



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Cambios en la histología de la retina de ratones expuestos a la  
inhalación de pentóxido de vanadio y la participación del estrés  
oxidante.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G Ò**

P R E S E N T A:

**ERICKA MAREL QUEZADA MALDONADO**



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

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.

## **Hoja de datos del Jurado**

### **1. Datos del alumno**

Quezada  
Maldonado  
Ericka Marel  
16 74 44 45  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
307210210

### **2. Datos del tutor**

Doctora  
Teresa Imelda  
Fortoul  
Van der Goes

### **3. Datos del sinodal 1**

Doctora  
Rocío  
Salceda  
Sacanelles

### **4. Datos del sinodal 2**

Doctor  
Mario Agustín  
Altamirano  
Lozano

### **5. Datos del sinodal 3**

Doctora  
Teresa Imelda  
Fortoul  
Van der Goes

### **6. Datos del sinodal 4**

Doctor  
Paul  
Carrillo  
Mora

## **7. Datos del sinodal 5**

Doctora  
Laura  
Colín  
Barenque

## **8. Datos del trabajo escrito**

Cambios en la histología de la retina de ratones expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio y la participación del estrés oxidante.

49 p

2013

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá en primer lugar por traerme al mundo, ser base y pilar de mi vida, por la dedicación y esfuerzo que has puesto día tras día de mi existencia en todos los aspectos para formarme como ser humano, estudiante y ahora profesional, por ser el gran ejemplo a seguir y demostrar que se puede luchar y salir de la adversidad no importando la gravedad de la situación. Gracias por impulsarme a lograr esto tan importante y ayudarme a alcanzar mis sueños. Te amo.

A mi papá por darme la vida y acompañarme en cada momento, por brindarme una educación moral y académica, por apoyarme a lo largo de la carrera y estar al pendiente, por ser un ejemplo y que pesar de los problemas y dificultades nos has sacado adelante. Aunque no sea muy expresiva contigo sabes que te amo

A la UNAM por permitirme formar parte de la Máxima casa de Estudios, y la mejor Universidad de Latinoamérica brindándome todos los conocimientos, cultura y valores necesarios para lograr mi objetivo.

A mi tutora la Dra Fortoul, ya que sin usted no habría sido posible la dirección y realización de ésta tesis, gracias por su apoyo inmenso, su confianza en que lograríamos salir de las dificultades técnicas del principio, por su entusiasmo, dedicación.

A mi hermano, desde tu llegada hace 15 años cambiaste mi vida llenándola de felicidad , gracias por tu amor y muestras de cariño, apoyo y admiración, gracias por cambiar mis días de estrés haciéndolos más llevaderos, siempre estaré para ti en todo los aspectos, te amo.

A Diego por estar presente en mi vida y formar parte de ella, por cada día a tu lado y el apoyo que me has brindado en los momento buenos y malos a lo largo de éstos año y de este camino, por soportar todo mi estrés y en lo personal, gracias por brindarme tu cariño y ánimo, la primera meta cumplida y todas las que se avocinan juntos,te amo.

A mis abuelos por su amor y cuidados desde el principio de mi existencia, gracias por sus consejos, sus porras y por demostrarme lo orgullosos que están de mí, gracias por los valores inculcados y las enseñanzas, los quiero muchísimo.

A mis tíos y primos por formar parte de mi familia, estar pendiente de mí tanto de manera personal como por su interés por mi avance y conclusión de esta meta, por los consejos y su apoyo, los quiero muchísimo.

A mis amigos, desde la primaria hasta los de esta etapa universitaria, cada uno de ustedes representa una parte muy importante, gracias por las pláticas, las risas, los momentos de estudio, los divertidos, de fiesta o de un simple café, gracias por su apoyo y comprensión en cada etapa de mi vida, los quiero mucho.

Al laboratorio, gracias a todos los que me ayudaron en este trabajo, con cada semillita aportada se obtuvo este resultado, gracias por su paciencia, comprensión y ayuda inmensa, Silvana que te puedo decir solo!, las palabras sobran te adoro, gracias por luchar juntas aventurándonos en estos campos desconocidos y sufrir juntas hasta lograrlo, Sofía gracias por todo! Nada hubiera sido igual sin tu ayuda inmensa con las inmunos, tu programa y los análisis estadísticos, así como el apoyo emocional.

A la Doctora Laura, Paty, Adri, a Marce, Vianey, Shere, gracias por sus observaciones, sugerencias, dudas respondidas y conocimientos transmitidos, a Paco y Armando por su apoyo en la toma de fotografías.

A técnicas histológicas, Raquel Alquiricia, Verónica Rodríguez y Ricardo por la paciencia y apoyo en el procesamiento de las muestras.

A mis demás seres queridos, y a todas las personas que creyeron en mí, que me han visto crecer y que se sienten orgullosos por la culminación de esta etapa tan importante en mi vida.

A mis sinodales, Doctora Rocío Salceda Sacanelles, Doctor Mario Altamirano lozano, Doctora Teresa Fortoul, Doctora Laura Colín Barenque y Doctor Paul Carrillo Mora, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis, así como sus comentarios y correcciones con las cuales aportaron las ideas necesarias para un mejor trabajo.

## Resumen

Entendemos como contaminación del aire cualquier alteración de las condiciones atmosféricas dada la presencia de sustancias que se encuentran en concentración suficiente para ocasionar daños y afecciones en seres humanos, animales, y vegetales (Guarneros, 2009). La contaminación, como ya es bien conocido ha ido en aumento en las últimas décadas, sobretodo en zonas urbanas, ocasionada gracias a las diversas actividades antropogénicas, como lo son la quema de combustibles fósiles, el uso indiscriminado de automóviles, las industrias, etc; este problema mundial se ha relacionado de manera importante con daños severos a la salud, alteraciones de diversos órganos y con el aumento de la morbilidad y mortalidad de los habitantes de las ciudades con altos índices de contaminación; dichos efectos pueden variar de persona a persona y conforme a la duración e intensidad de la exposición a los contaminantes.

Aunado a la contaminación podemos encontrar a las partículas suspendidas, que toman gran relevancia ya que mediante éstas se transportan muchos materiales orgánicos e inorgánicos entre los que destacan los metales, como es el caso del vanadio y a través de las cuales estos componentes ingresan al organismo ya sea por vía dérmica, digestiva y de mayor relevancia mediante la vía inhalada.

Los estudios que asocian los efectos de los contaminantes en particular del vanadio con la retina son muy pocos. En el ojo el síntoma principal del efecto de la contaminación es la conjuntivitis o irritación. En este trabajo se observó el efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio en la morfología general de la retina y los efectos sobre los fotorreceptores en particular en los bastones a diferentes tiempos de exposición.

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 de 33 g. se dividieron en grupos de 5 ratones cada uno, incluyendo un grupo control y grupos de inhalación 1 hora dos veces por semana durante 4, 8 y 12 semanas. Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico y se enuclearon ambos ojos, los cuales se procesaron mediante tinción hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica contra rodopsina e inmunohistoquímica contra 4-hidroxiacetilcolina.

Encontramos en la evaluación de la retina mediante HE diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control, observando alteraciones morfológicas en las capas de la retina a partir de la 4ª semana de exposición, siendo los fotorreceptores y las capas nucleares las más afectadas.



En cuanto a la inmunohistoquímica contra rodopsina la presencia del pigmento a las 4, 8 y 12 semanas de exposición es menor comparada con la del control. La inmunohistoquímica con 4-hidroxinonal registró la presencia del marcador a partir de las 4 semanas, así como a las 8 y a las 12, obteniendo una marca más intensa sobre los fotorreceptores y las capas plexiformes, lo cual indica la presencia de estrés oxidante.

Los resultados indican que la inhalación de pentóxido de vanadio produjo alteraciones considerables en la retina lo cual toma gran importancia en nuestra vida actual ya que dicho metal se encuentra presente en el aire que respiramos diariamente e ingresa al organismo a través de las partículas suspendidas a las que se adosa.

**Palabras claves:** Vanadio, Pentóxido de Vanadio ( $V_2O_5$ ), partículas suspendidas (PM), especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica, retina, fotorreceptor, bastón, capa nuclear externa (NE), capa nuclear Interna (NI), rodopsina, 4-hidroxinonal.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Contaminación atmosférica.....	1
Efectos de la contaminación en la salud.....	1
Contaminación por partículas suspendidas.....	2
Los metales como agentes participantes en el daño por partículas.....	3
Radicales libres.....	3
Especies reactivas de oxígeno.....	4
Estrés oxidante.....	4
Peroxidación de lípidos.....	4
El Vanadio como contaminante inhalado.....	5
Usos del Vanadio.....	6
Toxicocinética y toxicodinamia del Vanadio.....	6
Efecto de la contaminación atmosférica en el Sistema Nervioso.....	8
Efectos en el ojo .....	8
El ojo como estructura blanco del Vanadio.....	9
Estructura normal del ojo .....	10
Irrigación.....	10
Estructura de la retina.....	11
Composición de fotorreceptores.....	13
Fototransducción.....	14
Retina y estrés oxidante .....	15
JUSTIFICACIÓN.....	15
HIPÓTESIS.....	15

OBJETIVOS.....	16
MÉTODO.....	16
RESULTADOS.....	19
Tinción HE y capas nucleares.....	19
inmunohistoquímica contra rodopsina.....	22
inmunohistoquímica contra 4-hidroxinonenal.....	25
DISCUSIÓN.....	28
Morfología general.....	28
Fotorreceptores, rodopsina.....	29
Capas nucleares.....	31
Estrés oxidante.....	33
CONCLUSIONES.....	36
Perspectivas .....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

## **Introducción:**

### **Contaminación atmosférica**

El aire que respiramos se encuentra compuesto por un 78% de nitrógeno, 21% oxígeno, 0.093% argón y una porción de vapor de agua; cuando se altera este equilibrio y cambia su composición, se genera la contaminación del mismo, ya sea por fuentes naturales, o antropogénicas (Ferreira, 2010 ecoportal).

Sustancias químicas, microorganismos, radiación de todo tipo, se emiten al ambiente diariamente y la población se vuelve vulnerable antes sus efectos, uno de los mayores problemas es el hecho que las sustancias persistan en el ambiente y con esto se acumulen en los seres vivos siendo aún más tóxicos (Curtis, 2011).

La vida moderna, junto con el desarrollo de la tecnología, ha incrementado la cantidad de partículas y gases liberados en la atmósfera como consecuencia de actividades en las que ocurre la combustión de diversos compuestos, la actividad industrial, el humo del cigarro, los aerosoles, etc. (Mussali, Fortoul, 2008). Una fuente importante de contaminantes hacia la atmosfera se ha asociado al incremento en el uso de vehículos con motores de combustión interna (Bourcier, 2003), los cuales queman gran cantidad de combustibles fósiles (Hales, 2007). Esta combustión, de acuerdo con las condiciones en que se lleva a cabo, libera partículas a la atmósfera (González, 2010).

En las ciudades se exceden los lineamientos de la calidad del aire recomendados internacionalmente a pesar de las restricciones cada vez más fuertes impuestas por organizaciones internacionales y gobiernos nacionales (Guarneros, 2009). En particular en la ciudad de México en diciembre de 1994, se establecieron las normas oficiales mexicanas para la evaluación de la calidad del aire respecto al ozono, dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre, monóxido de carbono, plomo y partículas suspendidas (NOM-024-SSA1-1993), instaurando los niveles máximos permisibles de concentración de estos contaminantes para garantizar la protección de la salud.

### **Efectos de la contaminación en la salud**

Numerosos estudios epidemiológicos asocian los altos niveles de contaminación ambiental, con el incremento de ciertas enfermedades, tales como el asma, bronquitis, alteraciones cardiovasculares, cefalea, entre otras (Bourcier, 2003). Por lo mismo se ha convertido en un importante problema de salud pública, responsable de la muerte de millones de personas en todo el mundo, sobre todo al exponerse por tiempos prolongados a la contaminación, este problema se incrementa cuando el contaminante es lo que se conoce como partículas finas (Hales, 2007).

Gran cantidad de estudios, indican que los efectos de la contaminación no solamente pueden observarse en el sistema respiratorio ya que otro tipo de afecciones se han detectado en la sangre y se asocia con alteraciones en la coagulación, episodios de trombosis, así como alteraciones cardiovasculares; de igual forma se han registrado alteraciones importantes en el sistema nervioso, como desordenes del sueño, pérdida de memoria, fatiga, temblor en las manos, visión borrosa, cefalea y migraña (Fortoul, 2009).

### **Contaminación por partículas suspendidas**

Las partículas suspendidas que se encuentran en el aire, consisten de un núcleo de carbón más una mezcla heterogénea de compuestos tanto sólidos como líquidos. Estas partículas varían en tamaño y composición química dentro de los cuales se pueden incluir metales de transición, compuestos aromáticos policíclicos, hidrocarburos, iones, gases reactivos y material biológico como endotoxinas y polen (Fortoul, 2009) .

Las partículas por su emisión se distinguen en primarias, las cuales son emitidas directamente a la atmósfera y las secundarias derivadas de transformaciones fisicoquímicas de los diversos compuestos (Fortoul, et al. 2011). Estas partículas se clasifican de acuerdo con el tamaño, composición y fuente de la que provienen (Mussali, Fortoul 2008).

Por su tamaño las partículas suspendidas se clasifican en:

- PM 10, diámetro  $\leq 10 \mu\text{m}$  llamadas partículas gruesas, compuestas por óxidos de metales, esporas, partes de plantas, polvo, etc.
- PM 2.5, diámetro  $< 2.2 \mu\text{m}$  llamadas partículas finas, compuestas por sulfatos, nitratos y/o amonio, están asociadas al incremento y causas específicas de mortalidad y morbilidad por enfermedades respiratorias y cardiovasculares.
- PM con diámetro  $-0.1 - 1.0 \mu\text{m}$  son conocidas como partículas ultrafinas e incluyen compuestos orgánicos, metales, amonio, etc.

El tamaño de las partículas, determina la porción del tracto respiratorio en el que pueden depositarse (Fortoul, 2009), las partículas finas y ultrafinas pueden penetrar hasta lo más profundo del tejido pulmonar y con esto llegar al torrente sanguíneo.

