



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Inhalación de vanadio e ingesta de bebidas altas en
sacarosa. Estudio de la morfofisiología del páncreas y
su relación con los niveles de glucosa en sangre**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

JUAN CARLOS ALBARRAN ALONSO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ADRIANA ELIZABETH GONZÁLEZ
VILLALVA**

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Albarran

Alonso

Juan Carlos

47542019

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

30732291-5

2. Datos del tutor

Dra.

González

Villalva

Adriana Elizabeth

3. Datos del presidente

Dra.

Fortoul

Vander Goes

Teresa Imelda

4. Datos del vocal

Dr.

Altamirano

Lozano

Mario Agustín

5. Datos del suplente

Dra.

Ortiz

Hernández

Rosario

6. Datos del suplente

M. en C.

Bizarro

Nevarés

Martha Patricia

7. Datos del trabajo escrito

Titulo: Inhalación de vanadio e ingesta de bebidas altas en sacarosa. Estudio de la morfofisiología del páncreas y su relación con los niveles de glucosa en sangre

Número de páginas: 65

Año 2015

AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Teresa I. Fortoul Vander Goes

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dra. Adriana Elizabeth González Villalva

Dra. Rosario Ortiz Hernández

M. en C. Martha Patricia Bizarro Nevares

A la tutora de esta tesis, la Dra. Adriana Elizabeth González Villalva, por su constante apoyo en la planeación, realización y revisión de este trabajo.

Departamento de Biología Celular y Tisular, Laboratorio de Microscopia Electrónica, Facultad de Medicina, UNAM. Por el constante apoyo en la toma de fotomicrografías utilizadas en este proyecto:

Biol. Armando Zepeda Rodríguez.

Técnico Académico Francisco Pasos Nájera.

Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira.

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata.

Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Enrique Pinzón Estrada.

Dr. Ismael Torres Saldaña.

Dr. Víctor Manuel Salgado Alfaro

A Estefania Aketzali Ramírez Rodríguez por su investigación que permitió la estandarización de la concentración de azúcar utilizada en este proyecto.

A la MC. L. Sofía López Zepeda, por desarrollar y permitir el uso del software DENSIFE®.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **mi madre Guille Albarran** por brindarme todo lo que un hijo pudiera necesitar para cumplir con sus objetivos, por darme todas las facilidades y fuerzas para que pueda seguir realizándome y superándome. Gracias por tus consejos, las experiencias y enseñanzas que me has dado. Porque en cada paso que he dado, siempre has estado tú al lado mío superando las adversidades y los retos que se han presentado, mostrando siempre una gran confianza en mí y en lo que hago. Este triunfo es tuyo, recuérdalo con amor y mucho orgullo.

A **mis padres** por brindarme los recursos y el apoyo en cada una de las decisiones que he tomado siempre acompañados de sus importantes consejos todo con la finalidad de poder salir adelante. Gracias por absolutamente todo.

A **Nayeli Meléndez** por estar a mi lado y compartir toda la carrera universitaria conmigo, en especial ésta etapa de mi vida. Gracias por ser un gran apoyo y un motor para seguir adelante, por darme fuerzas cuando lo necesitaba, por ayudarme a resolver cualquier duda, por amarme cada uno de los días que pasamos juntos y sobre todo porque nunca dejaste que perdiera los ánimos de seguir luchando y hasta la fecha me impulsas para alcanzar mis metas. Gracias por ser mi mejor amiga y compañera de vida. Te amo.

A **Adriana González Villalva** porque además de ser una excelente tutora, siempre mostraste una gran disposición de ayudarme en cualquier aspecto no solamente el escolar, te agradezco la inmensa paciencia, los conocimientos, la ayuda y la confianza que me brindaste durante todo este proceso apoyando mi crecimiento tanto escolar como personal.

A la **Dra. Tere Fortoul** por permitirme realizar mi proyecto de investigación en éste laboratorio siendo un ejemplo a seguir y mostrando siempre interés y una gran disposición por ayudarme en todo lo que requiriera haciendo de esta etapa en el laboratorio una motivación más para realizar ciencia.

A **Paty, Marce y Laura** por propiciar que el tiempo en el laboratorio fuera muy ameno, por mostrar interés por mi desempeño y apoyarme en lo que necesitara, además de ofrecerme alguien con quien hablar en cualquier momento.

A **Paco y Armando**, por el apoyo a la hora de tomar fotomicrografías, pero más importante que eso, gracias por mostrar una gran disposición por ayudarme en lo que necesitara con una sonrisa, por mostrar un interés por cómo iban las cosas sobrepasando el tema académico por brindarme siempre su afecto y una gran amabilidad.

A todos en el laboratorio con quienes compartí muchísimas cosas como experiencias, historias pero sobre todo risas. Gracias por haber sido parte de mi historia de una y mil formas, por hacer de este tiempo algo ameno, divertido y digno de recordar.

Índice

	Abreviaturas.....	i
1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	3
	2.1. Contaminación atmosférica.....	3
	2.2. Partículas suspendidas	4
	2.3. Vanadio.....	7
	2.3.1 Fuentes de emisión.....	7
	2.3.2 Usos.....	8
	2.3.3 Vías de exposición.....	9
	2.3.4 Toxicocinética.....	10
	2.3.5 Mecanismos de daño.....	12
	2.3.6 Daños a la salud.....	12
	2.4 Ingesta de bebidas azucaradas	14
	2.5 Páncreas.....	16
	2.5.1 Hormonas pancreáticas.....	19
	2.5.2 Efecto del vanadio como potenciador de la insulina.....	21
3.	Justificación.....	22
4.	Hipótesis.....	22
5.	Objetivos.....	23
6.	Método.....	24
	6.1. Modelo experimental.....	24
	6.2. Toma de glucosa, peso y circunferencia abdominal.....	24
	6.3. Medición de ingesta de bebida y comida.....	24
	6.4. Toma de muestras.....	25
	6.5. Inmunohistoquímica.....	25
	6.6. Toma de fotomicrografías y análisis densitométrico.....	26
7.	Resultados	28
	7.1. Supervivencia.....	28
	7.2. Peso corporal.....	30
	7.3. Circunferencia abdominal.....	31
	7.4. Consumo de alimento y bebida.....	32
	7.5. Niveles de glucosa en sangre.....	33
	7.6. Morfología del páncreas.....	34
	7.7. Inmunohistoquímica.....	36
8.	Discusión.....	40
9.	Conclusiones.....	50
10.	Perspectivas.....	51
11.	Referencias.....	52

ABREVIATURA

Al	Aluminio
B	Boro
Ca ²⁺	Ión Calcio
CO	Monóxido de carbono
COT	Compuestos orgánicos totales
COV	Compuestos orgánicos volátiles
Cr	Cromo
GLUT2	Transportador de glucosa tipo 2
H-E	Hematoxilina-Eosina
IFN α	Interferón alfa
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
KC	Quimiocina para neutrófilo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCP-1	Proteína quimioattractora de monocitos 1
Mn	Manganeso
NH ₃	Amoniaco
Ni	Níquel
NO _x	Óxidos de nitrógeno
NPY	Neuropéptido Y
O ₃	Ozono
PKC	Proteína Cinasa C
PM ₁₀	Material Particulado igual o menor a 10 micrómetros
PM _{2.5}	Material Particulado igual o menor a 2.5 micrómetros
PST	Partículas suspendidas totales
PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SO ₂	Dióxido de azufre
Ti	Titanio
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
VO ²⁺	Vanadilo
VO ³⁺	Metavanadato
VO ₄ ⁻³	Anión vanadato
W	Tungsteno
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

RESUMEN

La contaminación atmosférica se ha convertido en un problema de salud pública y uno de sus componentes son las partículas suspendidas a las cuales se les adosa entre otros compuestos el Vanadio. Éste es un metal de transición cuya presencia en la atmósfera se ha incrementado principalmente por la quema de combustibles fósiles y ha demostrado que ocasiona daños a diferentes órganos y sistemas además de provocar alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Otro problema de salud pública es la ingesta de bebidas azucaradas donde México ocupa el primer lugar en el consumo mundial lo cual se está traduciendo en enfermedades crónicas no transmisibles, como la obesidad, la hipertensión y la diabetes.

Dado que tanto el vanadio como las bebidas azucaradas tienen la capacidad de dañar la histología del páncreas y alterar el metabolismo de glucosa, se realizó un estudio donde se analizaron los cambios causados a este importante órgano con la combinación de ambos factores. Para esto se utilizaron 40 ratones CD1 separados en cuatro grupos (control(C), vanadio (V), sacarosa (S) y vanadio+sacarosa (V+S)). Los grupos V y V+S fueron expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M una hora dos veces por semana mientras que los grupos S y V+S bebieron agua con sacarosa al 30% diariamente; todo esto durante ocho semanas. Se registró el peso, la circunferencia abdominal y la glucemia a las 4 y 8 semanas. Posterior a esto se disecó el páncreas, se realizó la tinción H-E y la técnica de inmunohistoquímica para identificar insulina y glucagon y realizar un análisis densitométrico.

Se observó un peso menor en el grupo V a las 8 semanas y una circunferencia abdominal menor en el grupo V a las 4 semanas y en el grupo V y V+S a las 8 semanas. También se observó hipoglucemia a las 4 semanas en el grupo V+S y a las 8 semanas en el grupo V, además de observar hiperglucemia en el grupo S a las 8 semanas. Todos los grupos de experimentación presentaron infiltrado inflamatorio a las 4 y a las 8 semanas, sin presentar diferencias entre el tiempo o los grupos. De igual modo la inmunohistoquímica mostró marca más intensa en el grupo V para ambas hormonas, en el caso del glucagon a las 4 semanas y en el caso de la insulina a las 8 semanas.

Es importante resaltar que la combinación de la inhalación de vanadio y la ingesta de sacarosa ocasionó la muerte del 60% de los individuos de este grupo, presumiblemente por hipoglucemia severa. Sin embargo en cuanto a los daños morfológicos no se observó sinergismo, adición o

potenciación por parte de estos dos factores. Las alteraciones morfológicas del páncreas fueron iguales para todos los grupos de experimentación en ambos tiempos, y sólo presentaron infiltrado inflamatorio. Por otra parte, la exposición al vanadio provocó una detención en el aumento del peso de los individuos, así como hipoglucemia a las 8 semanas, lo que puede deberse al efecto potenciador de la insulina y anorexigénico del vanadio. En el grupo vanadio+sacarosa se observó hipoglucemia a las 4 semanas y una detención en el aumento del peso a las 8 semanas. En el análisis densitométrico se observó que la presencia de glucagon aumentó a las 4 semanas en el grupo vanadio mientras que la insulina lo hizo a las 8 semanas en el mismo grupo. Otro de los hallazgos relevantes es que la sola exposición subcrónica a vanadio fue capaz de provocar hipoglucemia a las 8 semanas, además de provocar la acumulación de insulina y glucagon dentro de las células del islote, posiblemente por aumento en la secreción o por alterar la vía de secreción a través de diferentes mecanismos de daño. En estudios posteriores se deberán medir las concentraciones de insulina y glucagon en el plasma para poder determinar la relación entre cambios morfológicos y bioquímicos que contribuyeron a la hipoglucemia y en la combinación, a la muerte de individuos en este experimento.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias extrañas (contaminantes) en concentraciones y lapsos suficientes para alterar el equilibrio de las propiedades físicas y químicas naturales de la atmosfera, además de tener efectos nocivos en los humanos, plantas y animales (Gallego *et al*, 2012). Ésta se ha incrementado a través de los años de la mano con el avance tecnológico e industrial y aunado a un crecimiento constante de la población y de los establecimientos humanos lo que la convierte en un problema de salud pública (Weitzenfeld, 1992).

Dentro de las fuentes de contaminantes más frecuentes se encuentran una gran cantidad de actividades que se desarrollan de manera cotidiana a escala individual como el uso del automóvil y la quema de basura, a escala institucional o empresarial como la quema de combustibles en la industria y el uso de solventes, de fuentes naturales como las erupciones volcánicas e incendios forestales o por la utilización de servicios como tintorerías y restaurantes. El resultado de estas actividades es la emisión de partículas o gases contaminantes que pueden resultar nocivos para la salud humana (Zuk *et al*, 2007).

Algunos de los contaminantes atmosféricos más importantes, por los daños que estos pueden ocasionar en la salud poblacional, son principalmente gases como el dióxido de azufre (SO₂), el ozono (O₃), el monóxido de carbono (CO), el amoniaco (NH₃) y los óxidos de nitrógeno (NO_x), así como los compuestos orgánicos totales (COT), los compuestos orgánicos volátiles (COV), las partículas suspendidas totales (PST) y las partículas suspendidas PM₁₀ y PM_{2.5} (Inventario de emisiones de la ZMVM, SMA, 2010).

Dada la importancia de estos contaminantes para la salud humana, la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) se ha encargado de hacer un seguimiento de los niveles de estos contaminantes atmosféricos desde hace años, con el fin de establecer normas y acciones que ayuden a regular las emisiones de estos contaminantes y su presencia en la atmósfera para tener una mejor calidad del aire.

Los daños a la salud que provocan estos contaminantes depende de la concentración y el tiempo de exposición a éstos, además del nivel de salud en la población. Algunos de los daños provocados por estos contaminantes van desde dolor de cabeza e irritación de los ojos hasta alteraciones en el sistema respiratorio como el asma, bronquitis, fibrosis pulmonar, cáncer y problemas cardiovasculares (Zuk *et al*, 2007, PROAIRE, 2011-2020).

2.2 Partículas suspendidas

Las partículas suspendidas, que son contaminantes a los cuales se les atribuyen una gran cantidad de efectos adversos, son una mezcla compleja de materiales sólidos y líquidos suspendidos en el aire. Están conformadas por un núcleo de carbón a los que se adosan en su superficie diversos materiales orgánicos e inorgánicos como algunos metales (Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, 2014).

La importancia de estas partículas radica en su tamaño y su composición que determinan diversos factores como su comportamiento, su permanencia en la atmósfera y sus efectos potencialmente nocivos para la salud humana.

Estas partículas suspendidas pueden categorizarse dependiendo de su diámetro en partículas suspendidas totales (PST), que tienen un diámetro aerodinámico de $100\mu\text{m}$, las partículas gruesas (PM_{10}) con diámetro menor a $10\mu\text{m}$, las partículas finas ($\text{PM}_{2.5}$) cuyo diámetro es menor a $2.5\mu\text{m}$ y las partículas ultrafinas (PM_1) cuyo diámetro es menor a $0.1\mu\text{m}$ (Rojas *et al*, 2003, Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte, 2014).

La distribución espacial de estas partículas está concentrada en zonas donde se presenta una alta actividad vehicular y sus principales fuentes de emisión son la quema de combustibles, las vialidades sin pavimentar, las industrias dedicadas a la fundición y moldeado de metales y en menor proporción la fabricación de diversas sustancias químicas.

En México la Norma Oficial Mexicana (NOM) hasta el 2011, establecía que las concentraciones de PM_{10} no debían exceder $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en períodos de 24 horas ni

50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en la concentración promedio anual. También establecía que las concentraciones promedio para PM_{2.5} no debían exceder los 65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para promedios de 24 horas y de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual. Sin embargo en la ZMVM estas concentraciones han rebasado la NOM en reiteradas ocasiones (NOM-025-SSA1-1993) (Fig. 1 y 2).

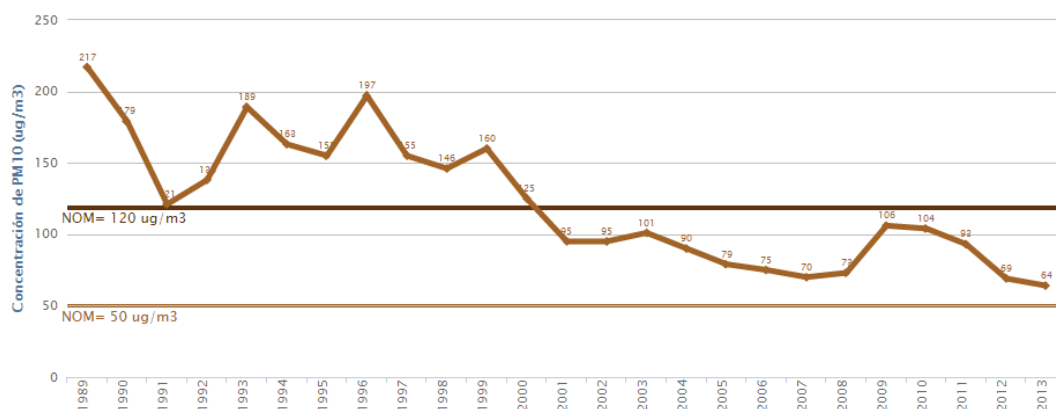


Figura 1. Promedio anual de la concentración de partículas PM₁₀ en zonas del centro de México 1989-2013. El límite de la concentración permitido es de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, sin embargo todas las zonas se ve rebasado. (Modificado de SIMAT 2014)

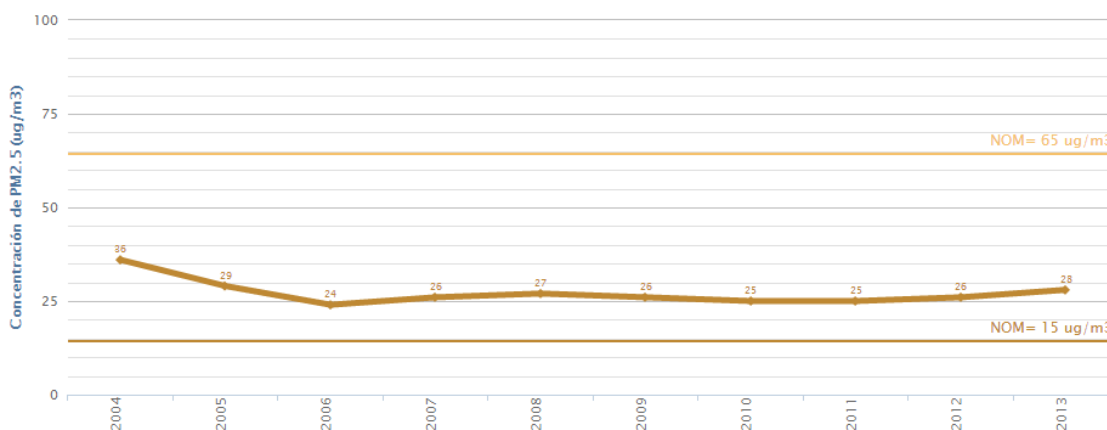


Figura 2. Promedio anual de la concentración de partículas PM_{2.5} en la ZMVM 2004 - 2013, el límite permitido para estas partículas es de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sin embargo en ninguno de los tiempos se cumple la norma. (Modificado de SIMAT 2014)

No obstante dada la vasta evidencia de los daños causados a la salud por parte de este tipo de contaminantes, en la NOM se decretó apenas en el año 2014 una drástica

reducción en los límites permitidos para las concentraciones diarias y anuales de las partículas PM₁₀ Y PM_{2.5}.

