



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Efecto de la carnosina en las células maduras e inmaduras
del epitelio olfatorio en un modelo murino por inhalación
de vanadio*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA :

LAURA SUSANA MENDOZA BRIONES



Director de tesis:

DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



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.

Datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno	Mendoza
Apellido materno	Briones
Nombres	Laura Susana
Teléfono	(044) 55-23009074
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	309221900

2. Datos del tutor

Grado	Dra.
Nombre	Laura
Apellido paterno	Colín
Apellido materno	Barenque

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dr.
Nombre	Mario Agustín
Apellido paterno	Altamirano
Apellido materno	Lozano

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dra.
Nombre	Adriana Elizabeth
Apellido paterno	González
Apellido materno	Villalva

5. Datos del sinodal 3

Grado	Dra.
Nombre	Teresa Imelda
Apellido paterno	Fortoul
Apellido materno	Vander Goes

6. Datos del sinodal 4

Grado	M. en C.
Nombre	Martha Patricia
Apellido paterno	Bizarro
Apellido materno	Nevarés

7. Datos del trabajo escrito

Título	Efecto de la carnosina en las células maduras e inmaduras del epitelio olfatorio en un modelo murino por inhalación de vanadio
Número de páginas	p. 66
Año	2016

Agradecimientos

Siempre estaré agradecida con la Dra. Laura Colín, ya que es una persona excelente en el ámbito profesional y personal, supo guiarme desde el principio, me brindó la confianza y paciencia necesaria para poder integrarme en el laboratorio y realizar este trabajo. Son demasiado valiosas sus enseñanzas que pude adquirir a su lado, las cuales siempre las tendré presentes. GRACIAS por abrirme las puertas a la investigación.

Agradezco el apoyo brindado de parte de la Dra. Fortoul, así como a Paty, Marce, Francisco, Armando, Sofi, Nelly, Adry, Nayeli, Juan y a todo el equipo de trabajo del laboratorio, quienes fueron muy cooperativos en todo momento. Por su colaboración y su gran apoyo, no sólo en el laboratorio sino en otros ámbitos, agradezco a mis amigos y compañeros de generación Edith, Mariana, Katia, Javier y Brenda, ya que formamos un equipo muy colaborativo.

Con toda sinceridad deseo agradecer a los ratones que fueron parte de este trabajo, ya que sin ellos, no se hubiera podido realizar este proyecto.

Agradezco a la Dra. Carmen Méndez y a la Técnico Académico María José Gómora Herrera del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina; por el apoyo en el manejo de técnicas de inmunofluorescencia y manejo del Microscopio Confocal Leica TCS SP5

A Verónica Rodríguez Mata, agradezco su colaboración técnica para obtener los cortes histológicos.

Al comité de revisión de tesis: Dr. Mario Altamirano, Dra. Laura Colín, Dra. Teresa Fortoul, Dra. Adriana González y M. en C. Patricia Bizarro, agradezco su tiempo, esfuerzo y sus valiosas observaciones y comentarios acerca de mi trabajo, ya que ahora y en un futuro son de utilidad para mi formación académica.

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave IN220414

Dedicatorias

A mi mamá *Laura*, que siempre estuvo motivándome y supo comprender cada etapa de mi vida, en especial de mi carrera. Gracias por enseñarme a jamás rendirme ante las adversidades y compartir conmigo lecciones de vida, risas, comprensión y amor.

A mi papá *Armando*, quien me enseñó que la clave de todo está en el empeño que le inviertas, para después obtener resultados fructíferos y en el apoyo que me brindó en esta etapa.

A mis hermanas *América y Lili*, las cuales siempre fueron mi centro de motivación para realizar este trabajo, así que sin ellas, no hubiera podido dar el 100% de mi esfuerzo. Mi esfuerzo, mi cariño y amor son para ustedes dos, SIEMPRE.

A mi tía *Raquel*, por nunca dejarme sola, aunque no pudiera frecuentarla, y darme consejos para la vida personal y laboral. Gracias por la ternura y amor de siempre.

Con cariño, dedico y agradezco también a todos mis amigos, en especial a Diana que desde hace años me ha acompañado en las decisiones importantes que he tomado, donde me mostró su gran apoyo durante la carrera; a mis amigos de la carrera, ya que mi estancia en la Facultad fue muy gratificante a lado de ellos desde los inicios de la carrera, ayudándonos en muchos ámbitos.

A la Facultad de Ciencias y algunos de sus maestros, ya que complementaron mi motivación como fuente de inspiración, con su pasión por enseñar y compartir sus conocimientos.

Resumen

La contaminación del aire es uno de los más importantes riesgos ambientales para la salud, en el que las partículas suspendidas (PM) juegan un papel importante debido a su asociación con contaminantes tales como el vanadio (V). El V es un metal de transición ampliamente distribuido en la naturaleza, su toxicidad en el SNC ha sido atribuida principalmente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres como el hidroxilo. Se ha observado que el V produce desorganización celular, picnosis y muerte celular en el epitelio olfatorio (EO). La L-carnosina tiene propiedades antioxidantes, quelantes y de neurotransmisor/neuromodulador del olfato, además en nuestro modelo por inhalación de vanadio, se ha observado un efecto neuroprotector en las células granulosas del BO. Por otra parte, un factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (EN) se ha atribuido a las ERO, donde la disfunción olfatoria se presenta como síntoma temprano. Como el EO es el primer sitio de contacto con los contaminantes ambientales, se estudian las subpoblaciones celulares del EO, determinando el efecto neuroprotector de la carnosina en un modelo murino expuesto a la inhalación de vanadio.

Se utilizaron 20 ratones macho de la cepa CD-1 y se formaron 4 grupos: 1) control expuesto a solución salina, 2) vanadio, 3) expuesto a vanadio y tratado con carnosina y 4) carnosina. Los ratones del grupo expuesto a vanadio inhalaban V_2O_5 (0.02M-1.43 mg/m³), una hora dos veces por semana. A los grupos tratados con carnosina se les suministró 1mg/kg diariamente por vía oral. Después de 4 semanas los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico 35 mg/kg., perfundidos con solución salina y con PFA al 4%, después se extrajeron los meatos olfatorios y se descalcificaron con EDTA 7%. Se procesaron con la técnica histológica ordinaria y se realizó inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios OMP para marcar neuronas maduras y GAP-43 para las neuronas inmaduras y los anticuerpos secundarios ALEXA 647 y 488 respectivamente, para el marcaje nuclear se utilizó DAPI.

En los grupos expuestos a vanadio se observó en el EO disminución de marca OMP y GAP-43 en ambas subpoblaciones neuronales así como disminución de la marca nuclear DAPI, posiblemente estos resultados estén relacionados con la desorganización y muerte celular provocados por el V, además de la generación de estrés oxidante provocada por este metal como ya se ha reportado. En contraste con el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina, el cual presentó mayor marca de núcleos y de ambas subpoblaciones del EO, debido posiblemente al papel que tiene la carnosina como antioxidante y quelante, sin embargo, en el caso de la marca OMP se observó aumento significativo semejante al del grupo control, posiblemente por la capacidad de síntesis de carnosina que poseen las

neuronas receptoras olfatorias (NRO) y que la carnosina funge como neurotransmisor/modulador del olfato. El grupo tratado con carnosina no tuvo diferencia significativa respecto del grupo control, por lo que funciona como un buen control positivo.

Se puede concluir que el vanadio provocó disminución del número de células y de proteínas que expresan las neuronas maduras e inmaduras del EO (OMP y GAP-43 respectivamente). Sin embargo, la carnosina presentó efecto neuroprotector en el EO en el modelo por inhalación de vanadio, manteniendo las subpoblaciones de neuronas maduras e inmaduras.

Índice

	Página
Tabla de abreviaturas	9
I. Introducción	10
I.1 Contaminación ambiental	10
I.1.1 Partículas suspendidas y contaminación por metales pesados	10
I.2 Vanadio	12
I.2.1 Generalidades del vanadio	12
I.2.2 Fuentes de exposición	13
I.2.3 Toxicocinética del vanadio	13
I.2.4 Toxicodinamia del vanadio	14
I.2.5 Efectos del vanadio en la salud	15
I.2.6 Efectos del vanadio en el sistema nervioso central	16
I.2.7 Efectos del vanadio en el sistema olfatorio	17
I.2.8 Vanadio y estrés oxidante	17
I.3 Antioxidantes	19
I.4 Carnosina	20
I.4.1 Carnosina y sistema olfatorio	22
I.4.2 Alteraciones del sistema olfatorio y enfermedades neurodegenerativas	24
I.4.3 Enfermedades neurodegenerativas y carnosina	25
I.5 Sistema olfatorio	26
I.6 Mucosa olfatoria	27
I.7 Epitelio olfatorio	28

II. Justificación	31
III. Hipótesis	31
IV. Objetivos	32
IV.1 Objetivo general	32
IV.2 Objetivos particulares	32
V. Material y método	32
VI. Resultados	34
VI. 1 Densitometría de la proteína OMP en las neuronas maduras del EO	34
VI. 2 Densitometría de la proteína GAP-43 en las neuronas inmaduras del EO	35
VI. 3 Análisis cuantitativo de núcleos en las zonas con marcaje para la proteína OMP del EO	37
VI. 4 Análisis cuantitativo de núcleos en las zonas con marcaje para la proteína GAP-43 del EO	39
VII. Discusión	42
VIII. Conclusión	53
Anexo 1. Protocolo de doble inmunofluorescencia en cámara húmeda	54
IX. Referencias	55

Tabla de abreviaturas

•O ²⁻	Radical superóxido
•OH	Radical hidroxilo
AGE's	Productos finales de la glicación
ALE's	Productos finales de la lipoxidación
ApoE	Apolipoproteína E
BHE	Barrera hematoencefálica
BO	Bulbo olfatorio
CBG	Células basales globosas
CBH	Células basales horizontales
Cd	Cadmio
CGO	Células gliales olfatorias
Cu	Cobre
EA	Enfermedad de Alzheimer
EN	Enfermedades neurodegenerativas
EO	Epitelio olfatorio
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies Reactivas de oxígeno
GAP-43	Proteína asociada al crecimiento
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
LP	Lámina propia
MDA	Malondialdehído
MMP	Metaloproteinasas
Mn	Manganeso
NRO	Neurona receptora olfatoria
OMP	Marcador de la proteína olfatoria
PEPT2	Transportador de oligopéptidos 2
PM	Partículas suspendidas
RO	Receptores olfatorios
SNC	Sistema nervioso central
SNPC	Sustancia nigra pars compacta
SOZMCM	Suroeste de la zona metropolitana de la Ciudad de México
TH	Tirosina hidroxilasa
TRM	Tracto rostral migratorio
UE	Uniones estrechas
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
Zn	Zinc
ZSV	Zona subventricular

I. Introducción

I.1 Contaminación ambiental

Globalmente la contaminación del aire es el más importante riesgo ambiental para la salud, los niveles de partículas suspendidas (PM) y otros contaminantes que dañan la salud son mayores en zonas urbanas que en las rurales debido a la mayor concentración de fuentes de emisión (Krzyzanowski et al., 2014).

El área metropolitana de la ciudad de México es una megaciudad con incremento significativo de su población y áreas urbanizadas, su rápida expansión incontrolada ha provocado aumento en la demanda de energía y transporte, resultando en el incremento de emisiones de gases y PM que tiene un impacto en la calidad del aire y del clima (Calderón-Garcidueñas et al., 2015).

I.1.1 Partículas suspendidas y contaminación por metales pesados

Los contaminantes directamente emitidos hacia la atmósfera son conocidos como contaminantes primarios, mientras que los contaminantes que son el resultado de reacciones químicas con otros contaminantes o con los gases atmosféricos son conocidos como contaminantes secundarios. (Bernstein, 2004)

Las propiedades físicas, de composición, morfología y termodinámicas de las PM varían respecto al tiempo, la localización e incluso la variabilidad estacional. (Colbek & Lazaridis, 2010)

Las PM se categorizan de acuerdo a su tamaño basado en su modo de distribución, su diámetro o variables dosimétricas relacionadas con la exposición humana, la clasificación más común se basa en el tamaño; partículas gruesas o PM₁₀ con diámetro aerodinámico de 2.5-10µm derivadas de la erosión del suelo, polvo de caminos y agregación de pequeñas partículas de combustión, en cuanto a las partículas finas o PM_{2.5} con diámetro aerodinámico <2.5µm y ultrafinas o PM₁ con diámetro aerodinámico <1µm son formadas durante la quema de combustible fósil (Colbek & Lazaridis, 2010; Bernstein, 2004). En México la concentración límite anual permitida de PM 2.5 o menores es en promedio: 10 µm/m³ (DOF, 2014), sin embargo, en el 2011 se reportó un promedio anual de 25 µm/m³ (WHO, 2014), por lo que en México se están excediendo los límites de PM_{2.5}

Las PM consisten de materia emitida ya sea sólida, líquida o de vapor que están "suspendidas" en el aire (Radian International, 1997), estas partículas están compuestas por un núcleo de carbón asociado a metales de transición y otros contaminantes (Katsouyanni, 2003), que al ser inhaladas pueden ingresar al bulbo olfatorio (BO) a través de la mucosa olfatoria en personas expuestas y animales experimentales (Calderón-Garcidueñas et al., 2010)

En la región urbana suroeste de la zona metropolitana de la ciudad de México (SOZMCM), que presenta altos niveles de PM, se realizaron biopsias de la mucosa olfatoria de personas adultas quienes estuvieron expuestas en esta zona <30 días y >60 días, en ambos tiempos de exposición observaron displasia en el EO, disminución de células globosas y aumento de linfocitos de la submucosa, en el caso de las personas expuestas a <30 días presentaron pérdida de cilios y menor proliferación celular en el EO; en la mucosa olfatoria de las personas expuestas >60 días observaron adelgazamiento de la membrana basal y proliferación de delgados canales vasculares, sin embargo, en ambos grupos se observó decremento de células globosas. De acuerdo con lo anterior, en el caso de biopsias en niños de la misma zona, se encontraron también cambios en las poblaciones de células globosas y ciliadas e hiperplasia de células basales, deficiencia ultraestructural de la integridad de uniones del epitelio nasal, presencia de PM en citoplasma y cuerpos heterolisosomales de células epiteliales y en espacios intracelulares. Sin embargo en adolescentes se encontró presencia de partículas ultrafinas en el citoplasma de células endoteliales del BO y membranas basales, disminución de la capa glomerular, hiperplasia endotelial en arteriolas y capilares y presencia de β -amiloides (Calderón-Garcidueñas et al., 1992, 2001, 2002, 2010).