Existen varios mecanismos mediante los cuales las partículas ejercen su efecto tóxico, de manera que se ha relacionado con la producción de citocinas inflamatorias y la producción de estrés oxidante, mecanismo de daño común a varios contaminantes , entre los que destacan los metales de transición como es el caso del vanadio (Fortoul, 2009, Mussali, Fortoul 2008).

Los óxidos de vanadio presentes en las partículas de menos de  $10 \mu\text{m}$  de diámetro, por ejemplo en cenizas y polvos, producto de la quema de combustibles

fósiles (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006) se han asociado con alteraciones en la salud.

### **Los metales como agentes participantes en el daño por partículas**

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, muchos son micronutrientes y constituyentes esenciales en los sistemas biológicos, sin embargo en concentraciones altas algunos tienen propiedades tóxicas, genotóxicas y carcinógenas (Rodríguez Mercado, Altamirano-Lozano, 2006).

La asociación de los metales de transición solubles como hierro, cobre, cromo y vanadio a las PM es la manera por la que éstos ingresan a los diversos organismos y ocasionan en su mayoría estrés oxidante, fenómeno que puede ocurrir de dos maneras, debido a la generación directa de especies reactivas de oxígeno en la superficie de las partículas (Mussali, Fortoul 2008), o incrementar los radicales hidroxilo (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano. 2006) mediante reacciones de tipo Fenton; de otra forma pueden actuar mediante la activación de células inflamatorias capaces de generar especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (Mussali, Fortoul 2008).

En la reacción de Fenton se genera el radical superóxido o los radicales hidroxilo a través de los metales de transición, asociado a mitocondria y peroxisomas, .La NADPH oxidasa, cataliza la transferencia de un electrón desde NADPH hacia el oxígeno con la formación del radical superóxido que se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo (el cual es capaz de atacar a la mayoría de los componentes celulares) (Fortoul, 2009, Fortoul,2007)

Peróxido de hidrógeno + Hierro → Radical hidroxilo



### **Radicales libres**

Un radical libre (RL) se define como un átomo o grupo de átomos que son muy reactivos al presentar un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad (Mayor,2010), por lo que tienden a tomar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar la estabilidad electroquímica; ya que esto ocurrió la molécula estable que lo cede se convierte a su vez en un radical libre al quedar con un electrón desapareado, de manera tal que se da paso a una reacción en cadena (Avello,2006)

El problema de este tipo de moléculas es que reaccionan de manera rápida y continua con todo lo que se encuentre a su alrededor lo que resulta en un gran daño en las moléculas y membranas celulares. Para contrarrestar el efecto de los radicales libres, el organismo produce enzimas tales como las catalasas y dismutasas que se encargan de neutralizar su efecto, sin desestabilizarse (Avello,2006)

## **Especies Reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas se forman como producto del metabolismo de los radicales libres, por lo tanto son moléculas oxidantes con alta capacidad de causar daño en otras células (Dorado, 2003), como principales efectos generan radicales hidroxilo y producción de estrés oxidante (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006). Las especies reactivas se dividen en Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), Especies reactivas de Nitrógeno (RNS) y Especies Reactivas de Hierro (RIS) y son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente a Radicales Libres (Dorado, 2003).

Aunque en todos los procesos metabólicos inherentes al organismo, se producen pequeñas cantidades de radicales libres, tal como en el retículo endoplásmico, microsomas y peroxisomas, la fuente endógena principal de ROS es el sistema mitocondrial de transporte de electrones, ya que se generan como producto del metabolismo energético oxidante (Dorado, 2003)

El problema para la salud, se presenta cuando el organismo se ve expuesto a una gran cantidad de radicales libres y por tiempo prolongado, como es en el caso de los contaminantes atmosféricos (Avello, 2006). El oxígeno es un elemento imprescindible para la vida, pero es la fuente principal de radicales libres, que si no se neutralizan de forma adecuada pueden tener efectos deletéreos sobre la función celular.

## **Estrés oxidante**

Se presenta estrés oxidante cuando existe un desequilibrio bioquímico debido a la exposición excesiva y prolongada a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida que se ven sobrepasada por las fuerzas oxidantes, ya que existe un aumento en la cantidad de ROS o RL, con lo cual se altera el equilibrio y función celular y se induce daño a los lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, etc, contribuye al desarrollo de enfermedades de tipo degenerativas y al envejecimiento. Los antioxidantes son moléculas que en concentraciones normales posee afinidad para interactuar con los RL o ROS y neutralizar la reacción (Mayor, 2010).

La alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, pueden tener distintos grados de magnitud, cuando se da un estrés oxidante leve las defensas antioxidantes son suficientes para restablecer el balance; pero cuando se trata de estrés oxidante grave se generan alteraciones de suma importancia en el metabolismo celular, como rompimiento de las cadenas de DNA, aumento en la concentración de calcio intracelular, descompartimentalización de iones de  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  catalíticos, daños a los transportadores membranales de iones, cambios en las proteínas funcionales, enzimas y transportadores (Soledad, 2007) y peroxidación de lípidos (Soledad, 2007, Mayor, 2010).

### **-Peroxidación de lípidos**

Las ROS atacan con facilidad a los ácidos grasos poliinsaturados, este tipo de daño es conocido como peroxidación lipídica y trae como consecuencia la

afección de los lípidos constituyentes de las membranas biológicas, que a su vez modifican las propiedades tales como la fluidez, permeabilidad iónica y el potencial de membrana, lo que ocasiona la pérdida de la integridad de la célula. Los peróxidos lipídicos y/o los derivados carbonílicos citotóxicos pueden ocasionar la inactivación de enzimas, o bloquear la síntesis de proteínas (Soledad,2007).

El 4-hidroxinonenal surge como producto final de la peroxidación lipídica, el cual puede ocasionar alteraciones en las proteínas cuando interacciona con la lisina, cisteína e histidina (Soledad,2007); Es un  $\alpha,\beta$ -aldehído altamente reactivo que puede causar muerte neuronal, por medio de la alteración de ATPasas, relacionadas con transferencia iónica y la homeostasis del calcio (Christen,2000). Para determinar el grado de oxidación del tejido se puede utilizar como biomarcador y así cuantificar el contenido de este producto (Soledad,2007).

El tipo de daño que ocasionan en general las ROS, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dura la exposición al estrés y de elementos como la edad, el estado nutricional, factores genéticos del individuo ; Un estado de estrés oxidante implica daños tóxicos en las células, que puede producir disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis, este tipo de daño es común en las enfermedades neurodegenerativas y aún no está claro si contribuyen iniciando el proceso o es una consecuencia del mismo (Dorado,2003).

### **El vanadio como contaminante inhalado.**

El vanadio es uno de los metales que en los últimos años ha incrementado formando parte de la contaminación del aire (Cano, 2009) y que ingresa al organismo por medio de la inhalación de las partículas suspendidas a las que se adosa.

Existe como metal de transición en diferentes estados de oxidación que van del -1 al +5 y generalmente pasa de un estado a otro por medio de la transferencia de un electrón en procesos redox, siendo un metal que participa en los procesos biológicos en forma de anión o catión (Rodríguez Mercado y Altamirano Lozano 2006).

El vanadio forma una amplia variedad de compuestos inorgánicos tales como vanadil sulfato, metavanadato, ortovanadato y pentóxido de vanadio, que pueden generar ROS, como resultado de la reacción de Fenton o por su unión con el oxígeno atmosférico (Korbecki,2012).

Los compuestos de vanadio, son genotóxicos y pueden generar la oxidación de las bases pirimídicas del ADN, lo que resulta en daño al material genético y el posible desarrollo de tumores. Otro mecanismo de los compuestos de vanadio en células tumorales es la apertura de la permeabilidad de los poros de transición en la mitocondria, como resultado la liberación del citocromo c y la inducción de apoptosis (Korbecki,2012)



Las consecuencias tóxicas de este metal en los organismos vivos, se presentan debido a su continua emisión hacia la atmósfera, lo que eleva sus concentraciones en el aire y por lo tanto su acumulación en los organismos (Korbecki,2012). La entrada de vanadio al organismo puede ocurrir de diversas maneras, la absorción por la piel es mínima, la ingerida y la inhalada son las más importantes (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano. 2006

### **-Usos del vanadio**

Se utiliza en la industria metalúrgica, aleaciones de alta resistencia, en la formación de amalgamas, preparación de vidrio, pinturas, colorantes, fungicidas, insecticidas, fertilizantes, así como en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. También se utiliza en la estructura de piezas para aviones y en tecnología espacial (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006).

Su liberación a la atmósfera es causada principalmente por la actividad humana, ya que en la naturaleza no se encuentra en forma pura dado que reacciona con otros elementos. Se genera en la industria, combustión de petróleo, carbón, aceites de pescado, emisiones volcánicas, incendios forestales, y otros procesos biogénicos (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano. 2006). La contaminación por este metal también se genera en cuerpos de agua como ríos, mares o lagos (Korbecki, 2012).

El pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) es un compuesto de color amarillo-rojizo, disponible en grandes cantidades en forma de complejos metálicos en todos los petróleos crudos y materiales de origen fósil; siendo de suma importancia destacar que los petróleos de América contienen mayor concentración de este compuesto y entre ellos destacan el de México y el de Venezuela (Fortoul, et al. 2011).

Como particularidad el pentóxido de vanadio se registra como uno de los principales elementos en la contaminación del aire, genera ROS que causan daño al DNA, modifica la apoptosis y posiblemente causa cáncer (Korbecki,2012).

### **-Toxicocinética y Toxicodinamia del Vanadio**

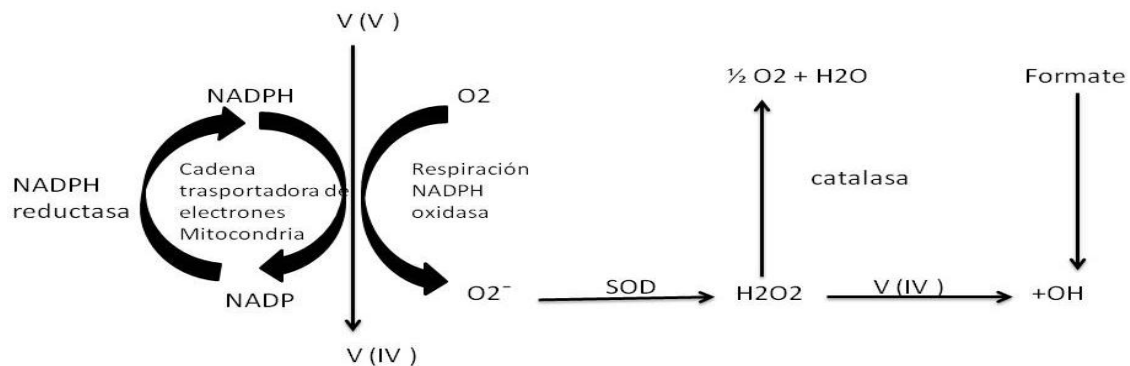
Los órganos que acumulan vanadio, posterior a su ingreso en el organismo principalmente son: hígado, riñón, hueso, bazo, en menor cantidad en pulmones y testículos, así como el corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso; por otro lado se conoce por su alta afinidad por el DNA, como se observa en la figura 1 (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006).

Después de entrar al sistema circulatorio del organismo mediante la vía inhalada o gastrointestinal y absorberse en el sistema, puede encontrarse en estados de oxidación III, IV y V; el  $V^V$  es reducido a  $V^{IV}$  por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico o catecolaminas, sustancias reductoras del plasma.

El vanadio es transportado por la albúmina y la transferrina; el  $V^V$  entra a la célula mediante mecanismos de transporte aniónico por los canales de fosfato principalmente (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006).

Los compuestos de vanadio V (vanadato) son transportados en el citoplasma y reducidos al estado de oxidación IV (vanadil) y finalmente depositados en el ambiente ácido de las vacuolas, como compuestos III. En el cuerpo humano, el vanadio se encuentra como +4 ó +5; los compuestos en estado +5 entran a las células por vía canales aniónicos, cuando se encuentran como compuestos +4, se hacen permeables a la membrana celular e ingresan por medio de difusión (Korbecki,2012).

Las ROS generadas mediante la reacción de Fenton y/o durante la reducción intracelular de  $V^V$  a  $V^{IV}$  por medio de la NADPH, participan en la mayoría de los eventos intracelulares inducidos por el vanadio (Fortoul,2007); la reacción procede con la generación de peróxido de hidrógeno o de un radical hidroxilo, (Korbecki,2012).



Los efectos del vanadio dependen de varios factores, entre ellos el tipo de célula en el que actúa, el tipo de compuesto del que se trate, la dosis, el tiempo de exposición y la vía (Korbecki,2012).

En un estudio realizado por Fortoul et al, 2002 se detectó en tejido pulmonar de autopsias practicadas a residentes de la Ciudad de México comparados con los de otros Estados de la república que vivieron en la década de los 90, que la cantidad de vanadio aumentó en el pulmón, en tanto las concentraciones halladas no correlacionaron con el género, edad, hábito tabáquico, ocupación o la causa de muerte (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano. 2006, Fortoul et al., 2011).

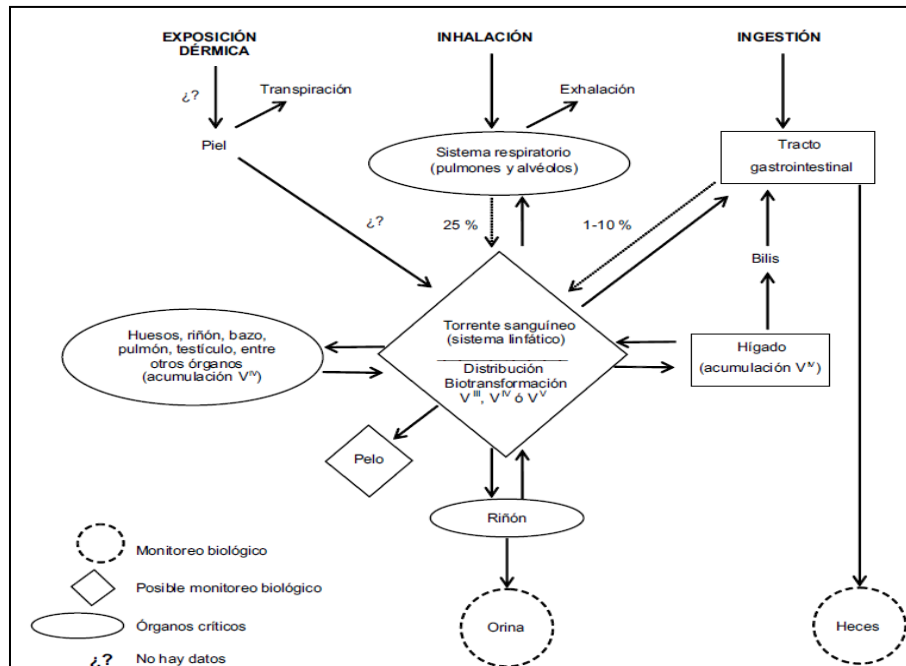


Figura 1. Vías de exposición, toxicocinética y toxicodinamia, tomado de Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006.

