



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto de la exposición por inhalación de vanadio en las  
células gliales de Müller (MGC) de la retina en un modelo  
murino**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**SILVANA CERVANTES YÉPEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. TERESA IMELDA FORTOUL  
VANDER GOES**

México D.F. abril 2014



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.

1. Datos del alumno

Cervantes Yépez Silvana

56 76 41 20

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307016696

2. Datos del tutor

Dra.

Teresa Imelda

Fortoul

vander Goes

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Patricia

Rivas

Manzano

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Laura

Colín

Barenque

5. Datos del sinodal 3

M. En C.

Martha Patricia

Bizarro

Nevares

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Martha Luz

Ustarroz

Cano

7. Datos de la tesis

Efecto de la exposición por inhalación de vanadio en las células gliales de Müller (MGC) de la retina en un modelo murino.

53p.

2014

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Teresa Imelda Fortoul vander Goes en el Laboratorio de Daños a la salud por metales pesados del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

Antes que nada, a esta maravillosa universidad, la UNAM. Desde hace 8 años que entré a la ENP 6 “Antonio Caso”, mi manera de pensar y de ser cambió; posteriormente, entrar a la Facultad de Ciencias, terminó por definirme. La UNAM me ha permitido crecer en libertad, expandir mis horizontes, plantearme y luchar por metas muy altas, obtener la mejor educación del país y me dio la capacidad de valorar el poder de la unión y la solidaridad entre universitarios. Aprendí a que una Goya no es sólo una porra en un estadio, es el reflejo de cientos de corazones que laten al mismo tiempo por amor a la UNAM y a México. Es imposible ser parte de esta universidad, y no ama a México y a la UNAM, un poco más cada día. GOYA!

A los miembros de mi jurado, Dra. Patricia Rivas Manzano, Dra. Laura Colín Barenque, Dra. Teresa I. Fortoul vander Goes, Dra. Martha Luz Uztarroz Cano y M. en C. Matha Patricia Bizarro Nevares, por aceptar participar en la revisión de mi tesis, por su disponibilidad, por todo su tiempo invertido y sus valiosas aportaciones.

A los miembros del laboratorio de Microscopía del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, Biol. Armando Zepeda Rodríguez y Téc. Acad. Francisco Pasos Nájera por el apoyo brindado en la toma de fotomicrografías de inmunohistoquímica.

A los miembros del laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, Téc. Raquel Guerrero Alquicira y Téc. Verónica Rodríguez Mata por el apoyo brindado para el procesamiento de las muestras.

Al Dr. Francisco Javier García Vázquez del Instituto Nacional de Pediatría por el apoyo y conocimiento brindado para la técnica de inmunohistoquímica.

Raquel y Francisco, muchas gracias por toda tu paciencia y apoyo cuando nada me salía. Me dieron alternativas y esperanza.

Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña, miembros del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo en la obtención, cuidado y mantenimiento de los animales de investigación.

A todos en el laboratorio, chicos y grandes, gracias por su paciencia, por haber compartido conmigo lo que saben, por sus consejos, por escucharme, por sus ánimos, por sus aportaciones en los seminarios y por darme la oportunidad de estar entre ustedes. Marel, juntas fuimos un gran equipo y lo seguiremos siendo.

## **DEDICATORIAS**

**A mi mamá:** Aún ni empiezo a escribirte y ya me dieron ganas de llorar. No hay palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí y también todo lo que has dejado de hacer por mí al ser, todos los días, madre y padre al mismo tiempo. Sé que quizá no te lo he dicho nunca, pero eres mi mayor y mi mejor ejemplo en la vida, te amo. Desde chiquita me enseñaste a ver el mundo diferente, de ti aprendí que se puede ser fuerte, independiente y sensible a la vez, que se puede ser una mujer exitosa en su trabajo, una mamá dedicada y al mismo tiempo estar atenta de la casa, la comida, todas las mascotas

y a parte, tener tiempo para la diversión con *la bola*. Aprendí que si se quiere lograr algo, hay que luchar por ello y dar lo mejor en el camino. De las adversidades entendí que a veces son necesarias para crecer y para cambiar, pero que si estamos juntas, el proceso es mejor y más rápido. Mamá, creo que he crecido muy rápido y ahora estoy por titularme de la carrera, pero quiero que sepas que siempre seguiré siendo esa Silvana que necesita de tus cariños y de tu guía, la diferencia es que ahora yo también puedo ver por ti y tratar de demostrarte mi amor de diferentes maneras. Gracias por todo lo que me ayudaste en la parte académica, el apoyo, las premuras y la paciencia. Estoy muy orgullosa de ser tu hija y de parecerme en tantas cosas importantes a ti. Fracase en el intento de no llorar al escribir.

**A mi papá:** Gracias por todos los momentos bonitos vividos, por el cariño y los cuidados, por las enseñanzas, por el apoyo, por el constante estímulo a ser mejor cada día y por enseñarme a hacer tantas cosas que amo, como nadar, andar en bici y tantas cosas de la biología y de la vida como tal. Quizá nunca te lo dije, pero cada sábado a tu lado, vencía muchos temores mientras conocíamos la ciudad. Eres una gran inspiración para mí, por todo lo que has logrado y la iniciativa que siempre tienes y que haces que yo también tenga. He aprendido que el tiempo pasa muy rápido y las cosas cambian; aún me acuerdo como si fuera ayer cuando bailamos el vals de mis XV, y hoy ya me estoy titulando! Te admiro y te quiero mucho.

**A toda mi familia:** Son la fuerza de mi vida y el motor de mis sueños. Me gustaría tenerlos conmigo por siempre y poder verlos más. **Abuelita**, eres una de las mujeres a las que más admiro. Tus ganas de vivir, tu bondad, tu fuerza, tu amor incondicional y tu inteligencia me inspiran a ser mejor persona y de verdad creo que todos en la familia somos muy afortunados de tenerte y poder aprender de ti cada día. **Malena, Grisi, Chelito**, no alcanzan las palabras para agradecerles todo lo que nos han dado en la vida. Soy la más afortunada y feliz de haber nacido en esta familia. Gracias por todos los cuidados, desde que nací hasta ahorita, todas las palabras de aliento, los abrazos, las pláticas, los buenos deseos, las llamadas de atención, etcétera. **Roberto**, más que un primo, has sido mi confidente, mi amigo y me has cuidado enormemente, gracias.

**A la Dra. Fortoul:** Más que una tutora, usted ha sido una gran guía y un gran ejemplo. Gracias por el apoyo, tanto académico como personal. Por esos tantos ratos de pláticas, alegrías, frustraciones y llanto. Sabemos que este camino no ha sido sencillo ni libre de obstáculos, pero quiero que sepa que valoro mucho la confianza que usted ha depositado en mí y la libertad que me concedió para resolver las cosas a mi manera. En este tiempo he aprendido y madurado mucho, mi visión ha cambiado y creo que en gran parte es por usted y por mi estancia en el laboratorio. Además, me llena de satisfacción decir que usted es una mujer muy exitosa y que fue mi tutora.

**A Sofía,** No supe en qué momento dejamos de comportarnos como simples compañeras de laboratorio y nos convertimos en íntimas. Pero ha sido una de las mejores cosas que me sucedieron en estos años! Te admiro muchísimo y te quiero mil más. Sé que a estas alturas, ya debería de haberte construido un altar en el laboratorio por todas las cosas en las que me has ayudado y todo lo que he aprendido de ti, pero sinceramente no creo que la Dra me deje por cuestiones de espacio jaja. Lo que sí puedo hacer, es agradecerte infinitamente por haberme dado las herramientas para crecer y por haberme enseñado que si aparentemente no existen soluciones a cierto problema, uno tiene que construir sus alternativas y seguir adelante. Gracias por ayudarme, por creer en mí y por brindarme tu confianza. Lo valoro muchísimo.

**A Ángel:** Eres el tipo de persona que cambia vidas, construye ilusiones y da esperanza. Para mí, eres esos colores brillantes en el paisaje, eres ese cielo azul claro, viento fresco y sol brillante de un día de primavera. Eres la promesa de que la vida puede ser

bondadosa, noble y sincera. Gracias por todo lo que hemos vivido desde que estamos juntos. Gracias por todos tus cuidados, tus cariños y tu compañía. Gracias por ser una persona tan completa y con mucho amor para dar. Gracias por todo tu apoyo y por las mil maneras que siempre encuentras para ayudarme y hacerme reír. Gracias por impulsarme, por siempre sacar lo mejor de mí, por no rendirte y por querer luchar conmigo por nosotros. Gracias por haber hecho equipo conmigo en la clase y para la vida. Vamos por todo, Chispita!! Te amo con todo mi ser.

**A Ale:** Beibi eres más que una mejor amiga, eres como mi compañera de vida, mi cómplice en cada paso que doy. Siempre estaré agradecida por nuestra amistad, por aquel día en 4º de prepa en el que nos dimos cuenta que éramos la una para la otra jaja. Has sido un gran pilar en mi vida, un apoyo constante y una fuente de amor inagotable. GRACIAS. Gracias por crecer conmigo en tantos aspectos, por siempre estar juntas y no dejar que nada nos separe. Gracias por toda tu ayuda en tantos años, por tus consejos, por tus ánimos y por creer en mí cuando mi camino fue incierto. Gracias por ser gran parte de mi fuerza, de mi motivación y de mis alas. Sé que juntas alcanzaremos todo lo que nos proponamos. Te amo forever.

**A todos mis mejores amigos:** gracias por hacer de todos estos años, una etapa inolvidable, increíble y única. Amistades así, duran toda la vida. Gracias por brindarme apoyo, ánimos, horas de pláticas y risas, viajes, salidas, un hombro para llorar y miles de recuerdos en la escuela y fuera de ella. Gracias por ayudarme a vencer mis frustraciones y mis miedos, a incitarme a ser mejor persona y futura profesionista. Gracias por soportar mis manías, mi estrés, mi ñoñez y mis risas estruendosas. **Marel**, atravesamos gran parte de la etapa universitaria juntas, nos tocaron tiempos difíciles en la vida de cada una, pero de la mano aprendimos a salir adelante a pesar de todo y hasta organizamos la graduación! Gracias porque juntas fuimos y somos incondicionales e invencibles. **Maira**, jamás olvidaré ni dejaré de añorar nuestros tiempos entre libros, camiones, montañas, cactus, playas, mar, rocas y bailes, gracias. Eres una de las pocas personas con las que sé que comparto muchas lecciones de vida y que quisiera seguir compartiendo. **Lobas**, hubiera amado conocerlas antes. Son increíbles y las amo! puras mujeres exitosas, guapas y biólogas! Gracias por llegar a quedarse en mi vida. **Arturo, Maribel, Mariana, Miguel, Rodrigo**, verlos y estar con ustedes siempre es de mis momentos favoritos del día. **Isaí**, has sido de las personas más importantes en mi vida, te quiero muchísimo. Gracias por todo. **Martha, Alfredo, Os**, siempre seremos la mejor familia del mundo! Y lo increíble es que estando juntos, siempre seguiremos siendo esos mocosos relajientos sin preocupaciones, como cuando nos conocimos. **Mariana, Diana**, Pushungas forever! Así se vayan al otro lado de la ciudad, de México, del mundo, siempre podremos regresar como si nada a nosotras <3 **Horacio, Serrano**, toda una vida juntos no basta para reírnos y recordar todo lo que hemos pasado juntos. No cabe duda que una amistad verdadera, sobrevive a cualquier cosa. **Jael**, me da muchísimo gusto haberte conocido y mil gracias por escucharme, por tu apoyo incondicional y tus ánimos.

**A la bola: A todas las mamás y papás sustitutos que alguna vez todos nosotros tuvimos y a sus respectivos hijos**, no sería yo sin ustedes. Gracias por tantísimos años (ya más de veinte!) de amistad, de amor, de cuidados, de regaños, de comidas, cenas, juegos, bailes, fiestas, raspones, llantos, desamores, mentadas de madre, viajes, risas y demás. **Paloma:** gracias por haber estado en los momentos más difíciles de mi vida.

**A los que ya partieron de este mundo**, GRACIAS. Siempre llevo en mi ser un pedacito de cada uno de ustedes. Siempre vivirán en mí.

Los amo!!

# ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	7
1. Resumen .....	8
2. Introducción .....	10
2.1 La contaminación atmosférica .....	10
2.1.1 Partículas Suspendidas .....	11
2.1.2 Metales .....	14
2.1.3 Vanadio .....	14
2.1.3.1 Vanadio en el Sistema Nervioso Central .....	16
2.2 El ojo .....	17
2.2.1 Estructura del Ojo .....	17
2.3 Retina .....	19
2.3.1 Fotorrecepción y fotorreceptores .....	21
2.3.2 Captura de estímulos .....	21
2.4 Célula glial de Müller y su función en la retina .....	23
2.4.1 Citoesqueleto .....	25
2.4.2 Filamentos Intermedios .....	25
2.4.3 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) .....	26
2.5 Glutamina sintetasa en el Ciclo Glutamato / Glutamina .....	28
2.6 La MGC en condiciones patológicas .....	29
2.6.1 Gliosis reactiva .....	29
3. Justificación .....	30
4. Hipótesis .....	31
5. Objetivo General .....	31
5.1 Objetivos Particulares .....	31

6. Material y método .....	32
6.1 Animales .....	32
6.2 Exposición con Vanadio .....	32
6.3 Preparación de las muestras .....	32
6.4 Inmunohistoquímica .....	33
6.5 Análisis Densitométrico .....	34
7 Resultados .....	35
7.1 Expresión de GFAP en retina de ratones expuestos a Vanadio .....	35
7.2 Expresión de GS en retina de ratones expuestos a Vanadio .....	36
8. Discusión .....	40
9. Conclusión .....	47
10. Bibliografía .....	48



## Lista de abreviaturas

1. MGC : Célula glial de Müller
2. GFAP : Proteína ácida fibrilar glial
3. GS : Glutamina sintetasa
4. CGG : Ciclo Glutamato / Glutamina
5. SNC : Sistema nervioso central
6. V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : Pentóxido de vanadio
7. CO : Monóxido de carbono
8. CO<sub>2</sub> : Dióxido de carbono
9. SO<sub>2</sub> : Dióxido de azufre
10. NO<sub>2</sub> : Dióxido de nitrógeno
11. O<sub>2</sub> : Oxígeno
12. DNA : Ácido desoxirribonucleico
13. ERO : Especies reactivas de oxígeno
14. PS : Partículas suspendidas
15. PM<sub>10</sub> : *Particulate matter* con diámetro aerodinámico ≤ 10 nm.
16. PM<sub>2.5</sub> : *Particulate matter* con diámetro aerodinámico ≤ 2.5 nm
17. MAP cinasas : Cinasas de proteína activadas por mitógenos.
18. 4-HNE : 4-Hidroxinonenal
19. BHE : Barrera hematoencefálica
20. NF-κB : Factor nuclear - kappaB
21. mRNA : Ácido ribonucleico mensajero
22. Glu : Glutamato
23. Gln : Glutamina
24. GABA : Ácido γ-aminobutírico
25. GLAST : Transportador glutamato / aspartato
26. NMDA : N-metil-D-aspartato
27. FGF : Factor de crecimiento fibroblástico
28. bFGF : Factor de crecimiento fibroblástico básico
29. PBS : Solución amortiguadora de fosfatos
30. HRP : Peroxidasa del rábano
31. DAB : Diaminobenzidina
32. ERKs : Cinasas reguladas extracelularmente
33. GRE : Elemento de respuesta a glucocorticoides
34. RG : Receptor de glucocorticoides
35. BrdU : Bromo-deoxiuridina
36. PCNA : Antígeno nuclear de proliferación celular

## 1. Resumen

El vanadio es un metal de transición que se adosa a las partículas suspendidas presentes en la atmósfera de ciudades con elevada contaminación, como la Ciudad de México. El ojo es un blanco importante ya que está expuesto directamente a la atmósfera y a los contaminantes que ya fueron absorbidos y distribuidos por la circulación sistémica. Así, llegan a la retina, sitio en el que se da la fototransducción. En la retina, el 90% de las glías presentes, corresponden a un tipo de astrocito, la glía radial llamada célula de Müller (MGC, por sus siglas en inglés), cuya distribución abarca desde la membrana limitante interna hasta la externa brindando soporte y estructura al tejido, asegura las sinapsis y regula tanto el microambiente, como el metabolismo neuronal de la retina.

La Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP, por sus siglas en inglés) es sobreexpresada cuando se inflinge un daño al tejido, por lo que representa un buen marcador de daño. Por otro lado, la Glutamina sintetasa (GS, por sus siglas en inglés) es una enzima específica de los astrocitos que forma parte del ciclo Glutamato / Glutamina (CGG) que transforma al glutamato en glutamina y detoxifica al tejido del exceso. Por lo que cualquier cambio en la expresión de GS, también se interpreta como un buen marcador de daño. Con el objetivo de estudiar el efecto de la exposición a vanadio en la MGC de la retina, se expusieron ratones macho de la cepa CD-1 a pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) por inhalación [0.02M] una hora, dos veces por semana durante 4 y 8 semanas, y se identificaron, los cambios en la expresión de GFAP y GS como marcadores de daño de las MGC en la retina de dichos animales. Se realizó densitometría en las fotomicrografías de retina con inmunohistoquímica para GFAP y GS, seguida de una prueba de ANOVA (con una prueba *post hoc* de Tukey) donde  $p < 0.05$ . Se encontró que la GFAP aumenta a las cuatro semanas de exposición a vanadio, con una diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control y con el de ocho semanas de exposición. A las ocho semanas disminuye la marca casi al nivel del grupo control; mientras que para la GS, se ve una disminución estadísticamente significativa a las ocho semanas comparada con el grupo control y con el de cuatro semanas.

El aumento de GFAP a las cuatro semanas podría ser evidencia de que las MGC experimentan gliosis reactiva, sin embargo, su posterior disminución a las ocho semanas, pudiera sugerir que la MGC se encuentra en un proceso de dediferenciación como consecuencia del daño por la exposición al vanadio. En dicho estado del desarrollo, no se expresa GFAP. Por otro lado, dado que la GS es una enzima específica de las células gliales cuyos niveles están determinados por sus sustratos, su disminución a las ocho semanas, sugiere que los fotorreceptores, que son las neuronas que producen en mayor cantidad glutamato en la retina, están degenerando en respuesta al insulto tóxico del vanadio. Los mecanismos mediante los cuáles se dan estos procesos pudieran ser tema de futuros estudios.

Se concluye que GFAP y GS son marcadores adecuados de daño celular ya que permiten explorar la toxicidad por la contaminación atmosférica en la retina, en especial, por el vanadio. Asimismo, existe daño en la retina de ratones macho de la cepa CD-1 por la exposición por inhalación al pentóxido de vanadio, en el que las MGC presentan gliosis reactiva y degeneración de los fotorreceptores.

## 2. Introducción

### 2.1 La contaminación atmosférica

Conforme se ha desarrollado la vida moderna, la contaminación atmosférica se ha convertido en un problema serio que compromete la salud. Las fuentes antropogénicas que generan y liberan contaminantes tales como gases y partículas a la atmósfera se han incrementado en los últimos años. Las principales fuentes son: la combustión de hidrocarburos, diversos productos industriales, el uso de aerosoles, entre otros (Avila-Costa *et al.*, 2005; Mussali-Galante y Fortoul, 2008; Valavanidis *et al.*, 2008).

La quema de combustibles fósiles genera partículas primarias que son liberadas a la atmósfera, por ejemplo, monóxido y dióxido de carbono (CO y CO<sub>2</sub>, respectivamente), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), formaldehído e hidrocarburos (Mussali-Galante y Fortoul, 2008). Se ha encontrado que al aumentar la concentración de SO<sub>2</sub> en la atmósfera, hay una mayor mortalidad de personas expuestas a las partículas suspendidas, un incremento en los casos de asma, así como reporte de otros signos y síntomas respiratorios como: tos, flemas, broncoconstricción e irritabilidad. Respecto al CO, se ha encontrado que hay picos de mayor concentración del contaminante en la atmósfera, los cuales corresponden a las horas en las que hay más tránsito vehicular. El CO se absorbe al inhalarlo y reacciona con la hemoglobina en la sangre por lo que disminuye la capacidad de ésta de transportar el oxígeno. Produce dolores de cabeza, mareo, coma, fallas respiratorias y en altas concentraciones, la muerte. El NO<sub>2</sub> se ha visto relacionado con enfermedades respiratorias agudas y falla en la función pulmonar (Valavanidis *et al.*, 2008)

Sin embargo, como partículas secundarias, algunos de estos contaminantes pueden reaccionar con la luz solar y dar lugar a otros productos, como el ozono (O<sub>3</sub>), potente oxidante y posible cancerígeno que daña el DNA (Avila-Costa, *et al.*, 2007; Mussali-Galante y Fortoul, 2008).

Los contaminantes al entrar en contacto con los organismos vivos, generan especies reactivas de oxígeno (ERO) que dañan a los tejidos y ocasionan

inflamación, así como mayor permeabilidad de vasos, lo que ocasiona edema (Valavanidis *et al.*, 2008; Mussali-Galante y Fortoul, 2008).

A través de estudios epidemiológicos se sabe que los principales efectos en la salud son a) incremento en la mortalidad de personas mayores y de los pacientes con enfermedades crónicas; b) efectos se agudizan en personas mayores con enfermedades cardiopulmonares; c) aumento en los casos de irritación en los ojos y sistema respiratorio (Valavanidis *et al.*, 2008).

### 2.1.1 Partículas Suspendidas

Los gases se inhalan fácilmente, pero la entrada de partículas suspendidas (PS) al organismo, depende de su tamaño y forma (Valavanidis *et al.*, 2008) (**Figura 1**). Según el Programa Internacional de Seguridad Química (IPCS, por sus siglas en inglés) (1997), mientras más pequeña sea la partícula, más profundo penetrarán en las vías respiratorias (**Figura 2**). Las PS tienen adosadas diversos elementos, entre ellos se encuentran algunos metales (Avila-Costa, *et al.*, 2007; Valavanidis *et al.*, 2008; Fortoul, *et al.*, 2011).

Las PM<sub>10</sub> (*particulate matter*), o también llamadas fracción respirable, son partículas con un diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$ . Las partículas más gruesas habitualmente se retienen en las vías respiratorias altas, bronquios y bronquiolos. Incluyen polvo, carbón y cenizas, carbonatos, óxidos de metales como Si, Al, Mg, Ti, Fe, cloruro de sodio, sal de mar, polen y esporas (Mussali-Galante y Fortoul, 2008; IPCS, 1997). Mientras que las partículas finas tienen un diámetro aerodinámico de  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ , por lo que pueden penetrar hasta las vías aéreas menores y producir fallas respiratorias y cardiovasculares, estrés oxidante por generación de ERO, inflamación (producción de factor de necrosis tumoral e interleucinas), entre otros (Valavanidis *et al.*, 2008). Las partículas con diámetro aerodinámico  $\leq 2.5 \mu\text{m}$ , consisten en sulfatos, nitratos, amonio, iones de hidrógeno, carbón, compuestos orgánicos, metales como Pb, Cd, V, Ni, Cu y Zn y partículas unidas al agua (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Avila-Costa, *et al.*, 2007; Mussali-Galante y Fortoul, 2008).

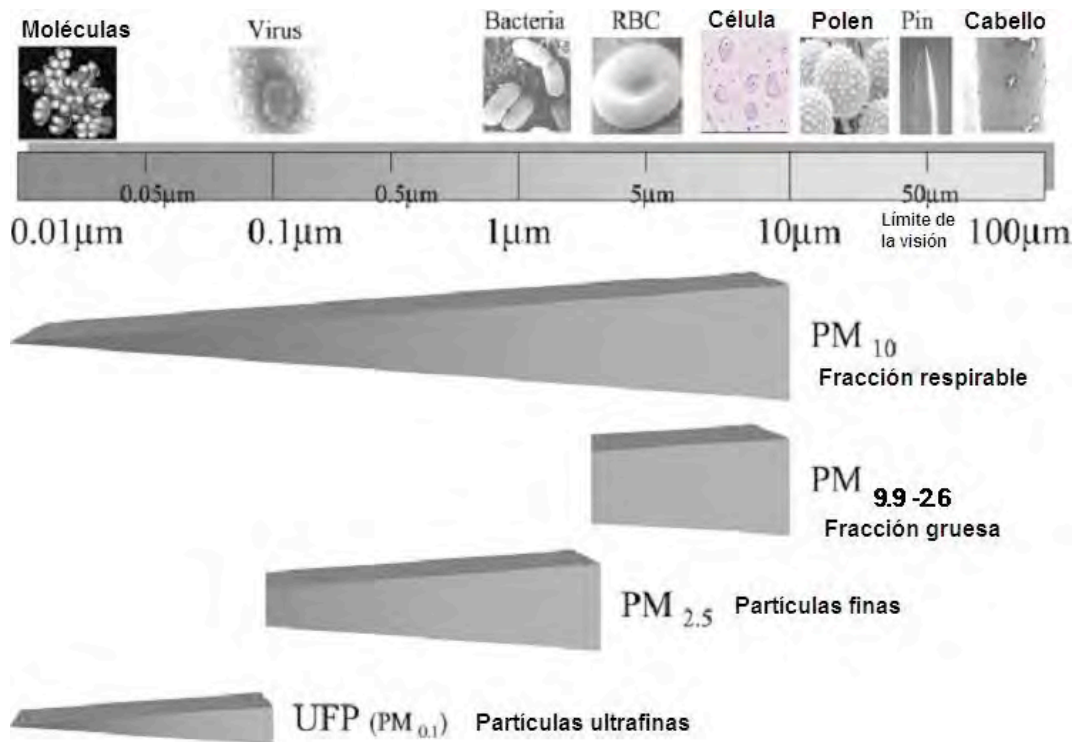
El mecanismo más importante propuesto para explicar la relación de la exposición a partículas suspendidas y las enfermedades cardiovasculares,

infecciones y cáncer, es el estrés oxidante mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Mussali-Galante y Fortoul, 2008; Valavanidis *et al.*, 2008).

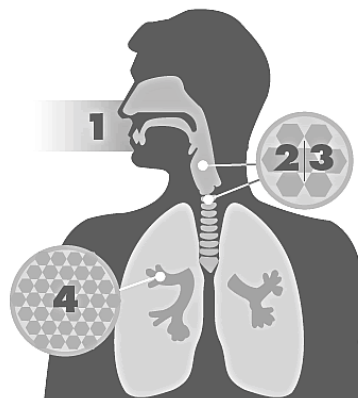
Los organismos aeróbicos cuentan con moléculas que contrarrestan los efectos del estrés oxidante llamadas antioxidantes, ya sea enzimáticos o no enzimáticos y les ayuda a mantener un equilibrio en los procesos de oxidoreducción de las macromoléculas (Elejalde, 2001). Sin embargo, cuando incrementan las ERO y radicales libres de fuentes exógenas sin control, por ejemplo provenientes de la contaminación ambiental, puede cambiar el estado redox de la célula. Esto da inicio a cascadas de señalización que promueven la inflamación, la peroxidación de membranas lipídicas y el daño al DNA (Valavanidis *et al.*, 2008).

De acuerdo con Valavanidis y colaboradores en 2008, el daño citotóxico por estrés oxidante, producto de la inhalación de PS, se ha propuesto que se lleva a cabo de tres maneras:

- 1) Al inicio del incremento en el estrés oxidante, algunos factores de transcripción inducen la expresión de determinados antioxidantes y enzimas que detoxifican el ambiente intracelular (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa, entre otras) capturando o destruyendo las ERO.
- 2) Si se logra controlar el estrés oxidante, no habrá efecto citotóxico, pero si no se controla y la intensidad es mucho mayor, seguirán aumentando las ERO en la célula resultando en un proceso inflamatorio y necrosis. Esto es por la activación de la cascada de señalización de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP cinasas) y Factor nuclear - kappaB (NF-κB) que inducen la expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión.
- 3) Si la magnitud del estrés oxidante fue menor pero no fue controlado, la mitocondria libera factores proapoptóticos que desencadenan la apoptosis celular. Esto ocasiona menor daño tisular que la necrosis.



**Figura 1.** Tamaño de las partículas comparado con parámetros conocidos. Tomada y modificada de la revisión de Fortoul y Rojas, 2007.



**Figura 2.** Entrada de partículas suspendidas al organismo. 1) Las partículas suspendidas entran a través de la nariz y la garganta; 2,3) las partículas suspendidas más grandes (PM<sub>10</sub>) pueden ser eliminadas del organismo al toser o estornudar; mientras que 4) las partículas suspendidas más pequeñas (PM<sub>2.5</sub>) pueden penetrar hasta los alvéolos llevando tóxicos al torrente sanguíneo. Tomada y modificada de: <http://www.bcairquality.ca/health/air-quality-and-health.html> el 10 de enero de 2014.

### **2.1.2 Metales**

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, y aunque algunos son esenciales para las células y su metabolismo, en altas concentraciones, pueden tener propiedades genotóxicas, citotóxicas y carcinogénicas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

### **2.1.3 Vanadio**

El vanadio (V) es el elemento número 22 en abundancia en la Tierra (0.014 - 0.02 %) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006), es el primer metal de transición del grupo VB de la tabla periódica y tiene como número atómico 23 (Avila-Costa *et al.*, 2005). Se encuentra principalmente en combustibles de origen fósil, en especial, en los petróleos crudos de América como los de México y Venezuela (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Fortoul, *et al.*, 2011). De manera natural, se libera a la atmósfera a través de erupciones volcánicas, incendios forestales y con la erosión del suelo. Sin embargo, se considera un contaminante ambiental ya que su liberación a la atmósfera es principalmente (91%) antropogénica a través de la quema de combustibles fósiles y la actividad industrial. Para la Ciudad de México se han reportado valores de vanadio en aeropartículas PM<sub>10</sub> que alcanzan 0.114 µg/m<sup>3</sup> mientras que en áreas rurales se registran cantidades menores a 0.024 µg/m<sup>3</sup> (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

En los residuos sólidos de la combustión de gasolinas y aceites, puede quedar hasta un 60% de vanadio, en forma de pentóxido de vanadio. Este compuesto posteriormente es utilizado en la industria de las pinturas y pigmentos, en la manufactura del ácido sulfúrico y para brindar protección a los vidrios contra los rayos ultravioleta, entre otros (Barceloux, 1999).

En estudios hechos con voluntarios, se observó que la exposición aguda (de 0.2 a 1 mg/m<sup>3</sup>) a óxidos de vanadio induce fiebre, conjuntivitis, dermatitis, vómito, diarrea, problemas respiratorios, temblores y daño renal (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Además de estar presente en el aire, el vanadio también se encuentra en los alimentos. Sin embargo, cuando se inhala, el porcentaje que ingresa al torrente sanguíneo es mayor comparado con el que se ingiere (25 y 10%,

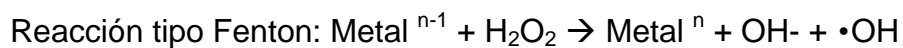


respectivamente), mientras que por la piel, éste es mínimo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Los estados de oxidación del vanadio van de -1 a +5, sin embargo, solo  $V^{III}$ ,  $V^{IV}$  y  $V^V$  tienen funciones biológicas conocidas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Una vez que los compuestos de vanadio son distribuidos por el torrente sanguíneo, el vanadio entra a la célula como vanadato ( $V^V$ ,  $H_2VO_4^-$ ) por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato y en el interior, se reduce al catión vanadilo ( $V^{IV}$ ). Una vez dentro de la célula, presenta preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas (Barceloux, 1999; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Interfiere con las cascadas de señalización dependientes de calcio, cambia el transporte transepitelial, incrementa la permeabilidad endotelial y elimina la función de la barrera epitelial (Avila-Costa *et al.*, 2005).