El límite actual para PM₁₀ es de 50 µg/m³ en periodos de 24 horas y 35 µg/m³ en periodos anuales y el límite actual para PM_{2.5} es de 30 µg/m³ en periodos de 24 horas y 10 µg/m³ en periodos anuales, una reducción de casi dos terceras partes de la norma anterior (NOM-025-SSA1-2014).

En términos de sus efectos en la salud, las partículas PM₁₀ y PM_{2.5} adquieren mayor importancia ya que por su diámetro las partículas PM₁₀ pueden entrar directamente al aparato respiratorio y depositarse en las vías aéreas superiores, mientras que las partículas PM_{2.5} y PM₁ son capaces de llegar hasta la zona alveolar interfiriendo con uno o más mecanismos de defensa del aparato respiratorio o actuar como vehículo de sustancias tóxicas adheridas a la superficie de la partícula. Estas partículas afectan principalmente al sistema respiratorio y cardiovascular ocasionando tos, bronquitis crónica, infecciones respiratorias, ataques cardíacos, arritmias, aterogénesis y trombogénesis (Zuk *et al*, 2007, EPA 2003).

Los compuestos que se adosan a las partículas suspendidas pueden ser orgánicos (benceno, 1-3 butadieno, hidrocarburos aromáticos policíclicos etc.) o inorgánicas como algunos metales, entre los que se encuentran el vanadio (PROAIRE 2011-2020, SIMAT 2011).

Existen estudios que relacionan a la contaminación atmosférica por partículas suspendidas y algunos metales adosados con problemas en el control de la glucemia, la resistencia a la insulina, la obesidad y con el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2 (Coronado *et al*, 2007; Krämer *et al*, 2010; Teichert *et al*, 2013; Qinghua *et al*, 2009; Janghorbani *et al*, 2014) relacionados con los procesos inflamatorios causados por las partículas suspendidas (Donaldson y Stone, 2003). Uno de los metales que se adosan a este tipo de partículas es el vanadio el cual se describirá en el siguiente apartado.

2.3 Vanadio

El vanadio (V) es un metal de color grisáceo ubicado en la tabla periódica como el primer elemento de transición del grupo VB siendo su número atómico el 23, cuenta con una densidad de 6.11 g/cm^3 y un peso atómico de 50.95, un punto de fusión de 1950°C y un punto de ebullición de 3600°C (Rodríguez- Mercado *et al*, 2006).

Según la ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) el vanadio ocupa el lugar número 22 entre los elementos más abundantes en la corteza terrestre en una concentración aproximada de 100 mg/g los cuales se distribuyen entre 65 diferentes minerales (ATSDR, 2009). El vanadio se encuentra en varios estados de oxidación que van de -1 a +5 siendo los estados más altos (V_{III} , V_{IV} y V_{V}) los que tienen funciones biológicas reconocidas como la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. Su participación en los procesos biológicos se da en forma de anión o catión, en condiciones fisiológicas el V_{V} predomina como anión vanadato (H_2VO_4^-) y V_{IV} como catión vanadilo (VO^{2+}); aunque, pueden presentarse otras especies de cationes (VO^{3+} , VO^{2+}) y aniones (HVO_4^{2-} , $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$ y $\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) de V_{V} y de aniones ($[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$) para V_{IV} mientras que en los fluidos extracelulares se encuentra en forma de metavanadato (VO^{3+}).

2.3.1 Fuentes de emisión

El vanadio ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre con una presencia de 0.014% a 0.02%. De manera natural puede encontrarse en distintos minerales como cuprodescloicita, descloicita, patronita, roscolelita, vanadinita, carnotita, corvuosita y fernandinita, entre otros, de los cuales puede extraerse el vanadio por métodos químicos. Sin embargo, la liberación de este metal al ambiente como contaminante se da a través de polvos continentales, aerosoles marinos, erupciones volcánicas e incendios forestales. En cenizas, residuos sólidos u hollín se pueden encontrar de 600 a $700 \text{ }\mu\text{g/g}$.

La liberación de vanadio por causas antropogénicas contribuye con dos terceras partes del vanadio liberado al ambiente, se debe en gran parte a las industrias pero principalmente a la quema de combustibles fósiles los cuales contienen grandes cantidades de vanadio en su composición, en particular el petróleo proveniente de países americanos entre los cuales el petróleo venezolano presenta una concentración de vanadio que va de 282 a 1180 $\mu\text{g/g}$, en la variedad atabasca de Canadá y la maya de México el contenido es de 640 y 243 $\mu\text{g/g}$, respectivamente (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006).

2.3.2 Usos

El vanadio se ha utilizado en la industria metalúrgica para la manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión al igual que para la producción de acero y aleaciones no ferrosas como por ejemplo aleaciones con aluminio (Al), titanio (Ti), boro (B), cromo (Cr), níquel (Ni), manganeso (Mn) y tungsteno (W). Se utiliza para la preparación de vidrio y pinturas de aplicación común al igual que en la producción de colorantes para fotografía y cinematografía y para la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético.

En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes y en la industria farmacéutica anteriormente se han utilizado compuestos de vanadio como el metavanadato de sodio para el tratamiento de la anemia, tuberculosis y diabetes en dosis de 1-8 mg.

Uno de los compuestos más utilizados dentro de la industria es el pentóxido de vanadio (V_2O_5), una sal amarilla, poco soluble en agua, con un punto de fusión de 1750°C y un punto de ebullición de 690°C , este compuesto es altamente tóxico por lo cual se ha establecido un límite de exposición ocupacional de $0.05\text{mg}/\text{m}^3$ (Rodríguez-Mercado, 2006), sin embargo se ha registrado que la exposición ocupacional a compuestos de vanadio ha alcanzado niveles de 50 a $100\text{mgV}/\text{m}^3$ y en algunas ocasiones hasta de $500\text{mgV}/\text{m}^3$ (Barceloux, 1999).

2.3.3 Vías de exposición

La toxicidad del vanadio depende de diversos factores entre los cuales se encuentra la vía de administración y el compuesto administrado, en el caso del vanadio se ha reportado que los compuestos de vanadio de mayor valencia, como los pentavalentes, presentan mayor toxicidad que los compuestos con una valencia menor.

De manera cotidiana la población se encuentra expuesta a los compuestos de vanadio por la vía oral, dérmica e inhalada.

Dérmica

Dada la baja solubilidad del vanadio en agua y lípidos no se ha reportado efectos por la exposición por esta vía de absorción (ATSDR, 2009); sin embargo se ha reportado que el contacto directo con el vanadio puede provocar dermatitis e irritación (SEPA, 2006).

Oral

Para la población general, los alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, En los alimentos se encuentra en los estados de oxidación III y IV que en su mayoría se encuentra en eneldo o pimienta negra, vegetales donde las concentraciones encontradas abarcan de 431 y 987 $\mu\text{g}/\text{kg}$, seguido de alimentos de mar, granos y carnes con concentraciones de 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y por último en grasas, aceites, frutas y vegetales con concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por lo que se ha estimado que la dieta diaria aporta entre 13 y 15 μg de vanadio. En el agua para beber se han encontrado concentraciones menores a 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (EFSA, 2004).

Inhalada

El vanadio es liberado al ambiente a través de procesos como la quema de combustibles fósiles, incendios forestales, erupciones volcánicas entre otros, éste al ser liberado se adosa a las partículas PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$. Los niveles de este contaminante en el ambiente depende de diferentes factores entre los que se encuentran las condiciones

climatológicas, la localización geográfica y las condiciones de urbanización. En grandes urbes se han detectado niveles que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y en zonas rurales cantidades menores a 0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En el caso de la ciudad de México se ha reportado que existen niveles de vanadio en la atmósfera de 0.62 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas urbanas y 0.011 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en zonas rurales (Fortoul *et al*, 2002) de los cuales se han encontrado adheridas a partículas PM_{10} 0.114 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y $\text{PM}_{2.5}$ 0.093 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Rodríguez-Mercado, 2006).

Estas concentraciones han incrementado en el tiempo, esto fue determinado indirectamente debido a que se detectó un aumento en la cantidad de vanadio en pulmones de habitantes de la ciudad de México de la década de 1990 con respecto a habitantes de la ciudad de México de la década de 1960 (Fortoul *et al*, 2002).

2.3.4 Toxicocinética

El vanadio es capaz de entrar al organismo por diferentes vías para posteriormente ser absorbido. Se sabe que la población está expuesta al vanadio por diferentes vías, sin embargo la cantidad de este metal que entra al organismo depende de la vía por la cual haya sido expuesto ya que existen reportes de que por vía oral se absorbe un 3% (WHO, 2001) mientras que por la vía inhalada se absorbe un 25% (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Una vez que es absorbido es transportado a diferentes tejidos del cuerpo a través del torrente sanguíneo en forma de vanadil unido a albúmina y preferentemente a transferrina donde el pH neutro del plasma favorece el dominio del V_V (Barceloux, 1999).

Cuando el vanadio es absorbido puede encontrarse en estados de oxidación III, IV y V; sin embargo, dependiendo de las condiciones del sitio en que se encuentre puede sufrir procesos de óxido-reducción.

El V_V es reducido a V_{IV} por el glutatión de los eritrocitos o por sustancias reductoras presentes en el plasma como el ácido ascórbico y las catecolaminas mientras que cuando se encuentra como V_{III} posiblemente puede ser oxidado a V_{IV} y V_V por la presencia de oxígeno en la sangre (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006).

2.3.5 Mecanismos de daño

El vanadio es capaz de inducir una gran cantidad de efectos tóxicos a través de diferentes mecanismos de daño, entre los cuales destacan el estrés oxidante, que es un desbalance en el estado de óxido-reducción natural provocado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces de dañar la integridad de las membranas y de las proteínas. A partir de esto se observan más daños provocados por los ROS, como es el daño genotóxico donde se observa el rompimiento de material genético de cadena sencilla y la formación de micronúcleos, también al dañarse la integridad de la membrana de las mitocondrias se libera el citocromo C el cual provoca la apoptosis mediada por las caspasas 3 y 9 y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Afeseh *et al*, 2009). También se propicia la inhibición de proteínas de la familia de las tirosinas fosfatasas, en el cual los ROS oxidan los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína de dichas proteínas causando la formación de enlaces disulfuro que alteran la conformación espacial de las proteína alterando su actividad catalítica (Samet *et al*, 1999; Mailhes *et al*, 2003). También inhibe proteínas ATPasas por la oxidación directa o indirecta de su sitio catalítico, lo que conlleva a otro tipo de daño al citoesqueleto, en particular a las fibras de actina y microtubulos ya que inhibe proteínas polimerizantes y como se mencionó antes proteínas ATPasas.

Otro tipo de daño causado por su configuración espacial parecida a los fosfatos, es la inhibición de proteínas que poseen este grupo (PO_4^-) como por ejemplo la adenilato ciclasa y la gliceraldehido-3-fosfato entre otras (Mussali-Galante *et al*, 2004; Fortoul *et al*, 2007).

2.3.6 Daños a la salud

Se ha reportado que en trabajadores ocupacionalmente expuestos a vanadio de manera crónica existen daños en órganos del sistema respiratorio provocando un color verdoso en la lengua y el desarrollo de enfermedades como la bronquitis, rinitis, faringitis y laringitis. También se han reportado daños en el aparato cardiovascular con variaciones en el ritmo

cardiaco y en la bioquímica sanguínea, donde se observa una disminución de los grupos sulfhidrilos y variaciones en la concentración de albúmina y colesterol.

De la misma manera, en exposiciones agudas se han observado irritación en la nariz y la mucosa oral, fiebre, conjuntivitis, aumento de la peristalsis, dermatitis, vómito, diarrea, temblores, daño renal y problemas respiratorios (Rodríguez-Mercado, 2006).

En el modelo de inhalación de (V_2O_5) a una concentración de 0.02M se han reportado daños a diferentes órganos y sistemas en diferentes tiempos de exposición:

Se reportó daño en el material genético caracterizados por rompimientos de cadena sencilla y formación de micronúcleos en leucocitos periféricos y células de médula ósea (Rojas-Lemus *et al*, 2014). En el sistema respiratorio se ha reportado infiltrado inflamatorio y un aumento en la secreción de citocinas inflamatorias en el epitelio bronquiolar, además de una reducción en el número de células bronquiales ciliadas como no ciliadas aunado a alteraciones en sus núcleos (Fortoul *et al*, 2011). En el sistema nervioso el daño se ha caracterizado en el bulbo olfatorio, la corteza motora, hipocampo en la sustancia negra y en el epéndimo donde se han presentado daño citológico, alteraciones funcionales y ultraestructurales. Además se ha reportado que existe daño a la barrera hematoencefálica por pérdida de las uniones estrechas (Ávila-Costa *et al*, 2005; Colín-Barenque *et al*, 2007). En el sistema hematopoyético durante una exposición subcrónica se encontró anemia normocrómica, normocítica, un aumento en el número de plaquetas además de alteraciones en su forma y función, un aumento en el número y el tamaño de los megacariocitos de médula ósea y bazo. Niveles elevados de neutrófilos, linfocitos, proteínas séricas totales y fibrinógeno (Gonzalez-Villalva *et al*, 2006, 2009, 2011). En el sistema inmune se reportó una alteración en los límites entre la médula y corteza del timo así como cambios nucleares en linfocitos (Piñón-Zarate *et al*, 2007). En el aparato reproductor se ha reportado necrosis en gran cantidad de células del epitelio seminífero, alteración en la morfología de los espermatozoides así como alteraciones en su morfología y en el proceso de espermatogénesis (Rodríguez-Lara *et al*, 2013).

En el aparato digestivo se reportó en hígado un aumento en la peroxidación lipídica y alteraciones morfológicas en hepatocitos además de un aumento en la presencia de células binucleadas y alteraciones que sugieren actividad regenerativa (Cano-Gutiérrez, 2012).

En el caso del páncreas en una exposición subcrónica de seis semanas se observó un aumento de la granularidad de las células acinares, inflamación con presencia de neutrófilos, además de un aumento en los niveles de amilasa y triglicéridos en sangre (Cano-Gutierrez, 2009).

2.4 Ingesta de bebidas azucaradas

Un problema de salud pública en los países tanto industrializados como en países en desarrollo es el alto consumo de bebidas azucaradas que puede provocar enfermedades no transmisibles relacionadas con el metabolismo energético tales como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y la hipertensión, que poco a poco se han venido convirtiendo en una pandemia (Barquera *et al*, 2008).

El incremento de estas enfermedades en la población humana ha asociado con el sedentarismo y el incremento en el consumo de ciertos grupos alimenticios entre los que se encuentran las denominadas bebidas azucaradas, que son bebidas a las cuales se les han añadido carbohidratos simples de origen natural (azúcares) en cantidades adicionales a las que posee originalmente. Entre los diferentes grupos de bebidas azucaradas podemos encontrar las llamadas bebidas carbonatadas regulares o gaseosas, jugos endulzados con azúcar, bebidas hidratantes con azúcar, té endulzado y bebidas energizantes, a las cuales les han añadido diversas combinaciones y concentraciones de “azúcares” como la sacarosa, la fructosa, jarabe de maíz rico en fructosa entre otros (Mendivil CO., 2013).

México es uno de los países que enfrenta este problema de salud debido al estilo de vida y al elevado consumo de estas bebidas. En términos energéticos la población mexicana es una de las poblaciones que obtiene mayor contenido energético de las bebidas

azucaradas en contraste con los otros grupos alimenticios. Este consumo ha venido aumentando a lo largo de los años entre los mexicanos mayores a dos años, de 100 a 300 kcal al día, a tal grado que en la actualidad los jóvenes consumen el 20.1% de sus calorías totales de las bebidas, mientras que los adultos consumen el 22.3% (Mendivil CO., 2013).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) señalaron que en México se consumen cerca de 163 litros de refresco por persona al año, lo que convierte a México en el mayor consumidor de refrescos en el mundo, superando a los Estados Unidos por aproximadamente 45 litros por persona al año. (WHO, 2011; Vartanian *et al*, 2007).

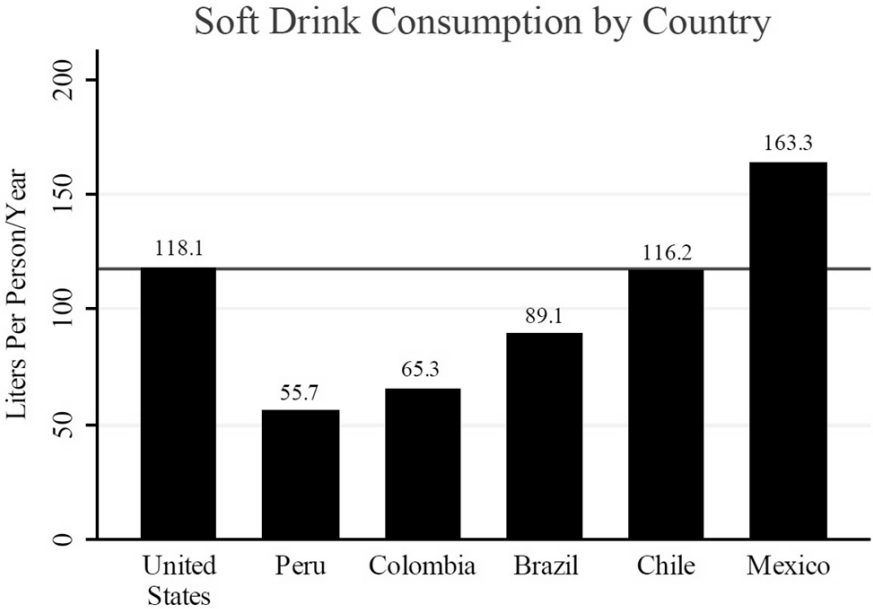


Figura 4. Promedio del consumo de bebidas azucaradas en países de América. México ocupa el primer lugar en el consumo con 163.3l rebasando a los Estados Unidos (Tomado de WHO, 2011).

