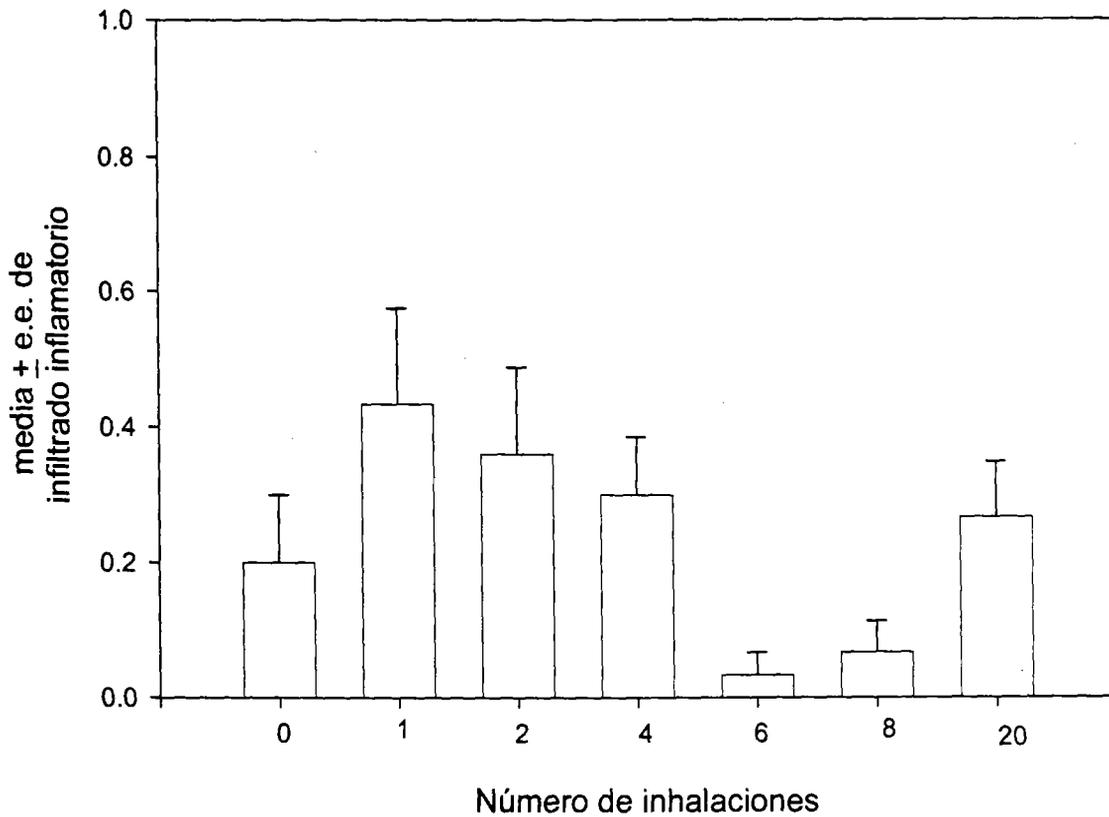
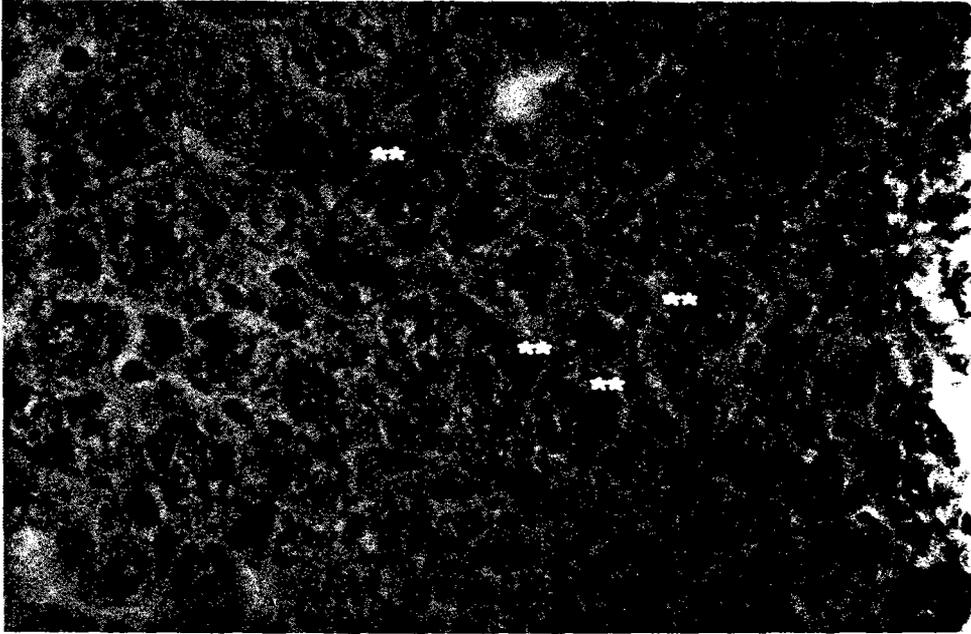


Figura 6. Número de focos de infiltrado inflamatorio en hígado de ratones expuestos a V_2O_5 [0.02M]. n= 6

Número de inhalaciones	n= 6	
	\bar{x}	\pm e.e.
0 (control)	0.2	\pm 0.1
1 inhalación (24 horas)	0.43	\pm 0.14
2 inhalaciones (1 semana)	0.36	\pm 0.13
4 inhalaciones (2 semanas)	0.30	\pm 0.09
6 inhalaciones (3 semanas)	0.03	\pm 0.03
8 inhalaciones (4 semanas)	0.06	\pm 0.05
20 inhalaciones (10 semanas)	0.26	\pm 0.08

A



B

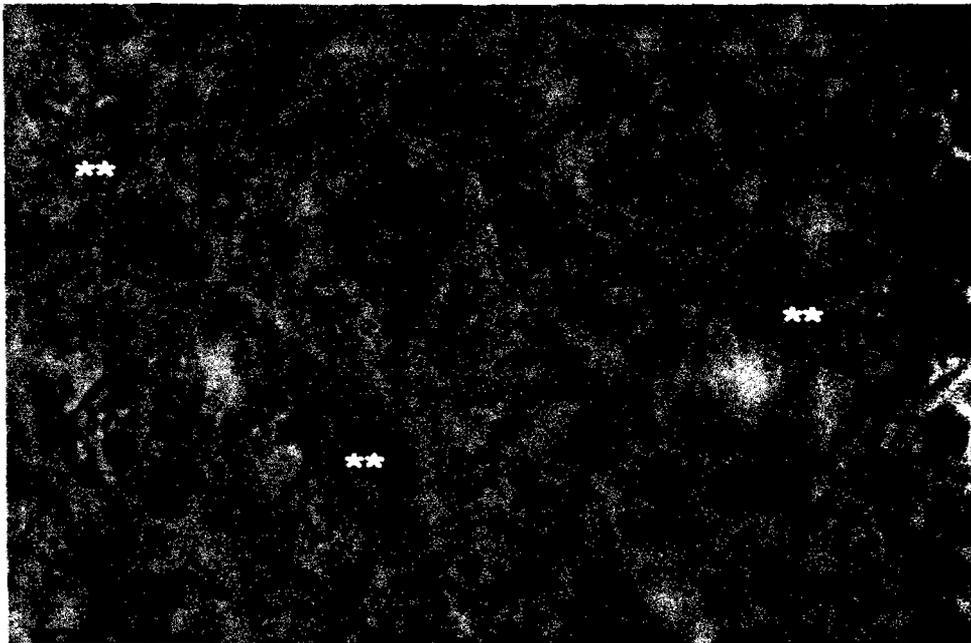


Figura 7. Parénquima hepático de un animal expuesto a seis inhalaciones. (A) Se observan células binucleadas (**) 400X. (B) Aumento de 1000X. Técnica H-E