## Efecto de la contaminación atmosférica en el Sistema nervioso.

Se cuenta con información sobre el efecto que el vanadio produce en el tejido nervioso: en un modelo de administración intraperitoneal de metavanadato de sodio a ratas, se encontró que la administración del compuesto por 5 días consecutivos altera el metabolismo de los lípidos y la concentración de proteínas, junto con la generación de lipoperoxidación en el hipocampo y cerebelo, se registro que atraviesa la barrera hemato-encefálica e induce alteraciones en los neurotransmisores (Sasi,1994). En el modelo de inhalación de pentóxido de vanadio, se encontraron alteraciones en el bulbo olfatorio incluyendo la reducción del número de espinas dendríticas, muerte celular por apoptosis y necrosis, deterioro de la memoria espacial conforme el tiempo de exposición (Ávila-Acosta, 2007, Colín Barenque et al., 2003, 2004).

## Efectos en el ojo

La información con la que contamos sobre este tema se ha enfocado prioritariamente a síntomas por exposición a gases irritantes que se encuentran en la atmósfera y que son altamente oxidantes, en las que la exposición a óxido de nitrógeno, dióxido de nitrógeno, ozono, dióxido sulfúrico, y partículas suspendidas gruesas, se asocia con la presencia de conjuntivitis y problemas de la superficie ocular (Bourcier, 2003).

Los síntomas más frecuentemente reportados en el ojo son ardor, pesadez del párpado, prurito, sensación de cuerpo extraño dentro del ojo, fotofobia, conjuntivitis, reducción de la visión y cambios en el pH del lagrimal (acidificación) (Bourcier,2003).

Dado que la conjuntiva (mucosa ocular) es la más expuesta al ambiente externo y con esto a los altos niveles de contaminación, se han reportando anomalías y cambios clínicos, siendo indicadores del daño potencial en el ojo y representantes como biomarcador ante los efectos adversos en la salud, inducidos por la contaminación ambiental; de cualquier manera el tipo de daño encontrado es proporcional al grado de exposición (Novaes, 2007).

En el caso particular de la conjuntiva, se ha visto hiperplasia en las células caliciformes, posterior a la exposición crónica ante contaminantes atmosféricos, ya que éstas responden ante la irritación o inflamación crónica que correlaciona con el NO<sub>2</sub>, contaminantes primarios como metales pesados, PM10, CO y SO<sub>2</sub> (Novaes, 2007).

Estudios recientes sugieren que los estilos de vida y los factores asociados a la contaminación, afectan la morfología de la vasculatura de la retina y por lo tanto pueden presentarse problemas en la microcirculación de ésta, lo que se ve reflejado en patologías que afectan al sistema en general (Serre, 2012).

### **El ojo como estructura blanco del vanadio**

- El estrés oxidante se ha relacionado con la degeneración de células de la retina, en especial los fotorreceptores (Roger,2012).
- La exposición aguda a polvos de vanadio, induce alteraciones como la conjuntivitis (Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano, 2006).
- Se ha visto que el vanadato en bajas concentraciones, activa a la fosfodiesterasa del segmento externo de los bastones aun en ausencia de luz, casi de la misma manera en que se activa la enzima en presencia de luz (Del Priore, 1985).
- El vanadato aplicado tópicamente, puede ocasionar inhibición o activación del transporte de Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> en la córnea de conejo, e influye modificando la presión intraocular, haciéndola más baja y con esto reduciendo la secreción del humor acuoso (Mittag, 1984).

## **Estructura normal del ojo**

El ojo es un órgano sensorial complejo receptor del aparato de la visión, se encuentra en órganos pares que envían al cerebro dos imágenes algo diferentes y superpuestas (campos visuales), tratándose de una visión binocular nos permite percibir la profundidad y distancia y lograr una imagen tridimensional (Ross, 2012)

El globo ocular se compone de tres capas:

- La túnica fibrosa, capa más externa que comprende a la esclerótica y a la córnea
- La túnica vascular, capa media comprende la coroides y la estroma del cuerpo ciliar y del iris
- La túnica nerviosa (retina) es la más interna, se encuentra en continuidad con el sistema nervioso central a través del nervio óptico.

La coroides es un tejido que cuenta con gran vasculatura y pigmentos, comprende desde la ora serrata en dirección anterior hasta el nervio óptico en dirección posterior, se une a la esclera por medio de filamentos de tejido conjuntivo, lo cual ocasiona que dichas capas se separen fácilmente en la parte anterior, por otra parte se encuentra fuertemente unido al nervio óptico y al epitelio pigmentario de la retina. La circulación de la coroides también nutre al epitelio pigmentario y a la retina hasta la cara externa de la capa nuclear interna (Ryan, 2009).

La arteria oftálmica, es la primera rama de la arteria carótida interna, se divide en una arteria ciliar posterior lateral y una medial antes de perforar la esclera; cada uno de estos vasos se divide en una arteria ciliar posterior larga y un número variable de arterias ciliares posteriores cortas, la entrada por la esclera transcurre en dirección anterior a través del espacio supracoroideo, hacia los puntos de ramificación cercanos a la ora serrata (Ryan, 2009).

El cristalino es bicóncavo y transparente, se mantiene a través del ligamento o zónula ciliar, el cual se inserta sobre el cuerpo ciliar, de frente se encuentra el iris. El ojo posee tres compartimientos, cámara anterior, cámara posterior entre las cuales se encuentra el humor acuoso, seguido por el espacio vítreo repleto del cuerpo vítreo (Junqueira, 2005).

### **-Irrigación**

El ojo se encuentra irrigado mediante la arteria oftálmica, la primera rama de la carótida interna; entra directamente a la órbita a través del canal óptico y recorre inferolateralmente al nervio óptico, cuando se divide de manera superior al nervio óptico, se fragmenta en pequeñas ramas. La vasculatura se divide en dos sistemas, el retinal que provee de sangre a los dos tercios internos de la retina y el sistema uveal que irriga a la coroides, cuerpo ciliar y capas externas de la retina. El epitelio pigmentario provee de nutrientes a los fotorreceptores e intercambia sustancias con la coroides (Beshare, et al. 2011).

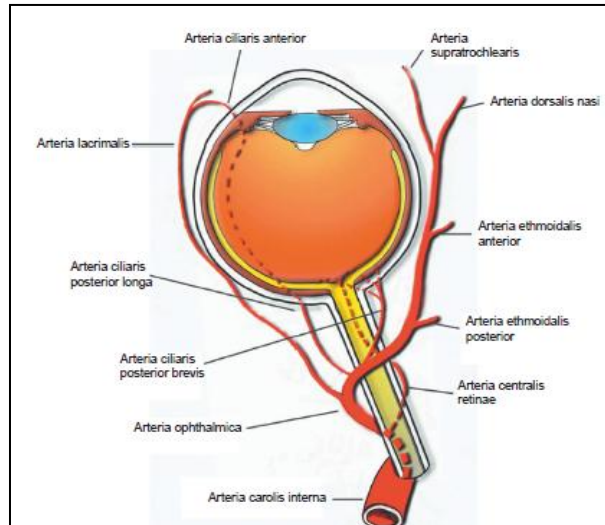


Figura 2 . Irrigación del ojo.  
Imagen tomada de Beshare, et al. 2011.

### **-Estructura de la Retina**

La retina se encarga de procesar todas las señales visuales que recibe, es decir es un procesador de información construido sobre un mosaico de conos y bastones que son las células que responden a luz y producen el cambio de señal luminosa a señal eléctrica (Ryan, 2009).

Es parte del sistema nervioso central, parte del encéfalo que consta de los mismos componentes y estructuras especializadas requeridas por los fotorreceptores, siendo el glutamato el principal neurotransmisor excitador, la retina sensorial se ocupa de la fototransducción por medio de los fotorreceptores y la retina neural consiste en neuronas que llevan a cabo los primeros pasos del procesamiento de información visual (Ryan, 2009).

El epitelio pigmentario (cúbico simple) se encarga de la síntesis de melanina y absorbe el exceso de luz que estimula a los fotorreceptores, también lleva a cabo la digestión y fagocitosis de los fragmentos externos de los bastones y re-sintetiza los pigmentos visuales (Junqueira, 2005), lo que mantiene estable a los fotorreceptores.

La capa nerviosa, se encuentra apoyada en la coroides y está estructurada por ocho capas celulares más el epitelio pigmentario, la información visual codificada por dichos fotorreceptores es enviada al cerebro en forma de impulsos transmitidos por el nervio óptico, la cual será integrada y permitirá identificar imágenes. Estas capas se agrupan de diversas formas de acuerdo con la función o la ubicación celular, Figura 3 (Ross, 2012).

1. **Capa de conos y bastones:** son células con dos polos cuya única dendrita es fotosensible, el otro polo establece sinapsis con otras células bipolares (Junqueira,2005), en esta capa se encuentran los segmentos externos e internos de las células fotorreceptoras (Ross, 2012).
2. **Membrana limitante externa:** límite superficial de las células de Müller (Ross,2012).
3. **Capa nuclear externa:** contiene los cuerpos celulares y los núcleos de conos y bastones. (Ryan, 2009).
4. **Capa plexiforme externa:** se sitúa entre la capa nuclear externa y capa nuclear interna, se encuentran las prolongaciones de los conos, bastones y otras prolongaciones de las células y neuronas bipolares y horizontales con las que hacen sinapsis.
5. **Capa nuclear interna:** contiene los cuerpos celulares de las, células bipolares y amacrinas horizontales y también se encuentran los cuerpos de las células de Müller (Ryan, 2009).
6. **Capa plexiforme interna:** entre la capa nuclear interna y la capa celular ganglionar, se dan las conexiones de células bipolar con células amacrinas y células ganglionares (Ryan, 2009).
7. **Capa ganglionar** contiene células amacrinas desplazadas y principalmente células ganglionares que forman las señales salientes de la retina hasta el encéfalo a través del nervio óptico (Ryan, 2009).
8. **Capa limitante interna** es la lámina basal de las células de Müller, que separan la retina del cuerpo vítreo (Ross, 2012).

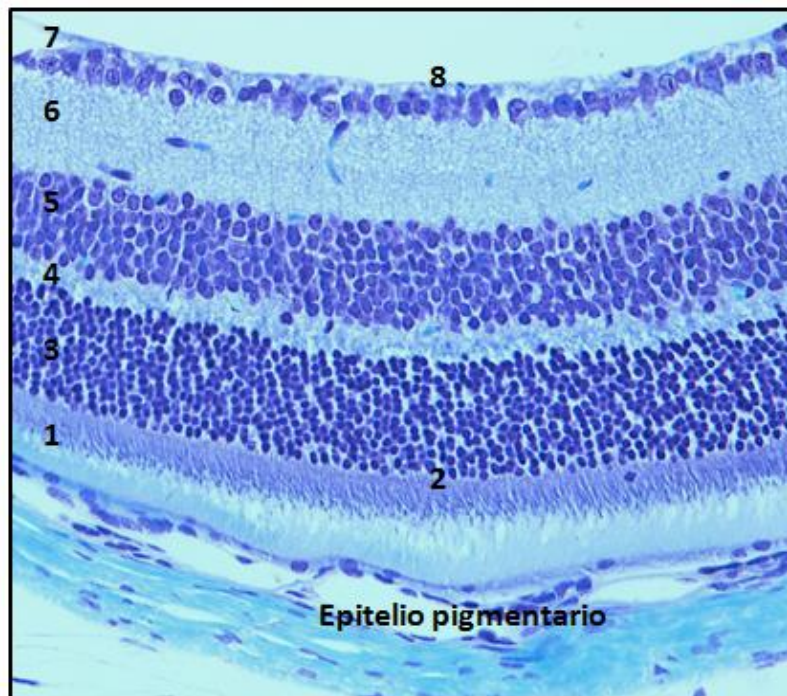


Figura 3 .Imagen histológica de las capas de la retina

La retina contiene dos tipos de fotorreceptores, siendo los bastones los de mayor abundancia, especializados para tener una alta sensibilidad en condiciones de oscuridad o poca luz, los conos son de mayor tamaño y proporcionan mayor agudeza visual con la luz del día al ser abundantes los fotones, en los humanos existe una zona con un valor máximo de células, conocido como fovea, lo cual lo hace la región con mayor agudeza visual, por otro lado en la zona donde se juntan los axones de las células ganglionares para formar en nervio óptico no hay fotorreceptores y se conoce como punto ciego (Ryan, 2009).

Los fotorreceptores se extienden de la capa externa de la retina nerviosa al epitelio pigmentario. La luz que llega a los fotorreceptores debe atravesar primero todas las capas internas de la retina nerviosa. Los conos y bastones están organizados en forma de empalizada, que se observan en el microscopio óptico como estriaciones verticales. La retina contiene aproximadamente 120 millones de bastones y 7 millones de conos para humanos (Ross,2012).

Los bastones miden unos 2  $\mu\text{m}$  de espesor y 50 $\mu\text{m}$  de largo, los conos van de 85 $\mu\text{m}$  en la fovea central y 25 $\mu\text{m}$  en la región periférica de la retina en humanos (Ross,2012). Este tipo de células son finas, alargadas y formadas por dos porciones distintas, su segmento externo se encuentra constituido por microvesículas aplanadas las cuales forman discos apilados en forma de moneda, este segmento está separado del segmento interno por una constricción (Junqueira,2005).

#### **-Composición de fotorreceptores:**

-Segmento externo: cilíndrico o cónico, esta porción del fotorreceptor está en relación íntima con las microvellosidades de las células del epitelio pigmentario contiguo (Ross,2012) contiene el fotopigmento lo que hace esta región fotosensible mediante la rodopsina en bastones y la conopsina en conos (Solari, 2007).