El Instituto Nacional de Salud Pública (INS), la OPS y la WHO han determinado que el consumo elevado de estas bebidas azucaradas es la causa principal del problema de obesidad en México. Aunado a esto se ha reportado que la ingesta constante de bebidas azucaradas trae como consecuencia repercusiones en varios sistemas y órganos del cuerpo humano, algunas de las consecuencias son la hiperinsulinemia y el agotamiento de las células β pancreáticas, el aumento de los niveles de glucosa en sangre, un aumento en

la masa y el tejido adiposo de los individuos y el aumento en la secreción de adipocinas que llevan al desarrollo del síndrome metabólico y algunas otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (Larqué *et al*, 2001). En diferentes estudios epidemiológicos se han relacionado los efectos de una ingesta elevada de azúcares simples con hiperinsulinemia, intolerancia a los carbohidratos, resistencia a la insulina por la pérdida de la función pancreática por una elevada secreción de insulina o por glucotoxicidad en la célula β , diabetes mellitus tipo 2 (Pilar Matía *et al*, 2007, Larqué *et al*, 2001).

Las bebidas azucaradas además de ocasionar problemas metabólicos, pueden dañar directamente al páncreas tanto a la fracción endocrina como a la fracción exocrina, esto se ha reportado en estudios que demuestran que el páncreas puede sufrir daños prooxidantes al consumir grandes cantidades de sacarosa y sufrir hialinización, focos inflamatorios y macrófagos en los islotes de Langerhans por la expresión de citocinas mediadoras de la inflamación; además de que un estudio reciente ha mostrado preocupación por relacionar diferentes tipos de cáncer con la ingesta elevada de sacarosa a través de la revisión de informes publicados, revisiones sistemáticas y metaanálisis, que hasta el momento solo han podido relacionar la ingesta de sacarosa con un posible riesgo de desarrollar cáncer pancreático (Busserolles *et al*, 2002; Aranceta-Bartrina y Pérez-Rodrigo, 2013; Roncal *et al*, 2011).

Debido a que tanto la contaminación como el consumo de bebidas azucaradas son factores que pueden alterar el metabolismo de la glucosa y el principal órgano para la regulación de la glucemia es el páncreas, se describe éste a continuación.

2.5 Páncreas

El páncreas es una glándula mixta perteneciente al sistema digestivo, esta se divide en 3 partes (cabeza, cuerpo y cola) y se encarga de secretar diferentes enzimas digestivas y diversas hormonas necesarias para algunos procesos energéticos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y otros compuestos de carácter energético.

En su histología está compuesto por una fracción endocrina y una exocrina, en cuanto al componente exocrino se encuentran descritos los acinos pancreáticos, los cuales están conformados por células con un núcleo central aplanado y citoplasma adelgazado llamadas células centroacinares las cuales secretan sodio y bicarbonato y las células acinares que tienen forma piramidal con basofilia basal y acidofilia apical, acinosa o tubuloacinosa que se encargan de producir zimógenos (enzimas inactivas) por ejemplo enzimas amilolíticas (alfa-amilasa) que ayuda a degradar carbohidratos, lipasas que ayudan a la degradación de lípidos, endopeptidasas proteolíticas (tripsinógeno y quimiotripsinógeno) y exopeptidasas proteolíticas (proaminopeptidasa y procarboxipeptidasa) que rompen los enlaces peptídicos para digerir proteínas y enzimas nucleolíticas (desoxiribonucleasa y ribonucleasa) que digieren ácidos nucleicos. Los zimógenos al igual que el sodio y el bicarbonato son secretadas a través del conducto pancreático principal (de Wirsung) para desembocar en la segunda porción del duodeno para seguir con el proceso de digestión (figura 5) (Ross M., 2012).

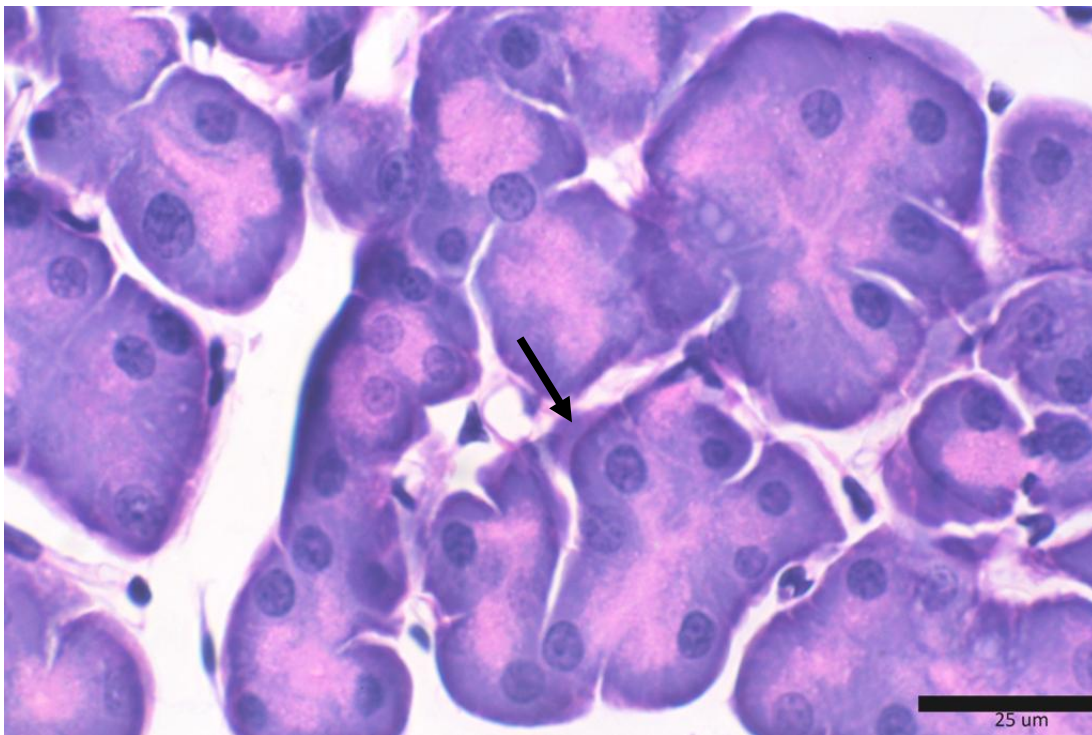


Figura 5. Corte longitudinal de páncreas exocrino de ratón teñido con la técnica H-E (40x). Se aprecian acinos pancreáticos con células acinares(↘).

El componente endocrino está conformado por acúmulos bien definidos de diferentes células llamados islotes de Langerhans, estos están integrados por células poliédricas entre las que destacan las células α , β y δ , éstas se diferencian en cuanto a su función y su proporción dentro del islote.

Las células β se encuentran situadas al centro de los islotes de Langerhans (figura 6), constituyen alrededor del 70% de la totalidad de células insulares y su principal función es sintetizar y liberar insulina además de servir como sensor de los niveles de glucosa en sangre.

Las células α se encuentran situadas en la periferia del islote de Langerhans representando entre el 15 y 20% de la totalidad de células (figura 7). Estas células se encargan de la producción de glucagón mientras que las células δ se encargan de producir somatostatina y se encuentran situadas en el centro del islote representando entre el 5 y 10% de las células en el islote (Ross M., 2012).

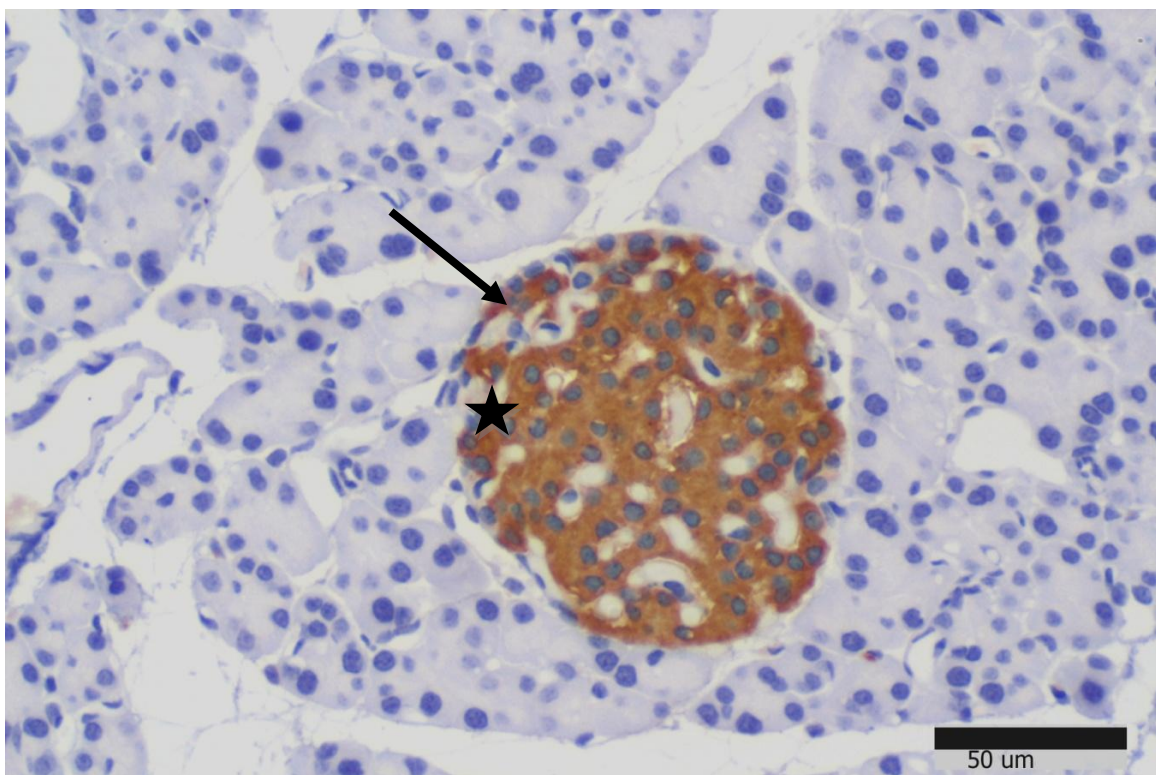


Figura 6. Corte longitudinal de páncreas de ratón procesado con inmunohistoquímica. Se observa el islote de Langerhans (*) con células β (∩) marcadas con anticuerpo anti-insulina.

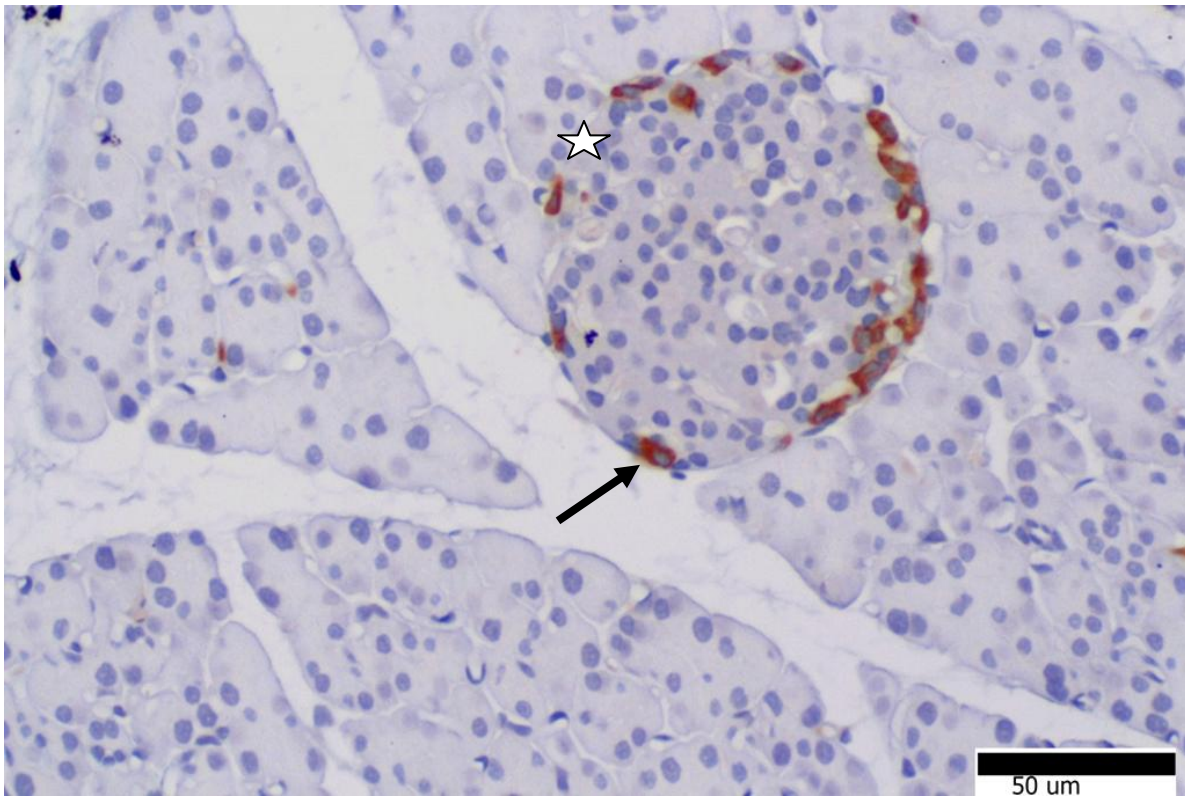


Figura 7. Corte longitudinal de páncreas de ratón procesado con e inmunohistoquímica. Se observa el islote de Langerhans (*) con células α (\blacktriangledown) marcadas con anticuerpo anti-glucagon.

2.5.1 Hormonas pancreáticas

Las hormonas pancreáticas son esenciales para el control de los niveles de glucosa en sangre (glucemia). Las dos más importantes son la insulina y el glucagon que son sintetizadas por la célula β y α respectivamente. Estas dos hormonas juegan un papel antagónico en cuanto a sus funciones de regulación de la glucemia y su liberación está estrictamente relacionada con la glucemia y el requerimiento energético del organismo.

Cuando los niveles de glucosa en sangre se encuentran bajos (hipoglucemia), las células α sintetizan glucagon y lo liberan al torrente sanguíneo donde se distribuye y llega a sus órganos diana en los cuales propicia diferentes procesos. Primero estimula la liberación de glucosa al torrente sanguíneo por parte de las células hepáticas, estimula la

gluconeogéneis y la glucogenólisis, estimula la proteólisis, moviliza las grasas de los adipocitos y estimula la lipasa hepática dando lugar al aumento de glucosa en el torrente sanguíneo para alcanzar los niveles homeostáticos de glucosa en sangre o normoglucemia (60 a 110 mg/dl.)

En el caso contrario, cuando los niveles de glucosa en sangre se encuentran elevados (hiperglucemia) la célula β sintetiza y secreta insulina la cual se dirige a través del torrente sanguíneo a sus órganos diana donde algunos de sus efectos más importantes son aumentar la entrada de glucosa de la sangre a las células gracias a la expresión e integración de los transportadores de glucosa GLUT en la superficie de las membranas de las células blanco (Castrejón *et al*, 2007); en los adipocitos aumenta el almacenamiento de triglicéridos e inhibe lipasas, en las células musculares aumenta la síntesis de proteínas y de glucógeno, en el hígado se aumenta la síntesis y almacenamiento de glucógeno, promueve la síntesis de proteínas y triglicéridos así como de lipoproteínas de baja densidad (LDL), e inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Hiriart M. y Vidaltamayo R., 2002).

La unión de la insulina con su receptor permite la expresión de los GLUT en las membranas de todas las células del organismo lo que facilita el paso de glucosa de un compartimento a otro a través de su gradiente de concentración por lo que se le llama transporte por difusión facilitada. Se han caracterizado 14 GLUT que se diferencian en cuanto a su distribución y su capacidad de introducir glucosa del torrente sanguíneo a las células, dependiendo de las necesidades energéticas de cada una de las células (Castrejón *et al*, 2007).

En el páncreas se expresa el GLUT10, GLUT11 y principalmente el GLUT2, este último se expresa estrictamente en la células β pancreáticas funcionando como sensor de los niveles de glucosa en sangre lo que ayuda posteriormente a la regulación hormonal a través de la insulina y el glucagon principalmente (Castrejón *et al*, 2007).

2.5.2 Efecto del vanadio como potenciador de la insulina

El vanadio ha demostrado tener efectos en el metabolismo energético y la homeostasis de la glucosa estimulando la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno y lípidos en el tejido muscular, hepático y adiposo. Además inhibe la actividad de varias enzimas gluconeogénicas tanto en hígado como en el riñón (Altamirano-Lozano, 2006).

Por otro lado en modelos experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* y en modelos de diabetes mellitus tipo I y tipo II se han encontrado efectos hipoglucemiantes provocados por los efectos inhibitorios del vanadio sobre la familia de proteínas tirosina fosfatasas (PTP), esta inhibición impide que las subunidades β del receptor de insulina (que fueron fosforiladas por la unión de la insulina con su receptor) se desfosforilen, permitiendo que la vía de señalización permanezca activa de manera prolongada y con los efectos propios de la insulina en los diferentes órganos blanco (Srivastava y Mehdi, 2004). Al estar activada permanentemente esta vía, hay mayor entrada de glucosa a las células, con lo que se produce hipoglucemia.