El  $V^{III}$  y  $V^{IV}$  actúan como potente oxidante ya que pueden producir radicales hidroxilo por la inducción de citocinas proinflamatorias (Avila-Costa *et al.*, 2005; Fortoul, *et al.*, 2011) y por reacciones tipo Fenton, lo que genera estrés oxidante en las células (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).



Si el radical libre no es inactivado, causará daños a la célula y puede hacerlo vía la unión a un blanco o capturando un hidrógeno del blanco. Los radicales libres, se pueden unir a biomoléculas y alterar su función (Peña *et al.*, 2001). Además, si el radical libre captura un hidrógeno de la molécula blanco, la convierte a su vez, en radical libre. La sustracción de hidrógeno del DNA produce rompimiento o ligaduras cruzadas de las cadenas, mientras que la sustracción a los lípidos inicia la peroxidación de estos compuestos (Peña *et al.*, 2001).

Posteriormente el vanadio es eliminado por la orina en dos fases; a las 20 horas se elimina la mayor parte y el resto se elimina de 40 a 50 días después (Barceloux, 1999; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). La fase

lenta se cree que está dada por la liberación gradual del vanadio de los órganos a los que se distribuyó (Avila-Costa, *et al.*, 2007).

Se ha encontrado evidencia en humanos de que el vanadio, una vez dentro del torrente sanguíneo, es transportado por la albúmina y la transferrina a varios órganos (Revisado por Avila-Costa, *et al.*, 2007). En animales de experimentación que fueron expuestos a vanadio, se han reportado cambios en hueso y dientes (Fortoul y Ruiz, 2007), hígado (Fortoul *et al.*, 2011), bazo (Fortoul *et al.*, 2009), aparato reproductor masculino (Mussali-Galante *et al.*, 2005), sistema nervioso central (Ávila-Costa *et al.*, 2004; 2005; 2006; 2007), aparato respiratorio (Bonner *et al.*, 2000), en la médula de nódulos linfáticos (Fortoul *et al.*, 2011), en las plaquetas y en el timo (González-Villalva *et al.*, 2006), entre muchos otros. Asimismo, se ha visto que se acumula como V<sup>IV</sup> particularmente en hígado, riñón, hueso y bazo, corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso, mientras que en pulmones y testículos se concentra en menor cantidad (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Además, el V<sup>IV</sup> puede atravesar la placenta y llegar al feto (Domingo, 1996).

### **2.1.3.1 Vanadio en el Sistema Nervioso Central**

El Sistema Nervioso Central (SNC) es vulnerable ante el estrés oxidante por su alto consumo de oxígeno (Fortoul, *et al.*, 2011). Acorde con esto, se ha reportado en ratones macho de la cepa CD-1 que han inhalado pentóxido de vanadio, reducción de espinas dendríticas en las células granulares del bulbo olfatorio y apoptosis (Ávila-Costa *et al.*, 2007); en el piso del cuarto ventrículo cerebral, se ha observado estrés oxidante, pérdida de cilios, mientras que los remanentes tienden a conglomerarse, el epitelio ependimal se ve desprendido de la membrana basal, así como pérdida de las uniones ocluyentes en dicho epitelio (Ávila-Costa *et al.*, 2005), así como edema en el pie de los astrocitos que conforman la barrera hematoencefálica (BHE) (Colin-Barenque *et al.*, 2012); pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y como consecuencia, alteraciones morfológicas de las neuronas espinosas medianas (Ávila-Costa *et al.*, 2004); deterioro en la memoria espacial como consecuencia

de muerte neuronal, pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales, necrosis y alteraciones en el neuropilo del hipocampo (Ávila-Costa *et al.*, 2006) y en la retina, estrés oxidante y degeneración de los fotorreceptores (Quezada, 2013).

Ya que la BHE protege al SNC de insultos químicos, al dañarse, se permite el paso de moléculas del tejido neural hacia el líquido cefalorraquídeo, pudiendo ser éste, otro medio de distribución del vanadio (Avila-Costa *et al.*, 2005). Además, al activarse los astrocitos, microglía y células endoteliales, producen citocinas y moléculas proinflamatorias que pasan a través de la barrera hematoencefálica dañando al tejido nervioso (Avila-Costa *et al.*, 2005).

Aún quedan muchos aspectos que conocer del SNC y su relación con los contaminantes de la atmósfera, por ejemplo, la retina. En 1985, Del Priore y Lewis, observaron que los iones vanadato, tungsteno y molibdato, activan una proteína involucrada en la activación de la cascada de señalización de la fototransducción del segmento externo de los bastones, denominada fosfodiesterasa. Sin embargo, no se han realizado estudios que nos permitan conocer la participación de las células gliales de la retina en organismos expuestos a vanadio.

## **2.2 El ojo**

El ojo es un órgano sensorial que actúa como aparato de la visión y a través del nervio óptico, transmite los impulsos al cerebro para su interpretación (Ross *et al.*, 2007; Junqueira y Carneiro, 2005).

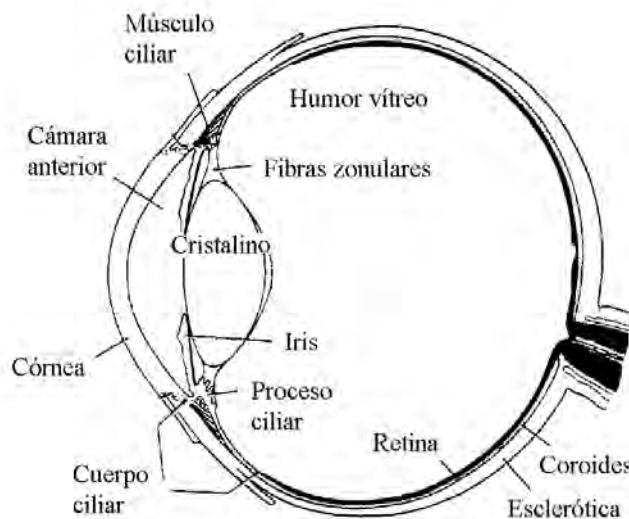
### **2.2.1 Estructura del Ojo**

El ojo está constituido por el globo ocular que mide alrededor de 25 mm de diámetro y está formado por tres capas (**Figura 3**) (Ross *et al.*, 2007; Junqueira y Carneiro, 2005):

1. **Capa exterior o Túnica fibrosa;** conserva la forma del globo ocular y está constituida por la córnea en su porción anterior, y el resto es la capa esclerótica.

2. **Capa media o túnica vascular;** también denominada coroides en la porción posterior. Presenta alta irrigación y a partir de esta capa, los nutrientes difunden a la retina. En la parte anterior se encuentra el iris, encargado de regular la entrada de luz por la pupila, seguido de una porción engrosada, denominado cuerpo ciliar. El tercio anterior del cuerpo ciliar tiene alrededor de 75 crestas radiales o también llamados procesos ciliares desde los cuales emergen fibras zonulares que se extienden hacia el cristalino. Del cuerpo ciliar se continúa la coroides hacia la parte posterior del ojo; es la porción de la túnica vascular que cubre la retina.

3. **Capa interior o retina;** Forma parte del SNC y consta de dos componentes, el epitelio pigmentario (con melanina) y la retina nerviosa con las células fotorreceptoras y redes neuronales.



**Figura 3.** Esquema en vista sagital de un globo ocular. A la izquierda se encuentra la parte anterior y del lado derecho, la parte posterior del ojo. Tomado y modificado de: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/publicaciones/fisiovet/tema4.html> el 9 de enero de 2014.

## 2.3 Retina

Es la capa en la que se realiza la fototransducción, proceso en el cual se recibe un fotón y éste genera una respuesta nerviosa en los fotorreceptores, la cual se distribuye y se transmite a la corteza visual de los lóbulos occipitales del cerebro (Lledó *et al.*, 2010). Por lo que consta de células fotorreceptoras, neuronas de conducción, de asociación y células de sostén.

En la retina nerviosa se distinguen dos regiones con función diferente: la región fotosensible que reviste la superficie interna del ojo, excepto donde nace el nervio óptico y la región no fotosensible que reviste la superficie interna del cuerpo ciliar y la superficie posterior del iris (Ross *et al.*, 2007; Junqueira y Carneiro, 2005).

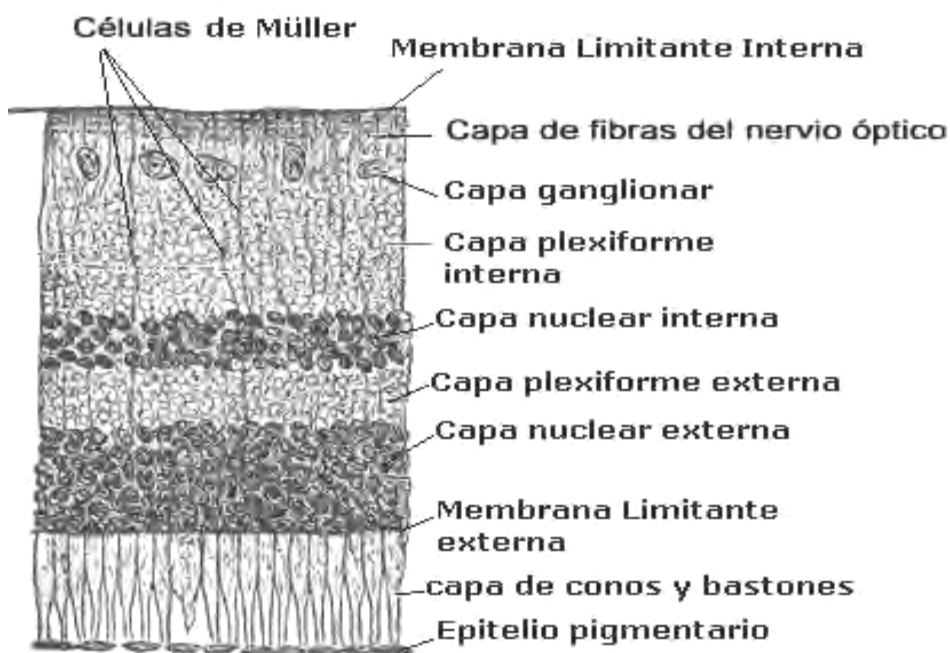
La retina de los vertebrados contiene diferentes tipos celulares:

- **Fotorreceptores;** conos y bastones.
- **Neuronas de conducción;** células bipolares y ganglionares.
- **Neuronas de asociación;** neuronas horizontales y amacrinas.
- **Células de sostén;** célula glial de Müller (MGC, por sus siglas en inglés), microgliocitos y astrocitos.

La distribución de los núcleos y prolongaciones celulares, así como la asociación entre las células determinan que la retina se encuentre dividida en 10 capas diferentes (**Figura 4**). Descritas de afuera hacia adentro (Ross *et al.*, 2007; Junqueira y Carneiro, 2005):

1. **Epitelio pigmentario (EP);** es la capa más externa de la retina, sin embargo, no forma parte de la retina nerviosa.
2. **Capa de fotorreceptores (CF);** contiene los segmentos externos de las células fotorreceptoras (conos y bastones).
3. **Membrana limitante externa (MLE);** formada por las uniones adherentes entre MGC en su porción apical y con los fotorreceptores.
4. **Capa nuclear externa (CNE);** contiene los cuerpos celulares y núcleos de las células fotorreceptoras (segmento interno).

5. **Capa plexiforme externa (CPE)**; contiene las prolongaciones de los conos y bastones y las prolongaciones de las células horizontales, las células amacrinas y las neuronas bipolares donde se realiza sinapsis.
6. **Capa nuclear interna (CNI)**; contiene los cuerpos celulares y núcleos de las neuronas bipolares, horizontales, amacrinas y las MGC.
7. **Capa plexiforme interna (CPI)**; contiene las prolongaciones de las neuronas horizontales, bipolares, amacrinas y ganglionares que hacen sinapsis entre sí.
8. **Capa ganglionar (CG)**; contiene los cuerpos celulares y núcleos de las neuronas ganglionares.
9. **Capa de fibras del nervio óptico (CFNO)**; constituida por los axones de las células ganglionares que salen al cerebro.
10. **Membrana limitante interna (MLI)**; conformada por el revestimiento de las terminaciones expandidas del pie celular de las MGC. Separa la retina del cuerpo vítreo.



**Figura 4.** Esquema de las diez capas que conforman la retina. Tomado y modificado de: <http://medicinafarmacologia.blogspot.mx/2010/11/capas-de-la-retina.html> el 9 de enero de 2014.

El funcionamiento de la retina consume elevadas cantidades de oxígeno y está expuesta a la luz, lo que la hace especialmente susceptible al estrés oxidante (Ballatori *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Fotorrecepción y fotorreceptores

En la retina existen moléculas especializadas en absorber la energía que llega de los fotones incidentes llamadas ftopigmentos y pueden estar en dos grupos principales de fotorreceptores. Los **fotorreceptores ciliados**, que poseen un único cilio que se extiende desde la célula y generalmente con una membrana muy plegada que contiene a los ftopigmentos y los **fotorreceptores rabdoméricos** o también llamados fotorreceptores con microvellosidades, en donde la superficie apical de la célula está cubierta por múltiples evaginaciones llamadas microvellosidades que contienen a los pigmentos (Moyes y Schulte, 2007).

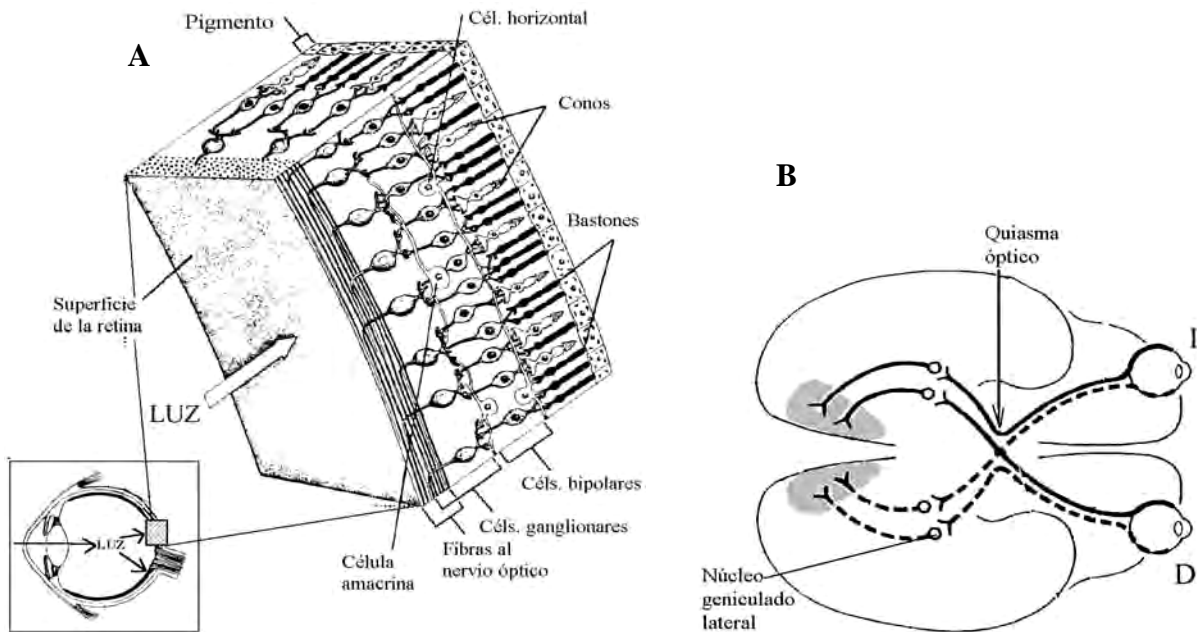
En vertebrados encontramos fotorreceptores ciliados sin embargo se dividen en dos tipos; los conos y los bastones. Gracias a éstos se da la fotorrecepción, que es la capacidad de detectar una pequeña parte del espectro electromagnético que va desde el ultravioleta hasta los infrarrojos (Moyes y Schulte, 2007).