-Pedículo de conexión: contiene un cilio compuesto de nueve dobletes periféricos de microtúbulos que parten de un cuerpo basal, siendo la porción estrecha de la célula que une el segmento externo con el segmento interno (Ross,2012). Incluye una prolongación calicial que surge desde el extremo distal del segmento interno para rodear la porción proximal del segmento externo.

-Segmento interno: dividido en una porción elipsoide externa y una mioide interna. Contiene orgánulos típicos de células activas en la síntesis de proteínas. Alberga la maquinaria metabólica, por lo que se sintetizan las proteínas y pigmentos necesarios para la visión (Ross,2012) .

Los pigmentos visuales están formados por una parte proteínica (apoproteína), las opsinas y un cromóforo derivado de la vitamina A, un aldehído (11-cis-retinal en rodopsina) que resulta indispensable para la fotosensibilidad (Solari, 2007).



## Fototransducción

Cuando la luz incide sobre los sacos de los segmentos externos, el 11-cis-retinal recibe un fotón y se isomeriza instantáneamente a la forma trans-retinal, este cambio se transmite a la opsina, entonces se produce la cascada de fototransducción, conocida como la conversión de la señal lumínica en impulso nervioso (Solari, 2007). Todos los fotorreceptores responden a la luz mediante una hiperpolarización que depende de la intensidad del estímulo luminoso (Ryan, 2009).

En la obscuridad los bastones y conos son despolarizados por una corriente de entrada positiva a lo largo del segmento externo, transmitida por el sodio y calcio, estos canales de cationes regulados por el GMPc se abren por la interacción directa entre una región del receptor del canal del ión y el GMPc del citosol (Ryan, 2009).

- 1- La luz isomeriza al retinal y la rodopsina sufre un cambio conformacional.
- 2- Se une la opsina con la proteína G “transducina” que se encuentra en los discos de los bastones.
- 3- Se da la disociación de la subunidad  $\alpha$  de la transducina.
- 4- La subunidad  $\alpha$  de la transducina activa a su vez la fosfodiesterasa que hidroliza la guanosina 3,5-fosfato cíclico o GMPc.
- 5- La reducción en los niveles del GMP cierra los canales de sodio regulados por GMPc en el segmento externo.
- 6- Se da la hiperpolarización de la membrana del receptor.
- 7- Se presenta la disminución en la liberación del neurotransmisor en la sinapsis del fotorreceptor con la célula bipolar.

En su estado abierto los canales permiten que entre el calcio en la célula, lo cual tiene un efecto depresor de la enzima guanilato-ciclasa, y permite controlar el la síntesis del GMPc, por lo que al cerrarse disminuyen la entrada de Calcio y se libera a la ciclasa de esta inhibición, aumentando así la producción de GMPc, que tiene un importante efecto en la adaptación a la luz (Ryan, 2009).

En la recuperación del fotorreceptor interviene la enzima guanilato ciclasa y la proteína “recoverina” la cual es afín al calcio (Solari, 2007). La arrestina participa en la fijación de la rodopsina fosforilada lo cual inhibe su capacidad para interactuar con la transducina (Ryan, 2009).

Los fotorreceptores son células que no se dividen en toda la vida adulta a pesar de su metabolismo tan intenso, el cual se pone de manifiesto por la continua separación y reposición de los sacos aplanados que se renuevan por completo en 10 días (Solari, 2007). En los bastones todas las mañanas se produce una eliminación brusca de discos, después de un periodo largo de obscuridad al recibir luz nuevamente (Ross, 2012).

## **-Retina y estrés oxidante.**

La retina es una de los tejidos metabólicamente más activos del organismo, dados los procesos como fototransducción que lleva acabo, además consume grandes cantidades de oxígeno para su correcto funcionamiento, siendo los fotorreceptores las células que consumen niveles mayores, además se encuentra expuesta de manera constante a la estimulación lumínica. Por lo anterior se conoce que la retina es más vulnerable a sufrir los efectos de cambios en los niveles de oxígeno, y alteraciones ocasionadas por ROS y radicales libres. Dentro de la gran variedad de tipos celulares los fotorreceptores son las más susceptibles al daño y a los procesos degenerativos; la pérdida de fotorreceptores, ocasiona cambios metabólicos en toda la retina (Punzo,2012, Hara, 2006).

### **Justificación:**

La contaminación atmosférica ha incrementado durante las últimas décadas de manera importante, por lo que se han visto efectos adversos en el organismo en general; aunado a la contaminación se pueden encontrar partículas suspendidas a las que se adosan una gran cantidad de componentes tóxicos para el organismo y que entran al organismo por inhalación, pasando por todo el tracto respiratorio, hasta llegar a los alveolos, donde ingresan al torrente sanguíneo, lo que les permite llegar a varios órganos y tejidos.

El ojo en general es un órgano sensible que puede verse más afectado ya que la exposición a contaminantes puede ser por medio de la conjuntiva, o al recibir estos contaminantes inhalados por la vía vascular sistémica, además es un órgano que se encuentra en constante exposición a estrés por medio de la luz y su alto consumo de oxígeno. Sin embargo, aunque existe una gran cantidad de estudios sobre contaminación atmosférica y el efecto del vanadio inhalado sobre el sistema nervioso, se tienen pocos reportes acerca del efecto de este elemento en el ojo, en especial en la retina que es también parte del SNC, por lo que es importante realizar estudios para identificar estos cambios, ya que es factible que la visión de la población expuesta, en ciudades con altos niveles de contaminación esté alterada y no estemos considerando la posibilidad de la participación de la contaminación atmosférica, como un factor más en este problemas de salud.

### **Hipótesis:**

La inhalación de vanadio inducirá cambios histológicos en las diferentes capas de la retina, en especial en los bastones, que se manifestará por la disminución en la población de estas células, relacionado con la participación del estrés oxidante, el cual incrementará con el tiempo de exposición.

### **Objetivo general:**

- ⊙ Identificar los cambios histológicos en las capas de la retina secundarios a la inhalación de vanadio y la participación del estrés oxidante en un modelo murino.

### **Objetivos particulares:**

- ⊙ Identificar los cambios histológicos en las capas nucleares de la retina en relación con el tiempo de exposición.
- ⊙ Identificar los cambios histológicos en los bastones de ratones expuestos y compararlos con el control.
- ⊙ Comparar por inmunohistoquímica las diferencias en la densidad celular de los bastones de la retina de ratones expuestos y controles utilizando como marcador a la rodopsina.
- ⊙ Identificar por inmunohistoquímica la participación del estrés oxidante (4-hidroxinonenal) en los cambios observados en la retina de los ratones expuestos.

### **Método:**

#### **-Inhalación del Pentóxido de Vanadio**

Se utilizaron grupos de 5 ratones macho de la cepa CD1 de 35g aproximadamente, con alimentación *ad libitum* y ciclo luz/obscuridad 12:12, para su exposición a inhalación de pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) concentración [0.02M] una hora, dos veces por semana durante cuatro, ocho y doce semanas, se incluyó un grupo de ratones control el cual se sometió a inhalación de solución salina en los mismos tiempos. La exposición se llevó a cabo en una caja de acrílico sellada, conectada a un nebulizador tipo hospitalario. Nebulizador Ultrasonico Yuehua (modelo WH-802)

#### **-Obtención de tejido**

Los ratones expuestos y controles se sacrificaron en las semanas seleccionadas de exposición (4,8,12) por medio de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (Marca Sedalphorte para uso veterinario, dosis 0.2ml), para la fijación de los tejidos, los ratones se perfundieron por vía intracardiaca, realizando primero un lavado con solución salina y en seguida con paraformaldehído al 2% , se disectó la cabeza y se mantuvo en inmersión con paraformaldehído durante 24 horas, después de este tiempo se realizó la enucleación de ambos ojos.

Posteriormente los ojos se procesaron mediante su inclusión en bloques de parafina, se realizaron cortes con el micrótomo con un grosor de 5  $\mu$ m que se colocaron en laminillas, los cortes en blanco se utilizaron para realizar inmunohistoquímica con rodopsina y con 4-hidroxinonenal y para la observación histológica general se realizó la tinción con hematoxilina eosina (HE).

### **-Observación histológica**

Las muestras de ambos grupos, controles y expuestos, teñidos con HE se observaron al microscopio a un aumento de 40x, se utilizó el programa Image Pro V6, donde se fotografiaron a lo largo de la curvatura de la retina, cinco campos de cada uno de los animales al mismo aumento y se midió, en micras, el grosor de las capas nucleares (externa e interna).

### **-Inmunohistoquímica**

Para marcar y observar los cambios en la cantidad de fotorreceptores (bastones) se realizó la inmunohistoquímica para la identificación de la presencia de la rodopsina, por otra parte se utilizó el 4-hidroxinonal como marcador de estrés oxidante asociado a la exposición.

1. Se fundió la parafina de las laminillas que contienen los cortes (de los bloques de parafina) en el horno de secado a una temperatura de 60°C durante 30 minutos.

2. Se desparafinaron los tejidos mediante la deshidratación en el tren de xiloles y alcoholes, se enjuagaron en agua corriente, agua destilada y se transportaron en Kopplins con PBS.

3. Las laminillas se cambiaron a solución Diva Decloaker 20X (Biocare medical) y se colocaron en la olla de presión hasta llegar a 15 psi por 3 minutos, con el fin de desenmascarar proteínas y exponer el epítipo. Se colocaron en hielo para enfriarlas y posteriormente se hizo un lavado de 5 minutos con PBS (pH 7.4) en la cámara húmeda.

4. Para el bloqueo de peroxidasa se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno 3% con acetona, se sumergieron las laminillas durante 40 minutos, en el Kopplin, trascurrido el tiempo se sacaron las laminillas y se realizó un lavado con PBS por 5 minutos.

5. Se realizó el bloqueo de proteínas con PBS-Albumina, mediante una incubación de 5 minutos

6. Se colocaron en la cámara húmeda las laminillas en presencia del anticuerpo anti rodopsina (marca Abcam, dilución 1/500) o anti 4-hidroxinonal (marca Genetex, dilución 1/1000) en la estufa a 37°C, durante 60 minutos, al terminar la incubación se realizó un lavado de 5 minutos con PBS.

7. En la cámara húmeda las laminillas se incubaron con anticuerpo secundario universal (Dako) por 60 minutos en la estufa a 37°C, al terminar se realizó lavado con PBS por 5 minutos.

8. Se incubaron bajo las mismas condiciones las laminillas con HRP-Estreptavidina (Dako) y se realizó el lavado.

9. Las laminillas se revelaron con diaminobenzidina (Invitrogen) a temperatura ambiente, monitoreando la reacción al microscopio al observar la marca, la reacción se detuvo con PBS.

10. Se realizó la contratinción con HE, la deshidratación con alcohol y xilol, se dejaron secar y se montaron en resina sintética y se cubrieron con el cubreobjetos.

#### **-Análisis de inmunohistoquímicas**

En un microscopio Olympus BX51 acoplado a una cámara y computadora mediante el uso del software Image Pro V6, se fotografiaron cinco campos de varias zonas de la retina de cada uno de los animales, tanto de controles como de expuestos, a un aumento de 40X; mediante el programa Densife se midió la densidad de los fotorreceptores mediante la evaluación de los píxeles de color registrados sobre el pigmento (marca de la rodopsina); y con la marca del 4-hidroxinonal, se midió la presencia del marcador de estrés oxidante.

#### **-Análisis Estadístico**

Para cada parámetro evaluado, tanto del grosor de las capas nucleares como para los resultantes de las inmunohistoquímicas, se obtuvieron las medias y las medidas de dispersión de los valores; con el programa Prisma, se aplicó una prueba de ANOVA (con una prueba *post hoc* de Dunnet) con el fin de determinar las diferencias estadísticamente significativas de cada semana de exposición con respecto del control. Se consideró que se registraba una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos cuando  $p < 0.05$ .

## Resultados:

### Tinción HE y capas nucleares

Los cortes teñidos con HE permitieron analizar la morfología completa de la retina de los ratones, observamos en los controles un arreglo continuo de todas las capas (Figura 4 A,C,E), por el contrario en los grupos de animales expuestos por 4, 8 y 12 semanas expuestos a la inhalación de  $V_2O_5$  (Figura 4 B,D,E), de manera general se registran cambios en la integridad de las capas nucleares, ganglionar y de fotorreceptores, es decir se observó un desarreglo de núcleos, y aumento en el grosor de las capas.

Al observar mediante la tinción de HE cambios morfológicos en las capas nucleares de la retina, se realizó la medición del grosor (micras) de dichas capas, con lo que se encontró que la capa nuclear externa (NE) en los controles mide en promedio  $32.62 \pm 1.3 \mu\text{m}$  y existe un aumento estadísticamente significativo a partir de las semanas 4 de inhalación; en la semana 8 no se registra diferencia, aunque a las 12 de nuevo encontramos diferencia con el control, obteniendo un grosor total promedio de  $41.53 \pm 1.9 \mu\text{m}$ . Entre los grupos de semanas de exposición el grupo de 4 semanas resulto tener diferencia significativa contra el grupo de 8 y 12 semanas. Gráfica 1.

Por otro lado la capa nuclear interna (NI) en los controles midió  $27.25 \pm 1.6 \mu\text{m}$  y se encontró que el aumento en el grosor a las 4 semanas es casi imperceptible por lo que no es significativo; por el contrario a partir de las 8 semanas, al igual que a las 12 de inhalación, se registró una diferencia estadísticamente significativa con una grosor promedio de  $37.14 \pm 1.4 \mu\text{m}$ ; No se encontró diferencia al comparar entre grupos expuestos. Gráfica 2.

Las capas nucleares de los ratones control se observaron uniformes, con una densidad homogénea de núcleos y de grosor constante, comparado con los núcleos de estas capas, en los ratones expuestos que se observaron de tamaño más pequeño además de la pérdida de organización y la presencia de espacios entre éstos.