Para que el vanadio provoque su acción hipoglucemiante, es necesario que el receptor de insulina este previamente activado, por lo cual es indispensable que existan concentraciones aunque sean mínimas de ésta hormona.

Para que el vanadio tenga efectos sobre el receptor de insulina, debe estar activo por lo que es necesario que existan cantidades aunque sean mínimas de esta hormona.

3. Justificación

La contaminación por partículas es un problema importante en las grandes ciudades y, de los metales que se adosan a su superficie, el vanadio ha aumentado de manera considerable en la atmósfera de la Ciudad de México. Por otro lado, la ingesta de bebidas azucaradas también es un problema de salud pública en nuestro país, que tiene efectos en la regulación de la glucemia y que, a largo plazo, predispone a la población a padecer enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes. Algunos metales tienen implicación en la regulación de la glucosa en sangre, como es el caso del vanadio ingerido, pero no se ha estudiado el efecto que tienen los metales contaminantes, en este caso el vanadio inhalado, en individuos que además consumen bebidas azucaradas.

El páncreas endocrino es un órgano importante en el control de la glucemia, por lo cual es indispensable estudiar el efecto combinado del vanadio en un modelo de ingesta de bebidas altas en sacarosa.

4. Hipótesis

Si el vanadio y la ingesta de sacarosa son factores que alteran la morfofisiología del páncreas, la combinación de ambos factores propiciarán la aparición de alteraciones histológicas y en la presencia de insulina y glucagón pancreáticos, así como en la homeostasis de la glucemia de los ratones expuestos a la inhalación de vanadio y al consumo de bebidas con alta concentración de sacarosa.

5. Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de la inhalación de vanadio y el consumo de bebidas altas en sacarosa en la glucemia, así como las alteraciones morfológicas y los cambios en la presencia de insulina y glucagon en el páncreas en un modelo murino.

Objetivos particulares

Comparar los cambios en el peso corporal y la circunferencia abdominal entre los diferentes grupos.

Comparar las diferencias en la glucemia de los diferentes grupos utilizando un glucómetro.

Determinar las diferencias en la ingesta de alimento y agua entre los diferentes grupos.

Analizar los cambios en la morfología del páncreas en cortes histológicos teñidos con H-E entre los grupos.

Analizar por inmunohistoquímica las diferencias en la presencia de insulina y glucagon en el páncreas endocrino en los diferentes grupos.

6. MÉTODO

6.1 Modelo experimental

Se utilizaron 40 ratones de la cepa CD1 con un peso de 30-35g los cuales fueron separados de manera aleatoria en cuatro grupos de 10 ratones (control (C), vanadio (V), sacarosa (S) y vanadio+sacarosa (V+S)) los cuales permanecieron bajo condiciones de luz/oscuridad de 12 horas con una alimentación *ad libitum*.

Durante 8 semanas los grupos V y V+S fueron expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M en una caja de acrílico cerrada conectada a un nebulizador durante una hora dos veces por semana mientras que los animales de los grupos C y S inhalaban vehículo de la misma forma.

Durante el tiempo del experimento los grupos S y V+S bebieron agua con sacarosa en una concentración de 30% a libre demanda.

6.2 Toma de glucosa, peso y circunferencia abdominal

Se midió el peso de los ratones con una báscula Taconic® y se midió la circunferencia en el diámetro mayor del abdomen con una cinta métrica en todos los grupos a las 0, 4 y 8 semanas.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal por corte de la cola después de mantener a los ratones de todos los grupos en ayuno de 12 horas a las 4 y 8 semanas, para determinar los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro ONE TOUCH ULTRA®.

6.3 Medición de ingesta de bebida y comida

Diariamente durante la cuarta semana del experimento se pesaron 150g de croquetas Rodent Laboratory Chow® y se colocaron en las cajas para la alimentación *ad libitum*, al día siguiente se pesaba el sobrante de comida y se hacía una comparativa para determinar la ingesta diaria de alimento de los ratones de cada grupo.

En el caso de la bebida, se preparaban 150 ml del agua correspondiente al tratamiento y al día siguiente se medía la cantidad de agua sobrante para determinar la cantidad de ml que ingerían diariamente los ratones de cada grupo.

6.4 Toma de muestras

Se realizó el sacrificio de 5 ratones de cada grupo a las 4 y 8 semanas; éstos fueron anestesiados previamente con pentobarbital sódico, se perfundieron vía intracardiaca con solución salina y se fijaron con paraformaldehído 4%, se disecó el páncreas y se colocó en paraformaldehído 4% durante 24 horas. Después, los órganos fijados se lavaron con PBS y fueron procesados con la técnica histológica convencional para obtener cortes blancos de 5 µm necesarios para realizar la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y la técnica de inmunohistoquímica.

6.5 Inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica cromatogénica según el protocolo de García F. (2012), para éste se utilizaron cortes blanco de páncreas de ratón de cada uno de los grupos en ambos tiempos (un corte blanco por ratón), los cortes blancos fueron desparafinados por medio de calor durante 30 min y xilol durante 5 min, estos fueron rehidratados en soluciones de alcohol graduales y alcohol-agua. Posteriormente las preparaciones fueron sumergidas en una solución de Diva Decloacker (biomedical care®) y colocadas dentro de una olla a presión hasta alcanzar una presión de 20psi para el desenmascaramiento de los epitopes o recuperación antigénica. Una vez realizado el desenmascaramiento se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena sumergiendo las preparaciones en una solución de H₂O₂ al 0.9% durante 15 min.

Continuando con el protocolo se incubó el anticuerpo primario anti-insulina (Cell Signaling® 1:200 con PBS-albúmina) durante 45 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo se realizaron tres lavados de 4 minutos cada uno, a las muestras con PBS-Tween para inmediatamente después incubar el anticuerpo secundario (Biotinylated Link Universal, DAKO®) durante 30 minutos procedido de otros tres lavados con PBS-Tween y

la incubación con estreptavidina-HRP (DAKO®) por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se revelaron las muestras con la reacción provocada por la diaminobenzidina (DAB-Plus substrate kit, invitrogen®) la cual fue monitoreada al microscopio y detenida con agua destilada. Este mismo procedimiento fue realizado con el anticuerpo anti-glucagon (Cell Signaling® 1:200 con PBS-albúmina).

6.6 Toma de fotomicrografías y análisis densitométrico

Se tomaron fotomicrografías con una cámara Canon® EOS REBEL T4i adaptada a un microscopio óptico Olympus BH2-RFCA® de los cortes de páncreas tanto teñidos con H-E como de los que fueron procesados con la técnica de inmunohistoquímica anti-insulina y anti-glucagon.

El análisis densitométrico de 15 imágenes digitales de diferentes islotes de Langerhans de cada grupo en ambos tiempos, para ambas hormonas se realizó con la ayuda del software DENSIFE® con el cual se establecieron dos umbrales de marca con la finalidad de diferenciar dos intensidades teniendo como resultado una marca con alta inmunoreactividad (umbral 0.3) y una marca con baja inmunoreactividad (umbral 0.5) (figura 8).

El número de pixeles obtenidos con el umbral alto (0.5) se consideró como el 100% de la marca (cabe mencionar que con este umbral se consideraron tanto las células con marca leve como las que la tenían intensa). Posteriormente se midió el número de pixeles obtenidos con el umbral bajo (0.3) (que corresponde a las células con una marca intensa) y se realizó la conversión de este último a porcentaje, el cual nos dio el porcentaje del área marcada con alta inmunoreactividad, lo que denota zonas en las cuales existe una mayor presencia de hormona.

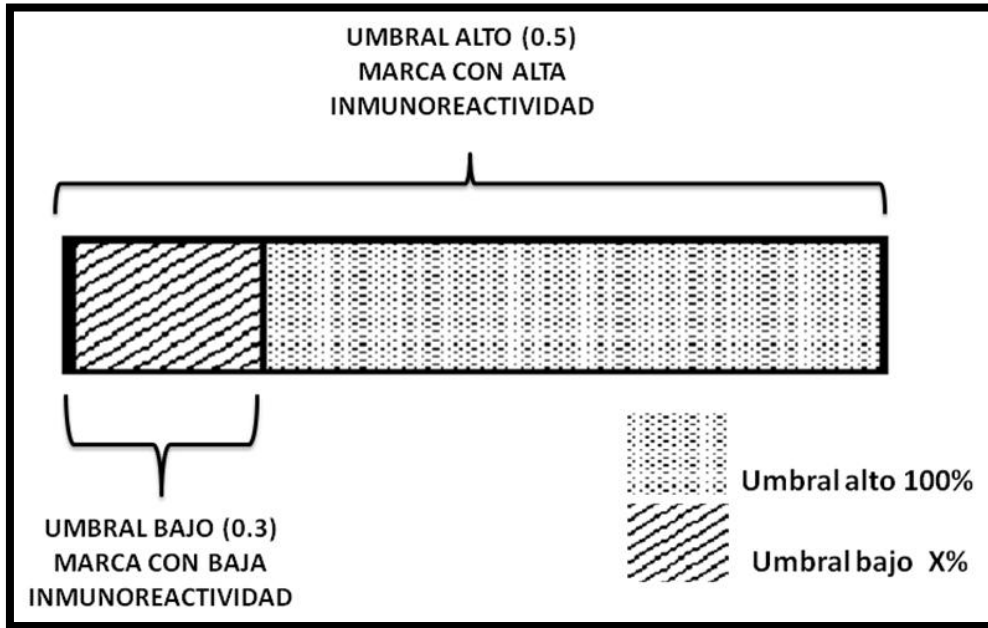


Figura 8. Resumen gráfico del método utilizado para el análisis densitométrico utilizando dos umbrales de lectura para diferenciar entre dos intensidades de marca.

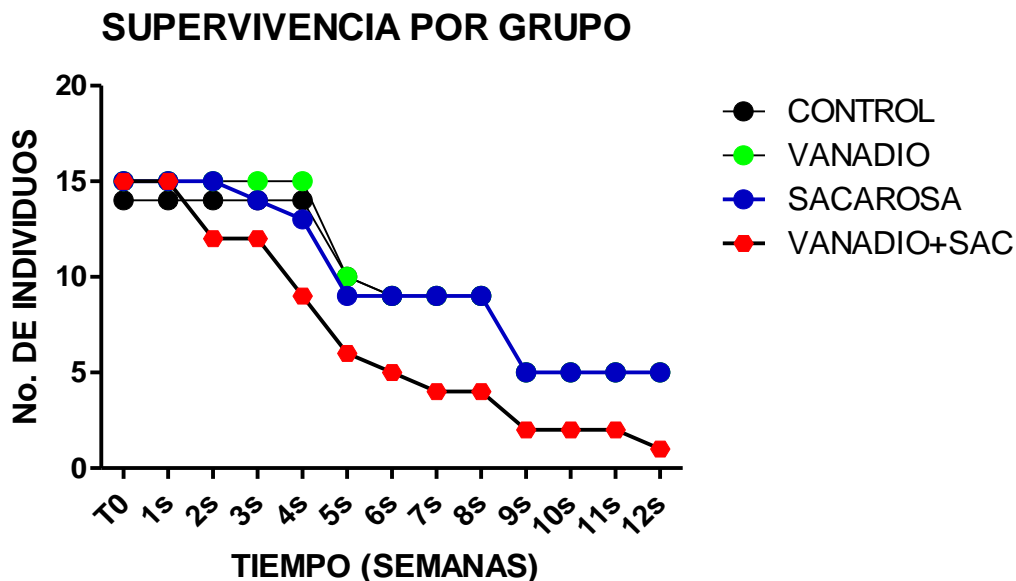
Con los resultados obtenidos en cada una de las etapas del experimento se realizó un análisis con la prueba de ANOVA considerando una diferencia estadísticamente significativa si $P \leq 0.05$ y posteriormente se realizó una prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Supervivencia

Inicialmente el número de ratones por cada grupo estaba programado para un experimento de 12 semanas, sin embargo durante el experimento, el grupo vanadio+sacarosa se murió el 60% de los individuos entre la 2° y la 4° semana (gráfica 1). Por esta situación se tuvo que repetir el experimento encontrando de nuevo los mismos resultados en cuanto a los decesos en este mismo grupo y se decidió comparar los resultados obtenidos hasta las 8 semanas.

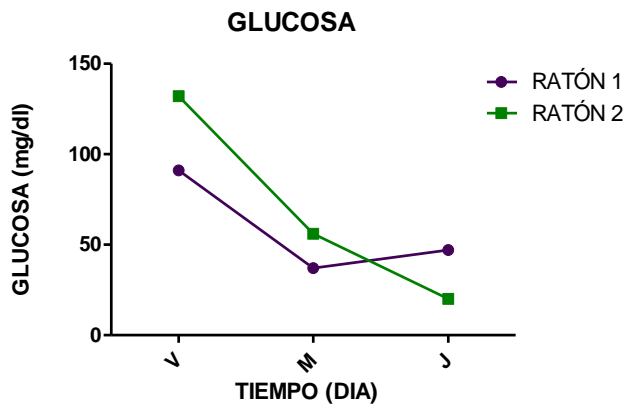
El estado de los ratones del grupo vanadio+sacarosa era de inmovilidad y falta de acicalamiento (figura 9), por lo cual se dio un seguimiento durante una semana de dichos ratones con lo que se constató que dichas muertes se debieron a una baja drástica en el peso corporal y a hipoglucemia severa (gráfica 2 y 3).



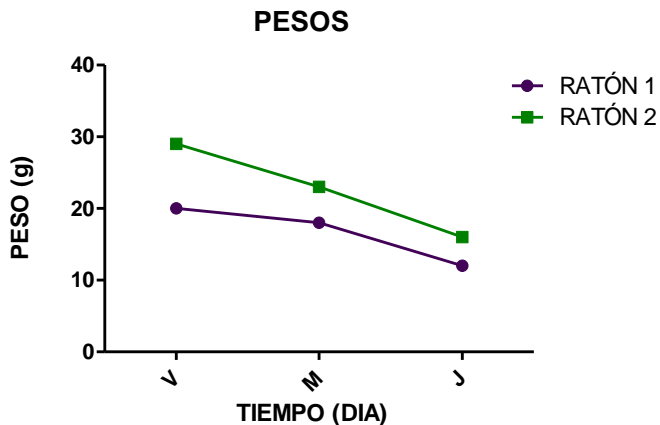
Gráfica 1. Supervivencia de los ratones de los diferentes grupos a lo largo de 8 semanas. Se encontró que el grupo vanadio+sacarosa sufrió una pérdida del 60% de los individuos entre la 2° y la 4° semana.



Figura 9. Fotografía de un ratón del grupo control (*) y un ratón del grupo vanadio+sacarosa (↘) tomada la segunda semana del experimento, se muestra una comparativa en el estado físico de los ratones de dichos grupos donde el estado del individuo del grupo vanadio+sacarosa se ve muy deteriorado.



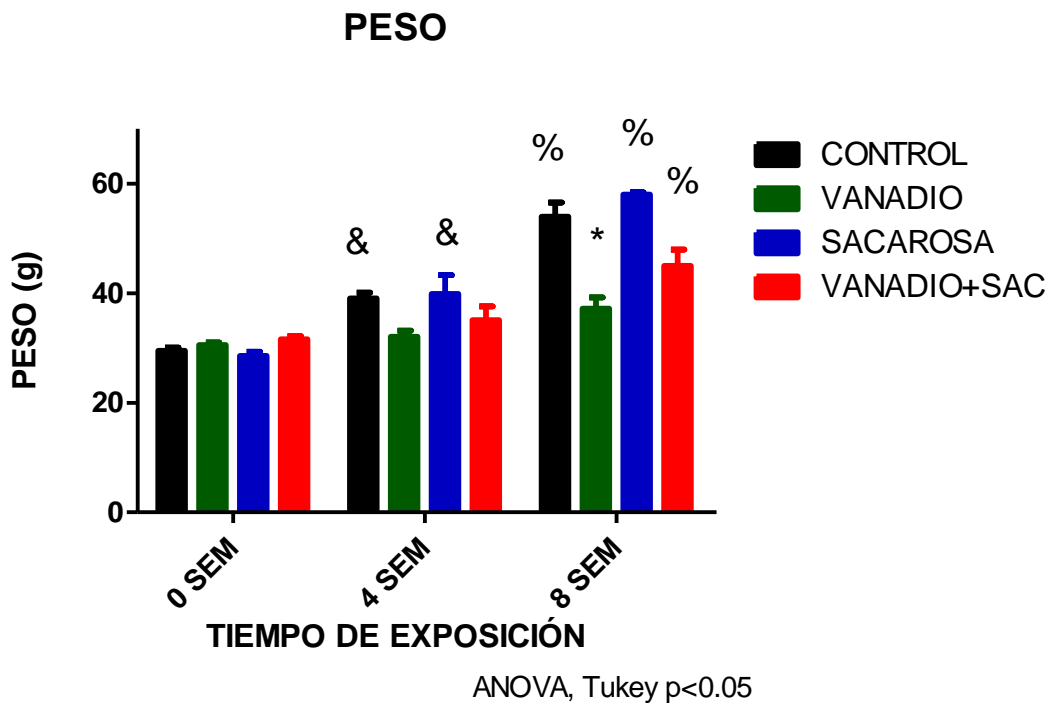
Gráfica 2. Monitoreo de glucosa de dos individuos del grupo vanadio+sacarosa durante una semana antes de su deceso, se observa que los valores de glucosa muestran un estado de hipoglucemia severa, lo cual resultó ser una de las causas de los decesos.



Gráfica 3. Peso corporal de dos individuos del grupo vanadio+sacarosa durante una semana antes de su deceso, se observa que el peso corporal disminuyó drásticamente durante este lapso de tiempo, lo cual resultó ser una de las causas de los decesos.