Calderón-Garcidueñas y cols. (2002) realizaron necropsias en perros callejeros residentes de la misma área de estudio (SOZMCM), de las cuales se obtuvieron muestras de mucosa olfatoria, donde observó hiperplasia de células globosas, pérdida focal entre las neuronas receptoras y células sustentaculares sin evidencia de regeneración, así como la pérdida de estas poblaciones celulares provocando una disminución en el grosor del EO, núcleos picnóticos, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de tejido conectivo y de fibras nerviosas en la lámina propia, presencia de células inflamatorias en la submucosa, desorganización y disminución de las glándulas de Bowman. En el BO se observaron apoptosis de las células gliales y astrocitosis en la capa plexiforme interna y externa, en la capa de células mitrales y en el glomérulo olfatorio, también se observó que los procesos de los astrocitos fueron focalmente ausentes provocando un espacio perivascular de los capilares del BO.

Estudios en animales y humanos sugieren que la contaminación por PM y metales de transición posiblemente causen incremento de la expresión de marcadores asociados a enfermedades neurodegenerativas (EN), por lo que la contaminación se considera como un factor de riesgo a desarrollar EN. En la ciudad de México, niños expuestos a contaminantes ambientales demostraron tener una acumulación neuronal de proteínas no plegadas similares a las que se observan anatómicamente en los estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Yegambaram et al., 2015).

En SOZMCM hay contaminantes ambientales tales como: compuestos orgánicos volátiles, formaldehído, acetaldehído y varios metales tóxicos como el cadmio (Cd), plomo (Pb), manganeso (Mn), mercurio (Hg), cobalto (Co), zinc (Zn), níquel (Ni), vanadio (V) entre otros, que están asociados a las PM finas (PM_{2.5}) (Schroeder et al. 1987, Calderón-Garcidueñas et al., 2003). Los metales que mejor representan una zona urbana son el níquel y el vanadio, que son considerados

como marcadores de uso de combustible en los transportes de largo alcance. (Calderón-Garcidueñas et al., 2015)

I.2 Vanadio

El vanadio (V) es un metal de transición ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra en el ambiente y ejerce potentes efectos tóxicos en una gran variedad de sistemas biológicos, una exposición aguda ambiental u ocupacional de este metal provoca riesgo a la salud de los humanos y animales (Ávila-Costa et al., 2005). Los mecanismos de toxicidad de este metal incluyen: el efecto mimético con el grupo fosfato (EPA, 2011) y a la insulina, inhibe o estimula la actividad de enzimas de DNA y RNA provocando efectos mutagénicos y genotóxicos (Mukherjee et al., 2004), también es inhibidor de fosfatasas y de la bomba sodio-potasio (ATPasa- Na^+K^+) de membranas celulares (EPA, 2011), induce la señalización y activación de vías dependientes de Ca^{+2} (Mukherjee et al., 2004), participa en la activación de la vía de señalización JAK/STAT (González-Villalva et al. 2014), en la producción de citocininas proinflamatorias (EPA, 2011) y en el incremento de MMP (metaloproteinasas) (Colín-Barenque et al., 2008), así como estrés oxidante, causado por la generación de radicales libres, teniendo efectos tóxicos en los sistemas biológicos (Fortoul et al., 2014; Evangelou, 2002; Todorich et al., 2011).

I.2.1 Generalidades del vanadio

El vanadio constituye 0.015% de la corteza terrestre (Rehder, 2003), tiene diferentes estados de oxidación que van de -1 a +5, y generalmente pasa de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de procesos de óxido-reducción. Sin embargo, sólo los tres estados más altos, V^{3+} , V^{4+} y V^{5+} , tienen funciones biológicas reconocidas. El vanadio con estado de oxidación +5, participa en procesos biológicos en forma de catión o de anión. El vanadio entra a la célula por el mecanismo del transporte de aniones y después es reducido, la mayoría de las veces por el glutatión intracelular, a vanadil (4+) (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006; Evangelou, 2002).

Para procesos industriales, el vanadio se obtiene de los minerales como la vanadita, carnotita, fernandinita, entre otros, que generalmente contienen sales y óxidos de este metal en estados de oxidación +5, +4 y +3. El pentóxido de vanadio (V_2O_5) es el compuesto más comercial, es una sal de color amarillo-rojizo y su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m^3 . Podemos encontrar vanadio en el gas natural (en baja proporción) y también en el petróleo, donde varía la concentración de este metal dependiendo del lugar de origen; el petróleo de los países con mayor concentración de vanadio son Venezuela, Kuwait y México, en México la variedad de petróleo maya tiene mayor concentración de este metal (243ug/g), el vanadio también se encuentra en las cenizas u hollín y en las emisiones generadas por incendios forestales

y combustión de petróleo, carbón y aceites pesados. El vanadio se utiliza en la industria de la metalurgia, preparaciones de vidrio, pinturas, colorantes para fotografía, fungicidas e insecticidas (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

I.2.2 Fuentes de exposición

La liberación del vanadio a la atmósfera es por actividad industrial y humana, por medio de la combustión de petróleo, carbón y de aceites pesados mientras que su liberación por procesos naturales incluyen la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

La liberación de este metal a la atmósfera en ciudades contaminadas es ocasionada principalmente por actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental, en la ciudad de México se ha reportado valores que alcanzan $0.114 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en aeropartículas de $10 \mu\text{m}$ y $0.093 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en partículas de $2.5 \mu\text{m}$. (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006) estas últimas partículas son inhaladas, llegando hasta los alvéolos, los capilares pulmonares, al sistema circulatorio y hacia todos los sistemas y órganos produciendo diferentes efectos en el organismo (Fortoul et al., 2014).

I.2.3 Toxicocinética del vanadio

La entrada del vanadio al organismo ocurre principalmente a través del tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio, el vanadio es absorbido y transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006). Se conoce que la vida media del vanadio es alrededor de 48 horas (CICADs, 2001). Una de las fuentes más importantes de exposición es por vía aérea, una vez absorbido por el cuerpo, el V^{5+} es reducido a V^{4+} por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras. El vanadio es transportado por la albumina y preferentemente por la transferrina. El V^{5+} entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico principalmente en los canales de fosfato (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

Estudios de farmacocinética en eritrocitos demuestran que la entrada de vanadio a la célula se da en dos etapas; en la etapa inicial el V^{5+} cruza la membrana celular a través del sistema de intercambio aniónico, en la segunda etapa el cruce es mucho más lento e involucra el producto reducido (V^{4+}) y un mecanismo de paso semejante al de cationes divalentes (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

En la célula el vanadio tiene preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas; se calcula que del 61% del total de V^{4+} se une a los fosfatos, el 29% a las proteínas y el 1% queda libre (Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

La principal ruta de eliminación del vanadio absorbido es a través de los riñones ya que en las primeras 20 horas se excreta la mayor cantidad y de 40 a 50 días el resto de vanadio, mientras que <10% es excretado por las heces (Barceloux, 1999; Rodríguez-Mercado & Altamirano-Lozano, 2006).

I.2.4 Toxicodinamia del vanadio

La toxicidad del vanadio incrementa con valencias más grandes y los compuestos pentavalentes son usualmente los más tóxicos (Barceloux, 1999). Los óxidos de vanadio son más tóxicos que las sales de vanadio, ya que se ha reportado que el V_2O_5 causa daño genotóxico en diferentes órganos como hígado, bazo, corazón y medula ósea (Evangelou, 2002; Altamirano-Lozano et al., 1999).

El V tiene la habilidad de formar oligómeros de vanadato para formar por ejemplo el decavanadato. Se ha visto que el decavanadato inhibe la cinasa adenilato, hexocinasa, fosfofructocinasa y el fosfato inositol, el decavanadato altera la homeostasis de calcio, también provoca la inhibición de la polimerización de actina alterando el citoesqueleto de las células y miosina bloqueando el ciclo contráctil e induciendo la oxidación de cisteína, por lo que podría estar alterando la contracción y regulación muscular (Aureliano, 2011).

Uno de los blancos del V es la mitocondria ya que se ha visto que hay acumulación de vanadio alterando la función de este organelo, otros blancos son las bombas, canales y receptores metabotrópicos (Aureliano, 2011; 2009). El vanadio inhibe la fosforilación oxidativa de la mitocondria, afectando el metabolismo de órganos como el corazón, riñón, hígado y cerebro. Se ha reportado que el decavanadato inhibe la respiración mitocondrial e induce la despolarización de la membrana mitocondrial en el hígado de ratas, (Barceloux, 1999; Aureliano, 2009)

El V puede formar complejos con moléculas de interés biológico como son la bomba ATP-Na/K, la ATPasa-Ca, el glutatión y aminoácidos a través de átomos como el oxígeno, nitrógeno y azufre, también tiene la habilidad de formar configuraciones geométricas que mimetizan la transición de sustratos enzimáticos e interfiere con la enzimas que contienen fosfato como las ATP fosfohidrolasas, cinasa adenilato, gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa y ribonucleasas, también funciona como inhibidor de las ATPasas, (Barceloux, 1999; Aureliano, 2009, 2011).

Estudios *in vitro* y en modelos animales indican que el vanadato y otros compuestos de vanadio incrementan la actividad transportadora de glucosa y promueve el metabolismo de la glucosa ya que el vanadio probablemente esté involucrado en la inhibición de la fosfotirosina fosfatasa y la activación de la proteína tirosina cinasa en la homeostasis de la glucosa, confiriéndole una acción mimética de la insulina al vanadato y al vanadil (Barceloux, 1999).

I.2.5 Efectos del vanadio en la salud

La inhalación por exposición ocupacional a ciertos tipos de metales como por ejemplo el níquel, cobre, cadmio y vanadio, en polvo o aerosoles puede ocasionar pérdida en la agudeza olfatoria, mucosa olfatoria atrofiada, septo nasal perforado o cáncer senonasal (Sunderman, 2001).

El V es un tóxico que puede causar disfunción respiratoria, alteraciones hematológicas, reproductivas y de desarrollo, inmunotoxicidad, mutagenicidad, nefrotoxicidad y neurotoxicidad. (Li et al., 2013). En estudios con animales se demostró que la toxicidad de compuestos de vanadio involucran debilidad, pérdida de apetito, deshidratación, reducción de peso corporal, sangrado nasal, hemorragia pulmonar, necrosis de tejidos linfoides, necrosis de túbulos renales y muerte. (Evangelou, 2002).

En un modelo murino de inhalación a V_2O_5 Fortoul y cols. (2014) reportaron efectos tóxicos en diferentes sistemas, órganos y tejidos tales como: el ojo, timo, bazo, páncreas, hígado, el tejido nervioso hematopoyético y testículo.

En los testículos se ha reportado disrupción en los túbulos seminíferos, inhibición de la espermatogénesis (Chandra et al., 2007) y necrosis de las células germinales y de Sertoli (Fortoul et al., 2007). Se puede describir al citoesqueleto como un blanco del vanadio, ya que hay disminución de actina y gama tubulina en las células testiculares participando en la alteración de la división celular (Rodríguez-Lara et al., 2013; Cooper, 2007)

Además han descrito alteraciones como aberraciones cromosomales y aneuploidia (Evangelou, 2002), también participa el daño oxidante directamente al DNA, debido a que el vanadio cataliza la formación de ERO (Calderón-Garcidueñas et al., 2003).

En modelos de exposición a V_2O_5 de ratas y ratones, se ha reportado que el vanadio induce respuesta inflamatoria en el epitelio bronquial el cual puede provocar hiperrespuesta y condiciones crónicas bronquiales similares al asma y a bronquitis crónicas (Musk & Tees, 1982; Fortoul et al. 2014) también se reporta neumonitis química, edema pulmonar y/o traqueobronquitis aguda (Cooper, 2007).

Estudios previos demostraron que los compuestos de vanadio solubles son absorbidos en el pulmón induciendo inflamación (Barceloux, 1999), ante la inhalación de vanadio se ha demostrado que provoca inflamación en el tracto respiratorio caracterizado por presencia de abundantes neutrófilos, macrófagos y liberación de citocinas proinflamatorias (Cooper, 2007). Después de la inhalación de V_2O_5 en ratas, se observó hiperplasia de células bronquiales no ciliadas y engrosamiento de musculo liso, asociado a un incremento de IL-6 y TNF α en las células epiteliales (Fortoul et al., 2014).