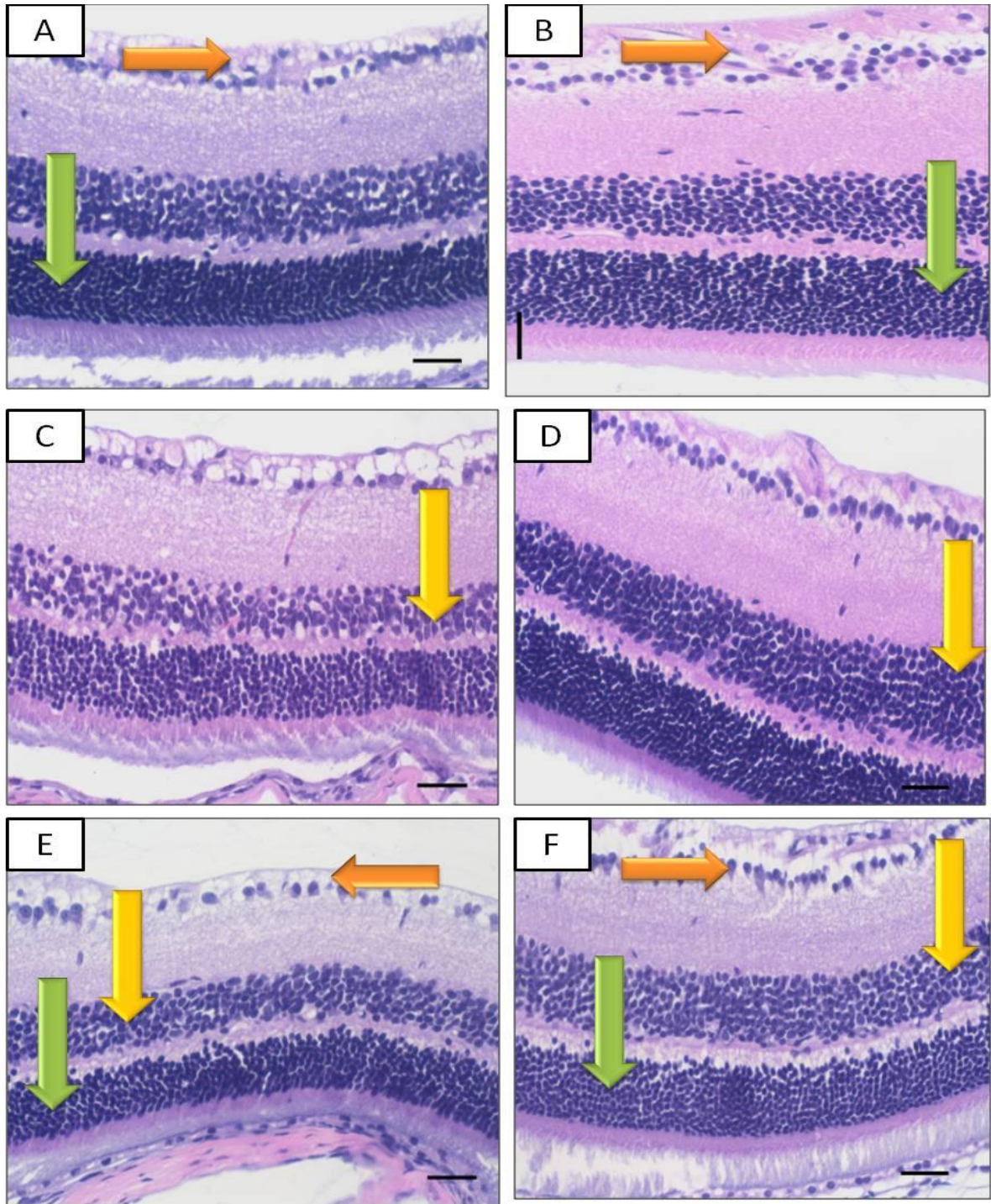
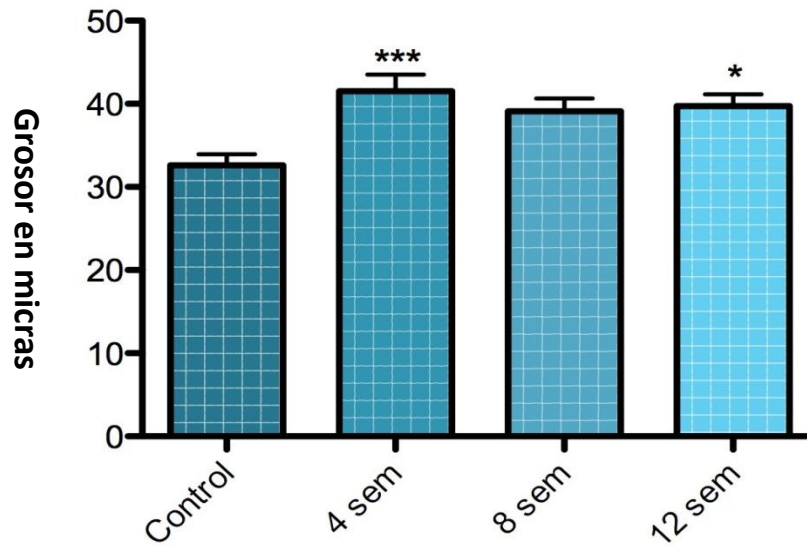


Figura 4. En la imagen A se observa la retina de un ratón control, la flecha verde señala la capa nuclear externa ordenada y de tamaño constante, la flecha naranja indica la capa ganglionar que también se encuentra ordenada y compacta, en la figura B retina expuestas 4 semanas, se señalan las mismas estructuras donde la NE en comparación se observa aumentada y desordenada al igual que la ganglionar donde aparentemente se pierde el orden de los núcleos. La fig. C retina de un ratón control señala con una flecha amarilla la capa nuclear interna con pocos núcleos, por el contrario en la D retina expuesta 8 semanas se nota un aumento de núcleos y separación entre ellos. En la imagen E se señalan las tres capas, (NE verde, NI amarillo y ganglionar naranja ) de la retina del ratón control que al compararlo con el F expuesto 12 semanas observamos aumento en el grosor de dichas capas nucleares, mayor número de núcleos, desorden que también se nota en la capa ganglionar, por otra parte los fotorreceptores de todos los expuestos se observan desorganizados, de menor tamaño y con menor continuidad, siendo el segmento externo el más afectado Barra = 20 $\mu$ . Todas las imágenes fueron tomadas en la región central de la retina cercana al nervio óptico.

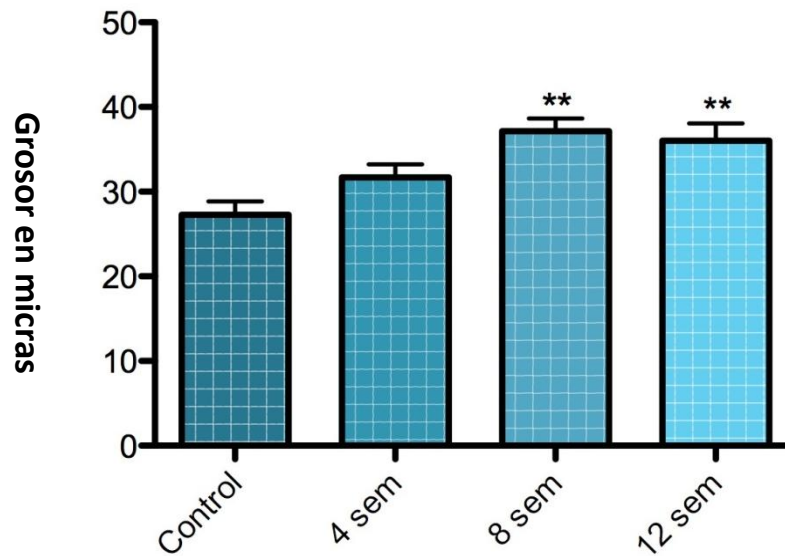




Gráfica 1. Grosor en micras capa nuclear externa, semanas de exposición, tinción HE.

Prueba de ANOVA (*post hoc* de Dunnet) ,  $p < 0.05$ , 5 animales por grupo, 5 campos por animal, barra indica Desviación estándar.

\*Diferencia estadísticamente significativa con el control, \*\*\* Diferencia estadísticamente significativa con el control y entre los grupos expuestos.



Gráfica 2. Grosor en micras capa nuclear interna, semanas de exposición, tinción HE.

Prueba de ANOVA (*post hoc* de Dunnet) ,  $p < 0.05$ , 5 animales por grupo, 5 campos por animal, barra indica Desviación estándar.

\*\*Diferencia estadísticamente significativa contra el control.



## **Inmunohistoquímica contra Rodopsina**

Al analizar la inmunohistoquímica con rodopsina, se observó la marca en la retina de todos los ratones, localizada en el segmento externo de los fotorreceptores como era esperado. Sin embargo se registró una disminución estadísticamente significativa en la densidad de la marca rodopsina respecto al control (Fig.5A,2C,2E) a las 4, 8 y 12 semanas de inhalación (Fig. 5B,2D,2F, respectivamente), al realizar la cuantificación de la densidad medida en pixeles (Fig. 5). La presencia e intensidad del marcador disminuyó a lo largo del tiempo de exposición comparado con el control, entre los grupos expuestos no existió diferencia estadísticamente significativa, como se observa en la gráfica 3.

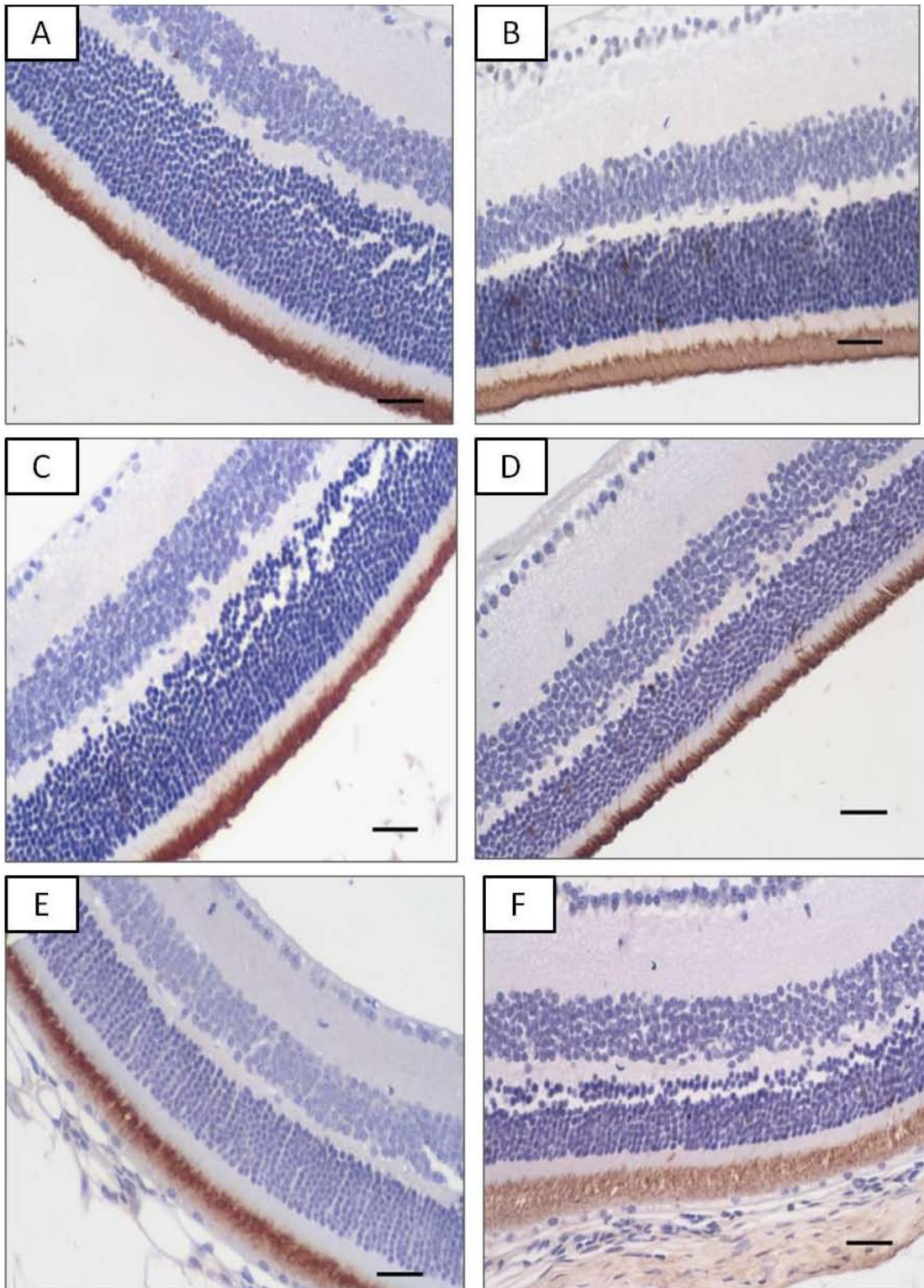
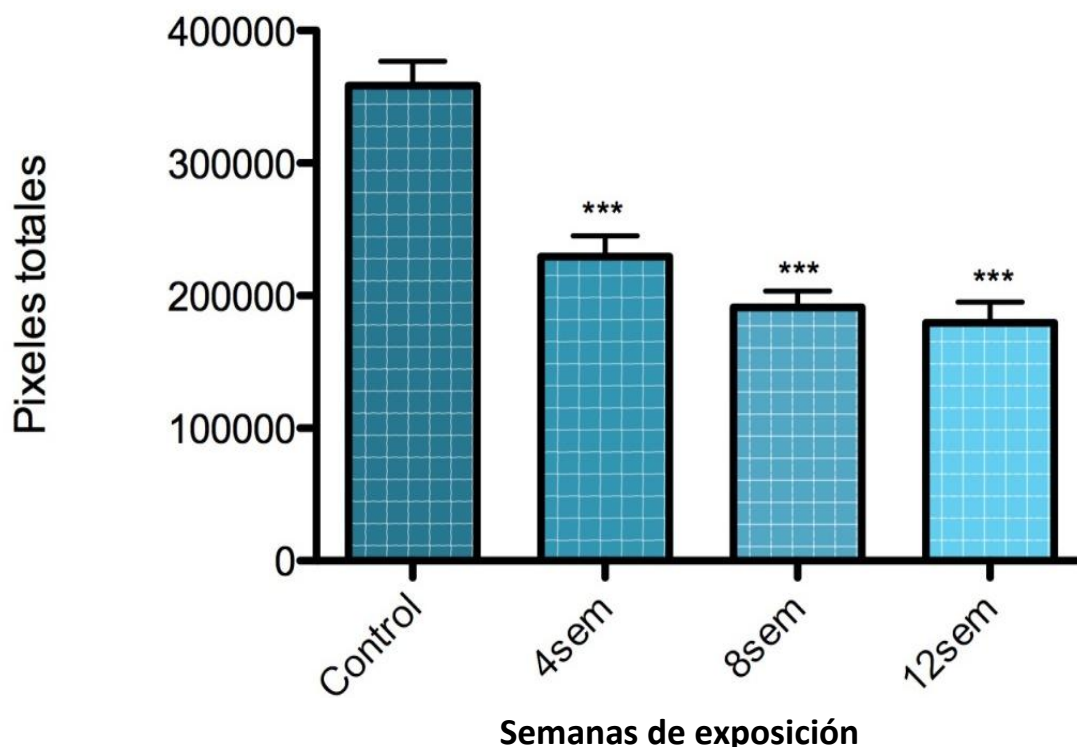


Figura 5. Inmunohistoquímica con rodopsina en retinas de ratones control y expuestos a  $V_2O_5$ . Las imagen A , C y E presenta la marca de la rodopsina en ratones control, ésta se encuentra localizada en el segmento externo de los fotorreceptores, es de color café intenso a lo largo de todo el segmento, contrario a lo que se muestra en las imágenes B ratón expuesto 4 semanas, D, expuesto 8 semanas donde vemos que la intensidad y brillo del pigmento son menores, en la imagen F expuesto 12 semanas podemos notar los espacios en blanco que se encuentran entre los segmentos de los fotorreceptores, además de tener una marca menos intensa comparada con su control E. Barra = 20  $\mu$ .