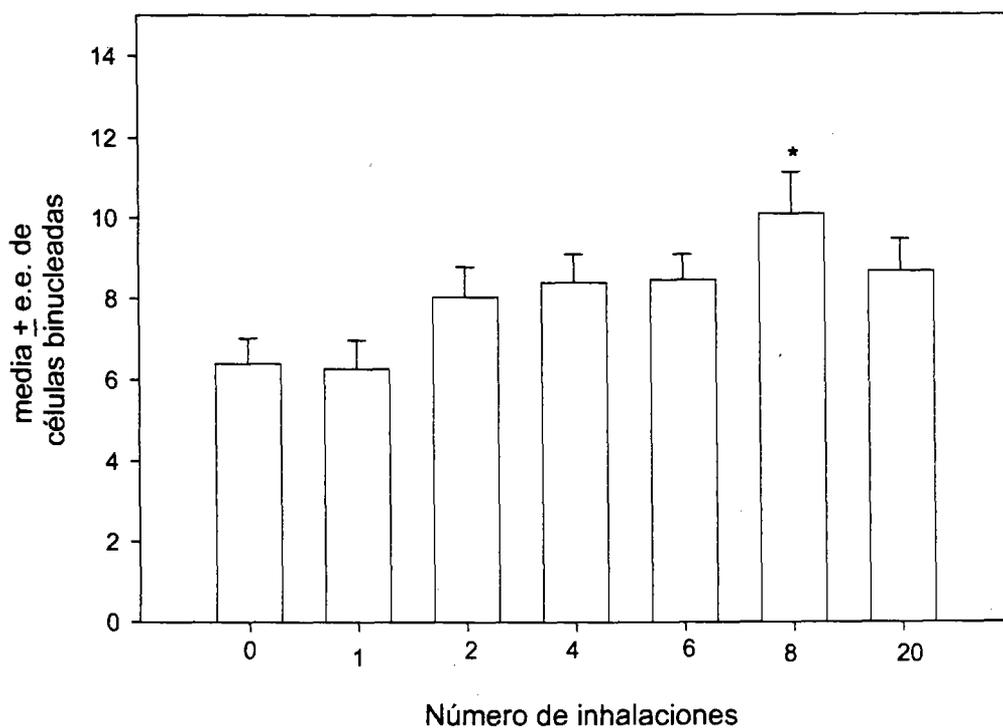
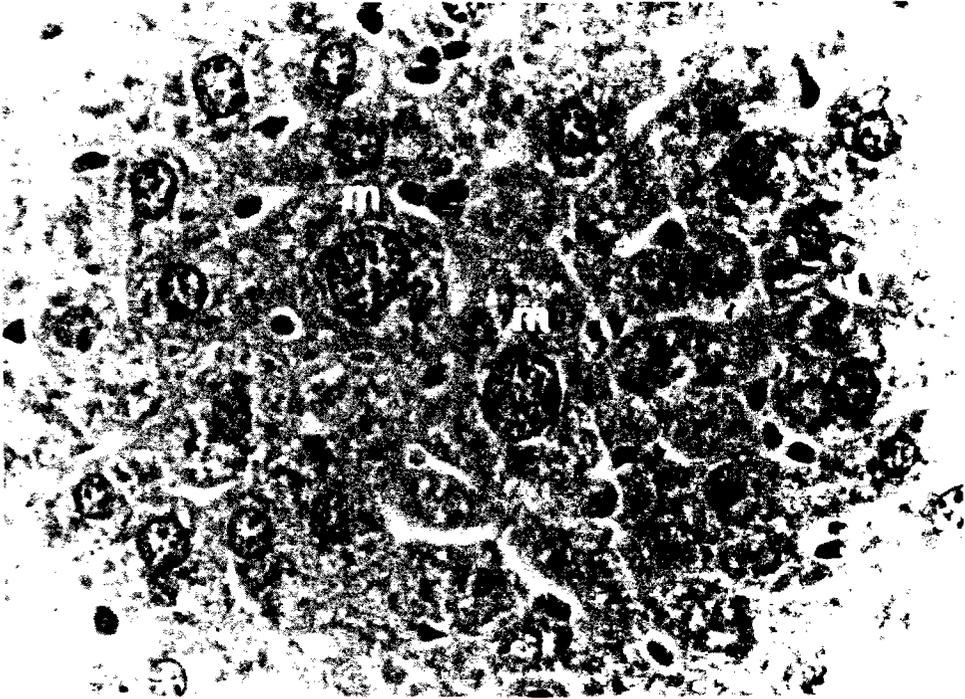


Figura 8. Hepatocitos binucleados en el hígado de ratones expuestos a V_2O_5 [0.02M]. Las barras representan la media \pm e.e, n=6. *ANOVA (Tukey) $p \leq 0.05$ vs el control.

Número de inhalaciones	n= 6	
	\bar{x}	+ e.e.
0 (control)	6.4	± 0.62
1 inhalación (24 horas)	6.26	± 0.70
2 inhalaciones (1 semana)	8.04	± 0.74
4 inhalaciones (2 semana)	8.40	± 0.69
6 inhalaciones (3 semana)	8.47	± 0.62
8 inhalaciones (4 semana)	10.10	± 1.03
20 inhalaciones (10 semanas)	8.66	± 0.80

A



B

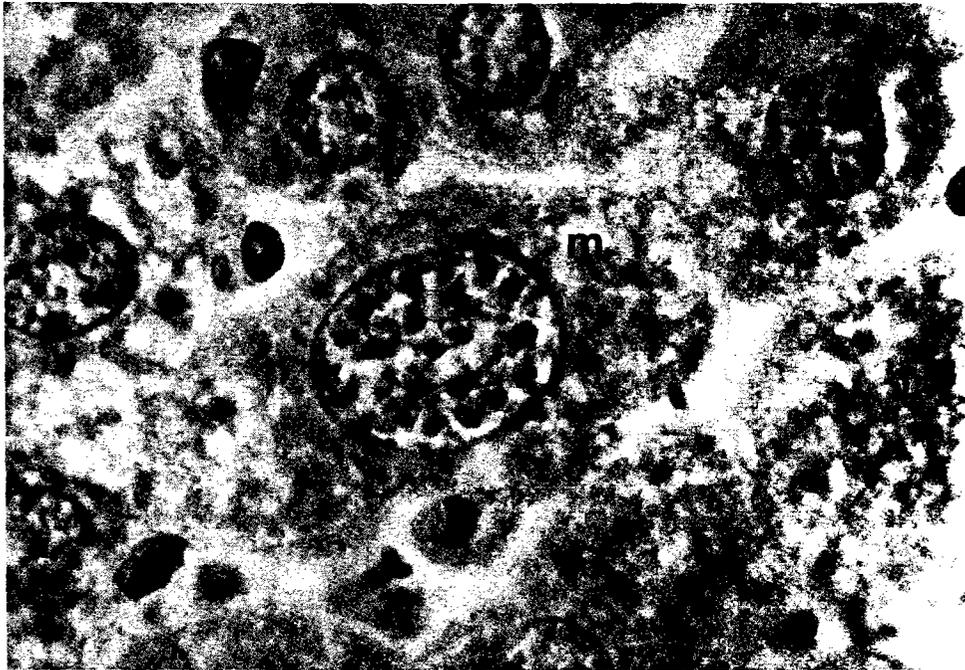


Figura 9. Parénquima hepático de un animal expuesto a ocho inhalaciones. (A) Se observa un hepatocito con meganúcleo (m) 400X. (B) Aumento de 1000X. Técnica H-E