Boulassel y cols. (2011) reportaron un envenenamiento por vanadato de amonio donde la paciente presentaba dolor, náusea, vómitos, múltiples diarreas diarias, hipoglucemia e insuficiencia renal aguda. Murió debido a que la paciente tenía dificultad respiratoria a pesar de

cuidados intensivos y terapia de oxígeno, en la autopsia se determinó que presentaba síndrome de asfixia y gastritis erosiva, la concentración de vanadio encontrado en su sangre fue de 6.22 mg/L correspondiente a tener 6000 veces mayor concentración de la normal en la población general. Otros síntomas que se han reportado causados por vanadio son tos con esputo (flemas), respiración silbante, dolor de garganta, de cabeza y rinitis, además se ha reportado que el vanadil sulfato participa en vasoconstricción en el pulmón.

Una exposición aguda a pentóxido de vanadio tiene importantes manifestaciones patológicas en el sistema nervioso (Cooper, 2007), y que los trabajadores expuestos a vanadio muestran alteraciones neuroconductuales como son la cognición, la atención y la memoria de corto plazo (Li et al. 2013).

I.2.6 Efectos del vanadio en el sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por presentar gran cantidad de ácidos grasos altamente peroxidables, bajos niveles de antioxidantes (como la catalasa y superóxido dismutasa) y un elevado metabolismo aeróbico por lo que es susceptible a estrés oxidante (Fortoul et al., 2014; Guerra et al., 2013; Gariballa & Sinclair, 2000)

Uno de los efectos patológicos del vanadio en el SNC es la alteración en la mielina. El tratamiento con metavanadato de sodio en ratas adultas se observó una mayor peroxidación lipídica y decremento en la densidad de fibras mielínicas en áreas del cerebro como en el cuerpo caloso, cerebelo e hipocampo evidenciada por la disminución de marca inmunohistoquímica de MBP (proteína básica de mielina) la cual está involucrada en la formación de la mielina (García et al., 2004; Todorich et al., 2011).

En el modelo por inhalación de V se ha reportado pérdida de espinas dendríticas de neuronas piramidales, muerte celular y alteraciones en el neuropilo del hipocampo en la región CA1, que está correlacionado al deterioro de la memoria espacial por ser vulnerables al estrés oxidante, también se ha visto que decrece la inmunoreactividad de la TH (tirosina hidroxilasa) en neuronas de la sustancia nigra pars compacta, además se ha reportado en las células ependimarias, pérdida de cilios y desprendimiento celular, alterando la permeabilidad del epitelio, promoviendo el acceso a mediadores inflamatorios y provocando muerte neuronal en el cerebro (Ávila-Costa et al., 2004, 2006). En el mismo modelo se ha reportado ruptura en la barrera hematoencefálica (BHE) por la producción de MMP (enzimas que degradan la matriz extracelular y participan en diversos procesos homeostáticos y patológicos), así el incremento de MMP-9 en el BO, corteza, hipocampo y estriado se asocia a muerte neuronal (Colín-Barenque et al. 2008).

I.2.7 Efectos del vanadio en el sistema olfatorio

En el sistema nervioso central de roedores, algunos metales como Al, Cu, Mn y Zn son transportados a través del nervio olfatorio, y algunos reportes mencionan su acumulación en el BO (Sunderman, 2001). La toxicidad del vanadio depende de una variedad de factores, los cuales incluyen la ruta de administración, la dosis, toxicidad del compuesto en particular y el tiempo de exposición, sin embargo, la inhalación es la ruta de exposición más importante del vanadio contenido en el medio ambiente (Barceloux, 1999; Afeseh et al., 2014).

Se reportó que una exposición a 1.1 mg/m^3 de vanadio en ratones causan inflamación nasal y atrofia del EO, a dosis de 0.56 mg/m^3 de vanadio produce degeneración hialina del EO y epitelio respiratorio (National Toxicology Program, 2002).

En el estudio de Afeseh y cols. (2014) demuestran que la exposición a vanadio causa alteraciones tales como disminución en los niveles de TH y dopamina en el BO, debido a que la capa glomerular del BO posee abundantes neuronas dopaminérgicas, siendo así la dopamina un neurotransmisor importante de la olfacción.

En un modelo murino por inhalación de V después de un periodo de 4 semanas, Colín-Barenque y cols. (2015) observaron, que los ratones incrementaron significativamente el tiempo de búsqueda de un odorante respecto al grupo control, también observaron decremento del tamaño del soma y pérdida de espinas dendríticas de las células granulosas del BO, presencia de células apoptóticas con marginación y condensación de la cromatina, núcleos picnóticos, vacuolización y condensación del citoplasma, y aumento de la actividad GPx y GR en el BO. En el mismo modelo, Arenas (2011) observó desorganización celular, picnosis y muerte celular en el EO así como vacuolización de las glándulas de Bowman y de fibras nerviosas en los ratones expuestos a V; Jiménez (2012, 2009) reportó que en la capa glomerular y granulosa del bulbo olfatorio, la densidad celular se ve afectada, debido a que observó una disminución de la marca NeuN, así como el aumento de 4-hidroxinonenal (4-HNE) en el soma de las neuronas piramidales de la corteza cerebral y en células endimarias.

I.2.8 Vanadio y estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son generadas de forma endógena por los productos de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, o exógena mediante los productos de reacciones catalizadas por un metal, por contaminantes presentes en el ambiente, y otros mecanismos, por ejemplo las ERO generadas por los neutrófilos y macrófagos durante la inflamación y por la exposición a rayos UV. Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones no apareados, los cuales le confieren un alto grado de reactividad, derivan del oxígeno presente y representan la clase más importante de las especies reactivas generadas en

sistemas vivos. Las ERO generan estrés oxidante y pueden causar daño en estructuras celulares como lípidos y membranas, proteínas y ácidos nucleicos (Valko et al., 2006).

El vanadio produce ERO y radicales libres hidroxilo por medio de diferentes vías, peroxidando la bicapa lipídica de las membranas celulares. El estrés oxidante está relacionado con una serie de fenómenos celulares que contribuyen a la muerte celular (Fortoul et al., 2014). Estudios previos han demostrado que la toxicidad del vanadio es en gran medida ocasionada por la generación de radicales libres, mediante el mecanismo que se muestra en la fig. 1 (Colín-Barenque et al., 2015). Por ejemplo en el hígado se ha visto peroxidación lipídica y que el vanadato se acumula en el espacio intermembranal de la mitocondria, donde los mecanismos de detoxificación son insuficientes para prevenir el daño en la mitocondria (Cooper, 2007).

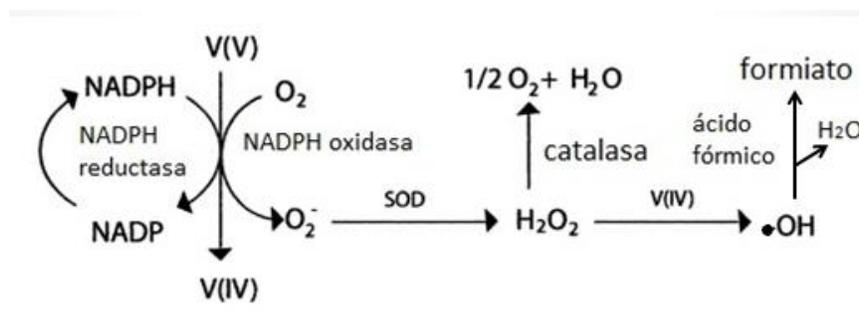


Fig. 1. Se muestra un posible mecanismo por el cual el vanadio genera estrés oxidante. Al entrar el V^{+5} a la célula, la NADPH lo reduce a un estado V^{+4} generando un radical superóxido, donde actúa SOD convirtiéndolo a peróxido de hidrógeno la cual se descompone con la catalasa en agua y O_2 , generando el radical hidroxilo que con la acción del ácido fórmico se descompone en agua y formiato (Mussali-Galante et al., 2007).

El estrés oxidante y macromoléculas asociadas al daño del EO y BO son considerados marcadores de envejecimiento y neurodegeneración, que tal vez estén involucrados en el decline olfatorio (Vaishnav et al., 2008). El estrés oxidante provocado por metales de transición como el vanadio, se considera como factor de riesgo para el desarrollo de EN, ya que hay una posible toxicidad sinérgica que altere el metabolismo, la neurotoxicidad y la respuesta a estrés oxidante (Wang & Michaelis, 2010; Yegambaram et al., 2015). El estrés oxidante y los radicales libres son generados como resultado de alteraciones metabólicas que pueden ser causadas por exposiciones químicas, como los radicales libres pueden estar acumulándose durante la vida del individuo y pueden llegar a inducir neuroinflamación y neuropatologías (Yegambaram et al., 2015).

Estudios *in vivo* con la administración de metavanadato se ha encontrado presencia de ERO y elevados productos finales de la peroxidación lipídica y alta actividad de superóxido dismutasa (SOD) (Soares et al., 2007). También se observó que ante la inhalación de V_2O_5 aumentó la glutatión peroxidasa en el BO de ratones expuestos (Colín-Barenque et al. 2015).

Por esta razón los antioxidantes son necesarios para prevenir o contrarrestar el daño a DNA, lípidos, proteínas y otras biomoléculas causado por los radicales libres. (Guerra et al., 2013).

I.3 Antioxidantes

Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones comparado con la del sustrato oxidable, inhibe o retrasa significativamente la oxidación de ese sustrato lo cual quiere decir que el papel fisiológico de los antioxidantes es prevenir el daño de componentes celulares como consecuencia de reacciones químicas que involucran radicales libres (Pham, He & Pham, 2008).

Como los radicales libres tienen la capacidad de reaccionar en una forma indiscriminada para provocar daño en la mayoría de los componentes celulares, existen antioxidantes endógenos que se clasifican como antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos mientras que los antioxidantes exógenos son de tipo no enzimáticos (Pham, He & Pham, 2008). En la tabla 1.

Antioxidantes		
Endógenos		Exógenos
Enzimáticos	No enzimáticos	
Superóxido dismutasa (SOD)	Vitamina C ^a	
Catalasa (CAT)	Acido lipóide	Vitamina E
Glutación peroxidasa (GPx)	Glutación	Metales traza
Glutación reductasa (GRx)	L-arginina	Carotenoides
	Coenzima Q-10	Flavonoides
	Melatonina	Ácidos grasos omega 3 y 6
	Proteínas quelantes de metales	
	Transferrina	
	Carnosina	

Tabla 1. Se muestran ejemplos de antioxidantes, a: la vitamina C puede ser endógena en los roedores y exógena en los humanos (Pham, He & Pham, 2008; Hipkiss, 2007).

I.4 Carnosina

La carnosina fue descubierta en Rusia en 1900, fue aislada por primera vez de un extracto de carne Liebig, en el cual se identificó como beta-alanil-histidina (Fig. 2), desde entonces varios aminoácidos han sido aislados de tejidos excitables como la anserina (beta-alanil-metilhistidina), homocarnosina (γ -amino-butiril-histidina), entre otros, por lo que en la naturaleza están presentes en compuestos que contienen histidina. Todos estos péptidos son estructuralmente similares y son sintetizados por la carnosina sintetasa que es una enzima con una amplia especificidad por el sustrato (Gariballa & Sinclair, 2000).



Fig. 2. Estructura química de la carnosina (Boldyrev et al., 2013).

La carnosina sintetasa, teniendo una amplia especificidad al sustrato, a partir de aminoácidos (β -alanina e histidina), Mg^{+2} y ATP es capaz de sintetizar la carnosina donde su actividad en el EO es de 50 a 100 veces mayor que en el cerebro y 10 veces más que en el músculo esquelético; en cambio, la carnosina posee su propia enzima hidrolítica llamada carnosinasa (Fig. 3), y posee dos isoformas la CN1 (carnosinasa sérica) principalmente producida y secretada del hígado y cerebro y CN2 (carnosinasa de tejido o dipeptidasa citosólica no específica), los cuales son miembros de la familia de las metaloproteasas (Boldyrev et al., 2013).

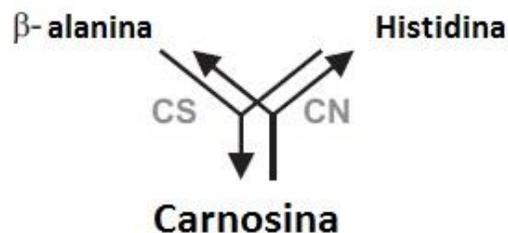


Fig. 3. Esquema de síntesis/degradación de la carnosina; CS (carnosina sintetasa), CN (carnosinasa) (Modificado de Boldyrev et al., 2013).

La carnosina está presente en tejidos animales; como en el cerebro, músculo cardíaco y esquelético, riñones, estómago, en mucosa y BO (Gariballa & Sinclair, 2000), las células que presentan síntesis de carnosina son las células musculares, gliales y receptores olfatorios (Mizuno & Kawahara, 2014).