### 2.3.2 Captura de estímulos

Una vez que la energía transportada por los fotones incidentes de los rayos de luz es absorbida por los ftopigmentos de los fotorreceptores, se da un cambio conformacional en las moléculas que inicia una cascada de transducción de la señal en la célula cuyo resultado es un cambio del potencial en la membrana. De esta manera los impulsos nerviosos pasan a las células bipolares y posteriormente a las ganglionares que tienen axones que salen del globo ocular por el nervio óptico hacia el cerebro. Donde se inicia el nervio óptico, llamado disco óptico, es por donde penetran los vasos sanguíneos y constituye un punto ciego ya que no hay fotorreceptores (Moyes y Schulte, 2007).

Los rayos luminosos convergen en la fovea central y en consecuencia se distinguen los objetos con claridad; para captar la profundidad de los objetos, las imágenes de la retina se enciman.

Los dos nervios ópticos se dirigen hacia la región occipital y algunas de sus fibras se cruzan al lado opuesto. A partir de este cruzamiento llamado quiasma óptico, se inicia el tracto óptico que pasa a los tubérculos cuadrigéminos, al tálamo y a la corteza cerebral (Moyes y Schulte, 2007), como se observa en la **Figura 5**.



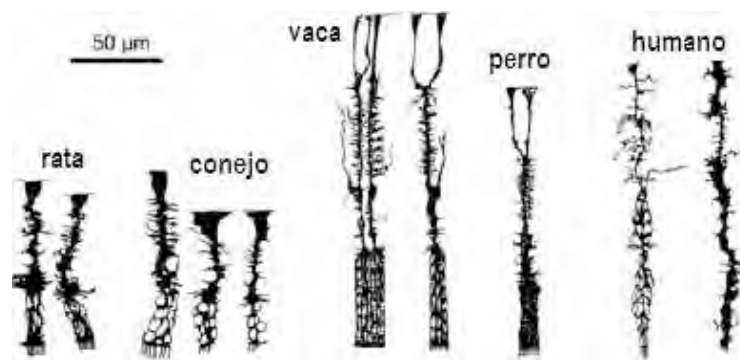
**Figura 5.** A) Esquema en vista sagital del ojo en el cual se resalta una porción de la retina, sus respectivas células acomodadas en capas y la dirección de la incidencia de los rayos de luz. B) Esquema del encéfalo visto desde arriba en el que se ve el trayecto de los nervios ópticos desde el globo ocular, hasta la corteza cerebral. Tomada y modificada de:

<http://www.uco.es/organiza/departamentos/publicaciones/fisiovet/tema4.html> el 9 de enero de 2014.

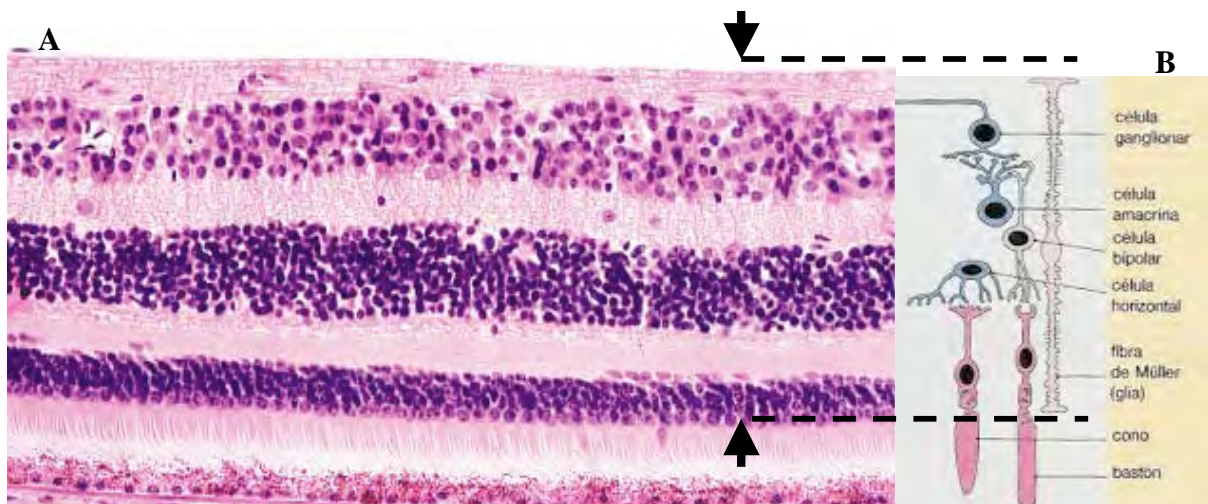


## 2.4 Célula glial de Müller y su función en la retina.

En la retina se encuentran diferentes tipos de glía, el 90% lo forma las células de Müller (MGC), seguida de los astrocitos y la microglía. Las MGC son células gliales radiales de origen neuroectodérmico, alargadas y con sus núcleos en la capa nuclear interna. La morfología y tamaño de las MGC varía en diferentes mamíferos (**Figura 6**). Estas células abarcan gran parte del ancho de la retina, desde la membrana limitante externa hasta la interna (**Figura 7**) (Huster, *et al.*, 2000; Sarthy y Ripps, 2002; Bringmann, *et al.*, 2006).



**Figura 6.** Dibujos a partir de preparaciones con impregnaciones argénticas (Técnica de Golgi) donde se muestra la morfología y tamaño de la Célula glial de Müller en diferentes mamíferos. Tomada y modificada de Reichenbach y Bringmann, 2010.



**Figura 7.** A) Foto de retina teñida con Hematoxilina y Eosina a 40x. B) Esquema que demuestra la localización de la MGC respecto a la organización de las capas celulares de la retina. Tomada y modificada de: A) [http://mx.fotolog.com/bubu\\_flogger/37270736/](http://mx.fotolog.com/bubu_flogger/37270736/) B) <http://conocimientos-histologia.blogspot.mx/2010/11/anatomia-microscopica.html>

La MGC almacena glucógeno y tiene un metabolismo basado en la glucólisis, por lo que brinda lactato y piruvato a las neuronas aledañas favoreciendo los procesos metabólicos; recicla fotopigmentos (Huster *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2007; Bringmann *et al.*, 2006), sintetiza antioxidantes como glutatión (Rice y Russo-Menna, 1997) y mantiene la homeostasis extracelular del tejido ya que los procesos de esta glía radial envuelven a los somas, axones y dendritas de las neuronas presentes a lo largo de la retina (Huster *et al.*, 2000).

No aíslan a las neuronas, ya que las sinapsis eléctricas o químicas entre éstas, no se ven obstruidas por dicha envoltura glial. Al contrario, se ha propuesto que favorecen las sinapsis ya que proveen sustratos energéticos, reciclaje y precursores de neurotransmisores (Sarthý y Ripps, 2002; Lewis y Fisher, 2003; Bringmann, *et al.*, 2006; 2009).

La MGC protege a la retina de la excitotoxicidad por el exceso de glutamato ya que disminuye los niveles de este neurotransmisor en el microambiente neuronal incorporándolo a su citoplasma. Una vez dentro de la célula glial, lo utiliza para sintetizar glutamina a través de la enzima glutamina sintetasa (GS) y posteriormente sintetizar el antioxidante glutatión, los cuales son liberados y aprovechados por las neuronas (Huster *et al.*, 2000; Bringmann *et al.*, 2009).

Durante el desarrollo, la MGC promueve la diferenciación de los fotorreceptores por la síntesis y secreción del ácido retinoico y la sobrevivencia de las neuronas ganglionares (García *et al.*, 2003; Bringmann *et al.*, 2006). Las MGC se activan cuando hay daño en el tejido. Proliferan y cambian el patrón de expresión de proteínas específicas de la célula, por ejemplo la GS y sobreexpresan algunos filamentos intermedios generando un proceso denominado gliosis reactiva (Lewis y Fisher, 2003; Bringmann *et al.*, 2009), el cual se abordará posteriormente.

### 2.4.1 Citoesqueleto

El citoesqueleto de las células animales es una red de fibras protéicas altamente estable que brinda estructura, compuesta por filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (7nm, 10nm y 25nm de diámetro respectivamente). A diferencia de los filamentos de actina y los microtúbulos que tienen funciones específicas y ya conocidas en las células; la expresión de los filamentos intermedios varía de acuerdo con el tipo celular, el estado de desarrollo y en condiciones patológicas (Lewis y Fisher, 2003; Peña *et al.*, 2001).

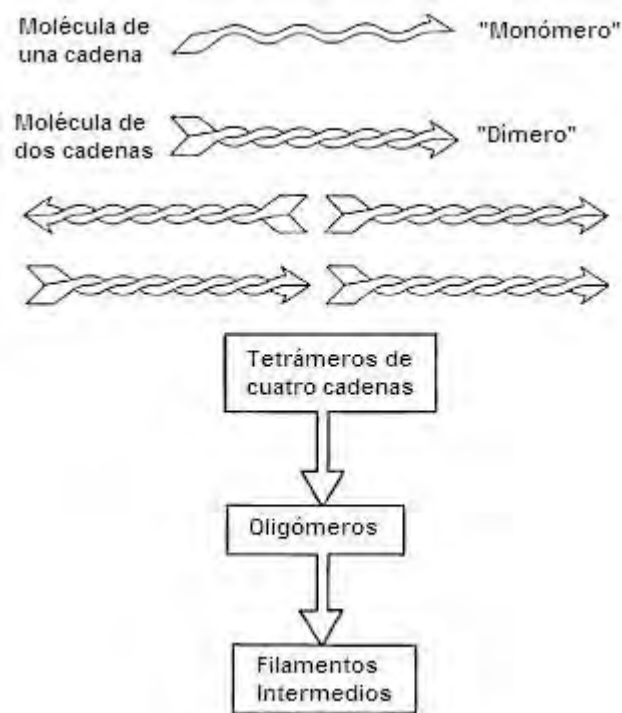
### 2.4.2 Filamentos Intermedios

Se descubrieron como un tipo de filamentos de grosor intermedio (de 8 a 12 nm) entre los de actina y los de miosina con la técnica de microscopía electrónica en las células musculoesqueléticas de embriones de pollo (Parry *et al.*, 2007). La región central de la molécula consiste en aproximadamente 310 aminoácidos y es la misma para todos los filamentos intermedios, lo que varía en tamaño, volumen y composición de aminoácidos, son los dominios de la cabeza y de la cola. Esto brinda una especificidad inmunológica y funcional a cada proteína (Lewis y Fisher, 2003; Peña *et al.*, 2001).

Para ensamblarse, los filamentos intermedios se empiezan a asociar en dímeros, posteriormente se combinan dos dímeros, resultando en un tetrámero. Finalmente, se juntan varios tetrámeros hasta formar filamentos de aproximadamente 10nm, ya sean homopolímeros o heteropolímeros (**Figura 8**) y se pueden clasificar en seis diferentes tipos según su secuencia de aminoácidos y el tipo celular que los presenta: Tipo I y II (queratinas neutras, ácidas y básicas en epitelios), Tipo III (desmina en músculo, proteína ácida fibrilar glial en células astrogiales, vimentina en células mesenquimáticas, periferina en neuronas), Tipo IV (neurofilamentos y  $\alpha$ -internexina en neuronas), Tipo V (láminas nucleares) y Tipo VI (nestina en SNC y células precursoras de músculo) (Stewart, 1990; Lewis y Fisher, 2003).

La polimerización de los filamentos intermedios se ve influenciada por el pH, los iones presentes y la fosforilación (Stewart, 1990). Se ha visto que los iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  favorecen la polimerización posiblemente por

la unión directa de estos cationes a la proteína. Por lo menos para la GFAP, ya se han detectado sitios específicos de unión a calcio. En cuanto a la polimerización por fosforilación, se ha observado *in vitro* e *in vivo* cierta influencia, ya sea para ensamblar los filamentos, como para desensamblarlos. Esto es confirmado por estudios que se han realizado, en donde la desmina y la vimentina se fosforilan al mismo tiempo que los demás filamentos de la célula que se desensamblan para la mitosis (Stewart, 1990).



**Figura 8.** Ensamblaje de los filamentos intermedios (con un diámetro de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ), desde monómeros hasta polímeros. Tomada y modificada de Stewart, 1990.

### 2.4.3 Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP).

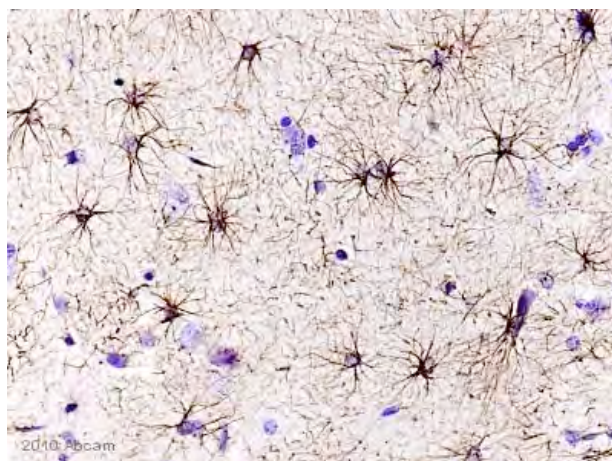
Las proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto glial posiblemente más estudiados, son la Vimentina y la GFAP (Sarchy y Ripps, 2002; Lewis y Fisher, 2003).

A través de estudios en donde se inhibe la expresión de GFAP, se sabe que esta proteína está implicada en la regulación del crecimiento, estabilidad, forma e hipertrofia de astrocitos en cultivo, así como en la formación de la cicatriz glial (Lewis y Fisher, 2003). Es decir, cuando hay un daño en el SNC, los astrocitos

se activan (Bringmann *et al.* 2009), aumentan su tamaño y proliferan en el tejido, cubriendo los espacios dejados por las neuronas dañadas, por lo que llenan su citoplasma de filamentos intermedios (Lewis y Fisher, 2003).

Sin embargo, en la retina, son las MGC y no los astrocitos las que se activan y sobreexpresan filamentos intermedios, generalmente GFAP y vimentina (Lewis y Fisher, 2003; Bringmann *et al.* 2009).

Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha comprobado que la vimentina, en el pie celular de las MGC, se encuentra desde el desarrollo hasta el estado adulto. La GFAP, además de estar presente abundantemente en los astrocitos (**figura 9**), también se encuentra en el pie celular de las MGC, pero en menor cantidad, rara vez alcanzando la capa plexiforme interna (Sarthy y Ripps, 2002). Se sabe por hibridación *in situ* que el mRNA de GFAP es exportado del núcleo a esta zona y es aquí donde se da la síntesis protéica (Lewis y Fisher, 2003). Debido a esto, a partir de la “región de crecimiento” en el pie celular, los filamentos se empiezan a expandir al resto de la célula. Cuando hay sobreexpresión principalmente es resultado de algún daño lumínico, trauma, estrés celular (isquemia), desprendimiento de la retina, glaucoma, retinopatía diabética, degeneración de la mácula por envejecimiento o insulto químico (Sarthy y Ripps, 2002; Lewis y Fisher, 2003; Bringmann *et al.* 2009), por lo que representa un buen marcador de daño tisular.