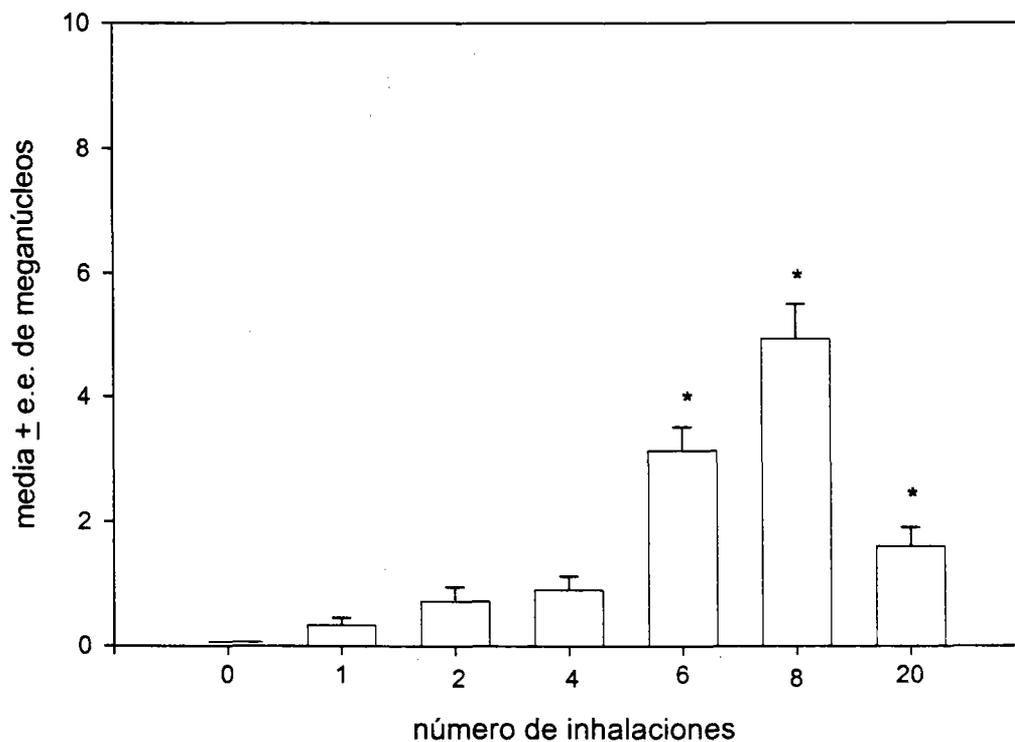


Figura 10. Frecuencia de meganúcleos en hepatocitos de ratones expuestos a V_2O_5 [0.02M]. n=6. *ANOVA (Tukey) $p \leq 0.05$ vs el control.

Número de inhalación	n= 6		
	\bar{x}	+	e.e.
0 (control)	0.0	±	0.0
1 inhalación (24 hrs)	0.33	±	0.12
2 inhalaciones (1 semana)	0.72	±	0.22
4 inhalaciones (2 semana)	0.90	±	0.21
6 inhalaciones (3 semana)	3.13	±	0.38
8 inhalaciones (4 semana)	4.93	±	0.55
20 inhalaciones (10 semanas)	1.16	±	0.30

III. Pruebas de funcionamiento hepático

Se realizó la cuantificación en suero de diferentes parámetros que miden funcionamiento hepático, tanto para los animales expuestos a distintos tiempos de exposición a vanadio (n=5), como a los animales control (n=5).

Los valores en suero de glucosa, bilirrubina total (BT), bilirrubina no conjugada (BNC) y bilirrubina conjugada (BC) de los animales expuestos a V_2O_5 muestran que existen diferencias significativas con respecto a las muestras de los animales control ($p \leq 0.05$, ANOVA; Tabla 4, Figura 11)

Con respecto a los niveles de colesterol, urea, aminotransferasa de alanina (ALT) y aspártica (AST), fosfatasa alcalina (FA) y albúmina, no existen diferencias significativas entre los animales expuestos a vanadio comparados con los valores control (Tabla 4, Figura 12).

Tabla 4. Concentraciones en sangre de parámetros que miden funcionamiento hepático.

Parámetros No. de inhalaciones	0 inhalaciones			1 inhalación (24 hrs)			2 inhalaciones (1 semana)			4 inhalaciones (2 semanas)			6 inhalaciones (3 semanas)			8 inhalaciones (4 semanas)			20 inhalaciones (10 semanas)		
	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e	\bar{X}	\pm	e.e
Glucosa	12.00	\pm	0.00	12.5	\pm	2.87	12	\pm	1.47	9.17	\pm	0.56 *	8.17	\pm	0.83 *	8.25	\pm	0.85 *	8.7	\pm	1.65 *
Colesterol	2.01	\pm	0.11	2.35	\pm	0.05	2.34	\pm	0.18	2.40	\pm	0.23	1.75	\pm	0.19	2.88	\pm	0.32	1.94	\pm	0.15
Urea	8.22	\pm	0.36	10.62	\pm	0.81	8.47	\pm	0.51	9.37	\pm	0.56	8.15	\pm	0.82	8.30	\pm	0.84	8.55	\pm	0.46
Bilirrubina Total	5.92	\pm	0.59	5.25	\pm	0.28	7.40	\pm	0.49	7.72	\pm	0.90	18.1	\pm	2.59 *	13.8	\pm	3.25 *	10.45	\pm	0.73*
BNC	0.32	\pm	0.10	0.55	\pm	0.08	0.68	\pm	0.12	0.67	\pm	0.11	1.40	\pm	0.29 *	1.02	\pm	0.16*	0.97	\pm	0.13*
BC	5.60	\pm	0.78	5.25	\pm	0.42	7.50	\pm	1.71	6.92	\pm	0.43	16.57	\pm	2.22 *	11.47	\pm	3.43	5.73	\pm	1.62
ALT	82.2	\pm	8.72	87.25	\pm	14.0	93.75	\pm	5.92	92.75	\pm	23.68	120	\pm	26.62	106	\pm	18.05	100	\pm	26.91
AST	200	\pm	7.60	162	\pm	15.8	253	\pm	15.34	243	\pm	47.5	185	\pm	20.8	188	\pm	33.7	187	\pm	59.64
Albúmina	23	\pm	1.22	21	\pm	0.04	24.5	\pm	0.28	26.75	\pm	2.17	20.5	\pm	1.04	23	\pm	2.79	20.75	\pm	2.28
FA	103	\pm	17.57	129.7	\pm	5.45	90	\pm	13.93	126	\pm	5.73	91	\pm	24.72	65.75	\pm	7.56	74.5	\pm	19.84

* Estadísticamente diferente del control $p \leq 0.05$ en prueba ANOVA (Tukey).