7.2 Peso corporal

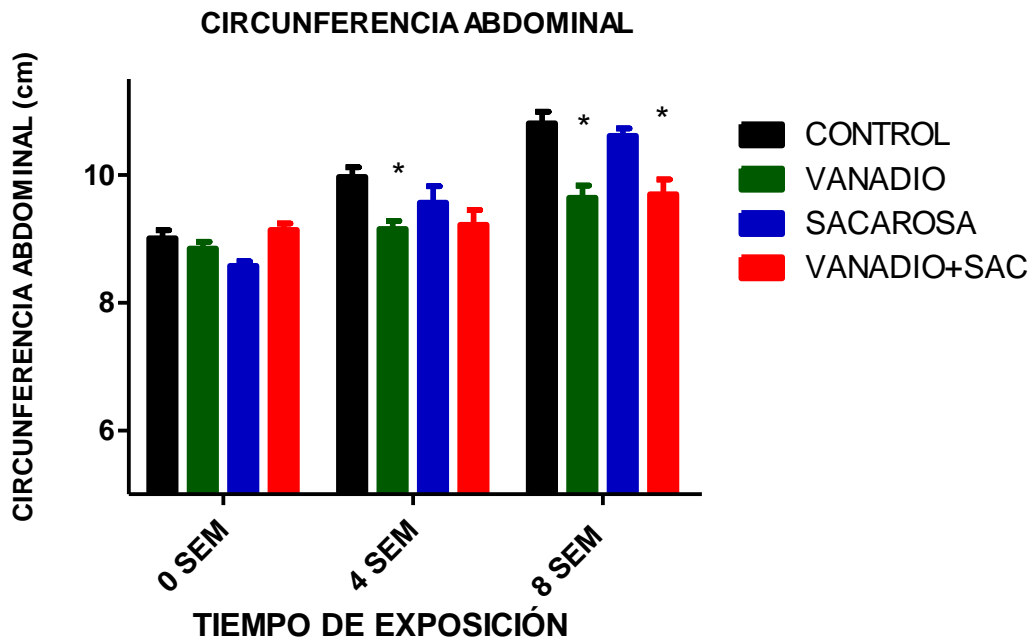
No se encontraron diferencias significativas entre los grupos al inicio del experimento ni a las 4 semanas. A las 8 semanas se encontró menor peso corporal de los ratones del grupo vanadio que resultó ser estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a los ratones del grupo control; esta disminución denota una suspensión estancamiento en el aumento de la masa corporal y no una pérdida de peso de los ratones del grupo vanadio. También se encontró un aumento del peso en los grupos control y sacarosa con respecto al inicio del experimento y las 4 semanas, y los grupos control, sacarosa y vanadio+sacarosa presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las 4 y 8 semanas. Estos aumentos representan la ganancia de peso en el crecimiento normal (gráfica 4).



Gráfica 4. Media del peso corporal en gramos de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 8 semanas. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control. El & representa diferencia entre el tiempo 0 y 4 semanas dentro del mismo grupo experimental y el % representa diferencia entre los tiempo 4 y 8 dentro del mismo grupo experimental. $X \pm ES$

7.3 Circunferencia abdominal

Al inicio del experimento no existía diferencia entre los grupos pero a las 4 semanas se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo vanadio y el grupo control, de igual forma, a las 8 semanas los grupos vanadio y vanadio+sacarosa presentaron diferencia estadísticamente significativa contra el control, estas diferencias que podrían ser vistas como una disminución no son más que una detención en el crecimiento de la circunferencia abdominal de estos dos grupos expuestos (gráfica 5).



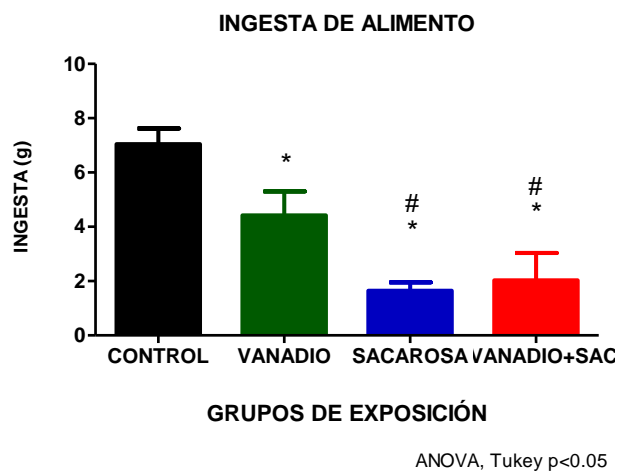
ANOVA, Tukey $p < 0.05$

Grafica 5. Media de la circunferencia abdominal en cm. de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 8 semanas. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control. $X \pm ES$

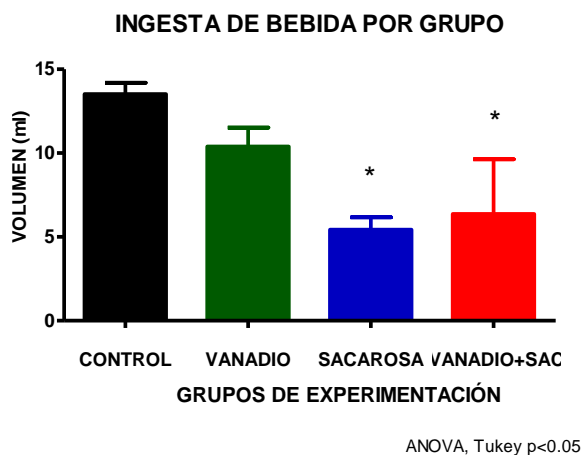
7.4 Consumo de alimento y bebida

En el consumo de alimento se observó una disminución significativa por parte de los grupos expuestos, sin embargo entre ellos se observa que existe una diferencia en el consumo de alimentos en los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa con respecto al grupo vanadio donde éste tiene un mayor consumo que los dos grupos anteriores pero sigue siendo significativamente menor al grupo control (gráfica 6).

En el caso de ingesta de bebida se observó una disminución estadísticamente significativa en la ingesta de los ratones de los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa (gráfica 7).



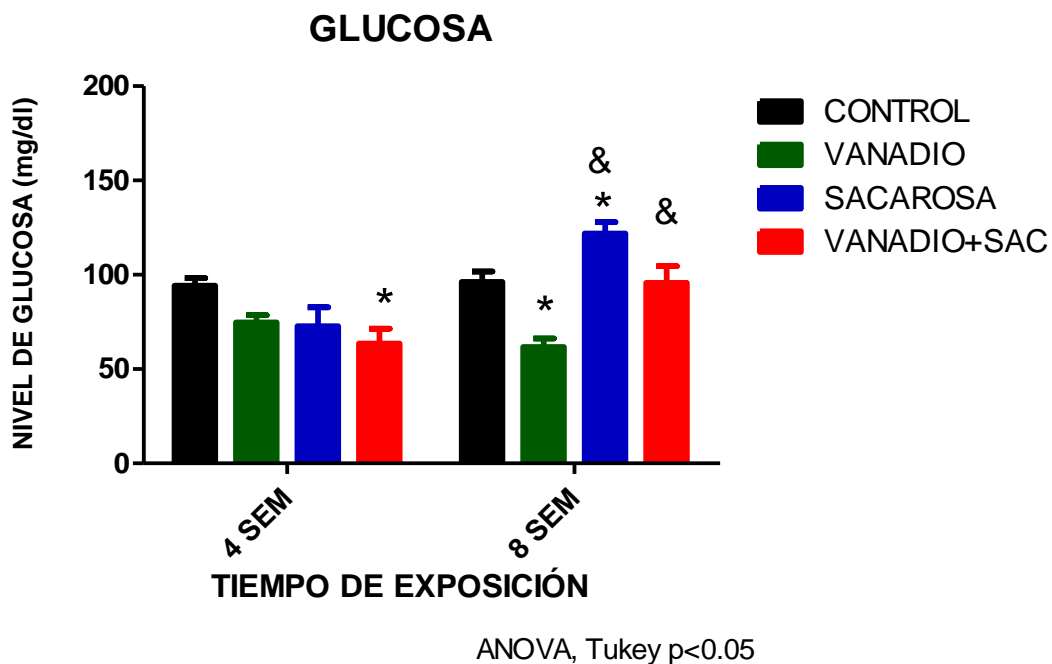
Gráfica 6. Media de ingesta de alimento de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 1 semana. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control y el # indica diferencias significativas con respecto al grupo vanadio. $X \pm ES$



Gráfica 7. Media de la ingesta de bebida de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 1 semana. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control. $X \pm ES$

7.5 Niveles de glucosa en sangre (glucemia)

Los resultados muestran que a las 4 semanas el grupo vanadio+sacarosa presentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de su nivel de glucosa en sangre, con respecto al grupo control, a las 8 semanas el grupo vanadio mostró una disminución mientras que el grupo sacarosa presentó un aumento en el nivel de glucosa en sangre con respecto al control. También a las 8 semanas se encontró diferencia entre los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa con respecto al grupo vanadio (gráfica 8).



Gráfica 8. Media de la glucemia de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 8 semanas. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control y el & indica diferencias significativas con respecto al grupo vanadio. $X \pm ES$

7.6 Morfología del páncreas

No se observaron cambios morfológicos en las células pancreáticas (figura 10), sin embargo en el grupo vanadio se pueden apreciar los acinos más eosinófilos comparados con los del grupo control como lo reporta Cano-Gutierrez en el 2009; por otro lado, a partir de las 4 semanas y en el resto del experimento se pueden apreciar células de infiltrado inflamatorio (predominantemente linfocitos) y generalmente rodeando a los vasos sanguíneos en los grupos vanadio, sacarosa y vanadio+sacarosa (figura 11 y 12).

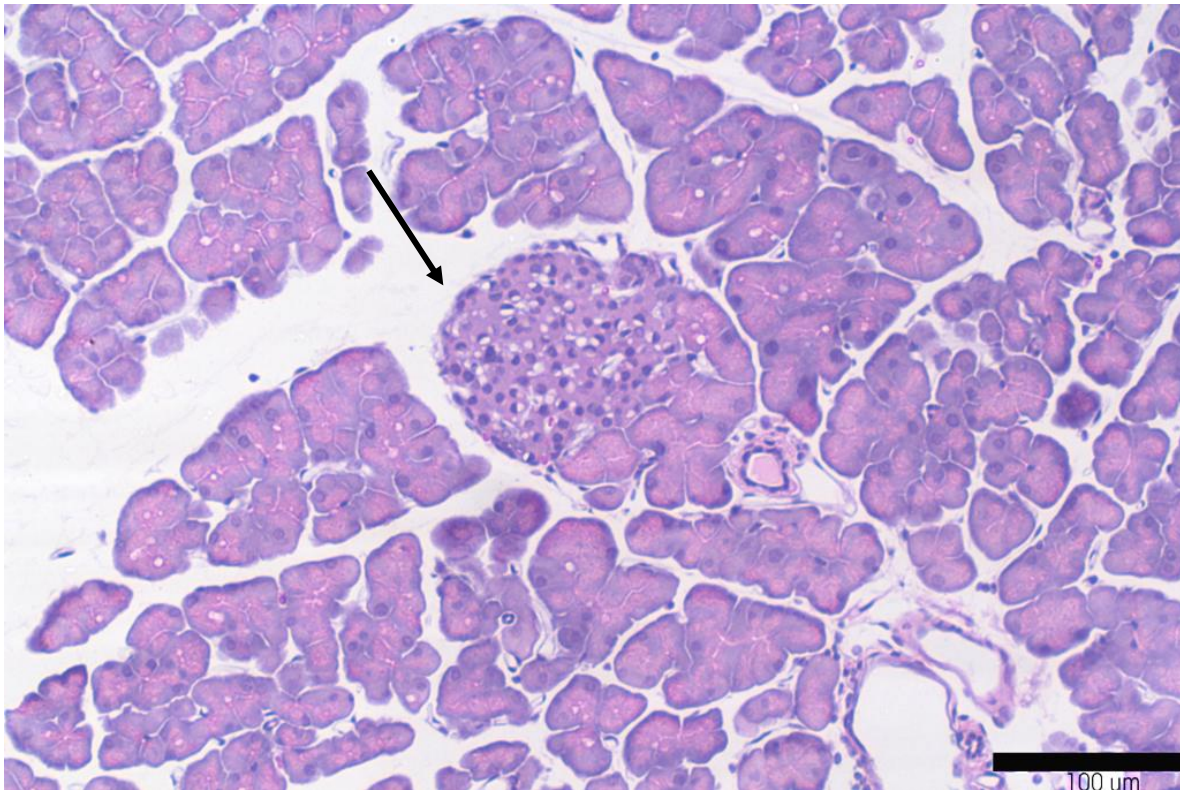


Figura 10. Corte longitudinal de páncreas de ratón del grupo control (H-E). Se aprecian acinos serosos, algunos vasos y un islote de Langerhans (↘).

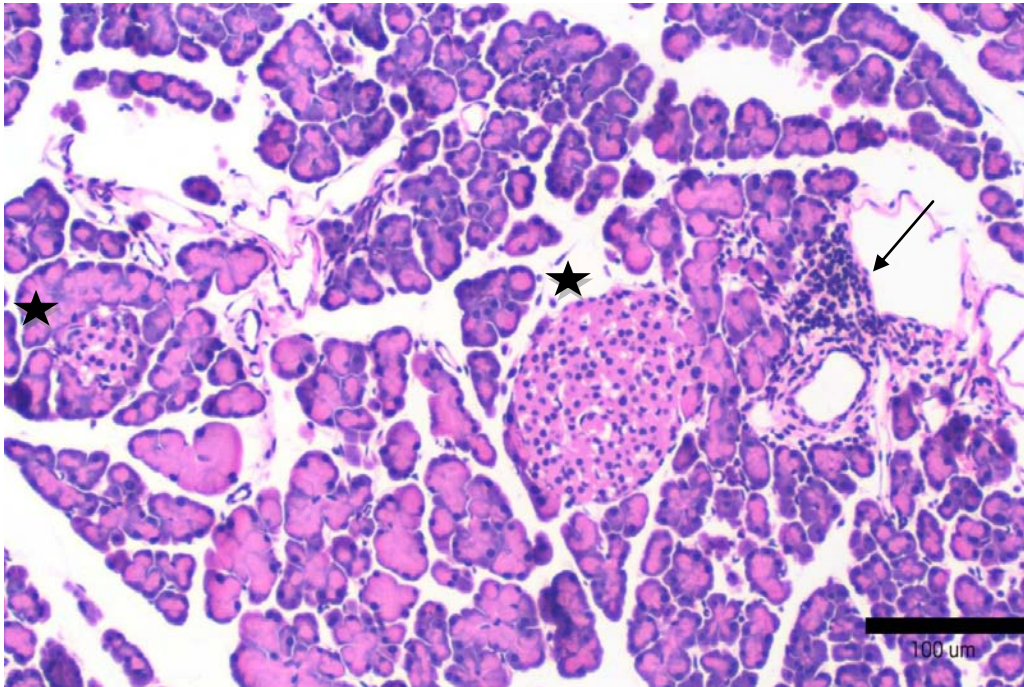


Figura 11. Páncreas de ratón con infiltrado inflamatorio (↘) cercano a un vaso sanguíneo. Los acinos se observan más eosinófilos comparados con los del grupo control. Se aprecian dos islotes (*). Estos cambios se observaron en el páncreas de ratones de los grupos Vanadio, Sacarosa y Vanadio+sacarosa.

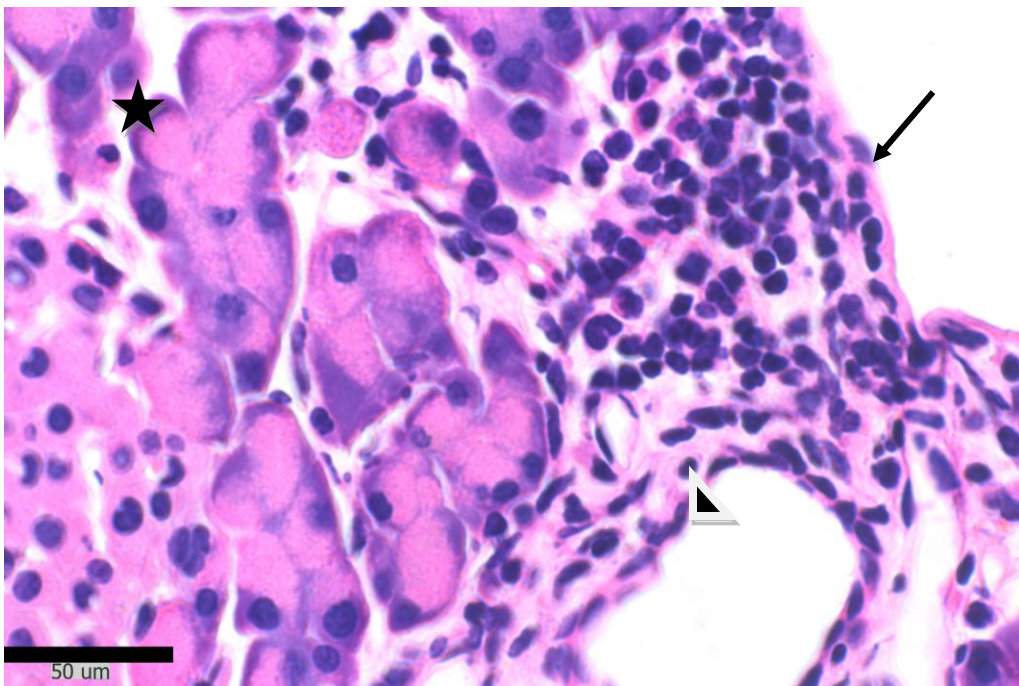
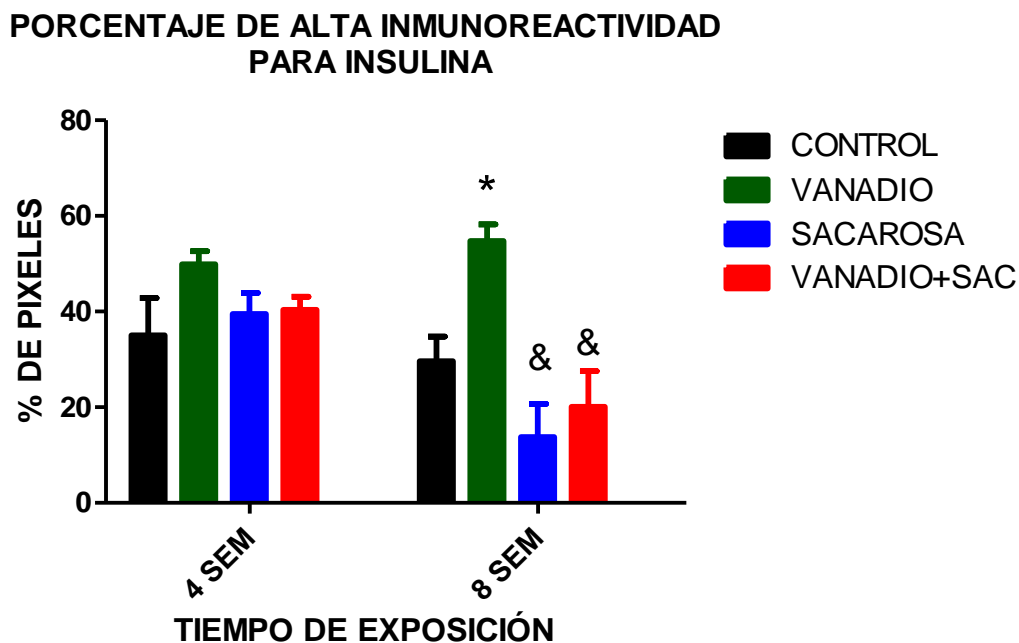


Figura 12. Imagen de páncreas de ratón con infiltrado inflamatorio (↘) encontrado en el páncreas de ratones de los grupos Vanadio, Sacarosa y Vanadio+sacarosa. Se observa un foco inflamatorio adyacente a un vaso sanguíneo (Δ) y acinos pancreáticos (*).