**Figura 9.** Astrocitos de cerebro GFAP positivos. Tomada de <http://www.abcam.com/gfap-antibody-ab7260.html> el 9 de enero de 2014.

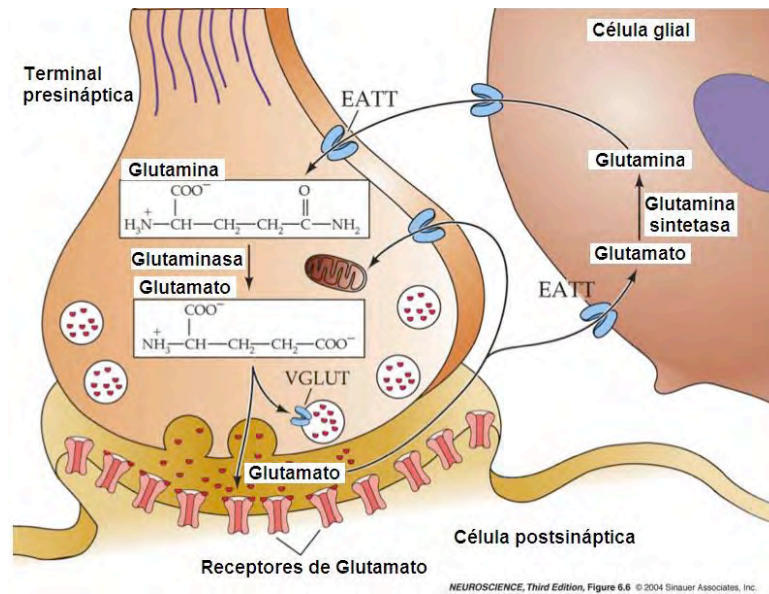
## 2.5 Glutamina sintetasa en el Ciclo Glutamato / Glutamina (CGG).

El glutamato (Glu) es el neurotransmisor excitatorio por excelencia del SNC y es usado en la transmisión del impulso lumínico en los fotorreceptores, las neuronas bipolares y las ganglionares (Sarthý y Ripps, 2002; Bringmann *et al.*, 2009). En condiciones patológicas como isquemia, glaucoma, retinopatía diabética, degeneración hereditaria de los fotorreceptores o malfuncionamiento de los transportadores gliales de Glu, dicho neurotransmisor, se encuentra en exceso extracelularmente. Las neuronas sufren de excitotoxicidad al ser activadas constantemente lo cual deriva en muerte celular (Bringmann *et al.*, 2013). Por otro lado, la glutamina (Gln) es el aminoácido que representa la intersección del ciclo del amonio con el del neurotransmisor Glu e indirectamente con el de GABA (Sidoryk-Wegrzynowicz y Aschner, 2013), neurotransmisor inhibitorio de la retina cuyo excedente extracelular es incorporado por la MGC (Bringmann *et al.*, 2013).

La MGC actúa como neuroprotector ya que elimina del ambiente neuronal el exceso de Glu transformándolo en una forma inactiva, la Gln (**Figura 10**). El Glu entra a la célula por medio del transportador de aspartato/glutamato (GLAST, transportador específico de la MGC), y una vez dentro, la GS, enzima específica de la MGC cuya distribución abarca la totalidad de la célula, lo convierte en Gln a través de una reacción de aminación que consume energía (Pérez, 2006; Sidoryk-Wegrzynowicz y Aschner, 2013).

Asimismo, el neurotransmisor GABA, al ser internalizado por la glía, se convierte en Glu y entra al ciclo de glutamato / glutamina. La Gln es liberada de la MGC y aprovechada por las neuronas que en su interior, a través de una glutaminasa, sintetizan de nuevo Glu y GABA, dependiendo de sus necesidades (Bringmann *et al.*, 2006). El Glu puede entrar al ciclo de Krebs donde es convertido a 2-oxoglutarato. De esta manera se estimula la glucólisis, que representa una vía de desintoxicación de glutamato en las células gliales y se potencia la exportación de lactato, fuente de energía neuronal (Pérez, 2006).





**Figura 10.** Interacción glia-neurona en el ciclo Glutamina / Glutamato. Tomada y modificada de <http://www.studyblue.com/notes/n/neuro-exam-2/deck/1317431> el 9 de enero de 2014.

## 2.6 La MGC en condiciones patológicas

### 2.6.1 Gliosis reactiva

Cuando hay estrés o se genera un daño en la retina, la MGC tiene un papel protector a través de la denominada gliosis reactiva (Lewis y Fisher, 2003; Bringmann *et al.*, 2006; 2009) que se presenta cuando hay algún trauma. El proceso inicia el día del insulto y cuando se trata de alguna enfermedad degenerativa o envejecimiento, se puede dar a lo largo de meses o años (Lewis y Fisher, 2003).

La activación de la glía consiste en intentar detener el daño y preservar la función tisular lo cual conlleva cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, por ejemplo, la sobreexpresión de GFAP a lo largo de la célula. Se liberan factores neurotróficos, de crecimiento, antioxidantes, citocinas, eritropoyetina, incorpora glutamato del ambiente extracelular, lo transforma en glutamina a través de la GS y posteriormente es liberada al ambiente extracelular (Rice y Russo-Menna, 1997).

Cuando en la retina ocurre un daño y hay muerte celular, la MGC puede actuar como célula progenitora, proliferar, migrar y posteriormente dar origen a células con fenotipo neuronal y glial (Hicks *et al.*, 1991; Fischer y Reh, 2001; Fischer *et al.*, 2002; Kohno *et al.*, 2006; Bringmann *et al.*, 2006; Bernardos *et al.*, 2007; Bringmann *et al.*, 2009). Estas respuestas pueden estar moduladas por la síntesis de factores de crecimiento o en respuesta a éstos (Hicks *et al.*, 1991). Tyler y Burns en 1991 observaron que al inyectar subcutáneamente uretano a ratas recién nacidas, la MGC sobre expresa GFAP modificando su morfología como un intento de reorganizar a la retina dañada, tratando de compensar la pérdida de los fotorreceptores. Fischer y Reh en 2001 vieron la respuesta de la MGC de pollos recién nacidos al inyectar intraocularmente *N*-metil-D-aspartato (NMDA, por sus siglas en inglés), conocida excitotoxina que provoca muerte neuronal. La MGC experimentó un proceso de desdiferenciación ya que se observó la expresión de factores de transcripción de progenitores retinales, seguido por un período de proliferación. Algunas de estas nuevas células dieron lugar a nuevas neuronas y nuevas células gliales, aunque gran parte de las nuevas células se quedaron desdiferenciadas. Lo mismo ocurrió al inyectar intraocularmente factor de crecimiento fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés) e insulina (Fischer *et al.*, 2002). Kohno y colaboradores (2006) observaron, con inmunohistoquímica, que en respuesta al daño por láser en la retina, la MGC experimentó una desdiferenciación y posteriormente proliferación por una semana. Estos resultados también se han visto cuando hay desprendimiento de retina (Kohno *et al.*, 2006).

### **3. Justificación**

La contaminación atmosférica es un problema que sigue preocupando a las instancias encargadas de la salud. El efecto de la contaminación por metales se ha observado en diversos sistemas del organismo como el nervioso.

En nuestro modelo murino con inhalación de vanadio se ha demostrado daño en diversas estructuras del sistema nervioso, siendo el sistema circulatorio una de las vías de entrada de estos metales. El ojo comparte la misma irrigación del resto de las estructuras del sistema nervioso y los pocos estudios que se han



enfocado a evaluar el efecto de la contaminación atmosférica en el ojo, indican que ésta ocasiona conjuntivitis e incremento en las infecciones, por mencionar algunas. Sin embargo, poco se sabe de los cambios en el ojo relacionados con la exposición a vanadio.

En el ojo, la capa encargada de la recepción de los estímulos luminosos es la retina, y en ésta se ubica la célula de Müller que tiene un papel fundamental en la regulación del microambiente neuronal y la transmisión del estímulo.

Por lo anterior, en este trabajo se decidió analizar el efecto que tiene la exposición a la inhalación de vanadio sobre la célula de Müller, empleando un modelo en ratón.

#### **4. Hipótesis**

La exposición a vanadio por vía inhalada generará cambios en las MGC de la retina que se manifestarán como gliosis reactiva, manifestada por un incremento de GFAP y GS como marcadores de daño.

#### **5. Objetivo General**

- Estudiar el efecto de la exposición por inhalación de vanadio en la MGC de la retina.

##### **5.1 Objetivos Particulares**

- Analizar por inmunohistoquímica y densitometría, los cambios en los marcadores GFAP y GS en células gliales de Müller de la retina de los ratones expuestos a vanadio en comparación con los ratones controles.
- Identificar la relación entre el tiempo de exposición subagudo y subcrónico a vanadio y el cambio en la expresión de los marcadores GFAP y GS en las MGC.

## 6. Material y método

### 6.1 Animales

Se utilizaron 45 ratones macho de la cepa CD1 de  $35 \pm 5$  g del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y se mantuvieron en una subestación del Departamento de Biología Celular y Tisular de la mencionada facultad en condiciones de luz-oscuridad (12:12 h) con agua y alimentación *ad libitum*.

### 6.2 Exposición con Vanadio

Los 45 animales se dividieron en 3 grupos de 15 ratones cada uno; los experimentales inhalan  $V_2O_5$  [0.02M] por una hora, dos veces por semana por 4 y 8 semanas mientras que los controles, en las mismas condiciones que los experimentales, únicamente inhalan solución fisiológica (**Figura 11, A**).

Para la inhalación, los animales fueron colocados en una caja de acrílico de 45 x 21 x 35 cm., cuya concentración promedio de vanadio durante la exposición fue de  $1436 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . La solución se dispersó en la cámara con un Ultranebulizador UltraNeb 99 (DeVilbiss) con flujo de 10 L/min.

### 6.3 Preparación de las muestras

Los animales control y experimentales se sacrificaron a las 4 y 8 semanas de exposición con una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico, de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999. Se perfundieron vía intracardiaca con paraformaldehído al 4% y se decapitaron. El exceso de fijador se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Los ojos se deshidrataron en alcoholes graduales ascendentes hasta llegar a xilol, se incluyeron en parafina y se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina.

Para la fijación ocular con paraformaldehído al 4%, se requirió utilizar 3 poblaciones de ratones, cada una con 15 ratones, 5 de cada grupo. En la población 1, únicamente se les fijó por perfusión vía intracardiaca y se extrajeron los ojos; en la población 2, una vez perfundidos, se decapitaron, las cabezas se sumergieron 2 horas en el fijador y se extrajeron los ojos y finalmente, en la población 3, una vez perfundidos, se decapitaron, las cabezas

se sumergieron 2 horas, se extrajeron los ojos y se puncionaron con una aguja para insulina a la vez que se sumergieron 2 horas en el fijador. La fijación no fue satisfactoria en las poblaciones 1 y 2 (**Figura 11, B**), por lo que se siguió con el procesamiento de la muestra únicamente con la población 3 y son los datos que aquí se reportan. Posteriormente se realizaron cortes de 5 micrómetros de grosor con el microtomo para inmunohistoquímica.

#### **6.4 Inmunohistoquímica**

En los cortes se evaluaron los marcadores de la MGC en la retina: GFAP y GS. Se utilizaron como control positivo para ambos marcadores, astrocitos en cerebro. Los cortes se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en alcoholes graduales descendentes hasta llegar a agua.

Con la finalidad de desenmascarar epítomos, se llevó a cabo la recuperación antigénica con Diva Decloaker 20X (Biocare Medical) en una olla de presión a 15 Psi, durante 3 minutos.

En vasos tipo Coplin, se realizaron lavados de PBS de 3 a 5 minutos y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno en metanol (4ml en 36ml). Posteriormente se bloquearon demás proteínas con un lavado de PBS albúmina por 5 minutos.

Utilizando un rack para inmunohistoquímica, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente los anticuerpos primarios contra los distintos marcadores. Se titularon y posteriormente se utilizaron a las siguientes diluciones: anti-GFAP a una dilución 1:1000 (Millipore) y anti-GS diluido a 1:500 (Novus Biologicals).

Se lavaron nuevamente con PBS de 3 a 5 minutos y se incubó el anticuerpo secundario Dako universal LSAB + System HRP por 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las muestras con PBS de 3 a 5 minutos y se incubó el complejo HRP estreptavidina por 45 minutos a temperatura ambiente. Se reveló con diaminobenzidina (DAB) y se contratiñó con hematoxilina.

## 6.5 Análisis densitométrico

Se diseñó una aplicación llamada *DensiFe*<sup>1</sup> en MATLAB<sup>®</sup> para realizar la cuantificación de la densidad media de la marca en píxeles en las fotomicrográficas tomadas a 40X (con un área de 152 mm<sup>2</sup>) y se compararon los resultados<sup>1</sup>. Esta evaluación se realizó en todas las preparaciones histológicas, tomando 10 áreas representativas a lo largo de toda la retina (campos) por individuo, es decir, 50 campos por grupo. Finalmente, se aplicó una prueba de ANOVA (con una prueba *post hoc* de Tukey) para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos evaluados. Se consideró la diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