Gráfica 3. Píxeles totales de la marca rodopsina, de ratones expuestos a  $V_2O_5$ , comparados con el control.

Prueba de ANOVA (*post hoc* de Dunnet) ,  $p < 0.05$ , 5 animales por grupo, 5 campos por animal, barra indica Desviación estándar.

\*\*Diferencia estadísticamente significativa con el control.

## **Inmunohistoquímica contra 4-hidroxinonenal**

Al analizar la inmunohistoquímica, se encontró que la marca de 4-hidroxinonenal se presentó desde las 4 semanas de inhalación (Fig.6B) haciéndose un poco menos intensa a las 8 semanas (Fig.6D) e incrementando de manera importante su presencia a las 12 semanas de inhalación (Fig.6F), marca que no fue encontrada en los ratones control (Fig.6 A, C, E) , haciendo de la diferencia entre éstos estadísticamente significativa, comprobado con la medición de la densidad en pixeles registrados por grupo. La marca se concentra de manera importante en los 3 grupos expuestos en los cuerpos neuronales, tanto de los fotorreceptores como de las neuronas de conexión, pero también se observa entre los núcleos de las neuronas.

El aumento se observó en relación al tiempo de exposición y la diferencia entre grupos solo se registra en 12 semanas contra 4 y 8 semanas tal como se observa en la Gráfica 4 donde se registra una marca muy intensa a ese tiempo de exposición.



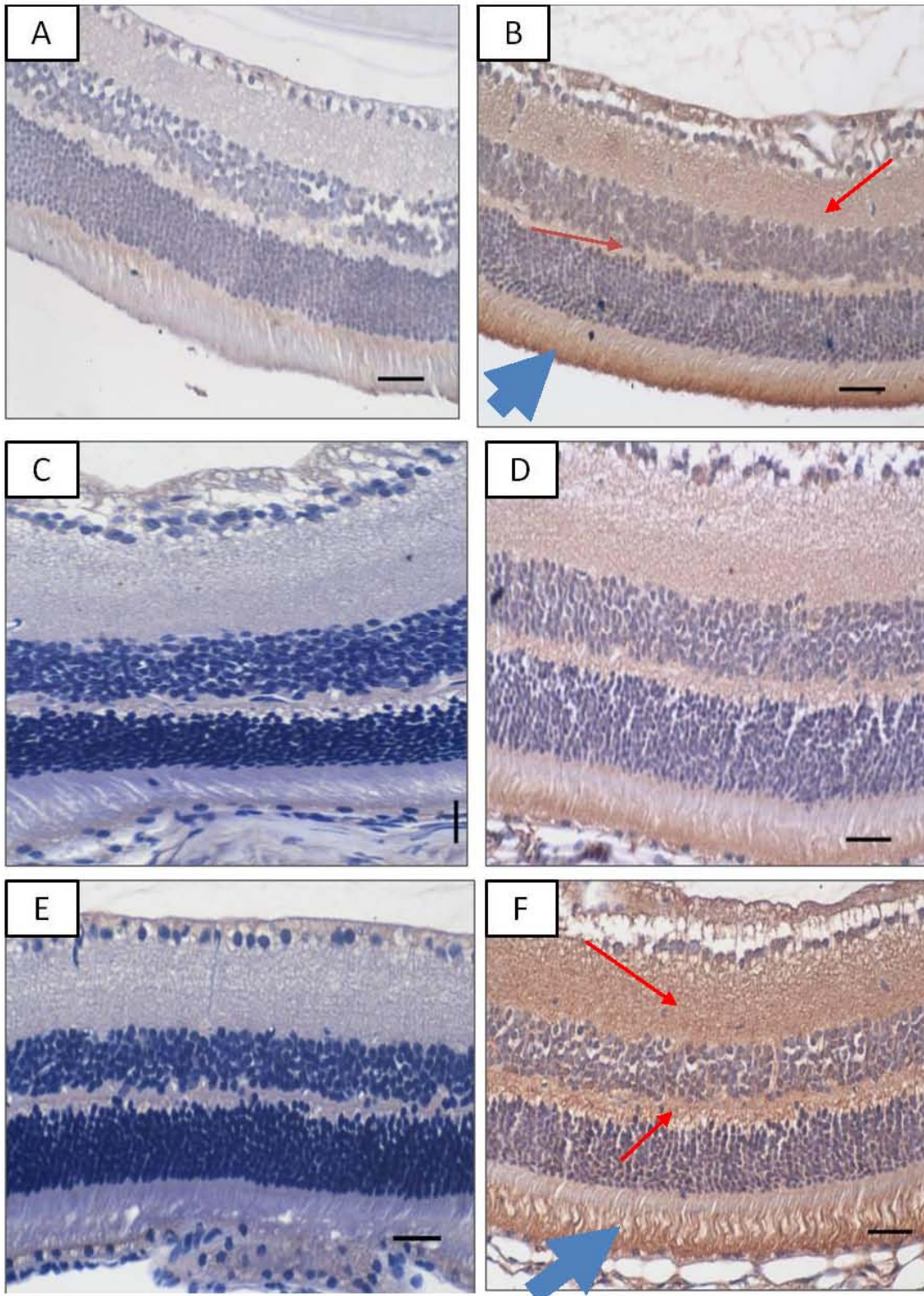
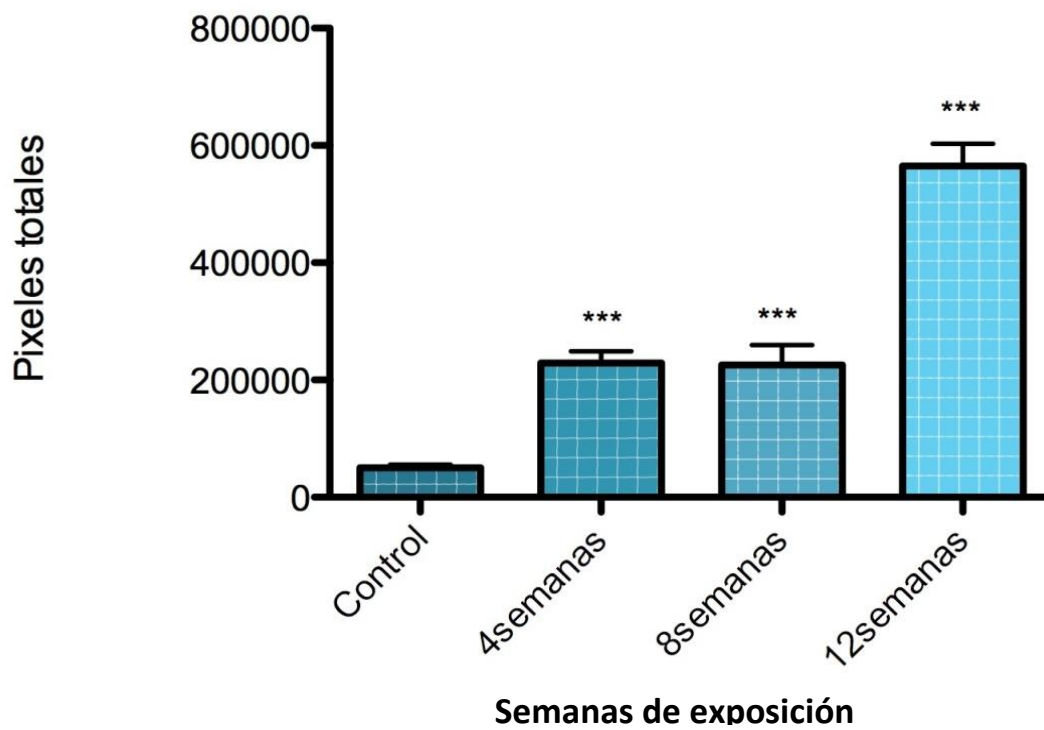


Figura 6. Inmunohistoquímica con 4-hidroxinonenal, grupos control y expuestos a  $V_2O_5$ . En los ratones control cuyas imágenes corresponde a A, C, E no se observa marca de éste anticuerpo, o su intensidad es mínima, en comparación a las retina de cuatro semanas, cuya imagen corresponde a B la marca es muy clara en toda la retina sobre todo en la parte externa del fotorreceptor (flecha azul) y en las capas plexiformes señaladas con flecha roja, a las 8 semanas, retina D si hay marca aunque es un poco más leve comparada con 12 semanas retina F la marca es muy intensa en las plexiformes (flecha roja), y en los fotorreceptores (flecha azul), e incluso entre los propios núcleos observamos marca de este aldehído. Barra = 20  $\mu$ .



Gráfica 4. Píxeles totales de la inmunohistoquímica contra 4-hidroxinonenal, grupos control y expuestos a  $V_2O_5$ .

Prueba de ANOVA (*post hoc* de Dunnet) ,  $p < 0.05$ , 5 animales por grupo, 5 campos por animal, barra indica Desviación estándar.

\*\*Diferencia estadísticamente significativa con el control.

## **Discusión**

A pesar de las normas la Ciudad de México se ve expuesta a grandes cantidades de contaminantes, rebasando muchas veces los rangos permitidos, entre las que destacan las partículas suspendidas que por sus características toman un papel muy importante ya que en ellas se transportan gran cantidad de elementos dañinos para la salud como lo es el caso del vanadio.

Se han relacionado numerosas emergencias oftálmológicas como la conjuntivitis y el cambio en el pH lagrimal, con la contaminación del aire y las partículas suspendidas en las ciudades, además la constante aparición de síntomas como la irritación, comezón, sensación de cuerpo extraño y ardor en los ojos (Bourcier, 2003).

Dados los pocos antecedentes encontrados sobre la relación de contaminación, en particular el vanadio con los daños en la retina se decidió realizar este estudio en el que utilizamos al pentóxido de vanadio ya que es uno de los compuestos más comunes y que se localiza en grandes cantidades en forma de complejos metálicos en el petróleo crudo de México (Rodríguez Mercado, 2006)

### **Morfología general**

La barrera hematorretiniana, previene la entrada al interior del ojo de agentes tóxicos que llegan al organismo y viajan por medio de la sangre (Mecklenburg, 2007), sin embargo en ocasiones puede verse modificada como sucede en la vasculitis retiniana, hipertensión y edema macular, alterando su funcionamiento y permitiendo el paso de sustancias, proteínas de mayor tamaño y el ingreso de los compuestos tóxicos que viajan por todo el sistema hacia la retina (Salorio, 1997) desde la ramificación de la aorta conocida como carótida común interna que a su vez se divide en la rama oftálmica y que se encarga de irrigar al ojo, probablemente en este caso el vanadio es capaz de acceder ya que se transporta mediante la partículas suspendidas que funcionan como vehículo; atravesando así la barrera y la membrana limitante externa con lo que se distribuye dentro de la retina; otra forma de ingresar a las células es mediante el transporte aniónico con la utilización de canales de fosfato y así interactuar con proteínas, péptidos, aminoácidos y nucleótidos como lo ha reportado Rodríguez Mercado, 2006.

El sistema visual es susceptible a los efectos tóxicos de iones y contaminantes diversos (Mela, 2012), no se cuenta con estudios que asocien al vanadio como contaminante inhalado y efectos en la retina; la retina guarda una configuración

de células muy definida, lo cual permite su correcto funcionamiento para la posterior generación de imágenes, en este caso la exposición a  $V_2O_5$  indujo cambios histológicos en distintas capas de la retina, por lo que podemos pensar en daños de diversas índoles como el deterioro celular, cambios estructurales de membranas o cambios en la fisiología normal de las células.

El deterioro de la retina, en general, en mamíferos se ha reportado posterior a exposición de metales y ha sido asociado con la muerte de bastones y conos (Mela, 2012). La retina es uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo, por lo que requiere de un aporte continuo y estable de oxígeno y nutrientes para mantener su correcto funcionamiento, si por cualquier razón esto se modifica se da como resultado el daño; los cambios metabólicos en la retina contribuyen a una degeneración progresiva (Hara, 2006).

### **Fotorreceptores, rodopsina**

Al finalizar el desarrollo embrionario, los fotorreceptores terminan de diferenciarse y posteriormente no existe un mecanismo que compense la pérdida de éstas células si mueren (Berta, 2011), por lo que si existe una lesión de los bastones ocasionada por la inhalación de vanadio, no hay forma en que esta población pueda recuperarse.

Gorin, 2010 asegura que los fotorreceptores pueden morir por muchos mecanismos, incluyendo la destrucción física mediante lisis, por medio de señales que desaten la apoptosis como lo son factores de crecimiento, depleción de energía por fallo de la mitocondria, daño oxidante a proteínas y lípidos, liberación de calcio por modificaciones de membrana, y por lo tanto desequilibrio de iones, procesos que alteran la homeostasis de la célula.

Se utilizó a la rodopsina como marcador de bastones, ya que este fotopigmento se ubica en el segmento externo de esta estructura (García J, 2007) La inmunohistoquímica contra rodopsina confirmó la disminución en la presencia del pigmento perteneciente a los bastones conforme al tiempo de la exposición, dicho resultado probablemente se deba a causas como la respuesta de la célula ante el estrés oxidante ocasionado por el vanadio, degeneración de los fotorreceptores (Bhanuprakash, 2009) o quizá un cambio funcional del propio fotorreceptor.