7.7 Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica para insulina

En el análisis densitométrico de los islotes pancreáticos marcados con anticuerpo anti-insulina se vio que a las 4 semanas no se encontraban diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos; sin embargo a las 8 semanas en el grupo vanadio se notó un aumento estadísticamente significativo con respecto al control del porcentaje de la marca con alta inmunoreactividad para insulina (grafica 9, figura 13).



Grafica 9. Media del porcentaje de la marca de alta inmunoreactividad para el anticuerpo anti-insulina de los islotes de Langerhans de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con sacarosa a lo largo de 8 semanas. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control y el & indica diferencias significativas con respecto al grupo vanadio. $X \pm ES$

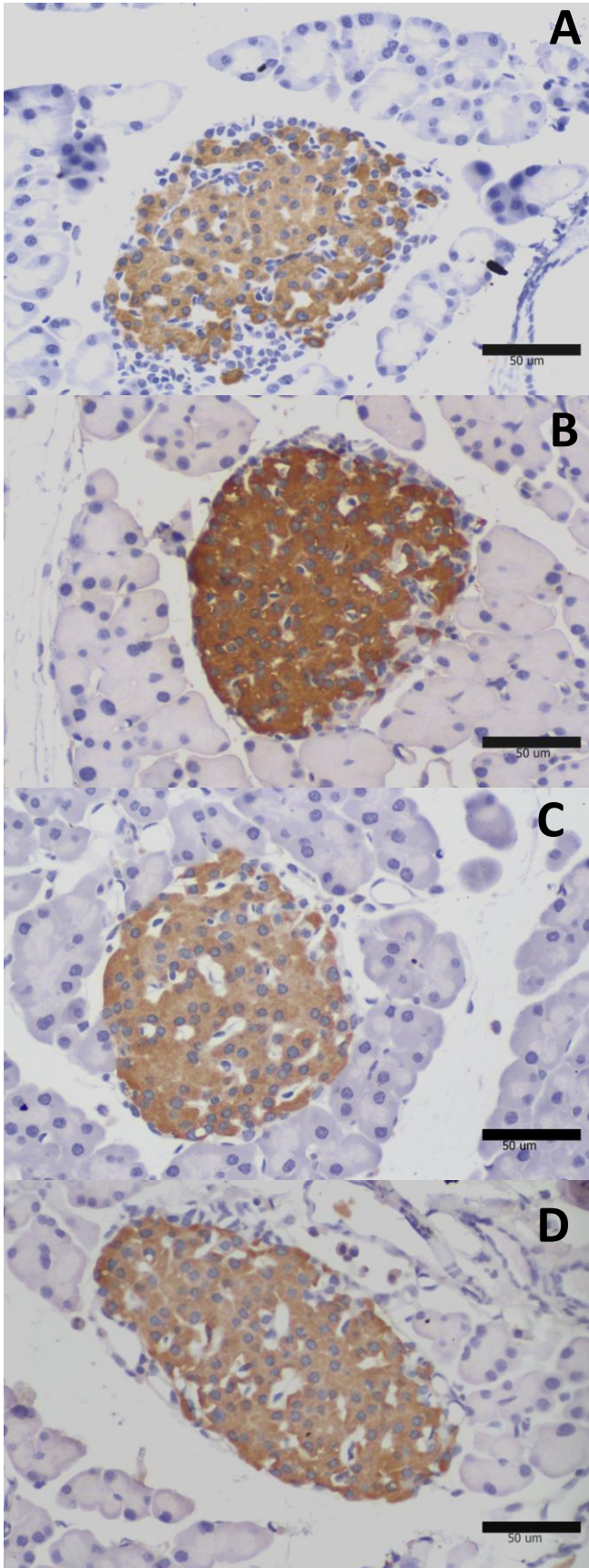
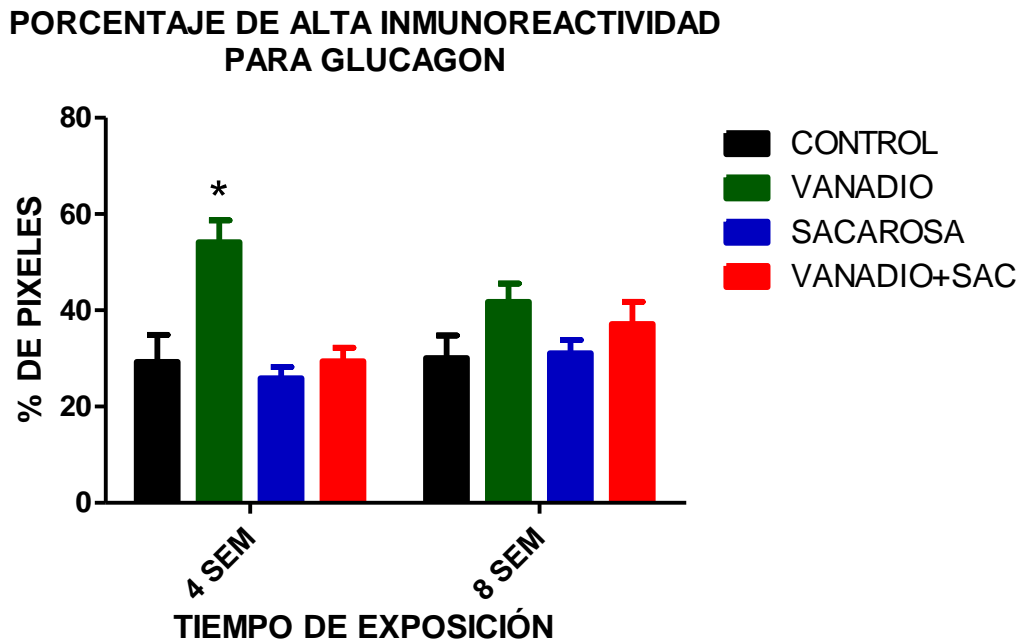


Figura 13. Páncreas endocrino procesados con la técnica de inmunohistoquímica cromatogénica para insulina en el grupo Control (A), Vanadio (B), Sacarosa (C) y Vanadio+sacarosa (D) a las 8 semanas. Se observa una mayor intensidad en la marca en el páncreas del grupo Vanadio (B).

Solo se muestran las imágenes a 8 semanas puesto que a 4 semanas no se encontraron diferencias significativas.

Inmunohistoquímica para glucagon

En el análisis densitométrico de los islotes pancreáticos marcados con anticuerpo para glucagon se encontró que a las 4 semanas de exposición el grupo vanadio presentó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de marca con alta inmunoreactividad; a las 8 semanas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (grafica 10, figura 14).



Grafica 10. Media del porcentaje de la marca de alta inmunoreactividad para glucagon de los islotes de Langerhans de ratones macho CD1 expuestos a la inhalación de vanadio con y sin suplementación de bebida con a lo largo de 8 semanas. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control. $X \pm ES$

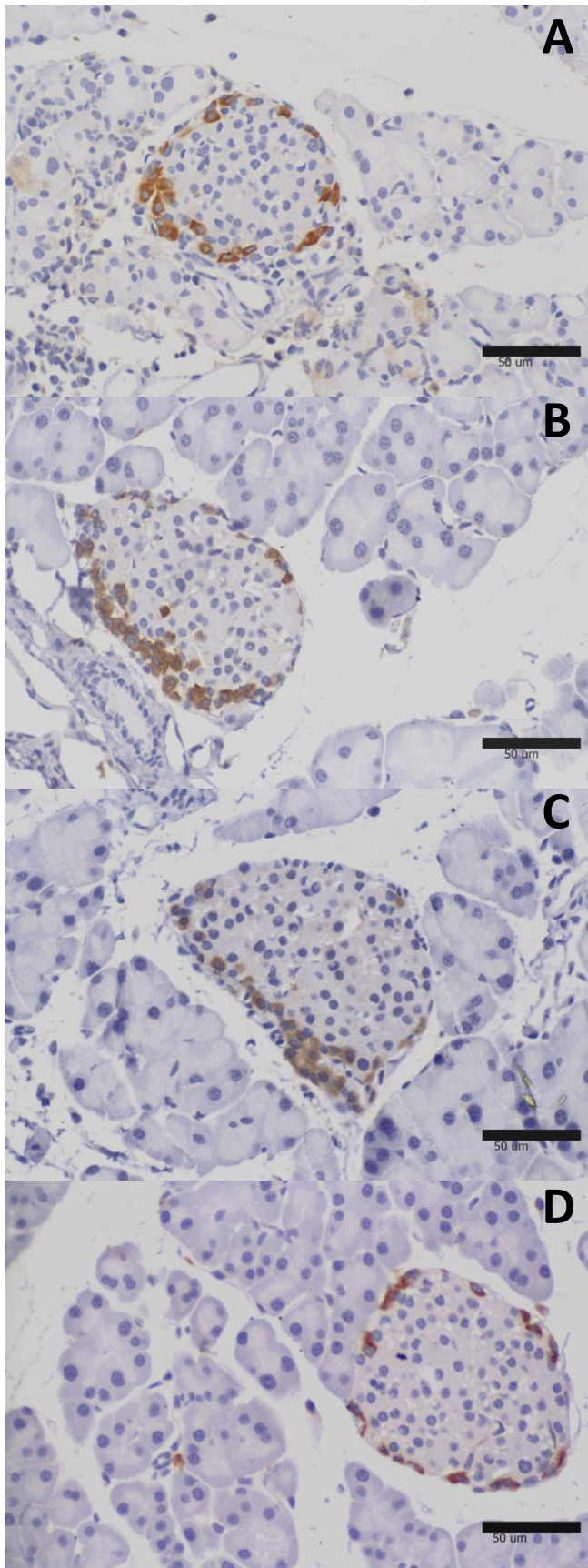


Figura 14. Islotes de Langerhans con la técnica de inmunohistoquímica cromatogénica para el glucagon del grupo Control **(A)**, Vanadio **(B)**, Sacarosa **(C)** y Vanadio+sacarosa **(D)** a las 4 semanas. Se observa una mayor intensidad en la marca de glucagon en los islotes del grupo Vanadio **(B)**.

Sólo se muestran las imágenes a 4 semanas puesto que a 8 semanas no se encontraron diferencias significativas.

8. DISCUSIÓN

8.1 Supervivencia

La muerte del 60% de los individuos del grupo vanadio+sacarosa entre la 2ª y la 4ª semana de exposición no era un resultado esperado. Se considera que esto se ocasionó por un descenso drástico en los niveles de glucosa en sangre y en el peso corporal. Esto pudo deberse a que los ratones de ese grupo constantemente ingerían sacarosa en su bebida lo cual pudo provocar que los niveles de insulina plasmática estuvieran constantemente elevados y en contacto con su receptor en los órganos blanco activando de manera constante a su receptor. Así mismo el vanadio pudo potenciar el efecto de la insulina dado que este metal inhibe la actividad de la familia de proteínas tirosina fosfatasa evitando la desfosforilación de las subunidades β y por lo tanto manteniendo activa la vía de señalización durante más tiempo (Srivastava, 2004) lo que provocó la entrada masiva de glucosa a los órganos y que los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo se vieran disminuidos drásticamente evidenciando que la ingesta de sacarosa y la inhalación de V_2O_5 son capaces de inducir un estado de hipoglucemia más severo. Es importante destacar que en este proyecto el vanadio se administró vía inhalada en la cual se da la mayor absorción de este metal en comparación a las otras vías. Cabe mencionar que en este experimento no se midió la insulina plasmática, pero sí la presencia de insulina y glucagón en páncreas por inmunohistoquímica, sin embargo no hubo cambios en la marca de estas dos hormonas en los ratones de este grupo en ningún tiempo experimental, lo que se discute posteriormente.

La hipoglucemia severa daña principalmente al sistema nervioso y al aparato cardiovascular. En el caso del sistema nervioso se ha reportado que la hipoglucemia o la falta de sustrato energético como es el caso de la glucosa puede provocar somnolencia, fatiga, pérdida de la conciencia, confusión y en ciertos casos hasta convulsiones (Fox, 2011). En el caso de los ratones del grupo vanadio+sacarosa se observó adinamia y anorexia, lo que se reflejó en la baja drástica del peso de los individuos de este grupo, que junto con la hipoglucemia severa los llevó a la muerte.

Por otro lado, el daño al aparato cardiovascular por hipoglucemia consiste en un aumento de la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca causadas por la liberación de catecolaminas como respuesta a la hipoglucemia, además de que se liberan potentes vasoconstrictores endoteliales, aumentando la viscosidad del plasma lo cual puede ocasionar trombosis e isquemia (Firer *et al*, 2011). La combinación de estas alteraciones puede provocar la muerte repentina de los individuos como se observó en este estudio.

8.2 Peso corporal y circunferencia abdominal

En el caso del peso corporal, a las 4 semanas del experimento no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos, Rojas Lemus en el 2014 utilizando el mismo modelo de inhalación de vanadio, tampoco encontró diferencias significativas en el peso del grupo vanadio; sin embargo a las 8 semanas del experimento el grupo vanadio presentó un peso corporal significativamente menor que el grupo control. Los otros grupos presentaron una curva de peso normal según reporta Charles River laboratories (2011). Los resultados obtenidos en cuanto a un menor peso en los individuos del grupo vanadio coinciden con los reportados en otros experimentos donde ratas Zucker ingirieron bis maltolato oxovanadio y vanadato en el agua para beber en una concentración de 0.2-0.8mg/ml durante 10 semanas. (Wang *et al*, 2001; Meyerovitch *et al*, 1989). Es importante mencionar que algunos individuos del grupo vanadio+sacarosa murieron antes de las cuatro semanas y sus pesos no se consideraron para la elaboración de la gráfica.

Por otro lado en el caso de la circunferencia abdominal a las 4 semanas de experimentación se encontró disminución de ésta en el grupo vanadio, mientras que a las 8 semanas el grupo vanadio y el grupo vanadio+sacarosa fueron los que presentaron esta disminución en comparación con el grupo control. A pesar de que no fue significativo el aumento de la circunferencia abdominal en el grupo sacarosa y, aunque no era objetivo de este trabajo, se observó una gran cantidad de grasa visceral en los individuos de este grupo.

La disminución de peso y circunferencia abdominal puede deberse a que el vanadio es capaz de inducir la reducción de la ingesta y el apetito, debido a la inducción de algunos mediadores de inflamación (Jhonson *et al*, 2002).

Los compuestos de vanadio como es el caso del bis maltolato oxovanadio tienen la capacidad de reducir las concentraciones de neuropéptido Y (NPY) en los núcleos arcuato y paraventricular (ubicados en el hipotálamo) lo cual provoca anorexia (Wang *et al*, 2001).

Por otro lado se sabe que la insulina tiene la capacidad por sí misma de inhibir la concentración de NPY y dado que en los núcleos arcuato y paraventricular se encuentra la mayor cantidad de receptores de insulina, el vanadio con su acción potenciadora del efecto de la insulina puede provocar, como un factor externo, la reducción y la inhibición de las síntesis de NPY.

La síntesis y liberación del NPY se regula por otra hormona llamada leptina la cual se encarga producir la sensación de saciedad y en altas concentraciones es capaz de inhibir la síntesis de este neuropéptido; se ha reportado que el vanadato es capaz de estimular la producción de leptina por mecanismos que no incluye a los receptores de insulina (Wang *et al*, 2002) por lo cual puede considerarse como otro factor que reduce los niveles de NPY y aumenta la sensación de saciedad de los individuos.

Además se ha reportado que el V_2O_5 es capaz de inducir inflamación en diferentes órganos como por ejemplo el pulmón, el hígado y el páncreas (Fortoul *et al*, 2011; Cano-Gutiérrez, 2009), así como el aumento de citocinas proinflamatorias en pulmón tales como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en ratón a las 4 semanas de experimentación (Falcón-Rodríguez, 2008; Pantoja-Urban, 2012). Estas citocinas proinflamatorias han sido relacionadas con la pérdida del apetito en diferentes situaciones, un ejemplo de este fenómeno se observa durante algunos procesos infecciosos (Jhonson *et al*, 2002). En los pacientes sometidos a hemodiálisis se ha detectado anorexia cuando los niveles de tres o más marcadores de inflamación se encuentran sumamente elevados (Kalantar *et al*, 2004). Por otro lado citocinas como el interferón α (IFN α), la interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2) y el TNF- α pueden inducir

anorexia a través de mecanismos de modulación de la neurotransmisión en el hipotálamo, modulación de las actividades gastrointestinales y cambios metabólicos (Plata- Salaman, 1998).