Este compuesto posee acción amortiguadora, mejoramiento del sistema inmune (modulando la función de neutrófilos, ocasionando incremento de interleucina-1 β) y como neurotransmisor. En un pH débilmente alcalino y aún en el caso de la acidificación del medio por la actividad muscular, la carnosina sigue teniendo su función como antioxidante (Gariballa & Sinclair, 2000). La L-carnosina tiene propiedades antioxidantes mediante el mecanismo como barredor de las ERO, radicales peróxido y radicales libres tales como el hidróxilo ($\cdot\text{OH}$) y superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y la quelación de metales (Gariballa & Sinclair, 2000; Boldyrev et al., 2013) (Fig.4). En estudios previos, se ha demostrado que a nivel de tejido y de organelos como las mitocondrias y el retículo sarcoplasmático, la carnosina y sus péptidos relacionados como la anserina y la homocarnosina, previenen la peroxidación de membrana, lo que sugiere que aparte de ser antioxidante soluble en agua tiene un dominio liposoluble (Gariballa & Sinclair, 2000; Quinn et al., 1992).

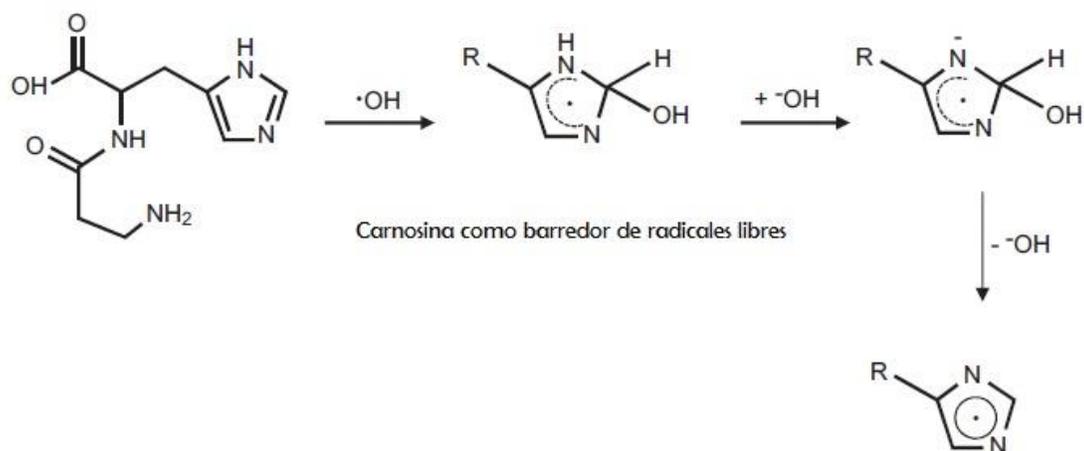


Fig. 4. Mecanismo antioxidante de la carnosina como barredor de radicales libres (Modificado de Boldyrev et al., 2013).

La propiedad antioxidante puede estar mediada también por el mecanismo de la quelación de metales, ya que la carnosina en presencia de metales de transición (como el Zn, Cu, V, entre otros) llega a formar complejos, debido a que la carnosina se considera como un ligando polidentado o agente quelante, donde sus sitios de unión son: los dos nitrógenos de imidazol, un grupo carboxilo y uno amino y por último el enlace peptídico (Baran, 2000), un ejemplo es el complejo de carnosina-zinc, que puede estimular la expresión de proteínas de estrés como la HSP 70, la cual puede suprimir la formación de proteínas alteradas o promover su replegación o finalmente su eliminación de la célula (Hipkiss, 2007). Elvingson y cols. (1994) demostraron que al pH fisiológico

el complejo que se forma con la carnosina y el vanadato (V^{+4}) es un complejo estable, debido principalmente a los átomos de N del anillo de amidazol, tal como se reportó en la literatura con otros metales como por ejemplo el Cu y Zn (Baran, 2000).

Como los iones metálicos son considerados agentes catalizadores, generando reacciones oxidativas, éstos participan en la formación de productos finales de la glicación (AGE's) y formación de productos finales de la lipoxidación (ALE's), los cuales contribuyen a la patogénesis de varias enfermedades seniles como la EA, rigidez arterial en la enfermedad cardiovascular, arterosclerosis, osteoartritis, artritis inflamatoria y cataratas (Mizuno & Kawahara, 2014). Se ha visto que la carnosina puede inhibir los AGE's y los ALE's en estudios *in vivo* e *in vitro*, lo cual es considerado como otro mecanismo antioxidante (Boldyrev et al., 2013) (Fig. 5).

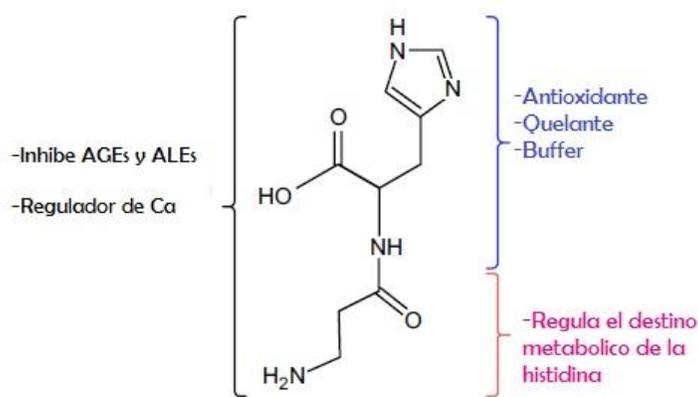


Fig. 5. Propiedades de la molécula de la carnosina (Modificado de Boldyrev et al., 2013).

I.4.1 Carnosina y sistema olfatorio

En el sistema olfatorio la carnosina se encuentra en altas concentraciones (2-3 mM) particularmente en las neuronas receptoras olfatorias y sus terminales en la capa glomerular del BO (Horning, Blakemore & Trombley, 2000), ya que se ha demostrado presencia de la carnosina en el pericarion y procesos celulares de las NRO, y es transportado y liberado a la capa glomerular del BO (Sakai et al., 1986; Boldyrev et al., 2013). Otras células del SNC que presentan actividad de síntesis de carnosina son las neuronas maduras olfatorias, oligodendrocitos (Boldyrev et al., 2013) y astrocitos (Mizuno & Kawahara, 2014; Margolis & Grillo, 1977).

Por otra parte, la presencia de carnosinasas se encuentra en las glándulas de Bowman de la mucosa nasal, en las células sustentaculares y en una pequeña región perinuclear de las NRO en el EO (Chen et al., 1994). Las carnosinasas son enzimas consideradas como un sistema inactivador análogo a las enzimas responsables de la degradación de otros neurotransmisores como la acetilcolina y las encefalinas (Rochel & Margolis, 1982).

Debido a que hay grandes concentraciones de carnosina en las neuronas receptoras del EO se ha propuesto a la carnosina como un neurotransmisor o modulador del olfato (Margolis, 1980; Bellia et al, 2011), como el glutamato es el principal neurotransmisor involucrado en la sinapsis entre las neuronas olfatorias y las células blanco (las células mitrales y periglomerulares) del BO, estudios inmunohistoquímicos y electrofisiológicos han demostrado presencia de carnosina en las terminales sinápticas de las neuronas receptoras en ratones y que la carnosina provoca un efecto excitatorio en las células mitrales y células de penacho, lo cual apoya la idea de que la carnosina es posiblemente un neurotransmisor (Boldyrev et al., 2013; Sakai et al., 1986).

En el BO se ha visto una unión estereoespecífica de la carnosina en la sinapsis glutamatérgica, lo cual sugiere que hay receptores específicos para la carnosina en el sistema olfatorio (Rochel & Margolis, 1982; Hirsch, Grillo & Margolis, 1978). Por otra parte se ha identificado que en el EO de humanos se expresa el transportador de di y tripéptidos llamado PEPT2 (transportador de oligopéptidos 2) que este posiblemente involucrado en la captación funcional y el transporte de la carnosina como sucede en los astrocitos, ya que su forma de consumo de carnosina es a través de PEPT2 (Boldyrev et al., 2013; Agu et al., 2011; Teuscher et al., 2004).

En un aislamiento de sinaptosomas de BO de ratones, se demostró que en presencia de un medio despolarizante de potasio y calcio, la liberación de carnosina se ve incrementada , pero solo en presencia de calcio se observó mayor liberación de carnosina por lo que los iones de calcio juegan un papel importante en la liberación de carnosina en la despolarización membranal, de tal manera que se considera que la exocitosis de la carnosina a partir de las NRO hacia el BO es calcio-dependiente (Rochel & Margolis, 1982). Se ha observado que la liberación de la carnosina de una manera calcio dependiente, se ve favorecido con la presencia de Zn (Trombley et al. , 2000).

Se ha descrito que la carnosina colocaliza con el glutamato y el Zn en las NRO, por lo que la carnosina puede modular la acción del glutamato y el Zn (Trombley et al., 2000). También se demostró que la carnosina tenía un flujo de salida similar a la que presenta GABA en el BO (Rochel & Margolis, 1982).

La carnosina puede modular directamente la excitabilidad neuronal influenciada por las acciones de Zn y Cu en los receptores de aminoácidos y transmisión sináptica, además la carnosina reduce o previene el efecto neurotóxico de metales, debido a la combinación de la quelación de metales y barrido de radicales libres, actuando como un agente neuroprotector (Trombley et al., 2000).

Reséndiz (2014) observó un efecto neuroprotector de la carnosina en un modelo por inhalación de V, donde reporto que los ratones expuestos a V presentaron disminución significativa en la densidad espinosa de las células granulosas del BO en el grupo expuesto a V, a diferencia del grupo que fue expuesto a V y tratado con carnosina presentó mayor densidad espinosa que el grupo solo tratado con V.

I.4.2 Alteraciones del sistema olfatorio y enfermedades neurodegenerativas

Los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) y de Alzheimer (EA) presentan disfunción olfatoria así como alteraciones citológicas en la mucosa y el BO, siendo éste un indicador temprano de la enfermedad (Doorn et al., 2013; Hipkiss, 2007).

La olfacción está definida como la capacidad de detección y discriminación de odorantes, por lo que estudios epidemiológicos reportan que la disfunción olfatoria se presenta antes de manifestaciones clínicas en enfermedades neurodegenerativas como la EA, EP y enfermedad de Huntington, lo cual se relaciona con el incremento del riesgo de padecer un déficit cognitivo, relacionado con edad avanzada (el mejor rendimiento de olfacción es entre los 20 y 40 años), ya que hay una relación estrecha entre el déficit olfatorio, la hiposmia y anosmia con la edad (Moulton & Yang 2012; Kovács, 2004).

Hay evidencia en pacientes con EA donde se demuestra que hay incremento de placas seniles extracelulares que consiste en su mayoría del péptido β -amiloide, marañas neurofibrilares compuesto por proteína tau-hiperfosforilada, pérdida celular y degeneración granulovacuolar en la corteza entorrinal, corteza prepiriforme y en el núcleo olfatorio anterior, estas regiones están involucradas en el procesamiento de la información olfatoria (Averback, 1983; Murphy et al., 1990). En pacientes con EA se ha visto inmunoreactividad de anticuerpos específicos para placas seniles y marañas neurofibrilares en masas anormales de neuritas en cerebro, y también se han identificado en el EO y BO en estos pacientes, por lo cual se altera la liberación de neurotransmisores y por consecuente el núcleo olfatorio anterior presenta alteración en el procesamiento de la información olfatoria (Talamo et al., 1989; Murphy et al., 1990; Hipkiss, 2007; Herculano, 2013; Doorn et al., 2013).

En el EO de pacientes con EA se observaron marcadores de estrés oxidante como la hemoxigenasa-1, y marcadores de lipoxidación como son HNE-pirrol y HNE-hidroxinonal (Perry et al., 2003), así como la presencia en las dendritas de los receptores olfatorios, donde se encuentran los receptores olfatorios de las NRO de la marca 3-nitrotirosina, el cual es un marcador de daño nitrosante en las proteínas membranales, lo que sugiere que un mecanismo directo de la discapacidad olfatoria (Getchell et al., 2003).

La EP es una enfermedad crónica neurodegenerativa donde se presentan síntomas motores como rigidez muscular, hipocinesia y temblores, se caracteriza por la presencia de cuerpos de Lewy, pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNPC), presencia de MDA basal (Dexter et al., 1989), en estadios tempranos de la enfermedad, hay una relación con la disfunción mitocondrial, acumulación de ERO y señales apoptóticas en la SNPC, también hay una cantidad elevada de proteínas carboniladas (Boldyrev et al., 2008). Como la monoamina oxidasa (MAO) es una enzima, que tras su activación provoca la acumulación de ERO, estimulando la oxidación de lípidos y proteínas, la MAO de manera *in vivo* metaboliza aminas biogénicas endógenas y derivadas de la dieta mediante la vía de desaminación oxidativa, siendo los sustratos

más importantes la noradrenalina, adrenalina, dopamina y serotonina, los cuales están implicados en la EP (Kovács, 2004; Riederer & Laux, 2011; Boldyrev et al., 2008).

En la EP la hiposmia y la presencia de α -sinucleína (componentes de los cuerpos de Lewy) en el BO es un evento temprano y presente durante los estadios presintomáticos de la enfermedad, la disfunción olfatoria parece estar relacionado con la progresión de la enfermedad en la fase premotora y motora de la EP (Doorn et al., 2013).

Pruebas olfatorias y cognitivas, pueden ayudar a dar información acerca de la progresión de la degeneración en estadios tempranos de EN especialmente para pacientes que estén predispuestos genéticamente a desarrollar estas patologías sin evidenciar signos de demencia (Murphy, 1999).