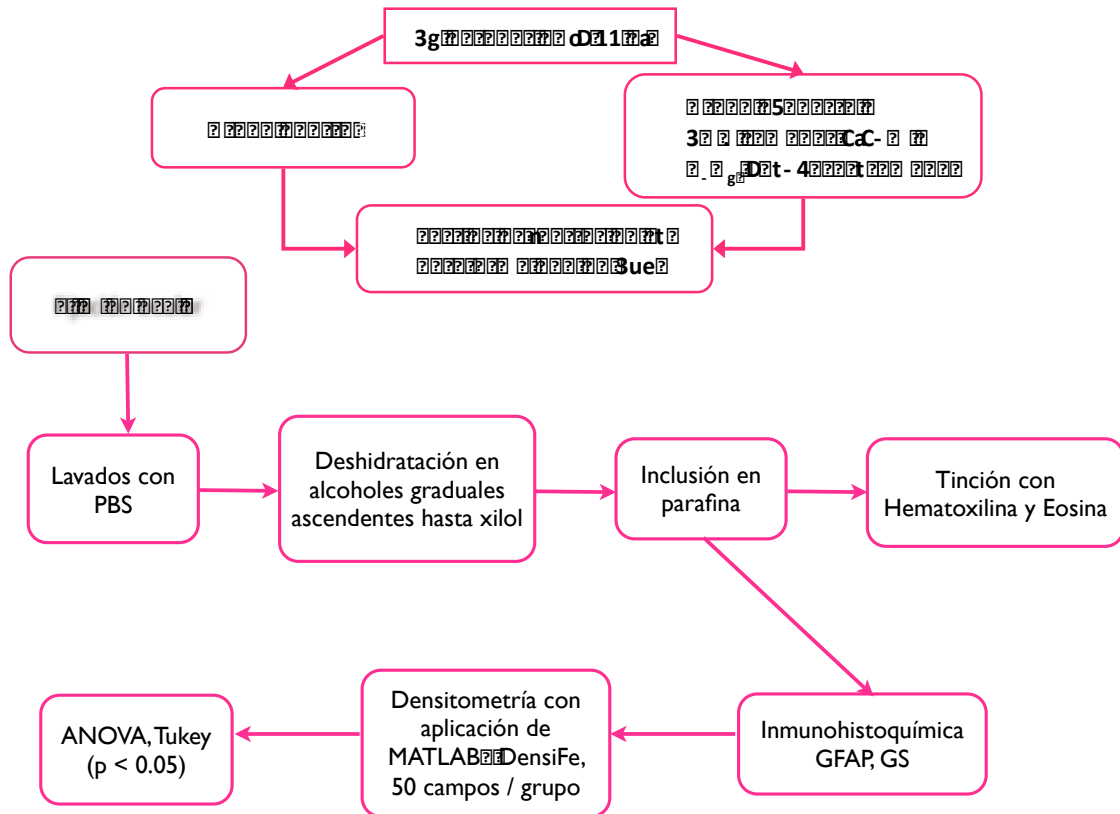
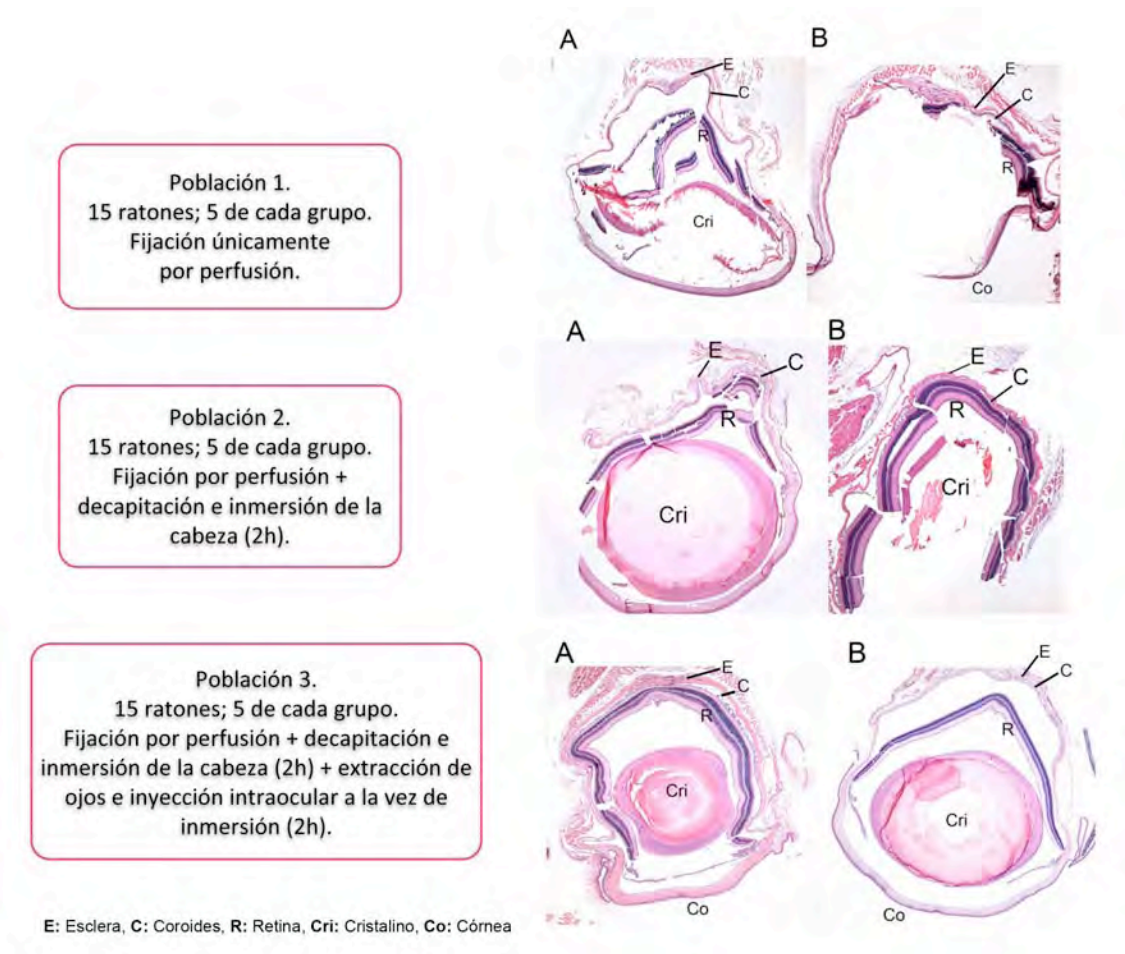


Figura 11, A. Diagrama del método.

<sup>1</sup> La aplicación *DensiFe* fue desarrollada por la Médico Cirujano Lorena Sofía López Zepeda.



**Figura 11, B.** Fijación ocular con paraformaldehído al 4%.

## 7. Resultados

### 7.1 Expresión de GFAP en retina de ratones expuestos a Vanadio

En la retina de los ratones control se observó el marcaje de GFAP+, distribuido en la MLI, es decir, en el pie celular de las MGC (**Figura 12, A**) y alrededor de capilares.

En las preparaciones de la retina de animales expuestos por 4 semanas se observó una marca mucho más intensa en la MLI, rodeando capilares y a algunas neuronas ganglionares. Asimismo, se observó la marca en los procesos celulares de las MGC que atraviesan las capas plexiformes, entre los núcleos neuronales de las CNI y CNE y hasta la MLE, abarcando así, la totalidad de las células (**Figura 12, B**). Sin embargo, a las 8 semanas de

exposición, la marca se observó en la MLI (**Figura 12, C**) y en muy pocos casos, en algunos procesos celulares en la CPI.

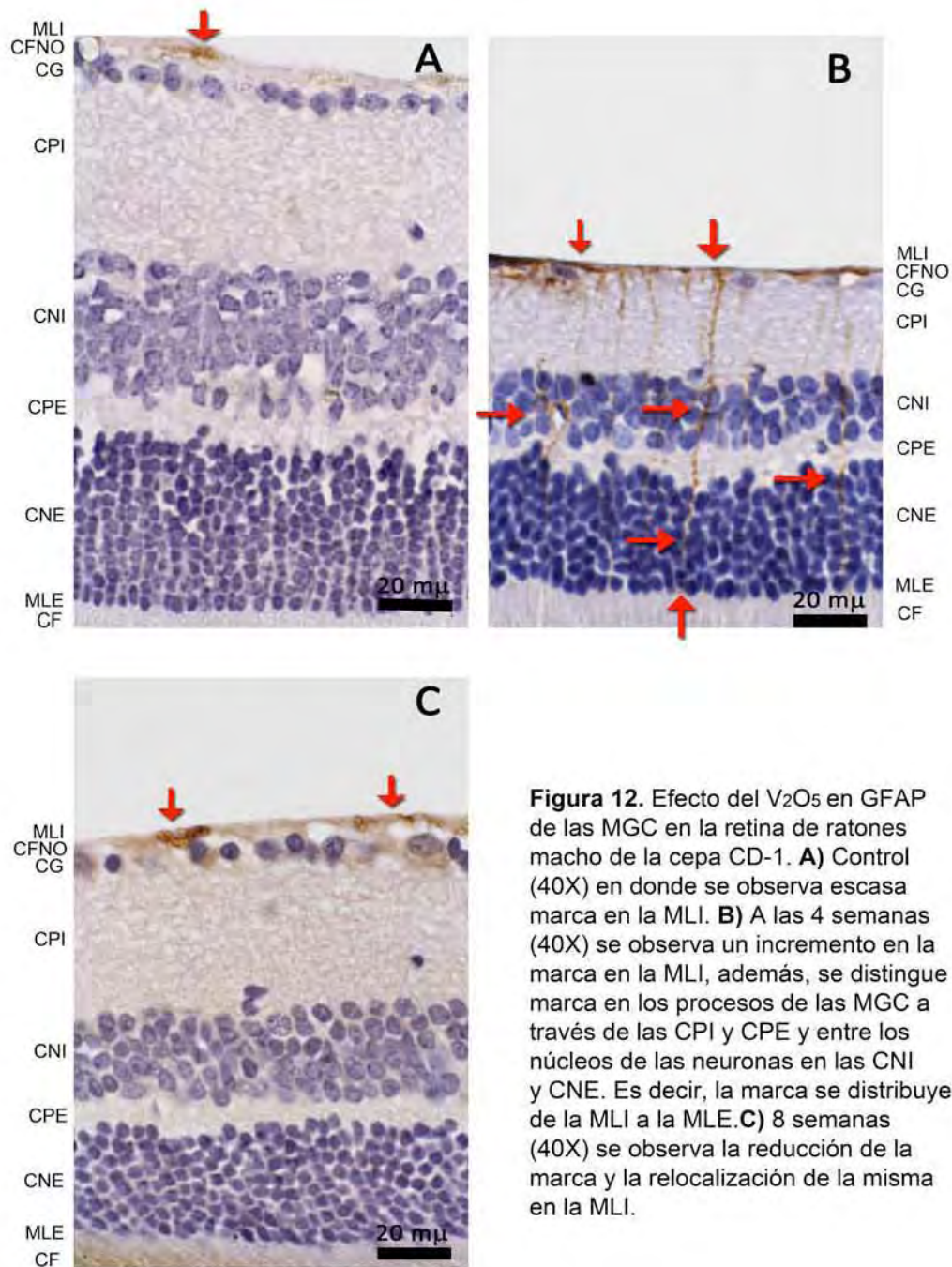
La representación gráfica del análisis densitométrico de las preparaciones a los diferentes tiempos de exposición se muestra en la **Figura 14, A**. El incremento de la marca para GFAP+ observado a las 4 semanas de exposición con vanadio fue significativamente diferente con respecto al control y con el grupo de 8 semanas ( $p < 0.05$ ). Mientras que el control no fue diferente significativamente del grupo experimental de 8 semanas.

## **7.2 Expresión de GS en retina de ratones expuestos a Vanadio**

En la retina de los ratones control se observó el marcaje de GS+ a lo largo de toda la célula (**Figura 13, A**). Se alcanza a distinguir la marca en las MLI y MLE, en los finos procesos celulares que cruzan tanto las CPI y CPE, como las CNI y CNE envolviendo los núcleos de las neuronas presentes en la retina. Asimismo, en la CNI, se observa la marca en el soma de las MGC en donde se encuentra el núcleo.

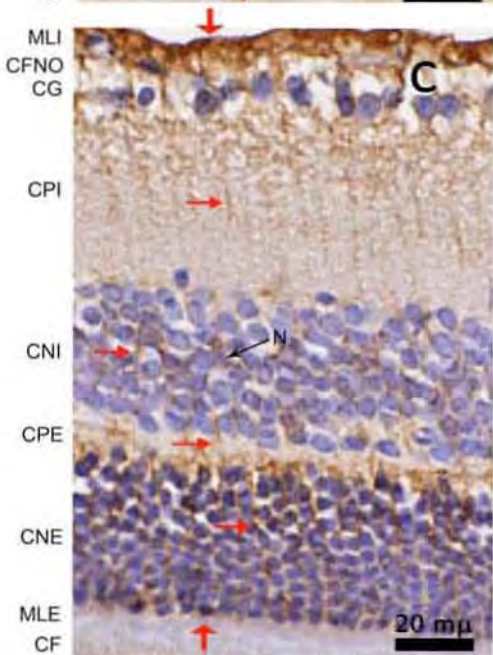
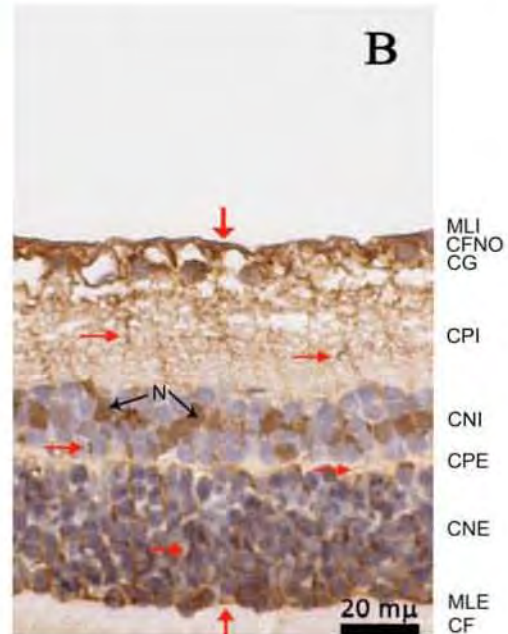
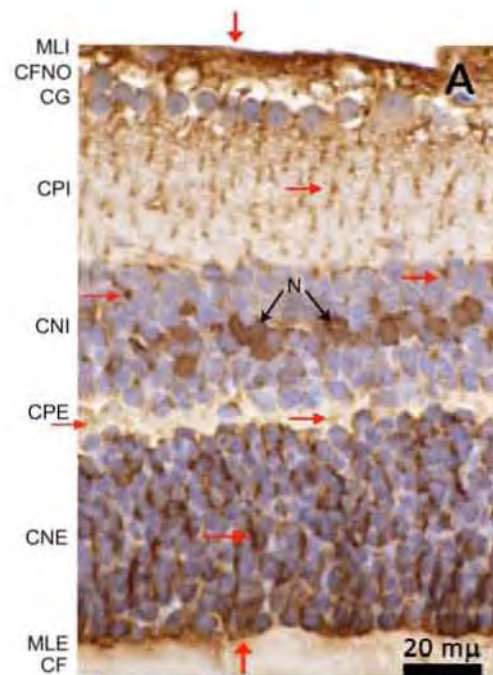
En las preparaciones de la retina de animales expuestos por 4 semanas se observó la marca abarcando de la MLI a la MLE. Sin embargo, se ve una disminución en la marca de los procesos celulares de las MGC en las capas plexiformes y nucleares. Así como en la parte de las MGC en donde se encuentra el núcleo (**Figura 13, B**). En cambio, en el grupo de las 8 semanas de exposición, la marca disminuyó considerablemente. Se observa marcada la MLI, ligeramente la CNE entre los núcleos de los fotorreceptores y casi no hay marca en ninguna de las demás capas de la retina (**Figura 13, C**).

El análisis densitométrico de las preparaciones a los diferentes tiempos de exposición se muestra en la **Figura 14, B**. La disminución de la marca para GS observado a las 8 semanas de exposición fue significativamente diferente con respecto al control y con el grupo de 4 semanas ( $p < 0.05$ ). Mientras que el control no fue diferente significativamente del grupo experimental de 4 semanas.



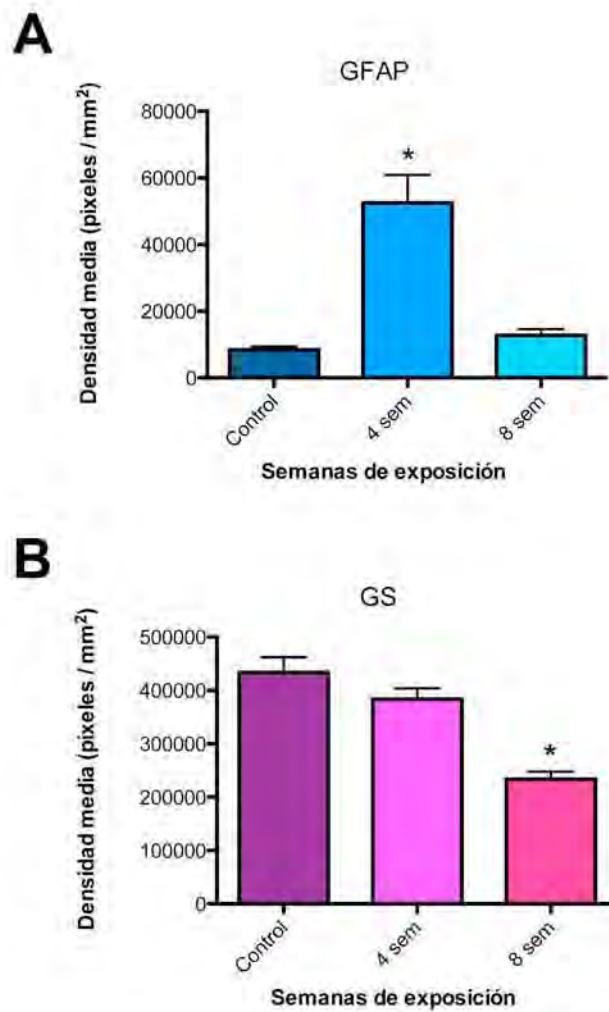
**Figura 12.** Efecto del  $V_2O_5$  en GFAP de las MGC en la retina de ratones macho de la cepa CD-1. **A)** Control (40X) en donde se observa escasa marca en la MLI. **B)** A las 4 semanas (40X) se observa un incremento en la marca en la MLI, además, se distingue marca en los procesos de las MGC a través de las CPI y CPE y entre los núcleos de las neuronas en las CNI y CNE. Es decir, la marca se distribuye de la MLI a la MLE. **C)** 8 semanas (40X) se observa la reducción de la marca y la relocalización de la misma en la MLI.