BNC= Bilirrubina no conjugada

BC = Bilirrubina conjugada

ALT= Transaminasa glutámico-pirúvica

AST= Transaminasa glutámico-oxaloacética

FA = Fosfatasa alcalina

\bar{x} = Media

e.e = error estándar

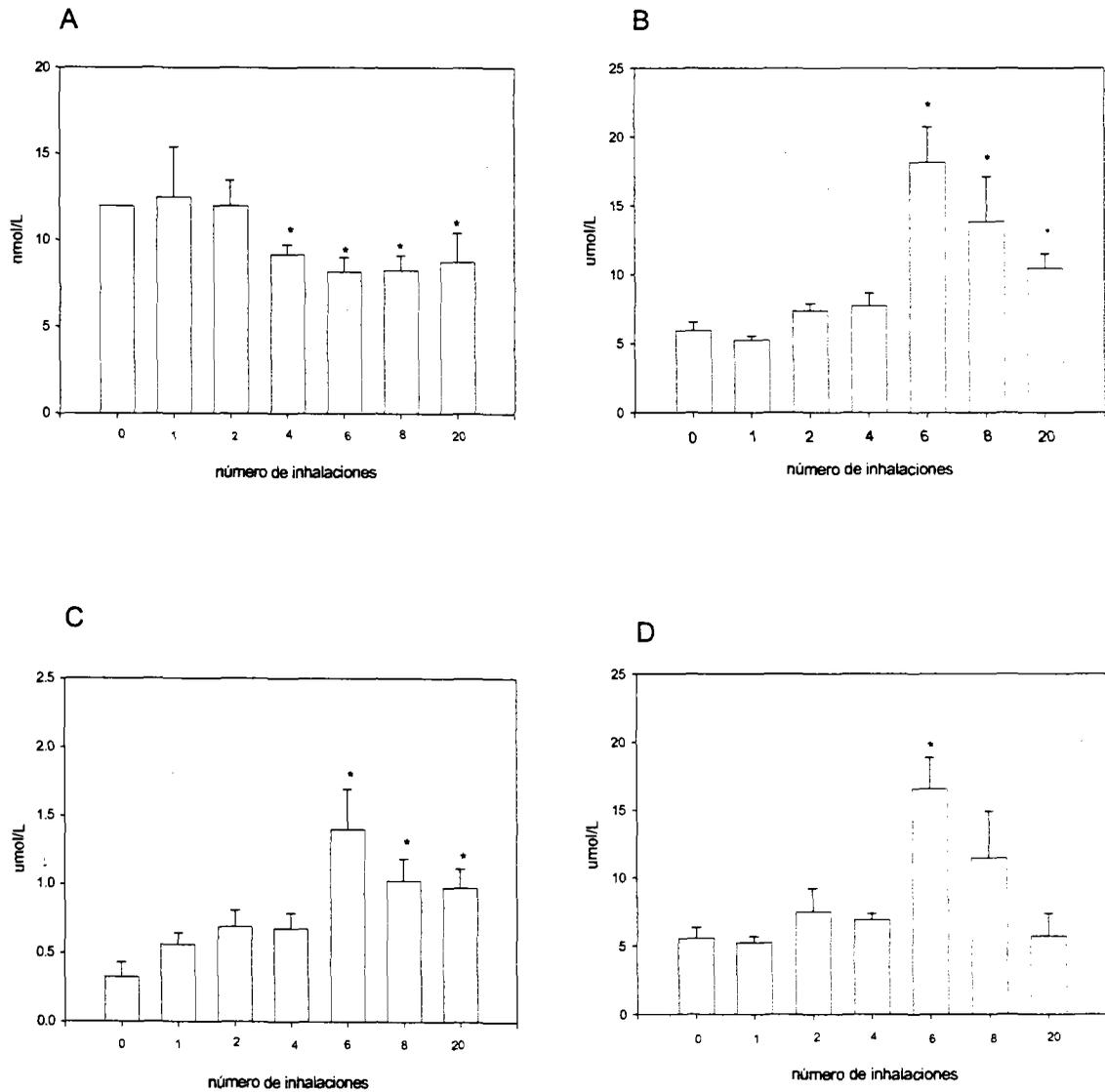


Figura 11. El efecto del V₂O₅ [0.02M] sobre la concentración en sangre de distintos parámetros de funcionamiento hepático en ratones expuestos a diferentes tiempos. (A) Glucosa. (B) Bilirrubina total. (C) Bilirrubina no conjugada. (D) Bilirrubina conjugada. Las barras representan la media ± e.e, n= 5. * ANOVA (Tukey) p ≤ 0.05 vs el control.

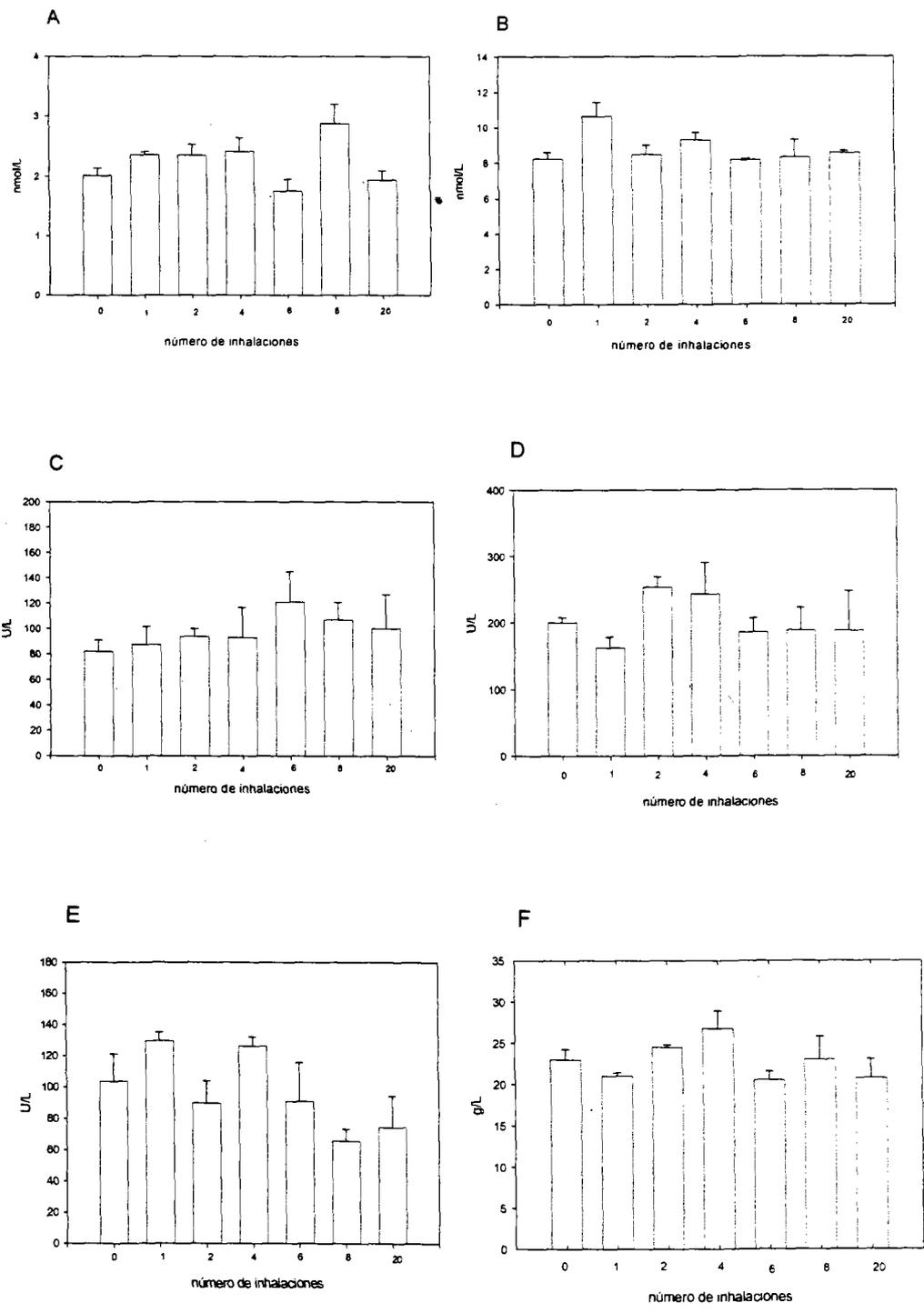


Figura 12. El efecto del V_2O_5 [0.02M] sobre la concentración en sangre de distintos parámetros de funcionamiento hepático en ratones expuestos a diferentes tiempos. (A) Colesterol, (B) Urea, (C) ALT, (D) AST, (E) FA, (F) Albúmina. Las barras representan la media \pm e.e, n = 5.

DISCUSIÓN

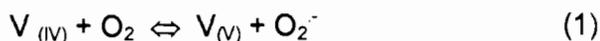
Peroxidación lipídica:

En el presente estudio, se observó que la administración por la vía inhalada del pentóxido de vanadio aumentó la peroxidación lipídica en el hígado del ratón, la cual se incrementó a medida que se aumentó el tiempo de exposición, con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en los diferentes tiempos de exposición, así como con su respectivo grupo control. Este incremento fue observado hasta la cuarta semana de inhalación, y a partir de la décima semana los valores disminuyeron significativamente.