1.4.3 Enfermedades neurodegenerativas y carnosina

Hay evidencia que indica que la acumulación aberrante o el desplegamiento de las proteínas, la formación de protofibrillas, el daño excitotóxico, estrés oxidante y nitrosante, disfunción del proteosoma, daño mitocondrial y daño en el transporte axonal y dendrítico, representan eventos de desórdenes neurodegenerativos progresivos como la enfermedad de Huntington, EA y EP (Calabrese et al., 2005). La función de la carnosina y sus derivados han tomado importancia, ya que en modelos de enfermedades neurológicas, la carnosina ha mostrado tener una significativa protección contra estas enfermedades tales como la EA, EP y demencia (Boldyrev et al., 2008; Bellia et al., 2011; Hipkiss, 2007).

En la EA, se ha visto que la carnosina inhibe los efectos tóxicos del péptido β -amiloide, MDA (malondialdehído) e hipoclorito (Hipkiss et al., 1998). El MDA se produce por la oxidación de ácidos grasos polinsaturados que inducen la formación de peróxidos de lípidos y degradación enzimática o química (Cheng, et al., 2011). Su toxicidad radica en reticular biomacromoléculas tales como proteínas estructurales y funcionales, siendo un potente agente neurotóxico (Cheng, et al., 2011). La carnosina como agente antiglicación, inhibe el cruzamiento de proteínas lo cual las protege para llevar a cabo su función nativa (Cheng, et al., 2011), también se ha visto que puede suprimir y barrer radicales libres y aldehídos reactivos (Hipkiss, 2007). Estudios previos demuestran que la carnosina no solo reacciona con los aldehídos de bajo peso molecular y cetonas, sino con grupos carbonilo (carnosilación) producidos por el daño oxidativo, atenuando el daño por estos intermediarios y disminuir la progresión de la enfermedad (Cheng, et al., 2011).

Como el Zn y el Cu están implicados en la acumulación de depósitos de β -amiloide en la EA (Preston et al., 1998) así como en otras enfermedades y alteraciones neuropatológicas (como la enfermedad de Menkes, accidentes cerebrovasculares y convulsiones entre otros) (Horning et al. 2000), se ha demostrado que la carnosina regula la acción neuromoduladora que tiene el zinc y el cobre sobre los receptores de aminoácidos y la transmisión sináptica, por lo que se sugiere que la

carosina funciona como un agente neuroprotector endógeno contra la toxicidad inducida por metales. Aunado a lo anterior, se demostró que 1mM es suficiente para reducir o prevenir los efectos del Zn estando a una concentración de 10-30 μ M, teniendo el mismo efecto protector de toxicidad en el caso del Cu (Trombley et al. 1998). Siendo una propuesta consistente, la carosina puede modular los síntomas de esta enfermedad, previniendo el declive cognitivo y de memoria (Hipkiss, 2007; Herculano, 2013).

Las enfermedades priónicas son una familia de EN progresivas (como la enfermedad de Jakob-Creutzfeldt), donde el Zn y el Cu promueven la neurotoxicidad de las proteínas priónicas (las cuales se sitúan en las sinapsis del SNC), éstas se generan a partir de proteínas normales que posteriormente cambian a una conformación anormal, provocando una mayor susceptibilidad a formar placas amiloides, las cuales están implicadas en pacientes con EA. Sin embargo, se ha demostrado que en cultivo de neuronas hipocampales, la carosina atenúa la muerte neuronal inducido por el fragmento del péptido de la proteína priónica (PrP106-126) (Mizuno & Kawahara, 2014; Kawahara et al., 2011).

La eficiencia de la carosina cuando se usa como aditivo alimenticio, incrementa la eficiencia de la terapia básica (la cual consiste en reemplazar la dopamina perdida con sus agonistas, incluyendo la terapia con L-DOPA: medicamento que se administra con dosis de levodopa en un rango de 200 a 800 mg/día, e inhibidores de MAO B o catecol-o-metiltransferasa) entre otros factores que facilitan el mejoramiento sintomático para pacientes con EP, ya que en pacientes tratados con terapia básica y además con carosina (dosis diaria de 1.5 g) se ha visto incremento en los niveles de SOD, y disminución de proteínas carboniladas medidas en sangre (Boldyrev et al., 2008).

También se ha demostrado que la carosina es eficiente para proteger la senescencia acelerada en ratones a partir de un parkinsonismo inducido, ya que a una dosis diaria de 100 mg/kg de peso, actúa previniendo la activación de MAO B e induciendo la reducción de la oxidación de proteínas y lípidos (Boldyrev et al., 2008).

En un modelo de hemiparkinsonismo de ratas Wistar se administró 50 mg/kg vía intraperitoneal de carosina y se reportó que decrecieron significativamente los niveles de MDA y nitrito, aumento en la actividad de catalasa y una reducción de daño cromosomal (Afshin et al., 2015).

En un cultivo de astrocitos, Calabrese y cols. (2005) reportaron que la carosina tuvo un efecto protector, ya que disminuyeron significativamente los niveles de estrés oxidante (3-nitrotirosina), los niveles de proteínas carboniladas y aumentó la viabilidad celular.

I.5 Sistema olfatorio

La nariz es un órgano estructural y funcionalmente complejo, se sitúa en la parte superior del tracto respiratorio, sitio primario para la entrada del aire inhalado al sistema respiratorio de los mamíferos, filtra, calienta y humedece el aire inhalado antes de entrar a las delicadas vías

respiratorias traqueobronquiolares y al parénquima alveolar de los pulmones (Harkema et al., 2006).

Para todas las especies, en especial el sentido del olfato, provee información crítica acerca de su ambiente, por ejemplo para detectar peligro, gracias a la habilidad para detectar estímulos químicos y codificarlos mediante un estímulo neuronal. Las neuronas sensoriales olfativas (NSO) poseen la habilidad de remplazarse ellas mismas a través de toda la vida del organismo. La percepción de los odorantes ocurre cuando las moléculas suspendidas en el aire del odorante son inhaladas y posteriormente unido a los receptores (Hadley et al., 2004).

Las dendritas de los receptores olfatorios están en contacto directo con el ambiente, y así la pinocitosis y el transporte neuronal son rutas de acceso hacia el SNC de tóxicos, el aparato multiciliar de la mucosa respiratoria funciona como una barrera protectora contra la captación y transporte atrapando el material insoluble (Calderón-Garcidueñas et al. 2002).

Los receptores olfatorios de la mucosa olfatoria proyectan al BO que se encuentra dentro de la fosa craneal subyacente a la corteza frontal y tiene varias capas: la capa del nervio olfativo, la capa glomerular, la capa plexiforme externa, la capa de células mitrales, la capa plexiforme interna y la capa de células granulosas. Dentro del BO hay dos tipos principales de células: las mitrales y las células en penacho (ubicadas en la capa plexiforme interna), y tres tipos de interneuronas: células periglomerulares, células granulosas y células de axón corto (Hadley et al., 2004). Los axones de las células mitrales y en penacho proyectan fibras eferentes que terminan en el área del telencéfalo, ampliamente definido como corteza olfatoria (Wrobel & Leopold, 2005), la cual proyecta fibras al hipotálamo lateral y al hipocampo (Hadley et al., 2004).

I.6 Mucosa olfatoria

La mucosa olfatoria está compuesta de 3 componentes primarios: membrana basal, lámina propia y EO o neuroepitelio (Russell et al., 2014). El EO es un epitelio pseudoestratificado que contiene diversos tipos de células, incluyendo los cuerpos celulares de las neuronas receptoras olfatorias (NRO) y neuronas inmaduras, células de soporte y células basales. El neuroepitelio olfatorio está separado de la lámina propia por una membrana basal, en dicha lámina propia se encuentran las glándulas de Bowman, haces de axones y vasos sanguíneos. Las NRO son neuronas bipolares que proyectan sus dendritas a la superficie del EO, las cuales contienen cilios no móviles, lugar donde se unen los odorantes a los receptores situados en dichos cilios y poseen un único axón proyectado al BO (Hadley et al., 2004).

I.7 Epitelio olfatorio

Debido a la función de detector de odorantes, el EO esta en contacto con metales y otras sustancias tóxicas provenientes del ambiente ya que la vía axónica es una ruta directa con el SNC sin necesidad de la participación de la BHE, permitiendo que el EO sea vulnerable a daños químicos y físicos, posiblemente debido a esto el EO tiene la capacidad de remplazar continuamente a las neuronas (Lindsay, Riddell & Barnett, 2010; Tallkvist et al., 2002).

En las terminales dendríticas de las NRO, hay una protuberancia apical que proyecta hacia la superficie del EO, cada protuberancia posee de 5 a 50 cilios especializados no móviles, los cuales se conforman de un cuerpo basal y un arreglo microtubular de 9+2 de tubulina. Estos cilios son más largos (de 30 a 200 μm) que los que presenta el epitelio respiratorio, y contienen a los receptores olfatorios (RO) necesarios para la transducción del estímulo del odorante. La membrana de éstos cilios es una bicapa fosfolipídica, donde su función es controlar el paso de los iones y elementos hacia la neurona y permitir la detección del odorante (Sankaran et al., 2002). Se cree que hay aproximadamente 1000 diferentes secuencias de genes que codifican para diferentes RO y en cada NRO se expresa solo un tipo de RO (Hadley et al., 2004).

Los axones de las NRO proyectan a glomérulos específicos, los cuales consisten en un compartimento axonal (NRO) y dendrítico (células mitrales y células en penacho) (Harkema et al., 2006) dentro de BO; la terminación de NRO tiene un axón delgado sin mielina, éstos se van juntando en fascículos y después se comienzan a mielinizar convirtiéndose en filamentos olfatorios (o el primer nervio craneal) que pasan a través de los orificios de la placa cribosa y forman la primera sinapsis en el BO, esta asociación con el SNC tan directa con el medio ambiente es única, por lo que estas neuronas y esta vía son vulnerables para agentes infecciosos, toxinas y traumas (Hadley et al., 2004; Sankaran et al., 2002). El anticuerpo que se utiliza como marcador para la proteína olfatoria (OMP) sirve para identificar a las neuronas maduras olfativas (Kott & Westrum, 1996).

El otro tipo de células en el EO, son las células de sostén las cuales tienen microvellosidades en su superficie, estas células rodean a las NRO para regular y mantener el medio iónico de las NRO cuando la transducción de señal ocurra. El neuroepitelio tiene dos tipos de células basales: las horizontales y las globosas, éstas son células madre del neuroepitelio, las células globosas se dividen en células hijas que se diferencian en neuronas olfatorias, las cuales se distinguen de las demás neuronas por tener la habilidad de regenerarse, las células basales horizontales, se cree que después de algún daño, éstas son capaces de diferenciarse en todos los linajes celulares del neuroepitelio (Hadley et al., 2004).

Las células gliales olfatorias (CGO) fueron descritas por Golgi y Blanes por primera vez cuando ellos observaban las poblaciones gliales en bulbos olfatorios de mamíferos, estas células se encuentran en el BO y en el EO donde el mesoaxón de cada CGO encierra haces densamente poblados de axones no mielinizados (fila olfatoria) y se proyectan de las NEO al BO. Las CGO tienen un núcleo lobulado con cromatina irregular bajo la envoltura nuclear y uno o dos nucléolos, cuando maduran

adquieren una forma elongada con un proceso laminar delgado que envuelven pequeños haces de axones. En el adulto las CGO tienen una forma fusiforme, en su citoplasma los ribosomas libres y cuerpos de inclusión son abundantes, en comparación con los astrocitos las CGO son electrodensos y tienen filamentos intermedios que se encuentran dispersos. Las CGO sobreexpresan genes involucrados en la cicatrización y en la regulación extracelular, se cree que estas células promueven la regeneración neuronal (Russell et al., 2014).

Las células basales son células madre del EO, en ratas se ha descrito que hay dos tipos de células basales; células basales globosas (CBG) y células basales horizontales (CBH), mientras que en el humano parece existir un solo tipo de célula basal que morfológicamente se asemeja a las CBG de la rata. Las neuronas inmaduras y maduras (NRO) están organizadas en una manera laminar donde las neuronas maduras se encuentran cerca de la superficie apical, ya que las neuronas inmaduras se diferencian y migran desde la base hacia la superficie del EO y reemplazan a las neuronas que han muerto a través de la muerte celular programada debido al envejecimiento. (Annick et al., 2011; Russell et al., 2014).

Las CBG tienen una morfología redondeada y son necesarias para la regeneración del EO, después de una lesión en modelos animales, estas células pueden dar lugar a las NRO, a células no neuronales como las células sustentaculares o a ambos tipos celulares ya que en el EO son células multipotentes (Russell et al., 2014). El anticuerpo GAP-43 (proteína asociada al crecimiento) funciona como un marcador para las neuronas inmaduras (Kott & Westrum, 1996).

Las CBH se encuentran en lo más profundo del EO y muy cercano a la membrana basal y mantienen una morfología plana, estas células son relativamente inactivas y se cree que solo ocasionalmente pueden dar lugar a las CBG (Russell et al., 2014).

Las células sustentaculares son células columnares irregulares con núcleos eucromáticos verticalmente elongadas y largas microvellosidades múltiples (Russell et al., 2014). La mayoría de las células sustentaculares se encuentran en la superficie de los somas de las neuronas receptoras olfatorias y en su citoplasma hay muchas mitocondrias y retículo endoplasmático granular y agranular (Russell et al., 2014). Se cree que las células sustentaculares están involucradas en el metabolismo y remoción de sustancias extrañas de la superficie del EO y mantienen el microambiente de contacto del odorante en el EO (Lindsay, Riddell & Barnett, 2010).