**Figura 13.** Efecto del  $V_2O_5$  en GS de las MGC en la retina de ratones macho de la cepa CD-1. **A)** Control (40X) en donde se observa marca desde la MLI hasta la MLE. Se distingue marca en los procesos de las MGC atravesando las CPI y CPE y entre los núcleos de las neuronas en las CNI y CNE. Además, en la CNI, se observa la marca en la zona de las MGC en donde se encuentran los núcleos (N) de las mismas. **B)** A las 4 semanas (40X) se observa marca en la MLI. Sin embargo, la marca se reduce en la zona de los núcleos de las MGC y en los procesos celulares de las mismas en las CPI, CPE y CNE. **C)** 8 semanas (40X) continúa la reducción de la marca en los procesos celulares de las MGC en las CPI, CPE y CNE, asimismo, en la zona donde se encuentran los núcleos de dichas células. Sin embargo, la marca en la MLI, persiste. En contraste con la MLE, que ya no se distingue.





**Figura 14.** Representación gráfica del análisis densitométrico de la presencia de A) GFAP y B) GS en la retina de ratones control y expuestos a vanadio a diferentes tiempos. Se analizaron 50 campos por grupo a 400x. Se consideró  $p < 0.05$ . A) \* denota diferencia estadísticamente significativa de 4 semanas vs. Control y 8 semanas. B) \* denota diferencia estadísticamente significativa de 8 semanas vs. Control y 4 semanas.

## 8. Discusión

En este trabajo se estudió la respuesta de la MGC ante la exposición por inhalación a vanadio a través de marcadores específicos de daño celular, como lo son la GFAP y GS. En la literatura se han reportado estudios en donde la respuesta de las MGC en condiciones patológicas como daño lumínico, trauma, isquemia, desprendimiento de la retina, glaucoma, retinopatía diabética, degeneración de la mácula por envejecimiento o insulto químico (Sarthý y Ripps, 2002; Lewis y Fisher, 2003; Bringmann *et al.* 2009), se ve como gliosis reactiva, es decir, un cambio metabólico en el que las células de Müller intentan detener y reparar el daño tisular mediante la sobreexpresión de algunos filamentos intermedios del citoesqueleto y otras moléculas que compensen el desbalance del ambiente extracelular (Rice y Russo-Menna, 1997; Bringmann *et al.*, 2006; 2009). Sin embargo, no se cuenta con suficientes estudios en la retina sobre el efecto que tiene la exposición a metales de transición como el vanadio, en la MGC.

Según Bringmann y colaboradores (2006), en la gliosis reactiva se dan dos tipos de respuestas: las específicas (1) que corresponden a diferentes tipos de daño y las no específicas (2) que pueden servir como marcadores generales tempranos de daño en la retina, por ejemplo:

1) Cambios en la expresión de glutamina sintetasa (GS): Cuando los fotorreceptores degeneran en el caso del desprendimiento de la retina, la GS disminuye; mientras que cuando hay daño hepático, la retina requiere desintoxicarse de amonio y la GS aumenta. Esta proteína también puede distribuirse en la célula hacia donde más se le requiera.

2) Mayor expresión de GFAP, activación de ERKs.

Se esperaba que las MGC experimentaran una gliosis reactiva como respuesta al daño infligido por el insulto tóxico y la consecuente muerte neuronal en la retina, aumentando significativamente la expresión de GFAP conforme aumentaban las semanas de exposición y de GS como un posible indicador de excitotoxicidad por glutamato, sin embargo, no fue lo que se observó.

## **GFAP**

En los controles, la marca de GFAP se encuentra principalmente en el pie celular de la MGC, es decir, en la membrana limitante interna, como lo reportan Sarthy y Ripps (2002). Acorde con lo esperado por gliosis reactiva, a las 4 semanas de exposición, la marca se incrementa significativamente abarcando toda la extensión de la célula, de la membrana limitante interna, a la externa. Sin embargo, a las ocho semanas disminuye. Esto va en contra del proceso general de gliosis reportado anteriormente en diversos trabajos de Gomes y colaboradores en 1999, Bringmann y colaboradores en 2006 y 2009, Sofroniew en 2009 y Vogler y colaboradores en 2013 ya que se sabe que, aunque el nivel del mRNA de GFAP se restablece días después del insulto, la sobreexpresión de filamentos ya formados, puede permanecer por meses (Lewis y Fisher, 2003). Lo cual se comprueba con el trabajo de Feng y su grupo en 2009. Estos últimos, observaron sobreexpresión de GFAP hasta por 7 meses en un modelo en rata con daño en los fotorreceptores, por un fallo en la proteína policistina 2, cuya función es unir al segmento interno y externo de los fotorreceptores. Esta permanencia de la sobreexpresión de los filamentos intermedios, es por lo que la gliosis también puede resultar perjudicial para la retina dañada ya que puede llegar a formar una cicatriz glial (Bringmann *et al.*, 2009).

En el SNC, cuando hay un daño en el tejido, llegan macrófagos del torrente sanguíneo, las microglías de la zona se activan, llegan precursores de oligodendrocitos, oligodendrocitos, células meningeales (si la lesión alcanzó las meninges) y astrocitos. Los astrocitos también se activan ya que proliferan, aumentan su tamaño, sobreexpresan grandes cantidades de GFAP, presentan mayor cantidad de procesos celulares muy juntos entre sí, entretejidos, unidos de manera ocluyente y comunicados por uniones de tipo gap; además son rodeados por matriz extracelular. Lo que en conjunto, forma una cicatriz glial (Fawcett y Asher, 1999). Cuando hay desprendimiento de la retina, la cicatriz glial se puede asociar a condiciones que ocasionen la muerte de los fotorreceptores ya que se impide la regeneración de los procesos neuronales y la remodelación del tejido (Lewis y Fisher, 2003). Sin embargo, en este modelo murino por exposición a vanadio, no se observó la formación de una cicatriz glial, por lo que se descarta como posible causante de mayor daño al tejido, además del ya causado por el insulto tóxico.

Por otro lado, para explicar la súbita disminución de la GFAP, se puede pensar que la MGC podría estar experimentando, como consecuencia a la exposición a vanadio, una desdiferenciación hacia un fenotipo progenitor tardío y a partir de ahí, proliferación o transdiferenciación (Bringmann *et al.* 2009; Bringmann y Wiedemann, 2009).

Se sabe que cuando las células están en proliferación no se observan filamentos intermedios sobreexpresados ya que éstos se degradan para permitir la mitosis y el rearreglo completo del citoesqueleto. Por esto, una vez terminada la citocinesis, es cuando se observa de nuevo la expresión de GFAP (Gomes *et al.*, 1999; Dyer y Cepko, 2000). También se demostró que existe una relación inversa entre la expresión de GS y la proliferación de la MGC en el desarrollo y en condiciones patológicas de la retina madura (Fischer *et al.*, 2002; Bringmann *et al.*, 2009). Cabe recordar que en la MGC en respuesta a vanadio, se observó una disminución en GS, lo que apoyaría la sugerencia de que la MGC experimenta desdiferenciación y proliferación.

Aunque si se diera la desdiferenciación de la MGC, se podrían ver comprometidas las funciones específicas que realiza la glía y romper la relación funcional glia-neurona (Bringmann, *et al.*, 2006; 2009).

Esta propuesta de desdiferenciación y proliferación de la MGC, se apoya además, en diversos experimentos en los que se ha visto que al haber un daño en la retina, los niveles de inhibidores de ciclinas en la MGC, en especial p27<sup>Kip1</sup>, drásticamente disminuyen y le permiten a la glía volver a entrar al ciclo celular. Poco tiempo después, la ciclina D3, que es la que interacciona con p27<sup>Kip1</sup>, disminuye su expresión para prevenir una proliferación sin control de la MGC. Al mismo tiempo, se vuelve a expresar GFAP y ya no se observa más división celular de la glía activada (Dyer y Cepko, 2000).

## **GS**

En los controles, la marca de GS es fuerte y se encuentra abarcando toda la extensión de la célula, de la membrana limitante interna hasta la externa, como se reporta que se encuentra en condiciones normales (Bringmann *et al.*, 2009).

Aunque a las 4 semanas, la marca se sigue observando de la membrana limitante interna hasta la externa, se empieza a notar una disminución, no obstante, no fue estadísticamente significativa comparada con el grupo control. Por otro lado, la marca sí se ve reducida con una diferencia estadísticamente significativa a las 8 semanas comparada con la marca del grupo control y 4 semanas. Como ya se había mencionado, los niveles de expresión de la GS en la MGC, dependen en gran medida de los niveles de sus sustratos en el ambiente extracelular, el Glu y el amonio (Bringmann *et al.*, 2006). Por lo que, observar la disminución de GS a las 8 semanas, sugiere que no se está experimentando en la retina, excitotoxicidad por Glu.

Se ha visto una disminución en la expresión de GS cuando hay isquemia, inflamación, daño por trauma y glaucoma (Bringmann *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha reportado que en condiciones patológicas como desprendimiento de la retina, daño lumínico o por enfermedad hereditaria, los principales liberadores de Glu en la retina, los fotorreceptores, degeneran ocasionando una disminución en la expresión de GS (Bringmann *et al.*, 2009). Además, Quezada en el 2013, observó en el mismo modelo murino de exposición por inhalación a pentóxido de vanadio que en este trabajo se utilizó, un aumento del estrés oxidante en la retina, producto del daño por vanadio, lo cual ocasionó una disminución en el fotorreceptor rodopsina. Lo cual quiere decir, que los fotorreceptores se ven afectados por el vanadio. La disminución de la expresión de GS en la MGC apoya lo sugerido por Quezada (2013). Con este mismo modelo, se ha reportado, en general, reducción de espinas dendríticas y pérdida neuronal en bulbo olfatorio (Ávila-Costa *et al.*, 2007), en la sustancia nigra (Ávila-Costa *et al.*, 2004) y en el hipocampo (Ávila-Costa *et al.*, 2006).

Según Sidoryk-Wegrzynowicz y Aschner (2013), la exposición a manganeso, metal de transición similar al vanadio, induce gliosis en los astrocitos de cerebro y disminución en la expresión tanto de GS, como de los transportadores de entrada y salida de Gln de la célula, rompiendo así el CGG. Proponen que esto disminuye la disponibilidad de la Gln para que las neuronas posteriormente sinteticen Glu, ocasionando una pérdida en la neurotransmisión

glutamatergica y la consecuente liberación de Glu al microambiente. Dando así una disminución en la expresión de GS por parte de la glía.

Cabe resaltar que, aunque la expresión de GS tiene que ver con la disponibilidad de sus dos sustratos en el ambiente extracelular, Glu y amonio (Bringmann, *et al.*, 2006), los glucocorticoides también pueden modular la expresión de GS (Moscona, 1983; Olkku *et al.*, 2004) ya que existe una región río-arriba del gen de esta proteína que responde a glucocorticoides (GRE) (Vardimon *et al.*, 1993; Bringmann *et al.*, 2009). Entre estos corticoides, se encuentran las hormonas esteroideas adrenales, como cortisol y corticosterona y el fármaco dexametasona (Moscona, 1983; Hicks *et al.*, 1991).

El mecanismo de esta regulación consiste en que las moléculas del receptor de glucocorticoides (RG) se encuentran en el citoplasma, pero al unirse a la hormona, entran al núcleo, dimerizan y se acoplan a GRE favoreciendo así la transcripción del material genético. Sin embargo, la respuesta a la inducción por glucocorticoides depende de si las moléculas activas de RG acopladas a GRE sobrepasan cierto umbral, si no es así, la transcripción no se lleva a cabo (Vardimon *et al.*, 1993).

También se sabe que existe una relación inversa entre la expresión de GS y la proliferación de la MGC en el desarrollo y en condiciones patológicas de la retina madura (Fischer *et al.*, 2002; Bringmann *et al.*, 2009):

**En el desarrollo**, una de las proteínas del complejo que regula la proliferación celular, c-Jun, es abundante en las células de la retina que están proliferando. Esta proteína, inactiva transcripcionalmente al RG, por lo tanto, no se acopla a GRE y no se induce la expresión de GS mediada por glucocorticoides. Una vez que disminuye la proliferación celular y c-Jun, GS se empieza a expresar en respuesta a glucocorticoides (Bringmann *et al.*, 2009).

**En la mayoría de las patologías** en las que la expresión de GS disminuye, se debe a la influencia de factores de crecimiento como el Factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF). En la retina de aves, vieron que el bFGF

incrementa la proteína c-Jun, es decir, hay proliferación a la vez que disminuye así la expresión de GS mediado por glucocorticoides. Este factor de crecimiento es liberado rápidamente después del desprendimiento de la retina, en condiciones isquémicas, después de daño lumínico y mecánico y como consecuencia de la enfermedad degenerativa de los fotorreceptores (Bringmann *et al.*, 2009).

Mientras que, cuando se bloquea GS experimentalmente, las neuronas de la retina pierden el contenido de glutamato ocasionando que los animales queden ciegos en dos minutos (Bringmann, *et al.*, 2006; 2009). Esto se debe a que en el ciclo de Glutamato / Glutamina (CGG), el Glu se recicla en la MGC por la GS para ser liberada como Gln, pero si la GS está bloqueada, se interrumpe el ciclo. La glía no puede convertir Glu en Gln para que las neuronas la incorporen y posteriormente la transformen a Glu. De esta manera se afecta gravemente a las sinapsis y al equilibrio en el microambiente neuronal.

Por todo lo anterior, se podría pensar que en este estudio pudiera estar ocurriendo una degeneración neuronal, en especial de los fotorreceptores como consecuencia al incremento del estrés oxidante, producto del daño por exposición a vanadio. Sin embargo, sería importante realizar más estudios para ver si se da la consecuente liberación de bFGF, como resultado de la degeneración de los fotorreceptores, y el incremento de la proteína c-Jun. Lo cual provocaría una disminución en la expresión de la GS mediada por glucocorticoides.

Estos resultados resaltan la estrecha relación neurona – glia, lo que nos recuerda que así como las células gliales mantienen el microambiente propicio para el desarrollo y supervivencia de las neuronas, las neuronas también pueden modificar o regular algunas actividades metabólicas de las células gliales.

## **GFAP Y GS**

La relación que presenta la proliferación con la reducción en la expresión de GFAP y la disminución de la GS, nos lleva a pensar que se necesitan más estudios para comprobar si la MGC, como consecuencia de la exposición a vanadio, sufre un proceso de dediferenciación y proliferación. En siguientes estudios, para evaluar si hay dediferenciación, se propone utilizar otras moléculas como marcadores; por ejemplo, otro tipo de filamento intermedio llamado nestina y los factores de transcripción Pax6 y Chx10 ya que se coexpresan en células progenitoras de la retina, como se vio en los trabajos de Fischer y Reh en 2001 y 2002. Tomando en cuenta los mismos trabajos, para ver si hay proliferación posteriormente, se pueden utilizar Bromo-deoxiuridina (BrdU, por sus siglas en inglés) para marcar el material genético de las células que están en fase de síntesis del ciclo celular y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, por sus siglas en inglés).