El aumento en los valores de peroxidación también se ha reportado en hígado por la administración de metavanadato de sodio i.p. (Sheriff, 1991) y ortovanadato de sodio (2mmol/l) *in vitro* (Younes y Strubelt, 1991), en el consumo de etanol (Albano, 2002; Bailey, 2003), por la exposición subaguda a plomo (Saxena, 2004) y al cadmio (El-Demerdash *et al*, 2004), al tetracloruro de carbono, así como a la administración de altas dosis de hierro y cobre (Poli *et al*, 1989; Albano *et al*, 1991; Poli, 1993; Britton y Bacon, 1994). El aumento de la peroxidación lipídica probablemente se debe a que el vanadio, por ser un metal de transición, puede generar ROS por medio de mecanismos que involucran la activación del complejo NADPH oxidasa y la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Liochev y Fridovich, 1986; Wang *et al*, 2003). Por otro lado, el vanadio dentro de las células está implicado en la modulación de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa las cuales pueden estar involucradas en los mecanismos de estrés oxidativo, generando así peroxidación lipídica (Aureliano *et al*, 2002). La generación de radicales libres por medio del metabolismo hepático, o bien directamente por el mismo hepatotóxico, produce daño celular vía oxidación de los ácidos grasos insaturados o fosfolípidos, los cuales pueden alterar el estado redox celular seguido de un daño mitocondrial debido a que el hígado es el principal órgano involucrado en el ciclo redox y en la generación de enzimas oxidativas, por lo que es responsable de una considerable actividad oxidante (Dong *et al*, 1998; Lapenna *et al*, 2002).

Existen diferentes mecanismos por los cuales el vanadio puede generar radicales libres, uno de ellos es la autooxidación del vanadio IV (vanadil) con O₂ proveniente del aire,

generando así anión superóxido (O_2^-), pero esta reacción puede estar drásticamente acelerada por la presencia de metales de transición (1). El O_2^- se dismuta directamente o enzimáticamente por medio de la SOD produciendo H_2O_2 (2). Este a su vez puede reaccionar nuevamente con el vanadil generando OH^\cdot en la reacción tipo Fenton (3), y a su vez el OH^\cdot puede reaccionar con el H_2O_2 y así generar nuevamente O_2^- en una reacción de Haber-Weiss (4) (WHO, 2000; Zhang *et al*, 2001; Wang *et al*, 2003).



La disminución en los valores de lipoperoxidación en la décima semana es algo que no se esperaba encontrar debido a que la concentración de vanadio se mantuvo porque la exposición fue continua. Hasta el momento no se conoce una posible explicación para este efecto por lo que será interesante retomar este punto.

Con respecto al aumento en los valores de lipoperoxidación de los animales control, éste se debe a que en condiciones fisiológicas normales, el uso de oxígeno por las células del organismo genera metabolitos intermediarios potencialmente reactivos, los cuales conocemos como ROS, por lo que en todas las células existe un estado basal de lipoperoxidación y se ha reportado que el nivel basal puede aumentar con la edad del organismo (Chihuailaf *et al*, 2001).

Morfología:

Existen estudios que reportan que el vanadio induce cambios morfológicos en diferentes órganos como riñón, testículo, cerebro, pulmón y sangre periférica (Hogan, 2000; De la Torre *et al*, 2003; Aragón, 2003; Wang *et al*, 2003; Rodríguez *et al*, 2000; Ávila-Costa *et al*, 2004).

Una de las primeras alteraciones morfológicas en nuestro estudio fue la presencia de focos de infiltrado inflamatorio identificados por la presencia de neutrófilos y eosinófilos, el

cual no tuvo diferencias significativas con respecto al grupo control. Se observaron células inflamatorias en los animales control debido a que su presencia es normal en todo tejido conectivo y el hígado es un órgano que cuenta con este tipo de tejido ya que es necesario para la formación del estroma el cual le da sostén.

Este parámetro es inespecífico ya que puede presentarse en muchas situaciones como en las infecciones agudas y crónicas e inflamación crónica (Robbins, 2000), y también se ha reportado en casos de exposición vía inhalada a vanadio (Knecht *et al*, 1985; Acevedo, 2002; Wang *et al*, 2003). La inflamación es básicamente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de las mismas.

Por otro lado, se observó un aumento en el número de hepatocitos binucleados a la cuarta semana de exposición, lo que probablemente nos indique una alteración en citoesqueleto causada por vanadio. Como lo reportan Kirazov en 1986 y Ramírez en 1997, quienes encontraron que V_2O_5 y $NaVO_4$ inhiben el ensamblaje de la tubulina e inducen la despolimerización de la misma y en como consecuencia, la alteración en la formación del huso mitótico, resultando en la formación de células aneuploides o poliploides. Otros autores también han reportado que daños cromosómicos, como aneuploidias, poliploidias y formación de micronúcleos, pueden ser inducidas por vanadio (Roldan y Altamirano-Lozano, 1990; Zhong *et al*, 1994; Ciranni *et al*, 1995; Altamirano-Lozano *et al*, 1999; Rodríguez-Mercado, 2003), lo que correlaciona con el aumento significativo en el volumen nuclear encontrado en la tercera y cuarta semanas de exposición, lo que probablemente revele que el vanadio ejerce una toxicidad máxima en dicho tiempo ya que para la última semana hubo una disminución en el número de hepatocitos con meganúcleos. Una característica de las poliploidias es la presencia de núcleos de mayor tamaño del normal (Lesson *et al*, 1990). Este tipo de daño genotóxico también ha sido reportado ante la administración de otros metales como el níquel, fierro y cobre (Muramatsu *et al*, 2000; Madra *et al*, 1995; Ohshima, 2003).

Funcionamiento hepático:

Un importante papel fisiológico del hígado consiste en eliminar de la sangre las sustancias endógenas y exógenas potencialmente nocivas y su posterior excreción por la bilis o su transformación en productos hidrosolubles para su eliminación por la orina (Sandford y Suhn, 1990).

El colesterol, la urea, la ALT, la AST, la fosfatasa alcalina y la albúmina no tuvieron diferencias significativas con respecto a su control, lo cual difiere de lo observado en estudios previos en donde utilizan otros compuestos de vanadio (oxovanadio, vanadil sulfato, vanadato de amonio), en donde los niveles de colesterol, urea y fosfatasa alcalina tuvieron una disminución significativa (Parsadanian *et al*, 1998; Krosniak *et al*, 2001; Shinde *et al*, 2001; Cusi *et al*, 2001; Bolkent *et al*, 2003). Con base en estos resultados, es importante enfatizar que el compuesto de vanadio utilizado, la vía, dosis y el tiempo de exposición, son fundamentales en la respuesta del organismo (Hogan, 2000).

En nuestro estudio encontramos una disminución en los niveles de glucosa en sangre a partir de la segunda semana de exposición, lo cual concuerda con estudios previos realizados por Zychlinski y cols. en 1991; quienes administraron intratraquealmente V_2O_5 (0.56mg/kg) en ratas, y Poucheret y cols. en 1998 quienes administraron vía oral vanadil sulfato en ratas, debido a que han reportado que el vanadio tiene efectos insulinomiméticos tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Glouver y cols. 2000; Goldwaser, 2000; Shafrir, 2001).

Distintos autores reportan que el efecto similar a la insulina del vanadio se debe a que el vanadato de sodio en ratas estimula la recaptura y oxidación de la glucosa en adipocitos, la síntesis de glucógeno en hígado y en músculo, así como la inhibición de la gluconeogénesis hepática (Thompson, 1999; Srivastava, 2000). Sin embargo, también se ha reportado que el efecto insulinomimético del vanadio es directamente en el receptor para la insulina debido a que el vanadio interfiere con enzimas que contengan fosfatos oxidando su dominio catalítico causando un aumento en la fosforilación celular. Este es el caso de la enzima tirosina fosfatasa (PTP) la cual al ser inhibida por vanadio los receptores de insulina se activan y autofosforilan estimulando la acción de la tirosina

cinasa activando el metabolismo de la glucosa en ausencia de insulina (Mukherjee *et al*, 2004; Srivastava y Mehdi, 2005).

Por otro lado, observamos que la administración de pentóxido de vanadio vía inhalada aumentó las concentraciones circulantes de bilirrubina total, bilirrubina conjugada y bilirrubina no conjugada.

Como se mencionó en la introducción, la bilirrubina es el producto final de la degradación del grupo hemo de la hemoglobina a partir principalmente de la destrucción de eritrocitos viejos, lo cual se lleva a cabo por el sistema fagocítico mononuclear (Robbins, 1999). Aproximadamente del 7-10% de la síntesis del hemo es convertida en bilirrubina y de ésta el 50% es conjugada (Rodgers y Cornelius, 1992).