Algunos estudios sugieren que las células sustentaculares juegan un papel importante en la regulación homeostática y en la proliferación de las NRO y también porque han encontrado que hay uniones estrechas (UE) y un complejo de señalización de calcio entre las NRO y las células sustentaculares en ratón (Russell et al., 2014). Las células de soporte están estrechamente asociadas con los NRO, células microviliares, células basales y entre ellas mismas, las células de soporte están unidas con sus células vecinas por un complejo de unión típico, el cual consiste de una zonula occludens (unión estrecha), zonula adherens (unión intermedia) y macula adherens (desmosoma). Las dendritas están completamente cubiertas de células de soporte, algunas

dendritas están envueltas por una sola célula de soporte y otras por dos o tres. Los desmosomas ocasionalmente forman un enlace entre la dendrita y la célula de soporte (Moran et al., 1982).

Hay un tipo de células sustentaculares también llamadas células microviliares, estas están localizadas en la superficie del EO, tienen una forma parecidas a la de un matraz con un conjunto de microvellosidades que se proyecta hacia la capa mucosa del EO, tienen un proceso citoplasmático parecido a un axón delgado que se proyecta desde el polo basal de estas células y pasa a través del epitelio hacia la lámina propia teniendo una morfología bipolar y se ha demostrado que la pérdida de estas células microviliares no afectan la función olfatoria (Russell et al., 2014). (Fig. 6)

Otro tipo de célula descrita en el EO de ratones son las células microviliares en forma de dedo (o fingerlike), estas células se encuentran entre las células sustentaculares (Miller et al., 1995) y únicamente se presentan en ausencia de cilios olfatorios como lo reportó Ota (1998) al diseccionar el BO, ya que no se ha reportado en EO sin insulto. Las microvellosidades de estas células se caracterizan por la ausencia una estructura específica que consiste en haces de microfilamentos y además es considerado como un posible mecanoreceptor (Russell et al., 2014; Ota, 1998).

La lámina propia contiene varios tipos celulares y estructuras incluyendo células endoteliales que componen a los vasos sanguíneos, haces de axones de las NRO (fila olfatoria), células de Schwann las cuales mielinizan los procesos de las NRO y las glándulas de Bowman (Russell et al., 2014; Steinke et al., 2008).

Las glándulas de Bowman proyectan canales excretorios a través de la LP y el EO humedeciendo la superficie mucosa que sirve como un solvente para las sustancias odoríferas (Lindsay, Riddell & Barnett, 2010).

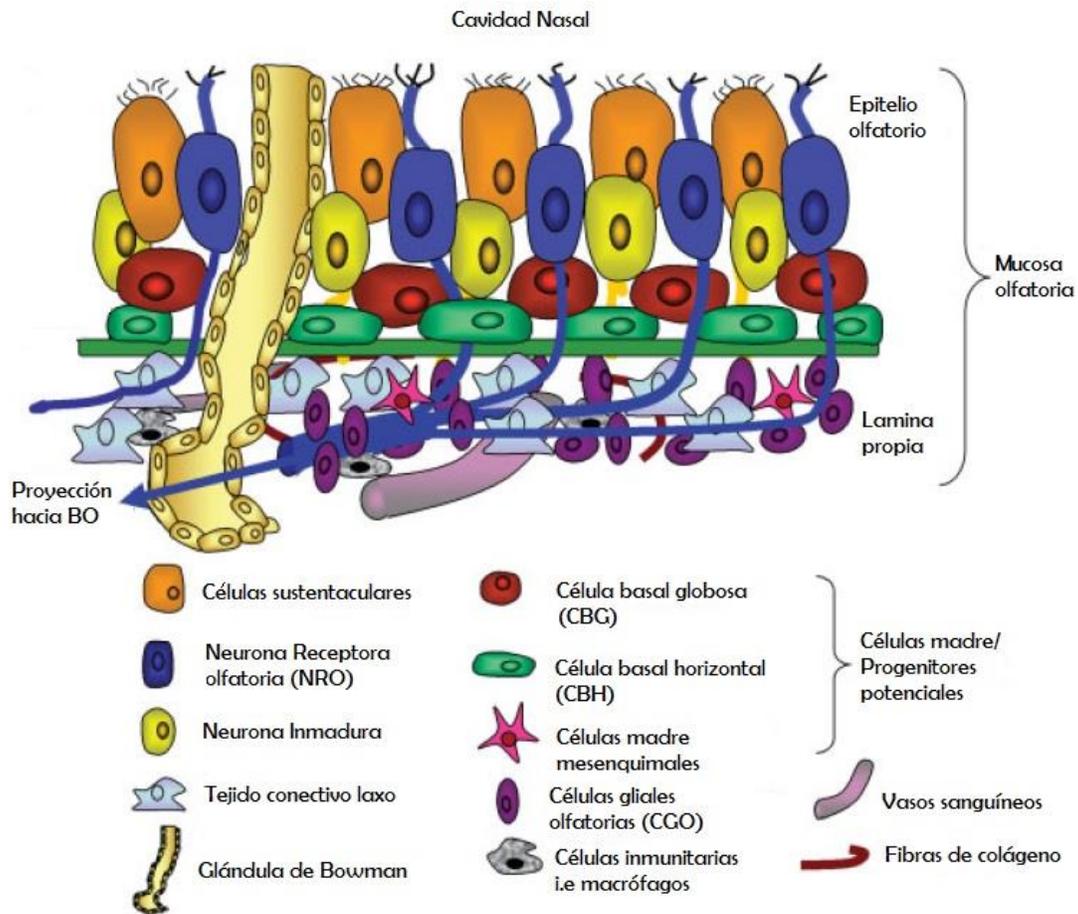


Fig. 6. Esquema de la mucosa olfatoria, donde se muestran las poblaciones celulares del EO (modificado de Lindsay, Riddell & Barnett, 2010).

II. Justificación

El estrés oxidante que genera el V, el cual es un contaminante ambiental que se adosa a las $PM_{2.5}$, es considerado como un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el EP y EA, en estas enfermedades neurodegenerativas se ha reportado disfunción olfatoria y alteración de los receptores olfatorios. Ya que el EO es el primer contacto que hace el SNC con el ambiente, toma importancia estudiar las subpoblaciones celulares del EO, y el papel de la carnosina como neuroprotector en ratones expuestos a vanadio.

III. Hipótesis

El vanadio causara pérdida de neuronas maduras e inmaduras en el EO, siendo menos afectados los ratones tratados con carnosina debido al efecto neuroprotector de ésta.

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

Determinar el efecto neuroprotector de la carnosina en las subpoblaciones celulares del epitelio olfatorio, en el modelo por inhalación de vanadio en ratón.

IV.2 Objetivos particulares

-Diferenciar las neuronas maduras e inmaduras del epitelio olfatorio, con los marcadores OMP y GAP-43 respectivamente con la técnica de inmunofluorescencia.

- Analizar por densitometría las subpoblaciones celulares del epitelio olfatorio.

-Determinar los cambios en la densidad de la marca de las subpoblaciones del epitelio olfatorio, en el modelo por inhalación de vanadio y la administración de carnosina.

V. Material y método

Se utilizaron 20 ratones machos de la cepa CD-1, con peso de 30±5 gramos, de los cuales se colocaron 5 ratones en los siguientes 4 grupos: grupo control, grupo vanadio, grupo tratado con carnosina y expuesto a vanadio y grupo tratado con carnosina.

El grupo control se expuso a solución salina durante 4 semanas, los grupos con tratamiento de carnosina se les suministro diariamente por vía oral 1mg/kg de peso de los ratones antes de la exposición a solución salina o en su caso a vanadio, finalmente los grupos expuestos a Vanadio, se sometieron a inhalación dentro de una caja de acrílico conectada un nebulizador ultrasónico YUEHUA™ por una hora dos veces a la semana usando una concentración de 0.02M (1.43 mg/m³) de pentóxido de vanadio durante el mismo periodo de tiempo.

Posteriormente se anestesiaron con pentobarbital sódico (35mg/kg) a los 4 grupos de ratones y fueron perfundidos por vía intracardiaca, utilizando solución salina al 0.9% y paraformaldehído al 4%, se extrajeron los meato-nasofaríngeos y se colocaron en paraformaldehído al 4% toda la noche. Al día siguiente las muestras se colocaron en solución EDTA al 7% para descalcificación, y posteriormente someter las muestras a técnica histológica ordinaria.

Después de obtener los cortes histológicos, se procesaron para realizar inmunofluorescencias con los marcadores OMP (1:50) y GAP-43 (1:100) como anticuerpos primarios, y los anticuerpos secundarios ALEXA 647 (1:100) y 488 (1:100) respectivamente para diferenciar las neuronas maduras e inmaduras, para el marcaje de núcleos se utilizó DAPI con medio de montaje (protocolo

de en anexo 1). Posteriormente se observaron las laminillas con objetivo de de 40x en microscopía confocal (Leica©).

Se realizó un análisis cuantitativo por densitometría (usando el programa Image J) para el marcador de OMP y GAP-43; se analizaron 4 áreas de la misma dimensión ($1322.0496 \mu\text{m}^2$) por cada foto y se tomaron 5 fotografías por cada ratón de los cuatro grupos. Se realizó conteo de núcleos en las zonas analizadas por densitometría a partir de las imágenes con empalme de cada uno de los marcadores con DAPI. Se analizaron los datos por medio de la prueba estadística Kruskal-Wallis, debido a la normalidad de los datos, y para comparar los resultados entre los grupos se utilizó la prueba *post hoc* de Dunn.

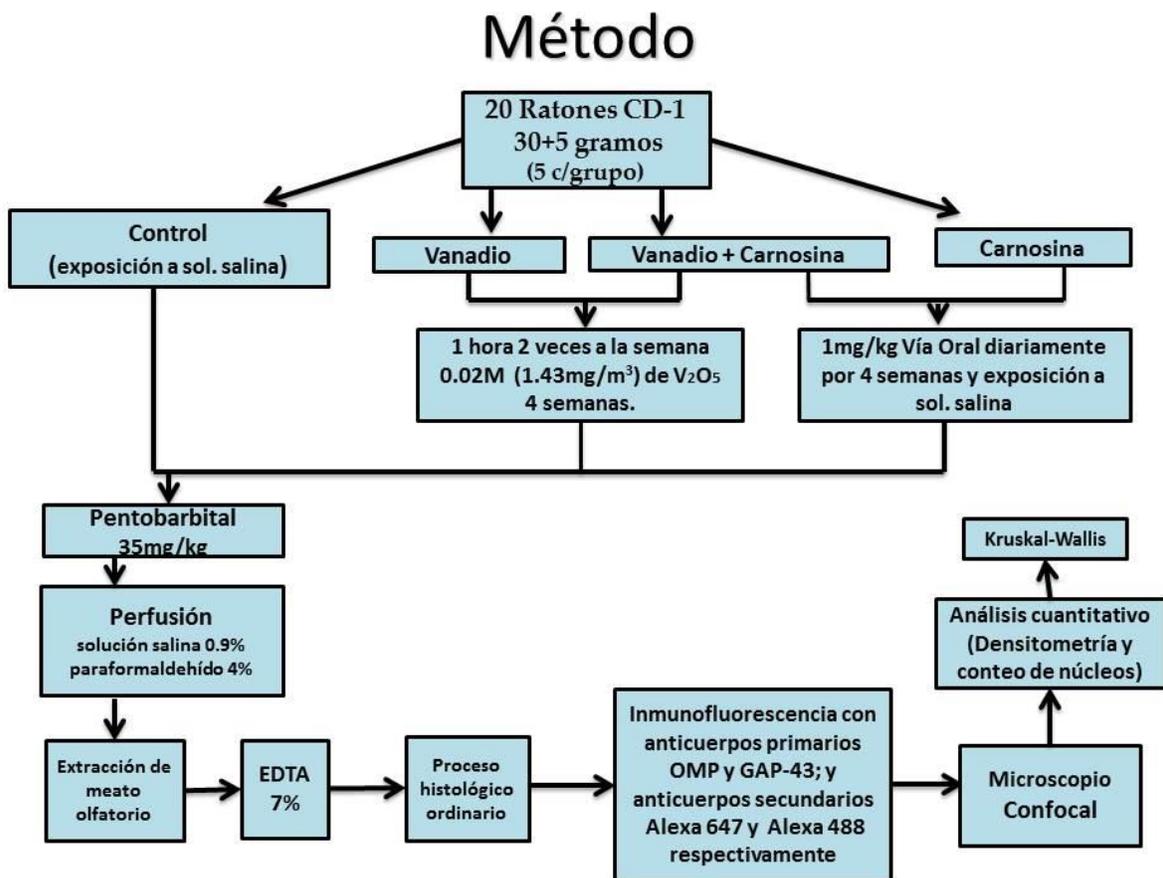


Fig. 7. Resumen del método.

VI. Resultados

VI. 1 Densitometría de la proteína OMP en las neuronas maduras del EO

En los resultados obtenidos a partir del análisis de la densitometría de la inmunofluorescencia con el marcador OMP para neuronas maduras en el EO, se observó que en el grupo expuesto a vanadio hay menos densidad de marca ($\bar{X}=75.61 \pm 12.65$) respecto al grupo control ($\bar{X}=214.3 \pm 32.60$), en el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina se observó que hay mayor densidad de marca ($\bar{X}=782.9 \pm 69.35$) comparado con el grupo vanadio y el grupo control, el grupo carnosina no mostró diferencia significativa ($\bar{X}=293.8 \pm 40.63$) respecto al grupo control (Fig. 8 y Gráfica 1).