8.3 Ingesta de alimento y bebida

En cuanto al consumo de alimento y bebida se observó una ingesta de alimento significativamente menor en todos los grupos expuestos y para el caso de la ingesta de bebida solamente los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa presentaron una ingesta significativamente menor en comparación con el grupo control. En el caso de la baja ingesta de alimento presentada por el grupo sacarosa pudo deberse a que en su alimentación ingerían agua con una concentración de sacarosa al 30% por lo cual sus necesidades de ingesta calórica pudieron ser satisfechas en gran parte, por el consumo de esta. Por otro lado el bajo consumo de alimento presentado por los grupos vanadio y vanadio+sacarosa se pueden deber a que el vanadio es un potente anoréxico como se ha explicado en el apartado anterior.

En el caso del bajo consumo de bebida que presentaron los individuos de los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa podría deberse a la ingesta de la bebida con gran contenido calórico aunque en el caso del grupo vanadio+sacarosa podría también estar involucrado el vanadio como factor inhibitorio del apetito y el estado de fatiga y confusión generado por los bajos niveles de glucosa en sangre que podrían haber impedido la correcta alimentación de los individuos de este grupo.

En estudios de exposición a vanadio por diferentes vías, se observó que la ingesta de alimento disminuía. Tal es el caso de la exposición por vía oral de bis maltolato oxovanadio en ratas durante 3 y 11 semanas (Wang *et al*, 2001), la administración durante 5 días seguidos vía peritoneal de 3mg/kg de metavanadato de sodio (Sasi *et al*, 1994) y exposición vía subcutánea de vanadato 0.9 mg/kg durante 5 días consecutivos (Bayati *et al*, 1989).

En experimentos donde los individuos han ingerido diversos carbohidratos en el agua de bebida se ha observado que los animales disminuyen su ingesta de alimento: ratas Wistar bebiendo agua con 30% de sacarosa durante 20 semanas (El Hafidi *et al*, 2001) y ratas Sprage Dawley ingiriendo glucosa, fructosa y sacarosa en una concentración de 250g/L en su bebida durante 16 meses (Kizhner *et al*, 2002). El excesivo consumo de calorías en el agua de bebida se ha relacionado con un decremento en la ingesta de alimento en ratas (Spector y Smith, 1984).

En el caso del consumo de líquidos, en un experimento en ratas expuestas a vanadio no se encontraron diferencias significativas entre ratas del grupo control y las que ingerían 0.2-0.8 mg/ml de oxovanadio en su bebida durante 10 semanas, a diferencia de este estudio, por otro lado la disminución de ingesta de los grupos vanadio y vanadio+sacarosa pudo deberse a que las concentraciones molares de sacarosa a los cuales fueron expuestos nuestros ratones era muy elevada y existen estudios que relacionan una alta molaridad con la inhibición del sistema de recompensa cerebral, lo que provoca que se reduzca la ingesta calórica (Amico *et al*, 2005).

En el mismo sentido, en otro estudio se determinó que la molaridad en las soluciones azucaradas es muy importante para condicionar la ingesta de éstas. En este estudio se observó que mientras mayor era la molaridad de sacarosa dentro de la disolución se presentaba un mayor consumo de la misma, hasta llegar a su punto máximo de ingesta en 0.5M, sin embargo cuando la molaridad de la solución alcanzaba el 1M, la relación se invertía disminuyendo la ingesta de esta bebida (Spector y Smith, 1984). En nuestro caso se observó que los dos grupos que ingirieron agua con sacarosa al 30%, la cual tiene una molaridad alta, disminuyeron dicha ingesta.

A pesar de que todos los grupos tuvieron una menor ingesta de alimento en comparación con el control, sólo el grupo vanadio presentó menor peso corporal y los grupos vanadio y vanadio+sacarosa tuvieron una menor circunferencia abdominal. Probablemente el peso se conservó en los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa debido a la ingesta calórica en el

agua de bebida. Así, a pesar de disminuir la ingesta de alimentos e incluso de bebidas, la ingesta calórica fue mayor que en el resto de los grupos.

8.4 Niveles de glucosa

A las 4 semanas de experimentación, el grupo sacarosa+vanadio presentó niveles de glucemia significativamente menores que el control; a su vez a las 8 semanas de exposición el grupo vanadio presentó una glucemia significativamente menor mientras que el grupo sacarosa presentó glucemia significativamente mayor al del grupo control.

Los bajos niveles de glucemia encontrados en el grupo vanadio+sacarosa pudieron deberse al efecto potenciador de la insulina provocado por este metal de transición (Srivastava, 2004) y a la hiperinsulinemia que ha sido reportada en muchos estudios donde los individuos ingieren diferentes concentraciones de distintos carbohidratos entre los que destacan la glucosa, fructosa y sacarosa (Lorte *et al*, 2013; Alvarado *et al*, 2013; Velasco *et al*, 2012; Aoyama *et al*, 2012; Roncal *et al*, 2011; Nakayama *et al*, 2010; Chen *et al.*, 2009; Romanko *et al*, 2009; Chou *et al*, 2009; Pérez *et al*, 2009; Cao *et al*, 2007; Kizhner *et al*, 2002; Surwit *et al*, 1995). En este experimento no medimos los niveles de insulina en sangre (sería indispensable medir este parámetro en experimentos subsecuentes), pero asumimos por la gran evidencia que existe, que los individuos del grupo vanadio+sacarosa presentan hiperinsulinemia. La insulina pudo estar activando al receptor de insulina constantemente y el vanadio, como potenciador de la insulina, indujo la internalización de la glucosa que llevó, en este caso, a la hipoglucemia severa.

La hiperglucemia presentada por el grupo sacarosa a las 8 semanas de exposición pudo deberse a diferentes factores entre los cuales está la constante ingesta de sacarosa al 30% con lo cual los niveles de glucosa en sangre suben de manera inmediata, al igual que los niveles de insulina plasmática. Existen reportes en los cuales se analiza la ingesta de carbohidratos como la glucosa, fructosa y sacarosa en animales de diferentes cepas y especies; sus resultados son contrastantes entre sí en relación a si presentan hiperglucemia o no la presentan, sin embargo en todos ellos se reporta hiperinsulinemia

(Lorte *et al*, 2013; Alvarado *et al*, 2013; Velasco *et al*, 2012; Aoyama *et al*, 2012; Roncal *et al*, 2011; Nakayama *et al*, 2010; Chen *et al*, 2009; Romanko *et al*, 2009; Chou *et al*, 2009; Pérez *et al*, 2009; Cao *et al*, 2007; Kizhner *et al*, 2002; Surwit *et al*, 1995).

Con la misma idea mencionada en el párrafo anterior, cuando existe hiperinsulinemia en reiteradas ocasiones el componente energético y los carbohidratos sencillos son almacenados en las células del tejido adiposo en forma de triglicéridos, esto puede provocar el aumento en la secreción de una hormona muy importante para la regulación de la acción de la insulina llamada resistina. Esta hormona es secretada por el tejido adiposo y se encarga de insensibilizar a las células de los tejidos blancos de la insulina a su acción, impidiendo que la glucosa sea internalizada y por lo tanto manteniendo alta la glucemia de los individuos provocando un fenómeno conocido como resistencia a la insulina; este factor también pudo intervenir en los resultados que observamos en los ratones del grupo sacarosa (Larqué *et al*, 2001).

Otros mecanismos que se han relacionado con la resistencia a la insulina son los generados por las células musculares y los hepatocitos provocado por la presencia de una gran cantidad de tejido adiposo y por la acumulación de lípidos. Por un lado los hepatocitos expresan genes de citocinas como la IL-1, IL-6 y TNF- α que mediadas por la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa\beta$) generan resistencia a la insulina acompañado del proceso en el que los adipocitos comienzan a secretar TNF- α e IL-6 además de resistina (Lazar *et al*, 2006). Por otro lado las células musculares al almacenar metabolitos lipídicos como acil-coA, las ceramidas y diacil glicerol activan a la proteína cinasa C (PKC) que a su vez aumenta los niveles de fosforilación de la subunidad 1 del receptor de insulina disminuyendo su activación y contribuyendo como otro factor para generar resistencia a la insulina (Yu *et al*, 2002).

En el caso de la hipoglucemia presentada por el grupo vanadio a las 8 semanas pudo deberse al efecto potenciador de la insulina descrito por Srivastava en el 2004, además de que el V pudo provocar anorexia con lo cual el componente energético obtenido de los

alimentos pudo haber disminuido en este caso. Existe un reporte de envenenamiento agudo con metavanadato de amonio, en el cual se reporta el fallecimiento de la persona por el efecto del vanadio causando broncoconstricción y por lo tanto asfixia, sin embargo se reportó también hipoglucemia severa (20mg/dl) constando como prueba de la actividad hipoglucemiente severa del vanadio (Boulassel *et al*, 2011). Por otro lado nuestros resultados contrastan con los resultados obtenidos en otro experimento donde durante 11 semanas, ratas ingirieron a través de su bebida bis maltolato oxovanadio en una concentración de 0.2-0.8 mg/ml. Este experimento no reporta hipoglucemia (Wang *et al*, 2001), sin embargo una causa de la diferencia con los resultados de este estudio pudo ser causada por la diferente concentración de V a la cual fueron expuestos los individuos y por la vía de administración que en este caso fue por vía inhalada, que es la que reporta mayor absorción del metal.

8.5 Morfología del páncreas

No se observaron cambios en la morfología las células pancreáticas ni a las 4 ni a las 8 semanas de exposición, solamente se observó lo ya reportado por Cano-Guitierrez 2009 en cuanto a la eosinofilia de los acinos, sin embargo a partir de la cuarta semana se observó infiltrado inflamatorio en todos los grupos expuestos sin mostrar diferencia entre ellos o entre ambos tiempos de exposición.

El vanadio es capaz de inducir inflamación a través del reclutamiento y proliferación de leucocitos causadas por la producción de citocinas proinflamatorias como se observó en un estudio con células del epitelio bronquiolar de humanos donde aumentó la presencia de IL-8 (Carter *et al*, 1997), y en epitelio bronquiolar donde aumentó la presencia de IL-6 y TNF- α (Falcon-Rodriguez, 2008; Pantoja-Urban, 2012).

También se ha reportado infiltrado inflamatorio en diferentes órganos con el mismo modelo de inhalación de vanadio. En bronquiolos pulmonares a partir de la cuarta semana de exposición (Falcón-Rodríguez *et al*, 2008), en hígado a partir de la primera semana a la décima semana de exposición (Cano-Gutiérrez *et al*, 2012; Acevedo-Nava, 2006), en

epitelio vaginal a partir de la primera y hasta la catorceava semana de exposición (Martínez-Pedraza, 2007) y en páncreas a la sexta semana de exposición (Cano-Gutiérrez *et al*, 2009).

Por otro lado la ingesta de sacarosa también es capaz de producir inflamación a través del reclutamiento de leucocitos por la producción de mediadores de inflamación, en este caso se ha observado el aumento en la producción de IL-6, proteína quimioattractora de monocitos 1 (MCP-1) y la quimiocina para neutrófilos (KC). Esto fue propuesto en un experimento donde se encontró inflamación en el páncreas de ratas después de una ingesta de sacarosa al 40% en la comida durante 16 semanas de experimentación (Roncal-Jiménez *et al*, 2011).

A pesar de que tanto el vanadio como la sacarosa son factores que pueden provocar inflamación en el páncreas, no se encontraron diferencias de daño entre los grupos de exposición que pudieran sugerir que la combinación de ambos factores surtiera un efecto potenciador, sinérgico o aditivo.

8.6 Inmunohistoquímica para insulina y glucagon

Los resultados del análisis densitométrico para ambas hormonas arrojaron que a las 4 semanas no hubo diferencias significativas de la marca de alta inmunoreactividad para insulina sin embargo en el caso del glucagon se observó un aumento en la presencia de esta hormona en las células α de los ratones del grupo vanadio. Esto puede ser explicado por la necesidad de los ratones del grupo vanadio por tratar de normalizar los niveles de glucosa en sangre que el vanadio posiblemente alteró por su capacidad hipoglucemiante (Srivastava, 2004), por lo cual la respuesta natural de las células alfa fue producir más glucagon para provocar la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Esto dio como resultado que los niveles de glucosa en sangre del grupo vanadio a las 4 semanas no tuviera un cambio significativo.

En el caso del grupo vanadio+sacarosa se observó hipoglucemia a las 4 semanas que fue provocada por el efecto combinado de la constante activación del receptor de insulina por

la posible hiperinsulinemia provocada por ingerir sacarosa y el efecto potenciador de insulina que presenta el vanadio, sin embargo no se observaron cambios en la presencia de ambas hormonas en los islotes. Es por ello que se requiere medir las concentraciones plasmáticas de estas hormonas. Es posible que la presencia de insulina en el islote se encuentre sin cambios debido a que en este tiempo, la célula se encuentra sintetizando y secretando la insulina (hiperinsulinemia) y no permite su almacenamiento dentro de las células. Tampoco se presentaron diferencias en los individuos del grupo sacarosa y podría deberse a la misma razón.

A las 8 semanas no se observaron cambios en la presencia de glucagon en ninguno de los grupos y en el caso de la insulina el grupo sacarosa y vanadio+sacarosa tampoco presentó cambios en la presencia de la hormona. Sin embargo se observó un aumento de la marca en las células β de los ratones del grupo vanadio. Este grupo presentó hipoglucemia en este tiempo, que correlaciona con la marca aumentada de insulina en el islote. En este caso, se puede considerar que se está produciendo gran cantidad de insulina y, aunque se está liberando, continúa aumentada su presencia intracelular. Además, se considera que el vanadio provocó la activación del receptor de insulina y perpetuó su efecto hipoglucemiante. Por otro lado, el aumento en la presencia de insulina dentro de las células del islote puede ser explicado por diversos mecanismos que el vanadio es capaz de dañar, interfiriendo con el proceso de secreción normal.

Por un lado, el mensaje para que se dé la secreción de insulina al torrente sanguíneo es la despolarización de la membrana plasmática de las células β mediada por potasio (K^+) lo cual propicia la apertura de canales de calcio dependiente de voltaje que permiten la entrada de calcio a la célula con lo cual se reclutan fibras del citoesqueleto encargadas de transportar el gránulo secretor de insulina a la membrana para exocitarla. Se sabe que el vanadio es capaz de dañar filamentos del citoesqueleto específicamente γ tubulina (Mussali-Galante *et al*, 2005), actina (Rodríguez-Lara *et al*, 2013) y tubulina (Ramírez *et al.*, 1997) con lo cual un desorden en la polimerización y despolarización de estos filamentos podría estar ocasionando un estancamiento de la hormona por un incorrecto transporte de los gránulos secretores.

Por otro lado, para que la insulina sea liberada al torrente sanguíneo es necesario que ocurra un cambio en el potencial de membrana mediado por calcio (Ca^{2+}), sin embargo el vanadio también es capaz de alterar el intercambio de calcio al inhibir a la enzima calcio-ATPasa reduciendo el flujo de este elemento (Ó Neal *et al.*, 1979; Fraqueza *et al.*, 2012), provocando una falla en la correcta liberación de insulina.

Algunos hallazgos en nuestro modelo, apoyan que el vanadio es capaz de alterar la secreción de los gránulos y aumentar la granularidad de distintas células después de 6 semanas de exposición. Esto se ha observado en megacariocitos (Fortoul *et al.*, 2009), células acinares del páncreas exocrino (Cano-Gutiérrez *et al.*, 2009), y ahora, la célula β .

9. CONCLUSIONES

La combinación de la inhalación subcrónica de vanadio y la ingesta de bebidas altas en sacarosa fue capaz de bajar los niveles de glucosa en sangre de los individuos de este grupo provocando su muerte. Sin embargo no existió un efecto potenciador de los daños por la combinación de ambos factores, ni en la morfología del páncreas ni en la presencia de insulina y glucagon.

La inhalación subcrónica de vanadio fue capaz de ocasionar disminución en la ingesta de bebida y comida, además de provocar un estancamiento en el peso e hipoglucemia a las 8 semanas en individuos sanos, lo cual podría representar un riesgo a la salud mucho mayor, sobre todo en individuos ocupacionalmente expuestos. Además el vanadio fue capaz de provocar una acumulación de insulina dentro de las células β que puede representar riesgos en la regulación hormonal del metabolismo energético y que tendrán que ser evaluados posteriormente.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar los niveles de insulina y glucagon en el plasma para correlacionarlos con los resultados expuestos en este proyecto.

Evaluar la concentración de GLUT 2 en páncreas y GLUT 4 en hígado ya que representan un factor importante para la regulación de la glucemia en este modelo de exposición subcrónica a V_2O_5 .

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de V_2O_5 para poder evaluar los cambios en el grupo vanadio+sacarosa sin que se incremente su mortalidad y de la misma forma

Realizar un estudio de exposición aguda y subaguda a V_2O_5 por vía inhalada para observar cambios en la glucemia en intervalos de tiempo cortos después de la inhalación del metal y observar si hay cambios inmediatos comparándolo con el tiempo de exposición de los individuos.

Analizar la presencia de los filamentos del citoesqueleto en los islotes de Langerhans.

Dado que no existe información del efecto del vanadio sobre el glucagon sería un área de interés dada la función fisiológica de esta hormona.