Hay que resaltar que este trabajo sirvió para establecer una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio sobre el efecto de la exposición a vanadio por vía inhalada en la retina en un modelo murino. Por lo cual, para realizar este estudio, nos basamos en el método que ya se usaba anteriormente para trabajar con el mismo modelo (pero en otros tejidos) en el grupo del laboratorio (Fortoul *et al.*, 2011). Dentro de la realización de esta tesis, se encontraron algunas sugerencias que podrían hacerse en un futuro al modelo de experimentación. Por ejemplo, en el caso del ojo, se podría acortar el tiempo para el primer sacrificio de los ratones y no esperar hasta las 4 semanas, ya que en otros modelos de daño neurotóxico en la retina, los cambios se empiezan a ver a la semana del insulto (Tyler y Burns, 1991; Dyer y Cepko, 2000; Fischer y Reh, 2001; Chen y Weber, 2002; Fischer *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2009; Joly *et al.*, 2011). Sin embargo, los modelos de daño neurotóxico en la retina previamente mencionados, son estudios de insulto tóxico agudo, por lo que también es importante estudiar los modelos de daño por insulto tóxico subagudo y subcrónico, como es este trabajo. Por otro lado, se encontraron reportes de Eclancher y su grupo de trabajo en 1990, en donde trabajan con tejido de cerebro y de Vaughan y colaboradores en el mismo año en tejido de retina, que indican que la fijación del tejido a estudiar con paraformaldehído al



1% y con acetona (Vaughan *et al.*, 1990), o en general con paraformaldehído (Eclancher *et al.*, 1990), altera el patrón inmunorreactivo de los epítopes de la GFAP comparado con otros fijadores ya que existe cierta sensibilidad al tipo de fijación; por lo que al analizar los resultados, podría arrojar resultados no comparables con otros tipos de fijadores. Sin embargo, debido a que en este trabajo, todos los individuos fueron perfundidos con paraformaldehído al 4% y las muestras fueron tratadas de la misma manera, nuestros resultados son comparables y confiables, y por lo tanto, las diferencias entre los grupos experimentales respecto al control son significativas. No obstante, en estudios futuros, se podría implementar una manera diferente de fijación con formol amortiguado en PBS y utilizar anticuerpos primarios monoclonales.

## **9. Conclusión**

Con este modelo identificamos daño en la retina de ratones macho CD-1 por la exposición por inhalación a pentóxido de vanadio ya que las MGC se encuentran activadas, lo que comprobamos por la presencia de gliosis reactiva. A las 8 semanas de exposición disminuye la marca de GFAP posiblemente por una desdiferenciación de la MGC como consecuencia al daño por exposición a vanadio. Mientras que la disminución gradual de GS pudiera deberse a la degeneración de los fotorreceptores como consecuencia al daño por vanadio.

No se ve una relación entre el tiempo de exposición y el cambio en la expresión de GFAP dado que inicialmente se ve un aumento de este marcador, pero posteriormente disminuye de manera drástica. Por otro lado, la expresión de GS sí disminuye gradualmente respecto del control conforme transcurre el tiempo de exposición.

Se requieren hacer más estudios en los que se evalúe la desdiferenciación de la MGC y la muerte neuronal en la retina como respuesta al daño tóxico por el vanadio.

## 10. Bibliografía

- Ávila-Costa M., Montiel-Flores, E., Colín-Barenque, L., Ordoñez, J., Gutiérrez, A., Niño-Cabrera, G., Mussali-Galante, P., Fortoul, T. 2004. Nigrostriatal modifications after vanadium (V2O5) inhalation. An immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*. 7:1357–62.
- Ávila-Costa M., Colín-Barenque, L., Zepeda-Rodríguez, A., Antuna, S., Saldivar, L., Espejel-Maya, G., Mussali-Galante, P., Avila-Casado, M., Reyes-Olivera, A., Anaya-Martínez, V., Fortoul, T. 2005. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience Letters* 381:21-25.
- Ávila-Costa, M., Fortoul, T., Niño-Cabrera, G., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Gutiérrez-Valdez, A., Ordoñez-Librado, J., Rodríguez-Lara, V., Mussali-Galante, P., Díaz-Bech, P., Anaya-Martínez, V. 2006. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V2O5) promote memory deterioration. *NeuroToxicology* 27: 1007-1012.
- Ávila-Costa, M., Fortoul, T., Colin-Barenque, L., Ordoñez-Librado, J., Gutiérrez-Valdez, A., Anaya-Martínez, V. 2007. Vanadium and the Nervous System en Vanadium: Its Impact on Health. Nova Science Publishers, Inc.
- Ballatori, N., Krance, S., Notenboom, S., Shi, S., Tieu, K., Hammond, C. 2009. Glutathione dysregulation and the etiology and progresión of human diseases. *Biological Chemistry*. 390(3): 191-214.
- Barceloux, D. 1999. Vanadium. *Clinical Toxicology* 37(2): 265- 278.
- Bernardos, R., Barthel, L., Meyers, J., Raymond, P. 2007. Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Müller Glia That Function as Retinal Stem Cells. *The Journal of Neuroscience*. 27:26 7028-7040.
- Bonner, J., Rice, A., Moomaw, C., Morgan, D. 2000. Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *American Journal of Physiology*. 278:1 L209–L216.
- Bourcier, T., Viboud, C., Cohen, J.C., Thomas, F., Bury, T., Cadiot, L., Mestre, O., Flahaut, A., Borderie V., Laroche, L. 2003. Effects of air pollution and climatic conditions on the frequency of ophtamological emergency examinations. *The Brotish Journal of Ophthalmology*. 87(7): 809-811.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S., Osborne, N., Reichenbach, A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 25:397-424
- Bringmann, A., Iandiev I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Osborne, N., Reichenbach, A. 2009. Cellular signaling and factors envolved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research* 28: 423 – 451.

- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A. 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International*. 54:143-160.
- Bringmann, A., Wiedemann, P. 2009. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 247: 865 – 883.
- Bringmann, A., Grosche, A., Pannicke, T., Reichenbach, A. 2013. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Frontiers in Endocrinology*. 4(48): 1 – 14.
- Chen, H., Weber, A. 2002. Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Glutamine Synthetase by Müller Cells After Optic Nerve Damage and Intravitreal Application of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Glia*. 38: 115 – 125.
- Colin-Barenque, L., Zepeda-Rodriguez, A., Jimenez-Martinez, R., Gonzalez-Villalba, A., Rojas-Lemus, M., Bizarro-Nevaras, P., Rodriguez-Lara, V., Pasos-Najera, F., Guarner-Lans, V., Santamaria, A., Fortoul, T.I. 2012. Blood-Brain Barrier (BBB): Morphology and Disease en The Blood-Brain Barrier: New Research. Eds: Pedro A. Montenegro y Stefane M. Juárez. Nova Science Publishers, Inc.
- Del Priore, L., y Lewis, A. 1985. Vanadate, tungstate and molybdate activate rod outer segment phosphodiesterase in the dark. *Biochimica et Biophysica Acta*. 845:81-85.
- Domingo, J. 1996. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity. *Reproductive Toxicology*. 10 (3): 175-182.
- Dyer, M. y Cepko, C. 2000. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nature*. <http://neurosci.nature.com>
- Eclancher, F., Perraud, F., Faltin, J., Labourdette, G., Sensenbrenner, M. 1990. Reactive Astrogliosis After Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Injection in Injured Neonatal Rat Brain. *Glia*. 3:502 – 509.
- Elejalde, J.I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*. 18 (6): 326-335.
- Fawcett, J.W., Asher, R. A. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*. 49 (6): 377 – 391.
- Feng, Y., Wang, Y., Stock, O., Pfister, F., Tanimoto, N., Seeliger, M., Hillebrands, J., Hoffmann, S., Wolburg, H., Gretz N., Hammes, H. 2009. Vasoregression Linked to Neuronal Damage in the Rat with Defect of Polycystin-2. *PLoS ONE*. 4(10):e7328.doi: 10.1371/ journal.pone.0007328
- Fischer, A. y Reh, T. 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal Chicken retina. *Nature Neuroscience*. 4 (3):247-252

- Fischer, A., McGuire, C., Dierks, B., Reh, T. 2002. Insulin and Fibroblast Growth Factor 2 Activate a Neurogenic Program in Müller Glia of the Chicken Retina. *The Journal of Neuroscience*. 22(21): 9387 – 9398.
- Fortoul, T., Rojas-Lemus, M. 2007. Vanadium as an air pollutant. In: Fortoul TI, Avila-Costa MR, editors. Vanadium: Its Impact on Health. chapter 1. New York, NY, USA: *Nova Science*; 2007. pp. 1–6.
- Fortoul, T., Ruiz, M. 2007. “Bone and teeth effects,” in Vanadium: Its Impact on Health, T. I. Fortoul and M. R. Avila-Costa, Eds., 1–6, *Nova Science*, New York, NY, USA.
- Fortoul, T., González-Villalva, A., Piñón-Zarate, G., Rodríguez-Lara, V., Montaña, L., Saldivar-Osorio, L. 2009. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*. 58 (6): 375–380.
- Fortoul, T., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colín-Barenque, L., Montaña, L., García-Pelez, I., Bizarro-Neves, P., Lopez-Valdez, N., Falcon-Rodriguez, C., Jimenez-Martínez, R., Ruiz-Guerrero, M., López-Zepeda, L., Morales-Rivero, A., Muñiz-Rivera-Cambas, A. 2011. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi:10.1155/2011/951043
- García, M., Ruiz Eder, J., Hernández-Barbáchano, E., Urcola, J.A., Bilbao Araiz, J., Durán, J.A., Vecino, E. 2003. Neuroprotección de las células ganglionares de la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 78:3 Madrid.
- Gomes, F., Paulin, D., Moura, V. 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32:619-631.
- González-Villalva, A., Fortoul, T., Avila-Costa, M., Piñón-Zarate, G., Rodríguez-Lara, V., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Bizarro-Neves, P., Díaz-Bech, P., Mussali-Galante, P., Colín-Barenque, L. 2006. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V2O5 inhalation. *Toxicology and Industrial Health*. 22: 113–116.
- Hauck, S., Ueffing, M. 2009. Factores neurotróficos derivados de las células de Müller. En el camino hacia la terapia neuroprotectora en la retina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 84:9 Madrid.
- Hicks, D., Bugra, K., Faucheux, B., Jeanny, J.C., Laurent, M., Malecaze, F., Mascarelli, F., Raulais, D., Cohen, S., Courtois, Y. 1991. Fibroblast Growth Factors in the Retina. *Progress in Retinal Research*. 11: 333 – 374.
- Huster, D., Reichenbach, A., Reichelt, W. 2000. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions. *Neurochemistry International*. 36:461-469.
- IPCS: Programa Internacional de Seguridad Química. 1997. Principios básicos de toxicología aplicada. La naturaleza de los peligros químicos. 2ª ed.

- Joly, S., Pernet, V., Samardzija, M., Grimm, C., 2011. PAX6-Positive Müller Glia Cells Express Cell Cycle Markers but Do Not Proliferate After Photoreceptor Injury in the Mouse Retina. *Glia*. 59:1033-1046.
- Junqueira, L., Carneiro, J. 2005. Histología básica, texto y atlas. 6 ed. Editorial Masson. España. 453-467.
- Kohno, H., Sakai, T., Kitahara, K. 2006. Induction of nestin, Ki-67 and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 244: 90-95.
- Lewis, G., Fisher, S. 2003. Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury: Its Potential Role in Glial Remodeling and a Comparison to Vimentin Expression. *International Review of Cytology*. 230:263-290.
- Lledó, M., Campos, E., Cuenca, N. 2010. La transducción visual. *Annals d'Oftalmologia*. 18(3): 130 – 136.
- Lundkvist, A., Reichenbach, A., Betsholtz, C., Carmeliet, P., Wolburg, H., Pekny, M. 2004. Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. *Journal of Cell Science*. 117:3481-3488.
- Moscona, A. 1983. On Glutamine Synthetase, Carbonic Anhydrase and Müller Glia in the Retina. *Progress in Retinal Research*. Vol. 2.
- Moyes, C., Schulte, P. 2007. Principios de Fisiología Animal. Pearson Educación. España. 804 p.
- Mussali-Galante, P., Rodríguez-Lara, V., Hernández-Tellez, B., Ávila-Costa, M., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Piñón-Zarate, G., Saldivar-Osorio, L., Diaz-Beck, P., Herrera-Enríquez, M., Tovar-Sánchez, E., Fortoul, T. 2005. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicology and industrial health*. 21:215.
- Mussali-Galante, P., Fortoul, T. 2008. Atmospheric pollution. In *Environmental Research Progress*. Nova Science Publishers, Inc. México. 147-160 p.
- Olkku, A., Bodine, P., Linnala-Kankkunen, A., Mahonen, A. 2004. Glucocorticoids induce glutamine synthetase expression in human osteoblastic cells: a novel observation in bone. *Bone*. 34:320-329.
- Parry, D., Strelkov, S., Burkhard, P., Aebi, U., Herrmann, H. 2007. Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Experimental Cell Research*. 313 (10):2204-2216.
- Peña, C., Carter, D., Ayala-Fierro, F. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

- Quezada, M. 2013. Cambios en la histología de la retina de ratones expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio y la participación del estrés oxidante. Tesis de Licenciatura. UNAM. México.
- Reichenbach, A. y Bringmann, A. 2010. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. Springer. NY, USA.
- Rice, M., Russo-Menna, I. 1997. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*. 82:4 1213-1223.
- Rodríguez-Mercado, J., Altamirano-Lozano, M. 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22 (4): 173- 189.
- Ross, M., Kaye, G., Pawlina, W. 2007. Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 894-927.
- Sarthy, V., Ripps, H., 2002. Perspectives in Vision Research, The Retinal Müller Cell, Structure and Function. Kluwer Academic Publishers. USA.
- Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M. 2013. Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 18:14-23.
- Sofroniew, M. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 32(12): 638 – 647.
- Stewart, M. 1990. Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Current Opinion in Cell Biology*. 2: 91- 100.
- Tyler, N. Burns, M. 1991. Alterations in Glial Cell Morphology and Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Urethane-Induced Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 32(2): 246-256.
- Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T. 2008. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*. 26(4): 339-362.
- Vardimon, L., Ben-Dror, I., Havazelet, N., Fox, L. 1993. Molecular Control of Glutamine Synthetase Expression in the Developing Retina Tissue. *Developmental Dynamics*. 196: 276 – 282.
- Vaughan, D., Erickson, P., Fisher, S. 1990. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Immunoreactivity in Rabbit Retina: Effect of Fixation. *Experimental Eye Research*. 50. 385 – 392.
- Vogler, S. Pannicke, T., Hollborn, M., Grosche, A., Busch, S., Hoffmann, S., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Hammes, H., Bringmann, A. 2013. Müller Cell Reactivity in Response to Photoreceptor Degeneration in Rats with Defective Polycystin-2. *PLoS ONE*. 8(6):e61631. doi: 10.1371/journal.pone.0061631

- <http://www.bcairquality.ca/health/air-quality-and-health.html> revisado el 10 de enero de 2014.
- <http://medicinafarmacologia.blogspot.mx/2010/11/capas-de-la-retina.html> revisado el 9 de enero de 2014.
- [http://mx.fotolog.com/bubu\\_flogger/37270736/](http://mx.fotolog.com/bubu_flogger/37270736/) revisado el 9 de enero de 2014.
- <http://conocimientos-histologia.blogspot.mx/2010/11/anatomia-microscopica.html> revisado el 9 de enero de 2014.
- <http://www.abcam.com/gfap-antibody-ab7260.html> revisado el 9 de enero de 2014.
- <http://www.studyblue.com/notes/n/neuro-exam-2/deck/1317431> revisado el 9 de enero de 2014.
- <http://www.uco.es/organiza/departamentos/publicaciones/fisiovet/tema4.html> revisado el 9 de enero de 2014.