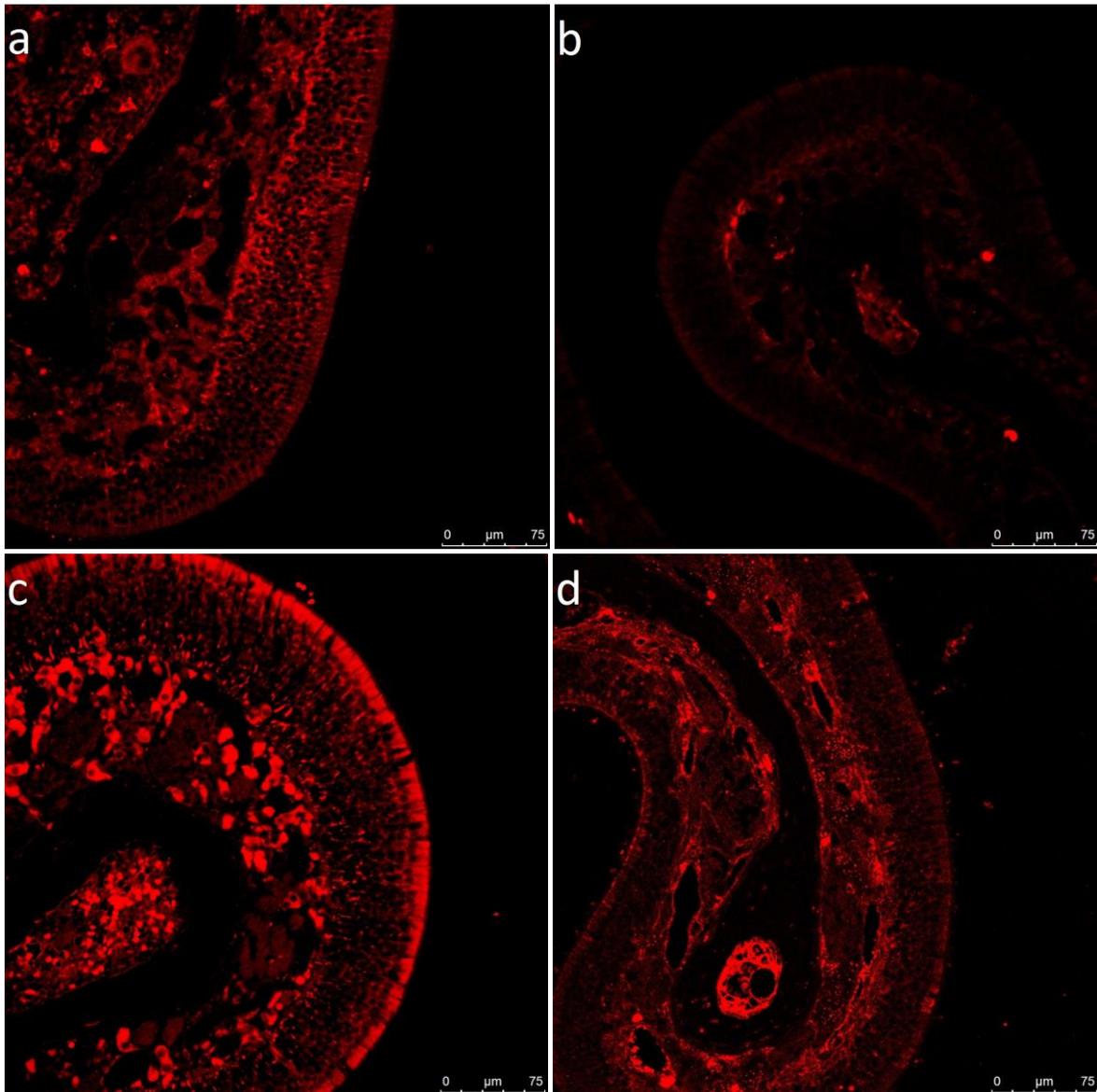
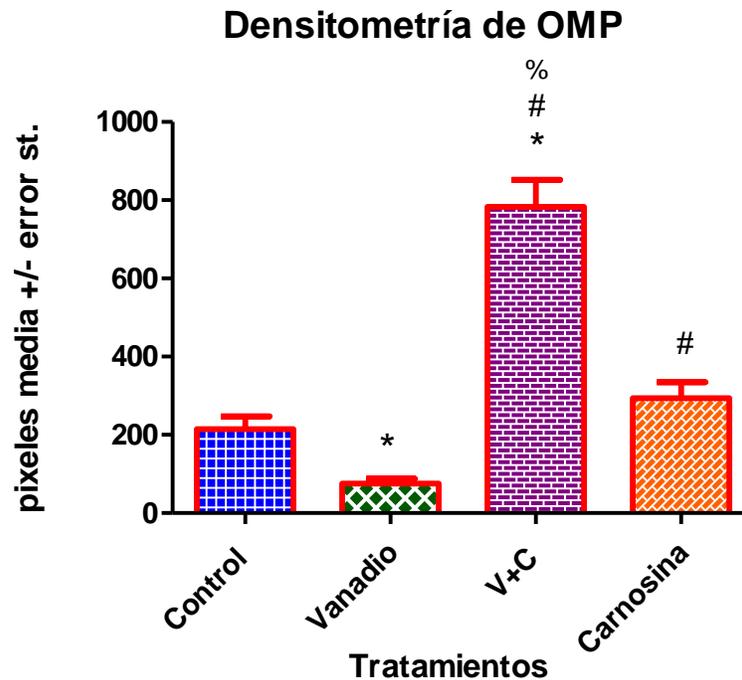


Fig. 8. Fotomicrografías del epitelio olfatorio, se observan las neuronas maduras con el marcador OMP. Se observa disminución de la marca en el grupo expuesto a vanadio (b), en el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina (c) se observa un aumento de marca incluso más que el grupo control (a). El grupo carnosina (d) muestra similitud con el grupo control. Escala= 75 μ m



* $p < 0.05$ Comparado con grupo Control
 # $p < 0.05$ Comparado con grupo Vanadio
 % $p < 0.05$ Comparado con grupo Carnosina

Gráfica 1. Se observa la densidad de marca para OMP en el EO. El * representa diferencia significativa respecto al grupo control, el # representa diferencia significativa respecto al grupo vanadio, el % representa diferencia significativa respecto al grupo carnosina.

VI. 2 Densitometría de la proteína GAP-43 en las neuronas inmaduras del EO

En el caso de la inmunofluorescencia para la proteína GAP-43, se observó que el grupo expuesto a vanadio ($\bar{X} = 60.63 \pm 10.20$) mostró disminución significativa ($p < 0.05$) comparado con el grupo control ($\bar{X} = 113.5 \pm 17.80$), a diferencia del grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina en

el cual se observó aumento significativo en la densidad de marca respecto al grupo vanadio ($\bar{X}=123.5 \pm 12.44$) y valores similares al grupo control,. El grupo tratado con carnosina ($\bar{X}= 115.0 \pm 12.82$) no tuvo diferencia significativa respecto al control (Fig. 9 y Gráfica 2).

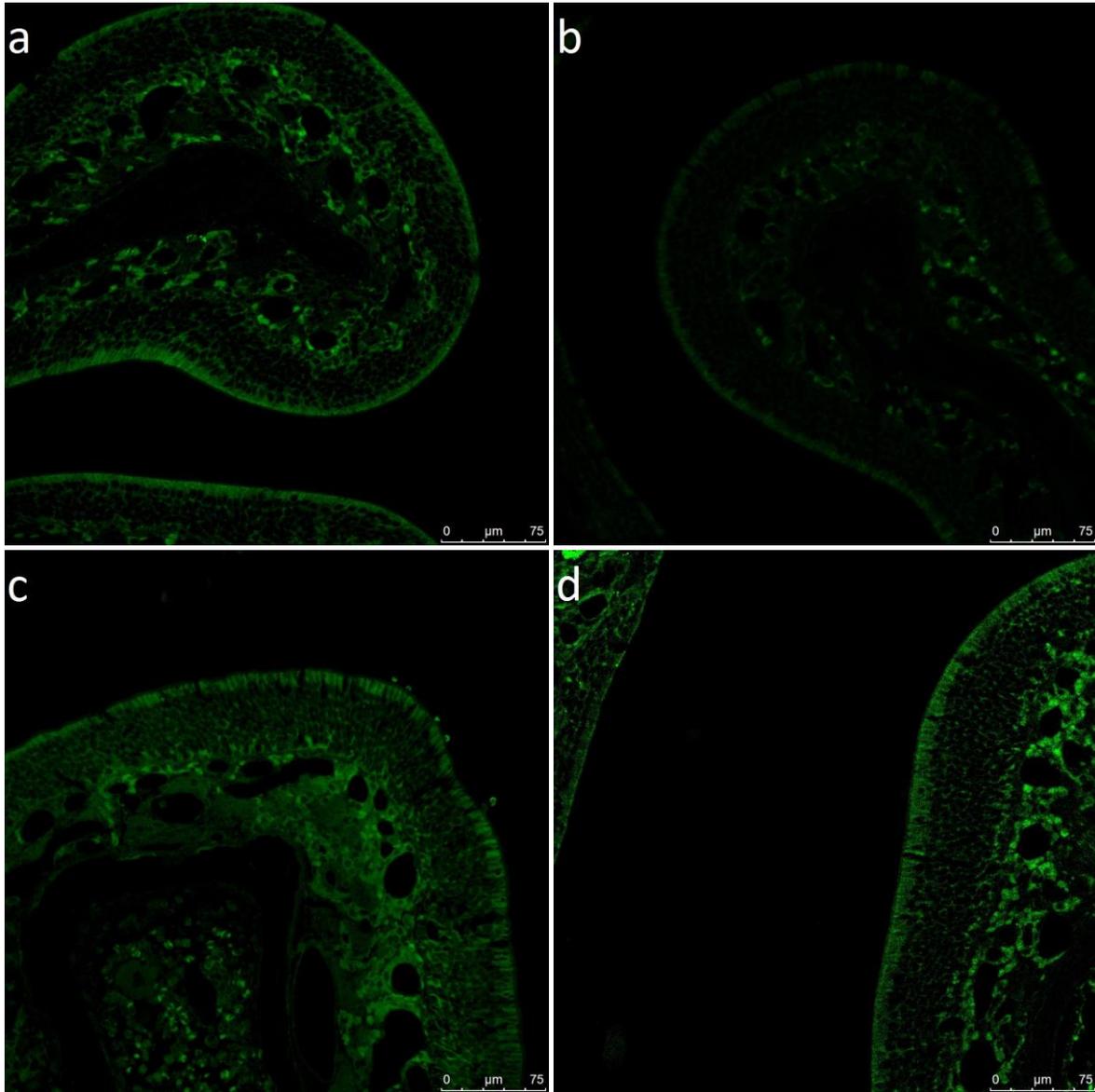
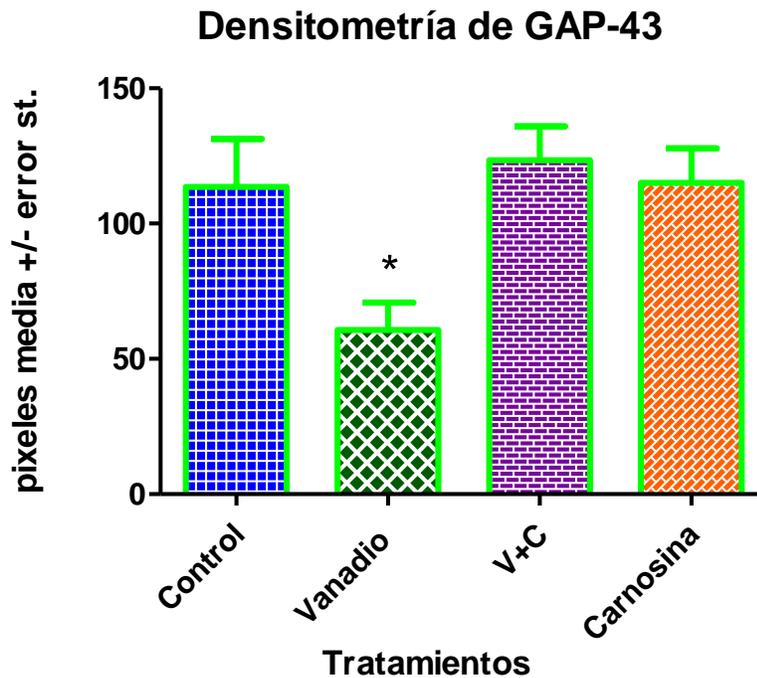


Fig. 9. Fotomicrografías del epitelio olfatorio, se observan las neuronas inmaduras con el marcador GAP-43. Se observa disminución de marca en el grupo expuesto a vanadio (**b**). Sin embargo, el grupo control (**a**), el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina (**c**) y el grupo tratado con carnosina (**d**) muestran marca similar. Escala= 75 µm



* $p < 0.05$ Comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina

Gráfica 2. Densitometría para la proteína GAP-43 en el EO. El * representa diferencia significativa del grupo Vanadio comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina.