La rodopsina es una proteína de membrana e importante componente estructural del segmento externo (Kennedy, 2009) compuesta de tres regiones distintas, intracelular o citoplasmática, transmembranal y extracelular o intradiscal, todas las regiones son esenciales para el funcionamiento correcto y adecuado de los fotorreceptores (Stojanovic, 2003), si alguna de los componente de la proteína se daña, ésta deja de funcionar adecuadamente. La regulación en los niveles de este



pigmento es de suma importancia y su reducción resulta en degeneración (Kennedy, 2009), en este modelo encontramos que los niveles de pigmento disminuyen por lo que es posible que la degeneración retiniana esté ocurriendo.

De manera normal se produce una renovación diaria de los discos que componen a los fotorreceptores mediante la fagocitosis de los desechos por parte del epitelio pigmentario; por éste y otros procesos los fotorreceptores se encuentran sometidos a un ambiente de constante cambio, tienen un metabolismo elevado y por lo tanto un alto consumo de oxígeno, factores que hacen que los fotorreceptores sean más susceptibles al daño oxidante (Punzo,2012), es posible que en este caso el vanadio altere o interrumpa el ciclo de renovación de discos como sucede en el estudio realizado con inhalación de metilmercurio de Mela, et al, en el 2012, y con esto dicha alteración esté modificando la fagocitosis de los discos membranales, lo cual a su vez acelera la pérdida de los segmentos externos o disminuye la producción del pigmento visual.

Probablemente la disminución en la densidad de la rodopsina es un indicador de la afección en particular del segmento externo de los fotorreceptores, en el que se pueden estar presentando modificaciones de su estructura o defectos en el transporte intracelular de nutrientes y materiales básicos para su correcto funcionamiento lo cual alteraría todos los demás procesos (Kennedy, 2009), asociado a lo anterior se reporta que los cambios en la morfología del segmento externo del fotorreceptor pueden alterar la eficiencia de la fototransducción y disminuir la calidad de la absorción del fotón y su procesamiento causando desórdenes visuales (Mela, 2012).

Fain, en su estudio del 2006 en el que se enfoca al daño inducido a los fotorreceptores mediante exceso de luz, reporta que la activación excesiva y constante de la cascada de fototransducción produce apoptosis en particular de los bastones, asociado a varios mecanismos como lo es la alteración en el equilibrio de iones, mayor cantidad de  $Ca^{2+}$  intracelular, la alteración de la energía utilizada por la retina que conlleva al decremento en la concentración de una variedad de cationes en el segmento externo y disminución de diversas moléculas de señalización, llevando a la retina al desequilibrio y por lo tanto a la apoptosis.

El segmento externo de los fotorreceptores contiene a la fosfodiesterasa, enzima que interviene en la hidrólisis del GMP durante la fototransducción y que es activada mediante el estímulo luminoso. Del Priore en 1985 trabajó con diversos compuestos de metales y reportó que en particular el vanadato es capaz de activar a la enzima fosfodiesterasa aún en ausencia de luz y consecuentemente ocasionar la activación constante de la fototransducción.

Aunado a lo anterior, podemos pensar que si el vanadio actúa tal como se reportó con el vanadato, uno de los mecanismos de daño hacia los bastones en nuestro modelo, es que al ser inhalado al distribuirse por el organismo y llegar a la retina, causa la activación directa y constante de la fototransducción aún en ausencia de luz lo que conllevaría a la apoptosis, a pesar de los estudios el mecanismo exacto por el cual la sobre estimulación puede llevar a la apoptosis aún no se encuentra definido. Debido a la similitud del vanadio con el fosfato, el vanadio compite por entrar a la célula mediante los canales de fosfato (Rodríguez Mercado, 2006) lo que es probable que se encuentre compitiendo con la fosfodiesterasa perteneciente a la cascada de fototransducción, impidiendo el correcto funcionamiento y la alteración de esta reacción en cadena.

### **Capas nucleares**

La capa nuclear externa se encuentra formada por los cuerpos de los fotorreceptores tanto de conos como bastones, la capa nuclear interna se compone de los núcleos de células con las que se lleva a cabo la sinápsis como lo son las neuronas horizontales, bipolares, amácrinas.

Al observar los cortes teñidos con hematoxilina-eosina encontramos alteraciones en dichas capas, por lo que recurrimos a la medición del grosor de éstas en diversos campos y encontramos que las capas nucleares aumentaban de tamaño en los ratones expuestos, la capa NE registró cambios significativos a las 4 semanas y a las 12, ya que en la semana 8 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas comparada con el control, por el contrario NI tuvo cambios desde la 8ª semanas al igual que en la semana 12.

Probablemente este resultado indique que a las 4 y 12 semanas el daño es mucho mayor para la capa nuclear externa, tratándose primero de una exposición subaguda por ser rápida y constante y la segunda de una subcrónica por ser más prolongada, tiempos en los que las células fotorreceptoras están respondiendo ante los cambios mediante un posible edema, contrario a lo sucedido a las 8 semanas en una exposición subcrónica, donde la respuesta es menor, por lo que la diferencia con respecto al control no es significativa, posiblemente el daño es menor en el segmento interno de la célula en particular, dado que sí vemos afección en la cantidad de pigmento de rodopsina, o quizá a este tiempo la retina tenga la capacidad de compensar el daño con algún mecanismo que permita conservar las células.

Sabemos que los fotorreceptores no son células que puedan regenerarse por lo tanto no es posible pensar en una compensación mediante células de éste tipo,

tendríamos que profundizar en el estudio ya que al observar más núcleos pensamos en el surgimiento de un nuevo tipo celular que ayude a la compensación del daño, como es el caso de las células gliales o la modificación del tipo celular.

En la capa nuclear interna existen varias posibilidades que podrían explicar el engrosamiento de la capa a partir de la 8<sup>a</sup> semana, en primera al tratarse de neuronas éstas pueden responder ante el daño mediante edema; otro mecanismo mediante el cual podría aumentar el grosor es la posible pérdida de conexinas y la modificación de las uniones GAP, que son fundamentales en el procesamiento de la información visual (Besharse, 2011) tal como ocurre en el estudio de la expresión de la conexina36 realizado por Feifenspan en el 2006. En dicha capa podríamos suponer en la respuesta al daño por parte de la microglía, debido a que su núcleo se encuentra localizado en esta parte, quizá si el vanadio está alterado la homeostasis en la retina, la célula de Muller siendo la microglía, tenga la capacidad de responder dividiéndose para tratar de ejercer un efecto protector mayor en la retina con lo que vemos un incremento en el número de núcleos y grosor de esta capa.

Los resultados obtenidos sobre las capas nucleares fueron contrarios a lo que se esperaba al disminuir la presencia de rodopsina conforme el tiempo de exposición ya que suponíamos que este cambio nos indicaría pérdida de la célula fotorreceptora completa y lo veríamos con la disminución del grosor de la capa nuclear externa compuesta con un menor número de núcleos debido a la falta de los bastones, tal como se ha reportado en varios estudios como el de Roger, en el 2011 enfocado al análisis de enfermedades como la retinitis pigmentaria y la degeneración macular, sin embargo en este modelo observamos un aumento en el grosor de dicha capa que parece estar condicionada por un aumento en el número de núcleos y desorganización de los mismos. Esto nos hace pensar por un lado que la pérdida celular del fotorreceptor no es total y solamente cierta parte del bastón está presentando alteración en particular el segmento externo donde se ubica el pigmento, lo que da como resultado la disminución en la presencia de éste.

Okano en el 2012 reportó que el alineamiento irregular de la capa nuclear externa se ha observado en estudio con pacientes con degeneración macular relacionada a la edad (AMD) y asoció este hecho con la disminución en la longitud del segmento externo del fotorreceptor comparado con los segmentos de individuos sanos, en donde se ha visto que por mucho, los bastones son más vulnerables a sufrir daño por distintas causas que los conos pero que su afección es capaz de inducir la degeneración completa de la retina.

Las causas del daño en el segmento externo pueden ser múltiples, entre las que destacan la pérdida y alteraciones de membrana, incorrecta formación y fagocitosis de los discos entre muchas otras, al suscitarse dicho daño la unión del segmento interno con el externo puede alterarse y desarreglarse, sin embargo a pesar de esta modificación el segmento interno puede mantenerse por un tiempo en funcionamiento sin modificaciones en su morfología (Lawwil, 1977). En dicho segmento se organiza el núcleo y los organelos del fotorreceptor entre los que destacan las mitocondrias, por lo que su adecuado funcionamiento es esencial para el mantenimiento de la célula completa, la susceptibilidad ante el daño es alta debido a que las mitocondrias son vulnerables ante los radicales libres y las ROS (Lawwil, 1977), en este modelo en efecto vemos un daño inducido por la inhalación de vanadio en el segmento externo, pero la posibilidad de que el segmento interno aún se encuentre funcionando y por esto no sea evidente la pérdida de núcleos en la capa nuclear interna.

### **Estrés oxidante**

En el modelo utilizado se ha reportado en otros órganos y en particular en el SNC, daño posterior a la inhalación de vanadio como consecuencia del estrés oxidante, y la producción de las ROS que se generan durante la exposición a este metal (Jimenez, 2009), por lo que fue de interés estudiar si dentro de la variedad de mecanismos por los cuales se genera un daño en los fotorreceptores se encuentra dicha vía; además reportes previos como el de Chen Yu, 2012 afirman que el estrés oxidante es un mecanismo que daña a los fotorreceptores en enfermedades degenerativas de la retina, retinopatía inducidas por luz y daño por enfermedades crónicas.

Los lípidos son los principales componentes de membrana, le confieren la estructura y propiedades básicas para su correcto funcionamiento, así como proveen de energía, permiten la señalización y la regulación, un cambio mínimo en la fluidez de la membrana ocasiona daños y procesos patológicos a la célula (Catala, 2009). El sistema nervioso contiene una gran cantidad de lípidos insaturados y ácidos grasos polinsaturados, además utiliza mucho oxígeno para su correcto funcionamiento, estos factores hacen de éste sistema muy vulnerable ante el estrés oxidante. Por su composición todas las membranas son susceptibles a la oxidación, en especial por radicales libres proceso conocido como lipoperoxidación (Forman, 2008).

El 4-hidroxinonenal es uno de los principales marcadores de lipoperoxidación, ya que se genera como producto tóxico de este proceso en forma de aldehído insaturado (Zarkovic, 2003), y el cual en concentraciones superiores a las fisiológicas puede estimular la proliferación celular o diferenciación de las células,

así como la apoptosis en varios tipos celulares como lo reporta Forman en el 2008 . El equilibrio en la concentración de este producto es crucial para que el ciclo celular se mantenga integro, cuando existe estrés oxidante se altera y este producto incrementa, llevando a las células al desorden (Awasthi, 2003).

Nuestros resultados son consistentes con estudios previos realizados con el mismo modelo, en Sistema nervioso (Jimenez, 2009), debido a que se comprobó que el mecanismo de lipoperoxidación en la retina durante la inhalación tiene gran relevancia ya que a partir de la 4<sup>a</sup> semana se observó la presencia de este marcador. En la retina, se encuentran altos contenidos de ácidos polinsaturados, siendo los componente principales de membrana de los fotorreceptores en particular de los segmentos externos (ácido docosahexanoico), a su vez éstas células contienen proteínas como la rodopsina, que se encuentra rodeada de fosfolípidos , juegan un papel esencial en el proceso de fototransducción durante los cambios conformacionales; Catala en el 2006 en su estudio de quimioluminiscencia y daño de los fotorreceptores por estrés ha sugerido que la lipoperoxidación por factores oxidantes es un proceso relativamente común en la retina que participa en el daño y degeneración que trae como consecuencia la pérdida progresiva de los ácidos polinsaturados y la pérdida de la integridad de la membrana.

Cuando la integridad de la membrana está alterada por mecanismos como la lipoperoxidación el gradiente entre iones sodio, calcio y potasio no se puede mantener, lo que ocasiona cambios estructurales y funcionales severos en el fotorreceptor (García J, 2007), afectando varias vías y sobretodo causando un desequilibrio en su metabolismo.

El incremento del aldehído 4-hidroxinonal en el modelo es muy claro en toda la retina, siendo más intensa en la parte del segmento externo, que como se indica con anterioridad se encuentra formado por gran cantidad de ácidos polinsaturados susceptibles a dicho proceso, con éste resultado comprobamos que la peroxidación de lípidos es uno de los mecanismos de daño responsable de la alteración en la homeostasis de dichas células que se genera a partir de la exposición a pentóxido de vanadio, acarreando consecuencias como la pérdida de continuidad en el arreglo de empalizada y la probable modificación de la unión del segmento externo con el segmento interno, que coincide con la disminución progresiva de la rodopsina ; de la misma manera la marca del 4-hidroxinonal destaca sobre los axones de las distintas neuronas que se unen a los fotorreceptores para transmitir la señal luminosa a eléctrica, siendo las capas plexiformes las de mayor marca donde podría ocurrir la lipoperoxidación.

Al conjugar todos los resultados podemos proponer que en nuestro modelo de inhalación de vanadio el estrés oxidante, en dicho caso la peroxidación lipídica, y por lo tanto la generación de ROS, es uno de los mecanismos por los cuales se generan las alteraciones encontradas en las células de la retina comprobado con la presencia del 4-hidroxinonenal, por otro lado es probable que el vanadio afecte o sobreactive la cascada de fototransducción alterando la homeostasis. Al enfocarnos en el estudio de los fotorreceptores encontramos evidencia de su alteración mediante el cambio en su morfología y la presencia disminuida del pigmento rodopsina, suponiendo entonces que existe pérdida de dicho tipo celular, (Fig.7).