11. REFERENCIAS

- Afeseh H., Kanthasamy A., Anantharam V., Song C., Witte T., Houk R., Kanthasamy A. Vanadium induces dopaminergic neurotoxicity via protein kinase c-delta dependent oxidative signaling mechanisms: relevance to etiopathogenesis of Parkinsons disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009, 204:2, 273-285.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for vanadium. Department of Health and Human Services. U.S. 2009
- Altamirano Lozano M. "El vanadio en el tratamiento de la Diabetes, manejo". 2° Congreso Nacional de Química Médica, México, Distrito Federal, 2006.
- Alvarado A., Avelino J., Velasco M., Torres-Jacome J., Hiriart M. Metabolic Syndrome remodels electrical activity of the sinoatrial node and produces arrhythmias in rats. *Plos One* 2013. 8(11) e76534.
- Amico JA., Vollmer RR., Rinaman L., Mediar JA., Hou-Ming C. Enhanced initial and sustained intake of sucrose solution in mice with oxytocin gene deletion. *American Journal of Physiology* 2005; 289 R1798-R1806.
- Aoyama M., Isshiki K., Kume S., Chin-Kanasaki M., Arakai S., Koya S., Haneda M., Kashiwaki A., Maegawa H., Uzu T. Fructose induces injury in the kidney of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419: 244-249.
- Aranceta-Bartrina J. y Perez C. The relationship between sucrose consumption and cancer; a review of the evidence. *Nutr Hosp* 2013; 28 (Supl. 4):95-105
- Ávila-Acosta MR., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez A., Antuna SB., Saldiva L., Espejel-Maya G., Mussali-Galante P., Ávila-Casado MC., Reyes-Olivera A., Anaya-Martinez V., Fortoul T. Ependymal epithelium disrupt after Vanadium Pentoxide Inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience letters* 2005; 381: 21-25.
- Bayati MA., Giri SN., Raabe OG., Rosenblatt LS., Shifine M. Time and dose response study of the effects of vanadate on rats: morphological and biochemical change in organs. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1989; (5-6): 435-455.
- Berceloux D. Vanadium. *Clinical Toxicology.* 1999, 37-2; 265-278.
- Barquera S., Hernández-Barrera L., Lizbeth Tolentino M., Espinosa J., Wen S., Rivera B. Energy intake from beverages is increasing among Mexicans Adolescents and Adults. *The journal of Nutrition.* 2008. 138(12):2454-2461.
- Boulassel B., Sodeg N., Roussel O., Perrini M., Belhad-Tahar. Fatal Poisoning by Vanadium. *Forensic Science International.* 2011: 206: e79-e81.

- Busserolles J., Rock E., Gueux E., Mazur A., Grolier P., Rayssiguier Y. Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats *British Journal of Nutrition* 2002; 87:337–342
- Carter JD., Ghio AJ., Samet JM., Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146:180-188.
- Cano-Gutierrez G., Acevedo-Nava S., Santamaria A., Altamirano-Lozano M., Cano-Rodríguez MC., Fortoul T. Hepatic megalocytis due to vanadium inhalation: Participation of oxidative stress. *Toxicol ind Health* 2012 May; 28(4) 353-360.
- Cano-Gutiérrez G., Falcón-Rodríguez C., Montañó LF., Rodríguez-Lara V. Pancreatic changes and vanadium inhalation. *Curr. Topics Toxicol.* 2009. 6:39-44.
- Cao D., Lu H., Lewis T., Li L. Intake of sucrose sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biochemical Chemistry* 2007; 282: 50 pp.
- Castrejón V., Carbó R., Martínez M. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *REB* 2007; 26(2): 49-57.
- CD-1® IGS Mouse Model Information Sheet 2011. Charles River Laboratories International Inc. disponible en www.criver.com
- Chen GC., Huang CY., Chang MY., Chen SW., Huang CJ., Chao PM. Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and sucrose containing beverage intake, alone or in combination inducing in Wistar Rats and C57BL/6J mice. *Metabolism Clinical and Experimental* . 2009. 155-164.
- Chou YC., Wang SY., Chen GC., Lin YS., Chao PM. The functional assessment of alpinia pricelon in Metabolic Syndrome induced by sucrose containing drinking water in mice. *Phytother Res* 2009; 23: 558-563.
- Colín-Barenque L., Martínez- Hernández MG., Baiza-Gutman LA., Ávila-Acosta MR., Ordóñez-Librado JL., Bizarro-Nevarés P., Rodríguez-Lara V., Piñón-Zarate G., Rojas-Lemus M., Mussali-Galante P., Fortoul T. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after Vanadium inhalation. *J Appl. Toxicol* 2007; 28: 718-723.
- Comisión para la Cooperación Ambiental de América del Norte. Aire y Atmósfera .Partículas suspendidas. El mosaico de América del Norte: panorama de los problemas ambientales más relevantes. *Cec.org*. 2014
- Coronado J., Del Razo L., Garcia G. Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico. *Environmental Research.* 2007; 104(3): 383–389

- Donaldson k., Stone V., Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanità* 2003; 39(3):405-410
- El Hafidi M., Cuellar A., Ramírez J., Baños G. Effect of sucrose addition in drinking water induces hypertension in the rats on liver microsomal $\Delta 9$ and $\Delta 5$ -desaturase activities. *The journal of nutritional Biochemistry* vol 12 issue 7. July 2001. 396-403.
- Environmental Protection Agency (EPA). Office of air and radiation. 2003. En <http://www.epa.gov/airquality/particlepollution/health.html>. Consulta 19 de octubre de 2014.
- European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission Related to the Tolerable Upper Intake Level of Vanadium. *EFSA Journal*. 2004, 33; 1-22.
- Falcón Rodríguez Carlos Iván. Tesis de licenciatura: Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio. Estudio comparativo en rata y en ratón. Universidad Nacional Autónoma de México. 2008. 74 páginas.
- Firer BM., Heller SR., Scherthner G. Hypoglycemia and Cardiovascular Risk. *Diabetes and Cardiovascular Disease* 2011; 34: 132-137
- Fortoul T., Rojas M. Bone and teeth effects in Vanadium: its impact on Health. Nova Science Publishers. USA. 2007; 1-6
- Fortoul T., Quan A., Sanchez I., Lopez I., Bizarro P., Mendoza M., Osorio L., Espejel G., Avila M., Avila-Costa M., Colín L., Villanueva D., Olaiz F. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of Environmental Health*. 2002, 57:5; 446-449.
- Fortoul T., Rojas M. Chapter 1: Vanadium as an air pollutant. *Vanadium: its impact on Health*. Nova Science Publishers. USA.2007; 1-6
- Fortoul T., González-Villalva A., Piñón-Zarate G., Rodríguez-Lara V., Montañó LF., Saldivar-Osorio L. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*. 2009. 58(6): 375–380
- Fortoul T., Rodríguez V., Gonzalez-Villalva A., Rojas M., Cano C., Ustarroz M., Colín L., Montañó L., Garcia I., Bizarro P. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J Biom Biotechnol*. 2011, 2011:951043 doi: 10.1155/2011/951043. Epub 2011 May 22.
- Fortoul T., Rodríguez-Lara V., Mussali-Galante P., Diaz-Bech p., Montañó F. Vanadium and respiratory system , in *Vanadium: its impact on Health*. Nova Science Publishers. USA .2007; 1-6

- Fox Stuart I. Fisiología Humana. Doceava edición. México. McGraw Hill. Educación. 2011, pp341-342.
- Gallego A., González I., Sánchez B., Fernández P., Garcinuño R., Bravo J., Pradana J., García M., Durand J. Contaminación atmosférica. UNED Publicaciones. Madrid. 2012; 63.
- García F. Manual de inmunohistoquímica. Laboratorio de Patología Molecular. Instituto Nacional de Pediatría. México. 2012.
- González-Villalva A., Fortoul T., Ávila-Acosta MR., Piñón-Zarate G., Rodríguez-Lara V., Martínez- Levy G., Rojas-Lemus M., Bizarro-Nevarés P., Díaz-Bech P., Mussali-Galante P., Colín-Barenque L. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic Vanadium Pentoxide inhalation. *Toxicol and Industrial Health*. 2006. 22: 113-116.
- González-Villalva A. Piñón-Zarate G., De la Peña-Díaz A., Flores-García M., Bizarro-Nevarés P., Rendón-Huerta E., Colín-Barenque L., Fortoul T. Effect of Vanadium on platelet function. *Environ. Toxicol . Pharmacol*. 2011. 32: 447-456.
- González-Villalva A., Rodríguez-Lara V., Montañón LF., Lima-Melo A., Ramírez G., Fortoul T. Blood changes generated after Vanadium inhalation. *Curr. Topics Toxicol*. 2009. 6:31-38.
- Hiriart M. y Vidaltamayo R. Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes. *Ciencia*. 2002; 53 (3): 38-45.
- Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la Zona Metropolitana del Valle de México. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. 2010; 17-31.
- Janghorbani M., Momeni F., Mansourian M. Systematic review and metaanalysis of air pollution exposure and risk of diabetes. *European Journal of Epidemiology* 2014; 29, (4): 231-242
- Jhonson PM., Vogt SK., Burney MW., Muglia LJ. COX-2 inhibition attenuates anorexia during inflammation without impairing cytokine production. *American Journal of Physiology – Endocrinology metabolism* 2002; 282: 650-656.
- Kalantar K., Block G., McAllister CJ., Humphreys MH., Koppie JD., Appetite and inflammation nutrition anemia and clinical outcome of hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:299-307.
- Kizhner T., Werman MJ., Long-term fructose intake: biochemical consequences and altered renal histology in male rat. *Metabolism*. 2002; 51(12): 1538-1547.
- Krämer U., Herder C., Sugiri D., Strassburger K., Schikowski T., Ranft U., Rathmann W. Traffic-Related Air Pollution and Incident Type 2 Diabetes: Results from the SALIA Cohort Study. *Environ Health Perspect* 2010; 118:1273–1279

- Larqué C., Myrian Velasco, Victor Navarro-Tableros, Mariana Duhne, Jonathan Aguirre, Gabriela Gutiérrez-Reyes, Jaime Moreno, Guillermo Robles-Diaz, Enrique Hong and Marcia Hiriart. Early Endocrine and Molecular Changes in Metabolic Syndrome Models. *IUBMB Life* 2001; 63(10): 831–839.
- Lazar Mitchell. The Humoral Side of Insulin Resistance. *Nature Medicine*. 2006. 12: 43-44.
- Lorte D., Crespo C., Rodriguez A., Barreto C., Vianna C., Barbosa M., Aguilar M., Madarim S. Renin angiotensin System blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and resistance in mice. *Plos One* 2013. 8(7) e67192.
- Matía P., Edurne P., Calle A. NUTRICIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO. *Rev Esp Salud Pública* 2007; 81: 489-505
- Mailhes J., Hilliard C., Fuseler J., London S., Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Elsevier, Mutation Research* 2003. 538: 101-107.
- Martínez-Pedraza Michelle. Tesis de licenciatura. Efecto del pentóxido de vanadio en ovario y epitelio vaginal. Modelo murino de exposición por inhalación. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007. 81 páginas.
- Mendivil Co. Bebidas azucaradas y riesgo de obesidad y diabetes. *Revista de la Asociación Latino Americana de Diabetes (ALAD)* 2013. 3(1); 387-396.
- Meyerovitch J., Shechter Y., Amir. Vanadate stimulates in vivo glucosa uptake in brain and arrests food intake and body weight in rats. *Physiol Behav*. 1989; 45(6): 1113-6.
- Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Ávila-Acosta MR., Fortoul T. Chapter 2: Mechanism of Vanadium Toxicity, in: *Vanadium as an air pollutant. Vanadium: its impact on Health*. Nova Science Publishers. USA. 2007; 1-6
- Mussali-Galante P, Rodríguez-Lara V, Hernández-Tellez B, Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarez P, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Piñón-Zarate G, Saldivar-Osorio L, Diaz-Beck P, Herrera-Enríquez MA, Tovar-Sánchez E, Fortoul T. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicol Ind Health*. 2005 Oct; 21(9):215-22.
- Nakayama T., Kosugi T., Gersch M. Thomas C., Sanchez-Lozada L., Lanaspá M., Roncal C., Perez S., Richard J., Nakagawa T. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol*. 2010. 298:F712YF720
- Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 26 de Septiembre de 2005.
- Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de Agosto de 2014.

- Ó Neal S., Rhoads D., Racker E. Vanadate inhibitor of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and other ATPases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1979. 89:3, 845-850.
- Pantoja Urban Andrea Haree. Tesis de licenciatura: El efecto de la inhalación de vanadio en la presencia de IL-6, MMP-9 y MMP-12. Diferencia por sexos. 2012. 66pp.
- Perez I., Roque P., El Hafidi M., Diaz E., Baños G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research* 2009; 43(8): 761-771.
- Piñón-Zarate G., Rojas-Lemus M., Garcia-Zepeda E., Fortoul T. Metals and immune system, in *Metals and Toxicological Implications in Health*. Research Signpost. 2007. 43-64.
- Plata- Salaman CR. Cytokines and anorexia: a brief overview. School of life and Health Sciences. University of Delaware. Newark. 1998. 19716-2590. USA.
- Qinghua Sun, Peibin Yue, Jeffrey A. DeJulius, Carey N. Lumeng, Thomas Kampfrath, Michael B. Mikolaj, Ying Cai, Michael C. Ostrowski, Bo Lu, Sampath Parthasarathy, Robert D. Brook, Susan D. Moffatt-Bruce, Lung Chi Chen and Sanjay Rajagopalan. Ambient Air Pollution Exaggerates Adipose Inflammation and Insulin Resistance in a Mouse Model of Diet-Induced Obesity. *American Heart Association* 2009; 539-545.
- PROAIRE. Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2011-2020, SEMARNAT, INE, SSA, Comisión Ambiental Metropolitana.
- Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res*. 1997 Jun; 386(3):291-8.
- Rodriguez-Lara V., Morales-Rivero A., Rivera-Cambas AM., Fortoul T. Vanadium inhalation induces actin changes in mice testicular cells. *Toxicol and Industrial Health* 2013 1-8.
- Rodriguez-Mercado J., Altamirano-Lozano M. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Int. Contaminación Ambiental*. 2006, 22-4; 173-189.
- Rojas-Lemus Marcela. Tesis de Doctorado. Comparación por sexo del efecto genotóxico de la administración de ácido ascórbico y anastrozol en ratones CD1 expuestos a la inhalación de vanadio. Universidad Nacional Autónoma de México. 2014. 89 páginas.
- Rojas L., Garibay V., Las partículas suspendidas, aeropartículas o aerosoles ¿Hacen daño a la salud? ¿Podemos hacer algo? *Gaceta Ecológica*, octubre-diciembre, número 69, Instituto Nacional de Ecología. Distrito Federal, México, 2003; 29-44.
- Rojas-Lemus M., Altamirano-Lozano M., Fortoul T. Sex differences in blood genotoxic and cytotoxic effects as a consequence of a Vanadium Inhalation: micronucleus assay evaluation. *J Appl. Toxicol*. 2014. 34: 258-264.

- Romanko OP., Ali M., Mintz JD., Stepp DW. Insulin resistance impairs endotelial function but not adrenergic reactivity or vascular structure in fructose fed rats. *Microcirculations* 2009; 16: 414-423
- Roncal CA., Lanaspá MA., Rivard CJ., Nakagawa T., Sanchez LG., Jalal D., Andres A., Tanabe K., Madero M., Li J., Cicerchi C., Mc Fann K., Sautin YY., Jhonson R. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy stress. *Metabolism Clinical and Experimental* 2011; 1259-1270.
- Ross Michael, Pawlina Wojciech. *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Panamericana. 6° edición. China. 2012.
- Samet J. Sibajoris R., Wu W., Graves L. Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999, 21; 357-364
- Scottish Environmental Protection Agency (SEPA). Scottish Pollutant release inventory. 2006 en <http://apps.sepa.org.uk/spripa/Pages/Substancesinformation.aspx?pid=110>. Consultado el 23 de septiembre del 2014.
- Sasi MM., Haider SS., Fakhiri M., Ghwarsha KM. Microchromatographic analysis of lipids, protein and occurrence of lipid peroxidation in various brain areas of vanadium exposed rats: a possible mechanism of vanadium neurotoxicity. *Neurotoxicology Summer* 1994; 15(2):413-420.
- Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT). Indicadores de la calidad del aire. Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal 2014. En <http://www.aire.df.gob.mx/default.php>
- Spector AC., Smith JC. A detailed analysis of sucrose drinking in the rat. *Physiology and Behavior* 1984; 33(1): 127-136.
- Srivastava Aky Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine* 2004; 22: 2-13
- Surwit RS., Feinglas MN., Rodin J., Sutherland A., Petro AE., Opara EC., Kuhn CM., Rebuffe S. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C576/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995; 55: 645-651.
- Teichert T, Vossoughi M, Vierkötter A, Sugiri D, Schikowski T, *et al.* Association between Traffic-Related Air Pollution, Subclinical Inflammation and Impaired Glucose Metabolism: Results from the SALIA Study. *PLOS ONE* 2013; 8(12): e83042.
- Vartanian L. PhD, Marlene B. Schwartz, PhD and Kelly D. Brownell, PhD. Effects of Soft Drink Consumption on nutrition and Health: A systematic Review and Meta-Analysis. *Framing Health Matters. |American Journal of Public Health* 2007;97(4) 667-675.

- Velasco M., Larque C., Gutierrez G., Arrendondo R., Sanchez C., Hiriart M., Metabolic Syndrome induces changes in KATP channels and Ca currents in pancreatic beta cells. *Islets* 2012(4):311.
- Wang J., Han J., Zang Y., Guo W. Effects of Vanadate on Leptin Production from Isolated Rat Adipocytes. *Biological Trace Element Research*. February 2002, Volume 85, Issue 2, pp 171-182
- Wang J., Yuen VG., McNeill JH. Effect of vanadium on insulin sensitivity and appetite. *Metabolism*. Vol 50 No. 6. June 2011. Pp 667-673.
- Weitzenfeld H. Contaminación atmosférica y salud en América Latina. *Boletín de la Organización Panamericana de la Salud*. 1992, 26:1; 97-109.
- World Health Organization (WHO). Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. *Concise International Chemical Assessment Document 29*. Geneva. 2001.
- Yu C., Chen Y., Cline WG., Zhang D., Zong H., Wang Y., Bergeron R., Kim JK., Cushman SW., Cooney GJ., Atcheson B., White MF., Kraegen EW., Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation in insulin receptor substrate-1-associated phosphatidylinositol-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277(52):50230-6.
- Zuk M., Tzintzun G., Rojas L., Tercer Almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en nueve ciudades mexicanas. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). 2007; 19-20.