Con respecto a las bilirrubinas se observó un aumento en las concentraciones a partir de la tercera semana de tratamiento. Esto ha sido documentado ante la exposición de cloruro de cadmio en humanos, la administración subcrónica de tetracloruro de carbono y cloruro de cobalto en ratas (Llesuy y Tomaro, 1994; Olinescu *et al*, 1994; Muriel y Escobar, 2003).

Una posibilidad que nos ayudaría a explicar el aumento en las concentraciones de bilirrubina es el hecho de que el vanadio puede producir cambios peroxidativos en las membranas de los eritrocitos, induciendo hemólisis (Zaporowska y Wasilewski, 1992; Nriagu, 1998; Hogan, 2000; Domingo, 2002) y ésto se ha observado debido a que la inhibición de la Na-K ATPasa puede originar fragilidad osmótica *in vitro* (Zaporowska y Slotwinska, 1996).

Los valores de bilirrubina total en suero están determinados por los valores de bilirrubina conjugada y no conjugada. En nuestro estudio encontramos un aumento de la concentración de BNC a partir de la tercera semana de exposición y hasta el final del estudio, que podría explicarse porque en condiciones hemolíticas se llega a incrementar la acumulación de bilirrubina no conjugada debido a que se excede la capacidad del hígado para capturarla y conjugarla (Murray *et al*, 1992; MacSween, 2002).

CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró un aumento significativo de lípidos peroxidados después de cada inhalación de V_2O_5 , excepto para la última exposición.
- ✓ Presencia de infiltrado inflamatorio en todas las semanas de exposición.
- ✓ Aumento en el número de hepatocitos binucleados que posiblemente estén relacionados con alteración en citoesqueleto.
- ✓ Aumento en el número de meganúcleos que puede estar implicado en daño genotóxico.
- ✓ Aumento en las concentraciones de bilirrubina total, no conjugada y conjugada en suero, resultado de la hemólisis generada por vanadio.
- ✓ La exposición aguda y subaguda a pentóxido de vanadio [0.02M] produjo alteraciones bioquímicas y morfológicas en el hígado de ratón CD-1.
- ✓ Con base en este trabajo concluimos que la peroxidación lipídica generada por la inhalación de pentóxido de vanadio es un factor causante de los cambios morfológicos y bioquímicos observados en el hígado.
- ✓ Este modelo de inhalación de vanadio es adecuado para estudiar el efecto de contaminantes ambientales en los organismos, debido que este trabajo demuestra que la inhalación de pentóxido de vanadio produce hepatotoxicidad en ratones desde el punto de vista morfológico y bioquímico.

BIBLIOGRAFÍA

- Ⓢ Acevedo N. S. Alteraciones morfológicas en hígado de ratón por inhalación de vanadio. Tesis para Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 2002. 57 pp.
- Ⓢ Albano E., Bellomo G., Parola M., Carini R., Dianzani M. Stimulation of lipid peroxidation increased the intracellular calcium content of isolated hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991; 1091: 310-316
- Ⓢ Albano E. Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 32 (2): 110-114.
- Ⓢ Altamirano-Lozano M. Efectos mutagénicos y alteraciones del ciclo reproductivo del ratón producidos por V₂O₅. Tesis de Doctorado. UNAM. México. 1992.
- Ⓢ Altamirano-Lozano M., Roldán-Reyes E., Rojas E. 1998. Genetic Toxicology of vanadium compounds. En Nriagu J Ed. Vol 31. Vanadium in the environment. John Wiley and Sons. New York. 158-178.
- Ⓢ Altamirano-Lozano M., Valverde M., Alvarez-Barrera L., Molina B., Rojas E. Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 1999. 19 (4):243-255.
- Ⓢ Amdur M O, Doull J, Klaassen C D. Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poisons. Pergamon Press. USA. 1991. 4ª ed. 1033
- Ⓢ Aragón MA., Altamirano-Lozano M. Sperm and testicular modification induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*. 2001; 15: 145-151.
- Ⓢ Aragón MA. Toxicidad reproductiva del vanadio (IV) en el ratón macho. Tesis de Doctorado. FES Zaragoza. UNAM. México. 2003. 94 pp.
- Ⓢ Aureliano M., Joaquim N., Sousa A., Martins H., Coucelo JM. Oxidative stress in toadfish (*Halobatrachus didactylus*) cardiac muscle. Acute exposure to vanadate oligomers. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002; 90(3-4): 159-65.
- Ⓢ Ávila-Costa MR., Montiel Flores E., Colín-Barenque L., Ordoñez JL., Gutiérrez AL., Niño-Cabrera HG., Mussali-Galante P., Fortoul TI.

- Nigrostriatal modifications alter vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 2004; 29 (7): 1365-9
- © Badmaev V., Prakash S., Majeed M. Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 1999; 5(3): 273-291.
 - © Banks W J. 1986. *Histología veterinaria aplicada. El Manual Moderno. México*
 - © Baran EJ. Oxovanadium (IV) and oxovanadium (v) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2000; 80: 1-10
 - © Barceloux D.G. Vanadium. *Clinical Toxicology*. 1999; 37 (2): 265-278.
 - © Barth A., Shaffer A.W., Konnaris C., Blauensteiner R., Winker R., Osterode W., Rüdiger H.W. Neurobehavioral effects of vanadium. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2002; 65:677-683.
 - © Bay BH., Sit KH., Paramanatham R., Chan YG. Hydroxyl free radicals generated by vanadium (IV) induce cell blebbing in mitotic human Chang liver cells. *BioMetals*. 1997; 10 (2): 119-122.
 - © Bayley SM. A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial dysfunction. *Free Radical Research*. 2003; 37 (6): 585-596.
 - © Bizarro NP. Alteraciones ultraestructurales en testículo por inhalación de acetato de plomo y cloruro de cadmio. Modelo experimental en ratón. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 2002. 59pp
 - © Boon-Huat B., Kwok-Hung S., Ramanujam P., Yee-Gek C. Hydroxyl free radicals generated by vanadyl [IV] induce cell blebbing in mitotic human Chang liver cells. *BioMetals*. 1997; 10: 119-122
 - © Borges G., Mendoca P., Joaquim N., Coucelo J., Aureliano M. Acute effects of vanadato oligomers on heart, kidney, and liver histology in the Lusitanian toadfish (*Holobatrachus didactylus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003; 45 (3): 415-422.
 - © Bravo H, Sosa R, Torres R. Ozono y lluvia ácida en la Ciudad de México. *Ciencias*. 1991; (22): 33-40.
 - © Britton RS., Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepato-Gastroenterology*. 1994; 41: 343-348.

- © Byczkowski JZ., Kulkarni AP. 1998. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. En Nriagu J Ed. Vol 31. Vanadium in the enviromental. John Wiley and Sons. New York. 235-263.
- © Cam MC., Li WM., McNeill JH. Partial preservation of pancreatic β -cells by vanadium: Evidence for long- term amelioration of diabetes. *Metabolism*. 1997; 46 (7): 769-778.
- © Ciranni R., Antonett M., Migliori L. Vanadium salts induce cytogenetic effects in *in vivo* treated mice. *Mutation Research*. 1995; 343 (1): 53-60
- © Chen H., Tappel A. Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation I rat liver homogenate. *Lipids*. 1996; 31(1): 47-50
- © Chihuailaf R., Contreras P., Wittwer F. 2001. Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud mental. Artículos de revisión. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Chile. 265-282
- © Cusi K, Cukier S, DeFronzo RA, Torres M, Puchulu FM, Redondo JC. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; 86 (3): 1410-7
- © Dabros W., Dziga D., Grybos R., Kordowiak AM. Biochemical and morphological alterations in rat liver Golgi complexes after treatment with bis(maltolato) oxovanadium (IV) [BMOV] or maltol alone. *Pathology, Research and Practice*. 2000; 196 (8): 561-568.
- © D'Cruz OJ., Uckun FM. Vanadocene- mediated *in vivo* male germ cell apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 166: 186-195
- © D'Cruz OJ., Uckun FM. Intravaginl toxicity studies of a gel- microemulsion formulation of spermicidal vanadocenes in rabbits. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001; 170: 104-112
- © De la Torre A., Granero S., Mayayo E., Corbella J., Domingo JL. Effect of age o vanadium nephrotoxicity in rats. *Toxicology Letters*. 1999; 105: 75-82.
- © Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents. *Biological Trace Element Research*. 2002; 88: 97-112.
- © Dong W., Simeonova PP., Gallucci R., Matheson J., Flood L., Wang S., Hubbs A., Luster MI. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in

- hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1998; 151 (2): 359-366.
- © El-Demerdash FM., Yousef MI., Kedwany FS., Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-caroteno. *Food and Chemical Toxicology*. 2004; 42 (10): 1563-71
 - © Farreras R. 2000. *Medicina Interna*. 14a Edición. Harcourt Ediciones. Madrid.
 - © Fortoul TI., Saldivar OL., Tovar TA., Salazar D, Castilla ME., Olaiz-Fernández G. Metals in Lung Tissue from Autopsy Cases in Mexico City Residents: Comparison of Cases from the 1950s and the 1980s. *Environmental Health perspectives*. 1996; 104 (6): 630-632.
 - © Fortoul TI., Quan Torres A., Sánchez I., López I., Bizarro P., Mendoza ML., Saldivar OL., Espejel- Maya G., Avila-Casado MC., Ávila Costa MR., Colín Barenque L., Navarro Villanueva D., and Olaiz FG. Vanadium in the air: Concentrations in Lung tissue from autopsies of Mexico resident in the 1960s and 1990s. *Archives of Enviromental Health*. 2002; 57(5): 446-449.
 - © Gartner L y Hiatt J. 1997. *Histología Atlas y Texto*. Mc Graw- Hill. Interamericana. México. 506 pp.
 - © Guevara J A. 1996. Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio. *Profesores al día*. Puebla, México. pp 185-189.
 - © Goldwasser I., Gefel D., Gershonov E., Fridkin M., Shechter Y. Insulin- like effects of vanadium: basic and clinical implications. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2000; 80 (1-2): 21-25.
 - © Golubev MA., Gorodetskii VK., Anis'kina AP., Tochilkin AI., Beliaeva NF. Comparative characteristics of vanadium-containing compounds, possessing insulin-like effects. *Vaprosy Meditsinskoi Khimii*. 2000; 46 (2): 155-161.
 - © Gutteridge JM., Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990; 15 (4): 129-35.
 - © Gutiérrez D. 1986. Efectos por la altitud de la contaminación atmosférica en la Cuenca del Valle de México. *Instituto Mexicano de Recursos Naturales*

- Renovables. XXV serie de mesas redondas. Ed del MIR, A.C. México. 256 pp.
- © Halliwell B. 1991. Lipid peroxidation, free-radical reactions, and human disease. Current concepts. Estados Unidos. 28pp.
 - © Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. American Journal of Clinical Nutrition. 1993; 57 (5): 715S-724S.
 - © Halliwell B., Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molecular Aspects of Medicine. 1985; 8 (2): 89-193.
 - © Halliwell B., Gutteridge JM. 2000. Free radicals in Biology and Medicine. 2ª Edición. Clarendon Press. Gran Bretaña. 543 pp.
 - © Ham A. 1975. Tratado de Histología. 7ª Edición. Interamericana. México 936 pp.
 - © Hansberg W. Biología de las especies de oxígeno reactivas. 2002. Mensaje Bioquímico. Vol XXVI. Facultad Medicina. UNAM. pag 19-54
 - © Harrison. 1994. Principios de Medicina Interna. 13ª Edición. Vol II. Interamericana McGraw- Hill. España. 3029 pp.
 - © Hogan GR. Comparative erythropoietic effects of three vanadium compounds. The Science of the Total Environment. 2000; 256: 185-189.
 - © International Programme on Chemical Safety (IPCS). Vanadium and some vanadium salts. Health and Safety Guide. 1990; No. 42. Geneve, WHO.
 - © International Programme on Chemical Safety (IPCS). Vanadium Pentoxide and Other Inorganic Vanadium Compounds. Health and Safety Guide. 2000; Geneve, WHO.
 - © Janiszewska G., Lachowicz L., Jaskolski D., Gromadzinska E. Vanadium inhibition of human parietal lobe APTases. Internacional Journal of Biochemistry. 1994; 26(4): 551-553.
 - © Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology. 1993; 23 (1): 21-48.
 - © Kirazov EP., Weiss DG. Effects of vanadate on the assembly and disassembly of purified tubulin. Cell Motil Cytoskeleton. 1986; 6(3): 314-23.

- © Knetch EA., Mooreman WJ., Clark JC., Lynch DW., Lewis TR. Pulmonary effects of acute vanadium pentoxide inhalation in monkeys. *American Review of Respiratory Disease*. 1985; 132:1181-1185
- © Krosniak M, Zachwieja Z, Filipek B, Zygmunt M, Grybos R. Effect of oxovanadium (IV) complexes on nondiabetic and diabetic rats. *Archiv der Pharmazie*. 2001; 334 (12): 388-92
- © LaDou J. 1999. *Medicina laboral y ambiental. Manual Moderno. México*. 549p.
- © Lapenna D., Ciofani G., Bruno C., Pierdomenico SD., Giuliani L., Giamberardino A., Cuccurullo F. Vanadyl as a catalyst of human lipoprotein oxidation. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 63: 375-380.
- © Lesson T, Lesson R, Paparo A. 1990. *Texto y Atlas de Histología. Interamericana. Mc Graw- Hill. México*. 741 pp.
- © Liochev S., Fridovich I. The oxidation of NADH by Tetravalent Vanadium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1987; 255(2): 274-278
- © Llesuy SF., Tomaro ML, Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement against oxidative damage. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1994; 1123 (1): 9-14
- © Lowry OH., Rosebrogh NH., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the foliphenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 1951; 193 :265-275.
- © MacSween RN., Burt AD., Portmann BC., Ishak KG., Sheuer PJ., Anthony PP. 2002. *Pathology of the liver. 4a Edición. Churchill Livingstone. London*. 982 pp.
- © Madra S., Styles J., Smith AG. Perturbation of hepatocyte nuclear populations induced by iron and polychlorinated biphenyls in C57BL/10ScSN mice durind carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1995; 16 (4): 719-27
- © Mahanan ES. 1992. *Toxicological chemistry. 2ª Edición. Lewis Publishers. USA*. 449 pp.
- © Martí-Mercadal J.A., Desoille H. 1993. *Medicina del trabajo. Masson. España*. 315-317 pp.
- © Mendoza PM. Determinación de manganeso y vanadio en tejido pulmonar humano en casos de autopsia por espectrofotometría de absorción atómica. Estudio comparativo entre las décadas de los 60's y los 90's.