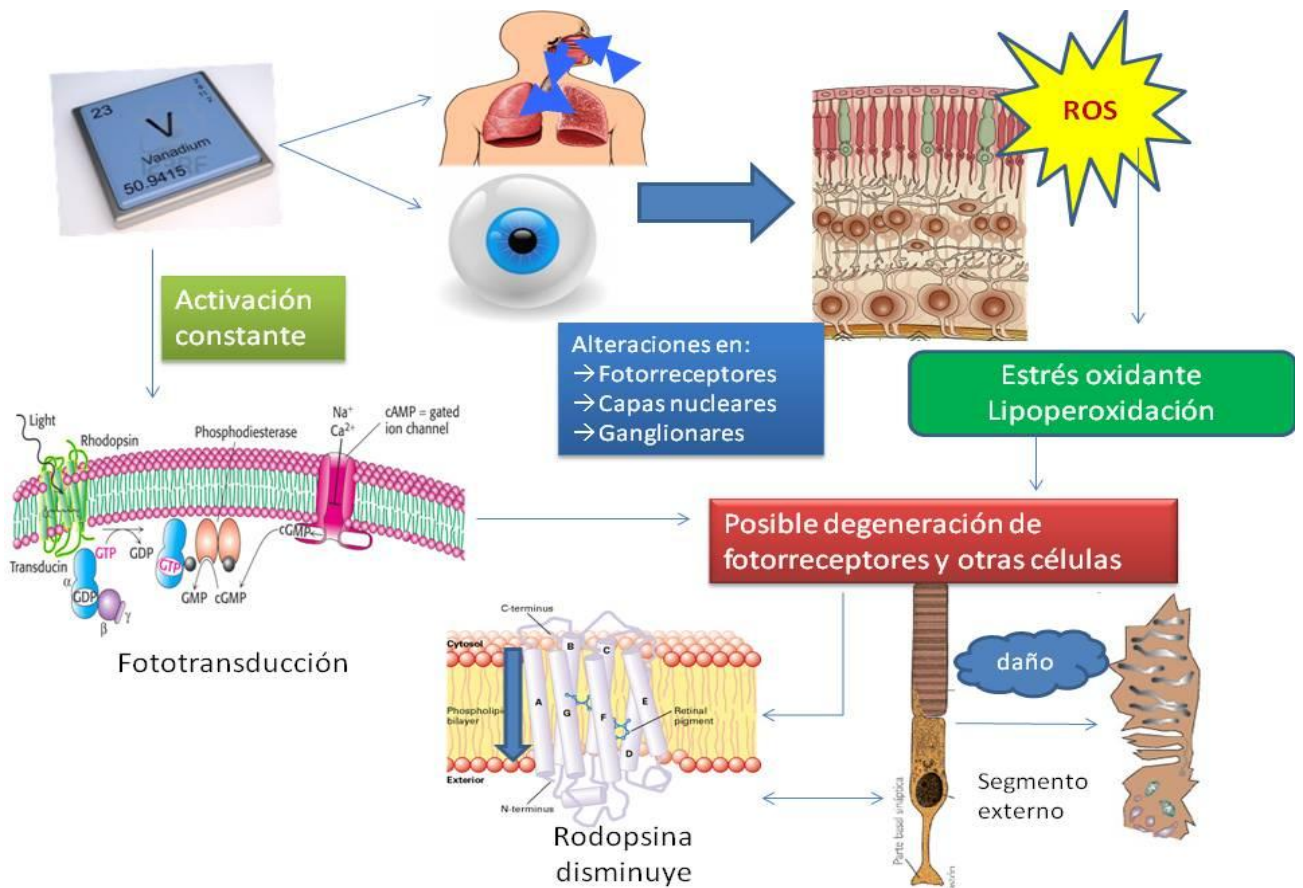


Imagen 7. Representación esquemática del daño inducido sobre la retina, por la inhalación de Vanadio.

## **Conclusiones:**

El pentóxido de vanadio se distribuye el organismo al ser inhalado, probablemente llega al ojo atravesando la barrera hematorretiniana y de esta forma ocasiona cambios morfológicos y bioquímicos en diversas capas de la retina , en particular en los fotorreceptores.

El vanadio induce cambios en la densidad del pigmento rodopsina, aumento significativo del grosor de las capas nucleares tanto externa como interna y desorganización de los núcleos, siendo las alteraciones más evidentes a las 12 semanas.

La inhalación de este metal de transición induce estrés oxidante con lo que probablemente se afecten los lípidos componentes de las membranas de las neuronas que forman parte de la retina.

Concluimos que el vanadio indujo alteraciones histológicas, que correlacionan con el tiempo de exposición y que probablemente tengan implicaciones en la visión nocturna de los ratones.

## **Perspectivas:**

Utilizar algún marcador de apoptosis para confirmar que la inhalación de este metal ocasiona la muerte de cierto tipo celular.

Es deseable realizar estudios más específicos con los cuales se pueda hallar la explicación para el engrosamiento de las capas nucleares y conocer si se trata de un tipo celular nuevo que se encargue de compensar la pérdida de los bastones y así mantener en las mejores condiciones posibles a la retina

Se podría llevar a cabo un estudio, en el que se evalúe si las alteraciones a nivel histológicas conllevan a una alteración de la función visual mediante pruebas conductuales o potenciales evocados, mediante el cual se evaluaría de manera más completa las alteraciones del Vanadio en la retina y por lo tanto en la visión.

## Bibliografía:

- Avello M, Suwalsky M. 2006. Radicales libres, estrés oxidativo y defensa antioxidante celular. Universidad de Concepción. Atenea Vol. 494. 161-172p
- Avila-Acosta M, Fortoul T, Colín-Barenque L, Ordoñez J, Gutiérrez-Valdez A, Anaya-Martinez V. 2007. Vanadium and the nervous system. Vanadium: its impact on health. 29-42p.
- Awasthi Y, Sharma R, Cheng J, Yang Y, Sharma A, Singhal S. Awasthi S. 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. Molecular aspects of medicine. Vol. 24. 219-230p.
- Berson D.L. 2011. The retina and its disorders. Elsevier. USA. 912p.
- Berta A, Boesze-Battaglia K, Genini S, Goldstein O, O'Brien P, Szél A, Acland G, Beltran W, Aguirre G. 2011. Photoreceptor cell death, proliferation and formation of hybrid rod/S-cone photoreceptors in the degenerating STK38L mutant retina. Plos one. Vol. 6. 1-13 p.
- Bhanuprakash G, Vasireddy V, Nawajes M, Tiruvalluru M, Wang X, Jablonski M, Nappanvettill G, Ayyagari. 2009. A novel rat model with obesity-associated retinal degeneration. IOVS. Vol. 50. 3456-3463p.
- Bourcier T, Viboud C, Cohen J-C, Thomas F, Bury T, Cadiot L, Mestre O, Flahaut A, Bordiere V, Laroche L. 2003. Effects of air pollution and climatic conditions on the frequency of ophthalmological emergency examinations. Br J Ophthalmol. Vol. 87. Paris. 809-811p.
- Cano G, Falcón C, Montaña L, Rodríguez V, Fortoul T. 2009. Pancreatic changes and vanadium inhalation. Current topics in toxicology. Vol. 6. 39-44p.
- Catala A. 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. Journal of biochemistry and cell biology. Vol. 38. 1482-1495p.
- Catala A. 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Journal of chemistry and physics of lipids. Vol. 157. 1-11P.
- Christen Yves. 2000. Oxidative stress and Alzheimer disease. The American journal of clinical nutrition. Vol. 71. USA. 621-629p.
- Curtis H., Barnes N., Schnek A., Massarini A. 2011. Biología. 7 ed. 3 reimp. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. Págs. 1005-1010
- Del Priore L., Lewis A., 1985. Vanadate, tungstate and molybdate active rod outer segment phosphodiesterase in the dark. Biochimica et Biophysica Acta. Elsevier. Vol. 845. 81-85p



- Dorado C, Rugerio C, Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Medicina (UNAM)* Vol. 46; 229-235.
- Fain G. 2006. Why photoreceptors die (and why they don't). Review article. *BioEssays*. Vol.28. 344-354p
- Feigenspan A, Janssen-Bienhold, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Sohl G, Willecke K, Ammermuller J, Weiler R. 2004. Expression of connexin36 in cone pedicles and off-cone bipolar cells of the mouse. *Journal of neuroscience*. Vol.24. 3325-3334p.
- Forman H, Fukuto J, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. 2008. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Journal of biochemistry and biophysics*. Vol. 477. 183-195p.
- Fortoul T, Rodríguez V, González A, Rojas M, Cano G, Ustarroz M, Colin L, Montaña L, García I, Bizarro P, Lopez N, Falcón C, Jiménez R, Ruiz M, López L, Morales A, Muñoz A. 2011. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Vol. 2011. 1-11p.
- Fortoul T, Rodríguez V, Ustarroz M, Montaña L, Lopez N, Falcón C. 2009. Traffic-related air pollution. Chapter 1. Nova science publishers. N.Y. 1-28p.
- Fortoul T, Avila-Acosta M. 2007. Vanadium: its impact on health. Nova Science Publishers, NY. 87p.
- García J, García M, Pinazo M. 2007. Retinopatía diabética y estrés oxidativo. *The innovación*. Vol. 48. 1-18p
- González A, Falcón C, Fortoul T. 2010. Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis. Artículo de Revisión. UNAM. *Gaceta Médica Mex* Vol. 146; 136-143p.
- Gorin M. 2010. Secondary photoreceptor degenerations. *The retina and its disorders*. USA. 836-840p.
- Guarneros M. 2009. Efecto adverso de la contaminación del aire sobre la función olfativa y la sensibilidad trigeminal nasal. UNAM. Tesis de Maestría.
- Hales S. 2007. Effects of air pollution on health. *BMJ*. Otago. Vol. 335. 314-315p
- Hara A, Niwa M, Aoki H, Kumada M, Kunisada T, Oyama T, Yamamoto T, Kozawa O, Mori H. 2006. A new model of retinal photoreceptor degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride. *Brain reserach*. Vol. 1109. El servier. 192-200p.
- Jimenez R. 2009. Daño oxidante en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada. UNAM (Tesis de licenciatura)
- Junqueira, Carneiro. 2005. *Histología básica, texto y atlas*. 6 ed. España. Editorial Masson. 453-467p.

- Kennedy B, Malicki J. 2009. What drives cell morphogenesis: a look inside the vertebrate photoreceptor. *Developmental dynamics*. Vol.238. 2115-2138p.
- Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. 2012. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. Review article. *Acta Biochimica Polonica*. Vol 59 Poland.1-6p
- Lawwil T, Crockett S, Currier G. 1977. Retinal damage secondary to chronic light exposure. *Documenta ophthalmologica*. Vol. 44. 379-402p.
- Mayor R. 2010. Estrés oxidativo y sistemas de defensa antioxidante. Artículo de Revisión. *Inst. medicina Tropical. Paraguay*. Vol. 5. 23-29p
- Mecklenburg L, Schraermyer U. 2007. An overview on the morphological changes in the retina pigment epithelium after systematic compound administration. *Journal of toxicologic pathology*. Vol. 35 252-267.
- Mela M, Regina S, Legeay A, Mesmer N, Massabuaa J, Fix D, Oliveira C. 2012. Morphological evidence of neutrotoxicity in retina after methylmercury exposure. *Neurotoxicology*. Vol. 33. El servier. 407-415p.
- Mittag T, Serle J, Podos S, Cohen L, Liebowitz F. 1984. Vanadate effects on ocular pressure (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)ATPase and adenilate ciclase in rabbit eye. *Investigate ophthalmology and visual science*. Vol. 25. 1335-1338p
- Mussali G, Fortoul T. 2008. Atmospheric pollution. Nova science Publishers, México. 147-157
- Novaes P, Hilario P, Kara-José N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, Berra A. 2007. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hiperplasia in human conjuntival ephitelium. *Environmental health perspective*. Vol. 115, número 12. Brasil. 1753-1756p
- Okano K, Maeda A, Chen Y, Chauhan V, Tang J, Palczewska G, Sakai T, Tsuneoka H, Palczewski K, Maeda T. 2012. Retinal cone and rod photoreceptor cells exhibit differential susceptibility to light-induced damage. *Journal of Neurochemystry* Vol. 121.146-156p.
- Rodríguez Mercado, Altamirano Lozano. 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient*. Vol. 22 (4) México. 173- 189p.
- Roger J, Ranganath K, Zhao L, Cojocar R, Brooks M, Gotoh N, Veleri S, Hiriyanna A, Rachel R, Mercedes M, Farris R, Wong W, Swaroop A. 2012. Preservation of cone photoreceptors after a rapid yet transient degeneration and remodeling in cone-only Nrl<sup>-/-</sup> mouse retina. *Journal of neuroscience*. Vol. 32 528-54p
- Ross M, Pawlina. 2012. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 6ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. Págs. 894-927.

- Ryan S. 2009. Retina. Vol 1. Principios básicos y enfermedades retinianas hereditarias. Marbán. España. Págs. 789
- Sasi M, Haider S, Fakhiri M, Ghwarsha K. 1994. Microchromatographic analysis of lipids, protein and occurrence of lipid peroxidation in various brain areas of vanadium exposed rats, a posible mechanism of vanadium neurotoxicity, Neurotoxicity. Vol.15. 413-420p.
- Serre K, Sasongko M. 2011. Modifiable lifestyle and environmental risk factors affecting the retinal microcirculation. Journal of the microcirculation society. Vol.19 Australia. 29-36p.
- Solari A. 2007. Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina. 3 ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. Págs. 568
- Soledad J. 2007. Estrés oxidativo y su relación con el aporte de antioxidantes nutricionales en el paciente crítico. Universidad de Granada. Tesis de doctorado.
- Stojanovic A, Hwang I, Gobind H, Hwa J. 2003. Retinitis pigmentosa rhodopsin mutations L125R and A164V perturb critical interhelical interactions. Journal of biological chemistry. Vol. 278. 39020-39028p.
- Zarkovic N. 2003. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. Molecular aspects of medicine. Vol. 24. 281-291p.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-024-SSA1-1993. "salud ambiental. criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las particulas suspendidas totales (pst). valor permisible para la concentracion de particulas suspendidas totales (pst) en el aire ambiente, como medida de proteccion a la salud de la poblacion"
- Ferreira, 2010, [http://www.ecoportel.net/Temas\\_Especiales/Contaminacion/la\\_contaminacion\\_atmosferica\\_un\\_problema](http://www.ecoportel.net/Temas_Especiales/Contaminacion/la_contaminacion_atmosferica_un_problema); consultado el 10 de abril del 2013.
- Sánchez M, Capeáns C, Santos L. 1997. Edema Macular Diabético Difuso. Disponible en: <http://www.oftalmo.com/studium/studium1997/stud97-1/a-16.htm>