- Tesis para Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. México. 2000.
- © Moore K., Jackson-Roberts L II. Measurement of lipid peroxidation. Free Radical Research. 1998; 28: 659-671.
 - © Morgan AM., El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. Pharmacology Research. 2003; 47(1): 75-85.
 - © Muramatsu Y., Yomada T., Moralejo DH., Mochizuk H., Sogaza K., Matsumoto K. Increased polyploid incidence is associated with abnormal copper accumulation in the liver of LEC mutant rat. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology. 2000; 107 (1-2): 129-36
 - © Muriel P., Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. Journal of Applied Toxicology. 2003; 23 (2): 103-8
 - © Murkherjee B., PATRA B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M. Vanadium an elemento f atypical biological significance. Toxicological Letter. 2004; 150 (2): 135-43
 - © Murray RK., Granner DK., Mayes PA., Rodwel VW. 1992. Bioquímica de Harper. 12ª Edición. Manual Moderno. Pag 740
 - © Mylonas C., Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In vivo. 1999; 13(3): 295-309.
 - © Naylor GJ. Vanadium and affective disorders. Biology Psychiatry. 1983; 18:103-112.
 - © Nechay RB. Mechanisms of action of vanadium. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 1984; 24: 501-524.
 - © Nriagu JO. 1998. Vanadium in the environmental. Part2: Health Effects. John Wiley and Sons, Inc. Cap: 1, 16. 1-19, pp 317-341.
 - © Ohshima S., Induction of genetic instability and chromosomal instability by nickel sulfate in V79 Chinese hamster cells. Mutagenesis. 2003; 18 (2): 133-7
 - © Olinescu R., Alexandrescu R., Hulea SA., Kumraraw FA. Tissue lipid peroxidation may be triggered by increased formation of bilirubin *in vivo*. Research Comun Chemical Pathological and Pharmacological. 1994; 84 (1): 27-34

- © Palacios BS. Efecto de la FB1 sobre la peroxidación de lípidos en membranas plasmáticas en embriones de maíz. Tesis para Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM. México. 2002. 75 pp.
- © Parker RD., Sharma RP. Accumulation and depletion of vanadium in selected tissue of rats treated with vanadyl sulfate and sodium orthovanadate. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*. 1978; 2 (2): 235-45
- © Parsadonian HK., Marchenko SN., Parsadonian KH., Borilyak IR., Vanadium as a factor that disturbs phosphorus metabolism in nervous tissue. *Neurotoxicology*. 1998; 19 (4-5): 561-4
- © Poli G. Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin*. 1993; 49(3): 604-620.
- © Poli G., Cheeseman KH., Biasi F., Chiarpotto E., Dianzani MU., Esterbauer H., Slater TF. Promethazine inhibits the formation of aldehydic products of lipis peroxidation but not covalents binding resulting from the exposure of rat liver fractions to CCl₄. *Biochemical Journal*. 1989; 264: 527-532.
- © Poucheret P., Verma S., Grynepas MD., McNeill JH. Vanadium and diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998; 188 (1-2): 73-80.
- © Quintanilha A. 1988. Reactive oxygen species in chemistry, biology and medicine. Ed. Plenum. E.U.A. 232 pp.
- © Ramírez P., Eastmond DA., Laclette JP., Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1997; 386: 291-298.
- © Rivas-Arancibia S., Colín-Barenque L., Dorado MC., Fortoul T. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Temas selectos de neurociencias II*. ED. Velásquez Moctezuma J. UAM-PUIS. 2001: 351-374.
- © Robbins S, Cotran R, Kumar V. 1999. *Patología estructural y funcional*. Mc Graw- Hill- Interamericana. España. 1474 pp.
- © Rodgers PA., Cornelius CE., Freedland RA. Bilirubin production and conjugation from newly formed heme in isolated rat hepatocytes. *International Journal of Biochemistry*. 1992; 24 (9): 1421-8

- © Rodríguez-Mercado JJ., Roldán-Reyes E., Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters*. 2003; 144: 359-369
- © Roldan RE., Altamirano LM. Chromosomal aberrations sister- chromatid exchanges cell- cycle lymphocyte cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1990; 245 (2): 61-5
- © Salvatierra SR. Efecto del selenio (selenito de sodio) sobre la peroxidación de lípido inducida por el ácido quinolínico en sinaptosomas de cerebro de ratas. Tesis para Biólogo. UNAM. México. 2004. 50 pp.
- © Sandford T., Suhn D. 1990. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 8a Edición. Tomo I. Salvat Editores. E.U.A.
- © Santamaría DA. Inducción de la peroxidación de lípidos *in vivo* por un metabolito de L-triptofano (ácido quinolínico) en un modelo de la corea de Huntington en la rata. Tesis para Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1993. pp 125.
- © Saxena G, Flora SJ. Lead- induced oxidatuve stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelaton in rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2004; 18 (4): 221-33
- © Semiz S., McNeill JH. Oral treatment with vanadium of Zucker fatty rats activates muscle glycogen synthesis and insulin-stimulated protein phosphatase-1 activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2002; 236(1-2): 123-131.
- © Shinde UA, Mehta AA, Goyal RK, Effect of chronic treatment with Bis (maltolato) oxovanadium (IV) in rat model of non-insulin-dependent-diabetes. *Journal of Experimental Biology*. 2001; 39 (9): 864-70
- © Shafrir E., Spielman S., Nachliel I., Khamaisi M., Bar-On H., Ziv E. Treatment af diabetes with vanadium salts: general overview and amelioraton of nutritionally induced diabetes in the Psammomys obesus gerbil. *Diabetes/Metabolism Research Reviews*. 2001; 17 (1): 55-66.
- © Sherif DS. Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels. *Reproductive Toxicology*. 1991; 5: 513-515.
- © Srivastava AK. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2000; 206 (1-2): 177-182.

- © Srivastava AK., Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine*. 2005; 22(1): 2-13.
- © Stein JH. 1989. *Medicina Interna*. Tomo 1. 2ª Edición. Salvat Editores. España. 1180 pp.
- © Sun Q., Sekar N., Goldwasser I., Gershonov E., Fridkin M., Shechter Y. Vanadate restores glucose 6-phosphate in diabetic rats: a mechanism to enhance glucose metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2000; 279 (2): E403-410.
- © Thompson KH. Vanadium and diabetes. *Biofactors*. 1999; 10 (1):43-51.
- © Tsalev L, Zaprianov. 1984. Atomic Absorption spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice. *Analytical Aspects and Health Significance* (1). Florida. pp 106-112
- © Tsiani E., Fantus G.I. Vanadium compound. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Transmission Electron Microscopy*. 1997; 8 (2): 51-56
- © Upreti K.R. Membrana- vanadium interaction: A toxicokinetic evaluation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1995.153: 167-171.
- © Wang L., Medan D., Mercer R., Overmiller D., Leonard S., Castranova V., Shi X., Ding M., Huang C., Rojanasakul Y. Vanadium induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice. Role of reactive oxygen species. *Journal of Cellular Physiology*. 2003; 195: 99-107
- © WHO (World Health Organization). *Environmental Health Criteria 81: Vanadium* IPCS, UNEP, ILO, WHO, Suiza, 1988. pp 1-31
- © WHO (World Health Organization). *Environmental Health Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds* IPCS, UNEP, ILO, WHO, Suiza, 2000. 78 pp
- © WHO (World Health Organization). *Environmental Health Criteria 29: Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds* IPCS, UNEP, ILO, WHO, Suiza, 2001. 54 pp
- © www.adi.uam.es/docencia/elementos/spv21.html
- © www.innbiomed.com.mx/socped/spv65n6/español/wsp86-06.html
- © <http://www.lenntech.com/español/formulario-de-consulta.htm>
- © www.mipediatra.com.mx/infantil/contaminación.htm
- © www.sima.com.mx/sima/df/contamin.html
- © www.ile.org.mx/publica/bolmj98/tec2198.htm

- © www.sima.df.gob.mx/simat/pnredma.2htm
- © Yanardag R., Bolkent S., Karabulut-Bulan O., Tunali S., Effects of vanadyl sulfate on kidney in experimental diabetes. *Biological Trace Element Research*. 2003; 95 (1): 73-85
- © Younes M., Strubelt O. Vanadate- induced toxicity towards isolated perfused rat livers: the role of lipid peroxidation. *Toxicology*. 1991; 63: 63-74
- © Zaporowska H., Wasilewski W. Hematological effects of vanadium on living organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1992; 102 (2): 223-231
- © Zaporowska H., Wasilewski W. effects of vanadium on rat erythrocytes in vitro. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 1996; 34 (1): 99-100
- © Zentella M., Saldaña BY. Papel fisiológico de los radicales libres. *Educación Bioquímica México*. 1995; 15(4): 152-161.
- © Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X. Vanadate- induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemisry and Biophysics*. 2001; 392 (2): 311-320
- © Zhong BZ., Gu ZW., Wallace WE., Whong WZ and Ong T. Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research*. 1994; 321: 35-42.
- © Zychlinski L., Byczkowski JZ., Kulkarni AP., Toxic effects of long-term intratracheal administration of vanadium pentoxide in rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1991; 20 (3): 295-8