VI. 3 Análisis cuantitativo de núcleos en las zonas con marcaje para la proteína OMP del EO

En el análisis cuantitativo de núcleos en las zonas donde se hizo el marcaje para OMP, se observó que hay disminución significativa en el número de núcleos en el grupo expuesto a vanadio ($\bar{X} = 17.36 \pm 0.3775$) respecto al grupo control ($\bar{X} = 22.74 \pm 0.6118$). En el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina ($\bar{X} = 21.98 \pm 0.4786$) se observaron valores similares al grupo control, por lo cual no hay incremento de neuronas maduras, sino aumento de la proteína OMP. El grupo tratado con carnosina ($\bar{X} = 22.15 \pm 0.5323$) no muestra diferencia significativa respecto al grupo control (Fig. 10 y Gráfica 3).

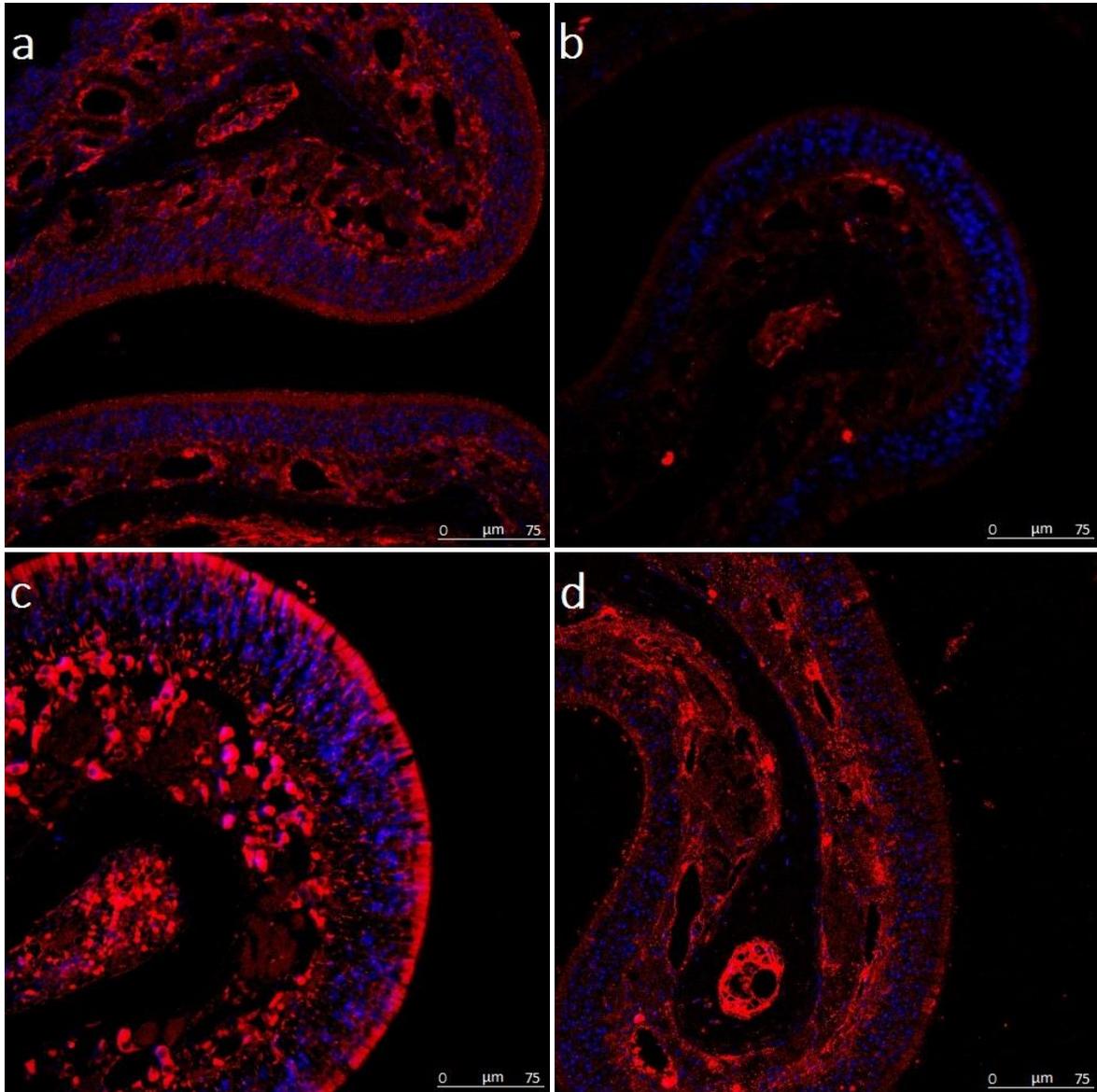
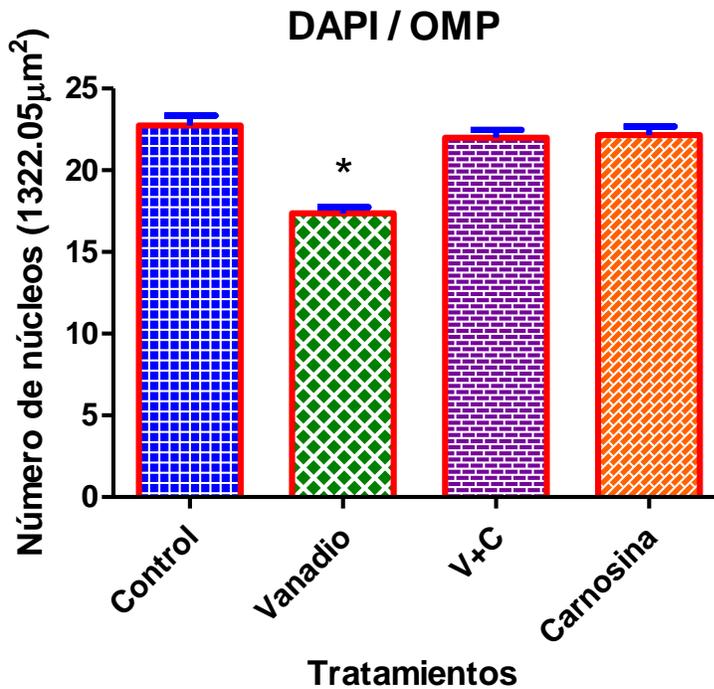


Fig. 10. Fotomicrografías del epitelio olfatorio de los receptores olfatorios marcados con OMP en rojo y DAPI en azul. Se observa el grupo control (a), (b) el grupo expuesto a vanadio, en el cual se observa disminución de marca OMP y DAPI comparado con el grupo control, grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina y el grupo carnosina, (c) pertenece al grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina, en el cual presenta aumento en la marca de OMP comparado con el grupo expuesto a vanadio y grupo control, presentando número de núcleos similares al grupo control, (d) pertenece al grupo carnosina, el cual ambos marcadores se presentan similares al grupo control. Escala = 75 µm



* $p < 0.05$ Comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina

Gráfica 3. Número de núcleos en las mismas zonas donde se realizó el marcaje para OMP. El * representa diferencia significativa el grupo Vanadio comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina.

VI. 4 Análisis cuantitativo de núcleos en las zonas con marcaje para la proteína GAP-43 del EO

Del análisis cuantitativo de núcleos en las zonas donde se hizo el marcaje para GAP-43, se observa disminución significativa en el número de núcleos en el grupo expuesto a Vanadio ($\bar{X} = 17.63 \pm 0.4657$) respecto al grupo Control ($\bar{X} = 20.07 \pm 0.4730$), en el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina ($\bar{X} = 20.23 \pm 0.4839$) se observan valores similares al grupo control. El grupo tratado con carnosina ($\bar{X} = 21.10 \pm 0.7388$) no muestra diferencia significativa respecto al grupo control (Fig. 11 y Gráfica 4).

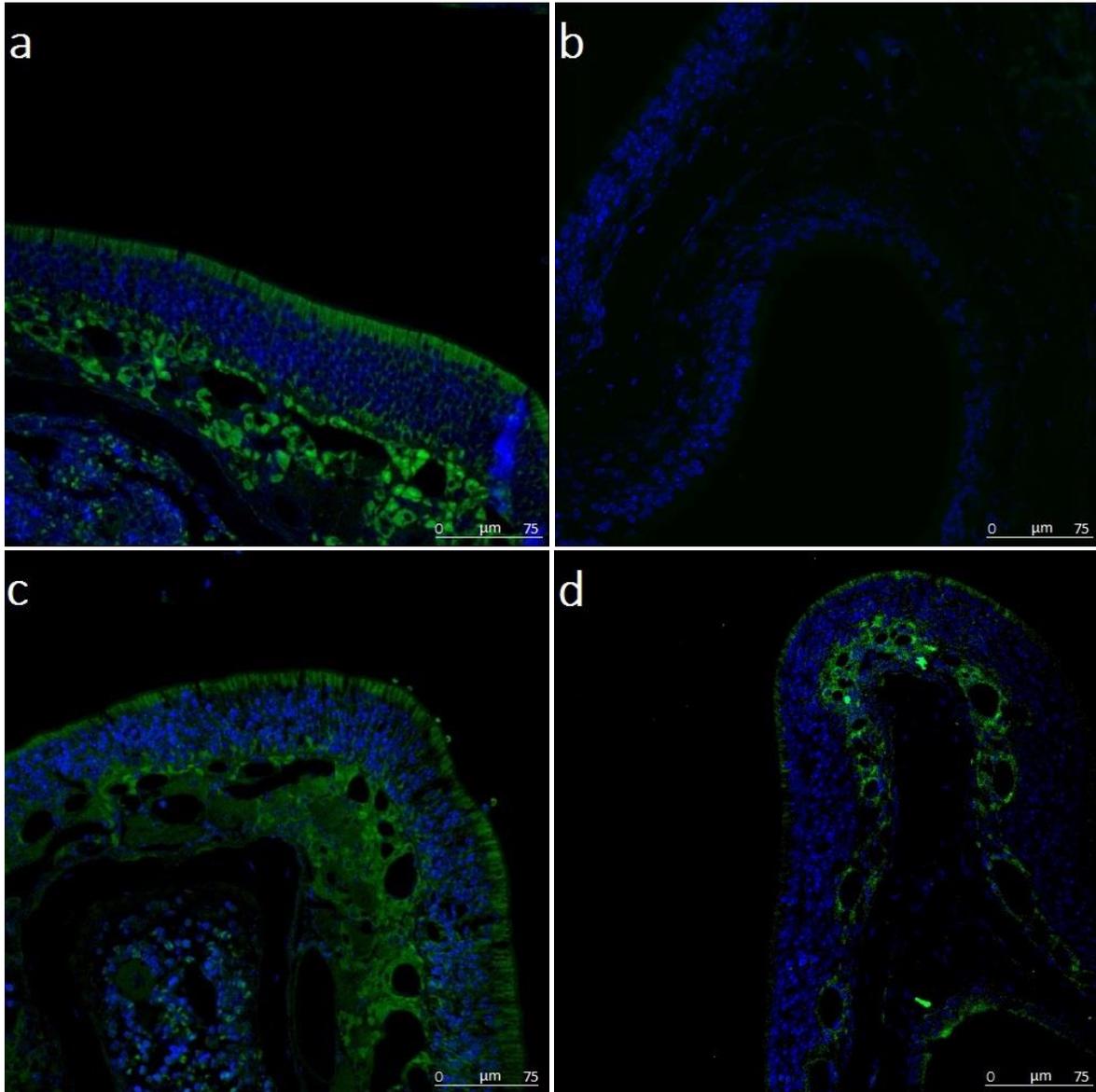
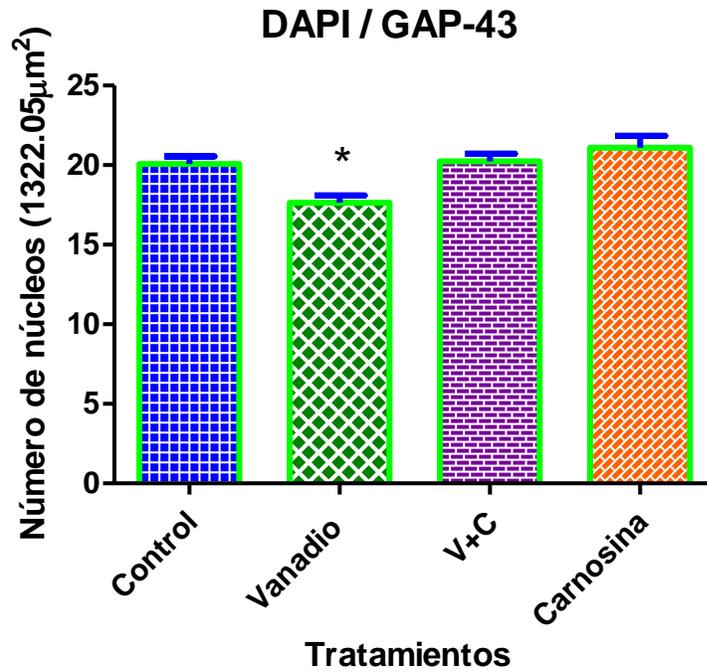


Fig. 11. Fotomicrografías del epitelio olfatorio de las células inmaduras marcadas con GAP-43 (verde) y DAPI (azul). Se observa en (a) el grupo control, en (b) el grupo expuesto a vanadio, en el cual se ve disminución de marca GAP-43 y DAPI comparado con el grupo control, grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina y el grupo carnosina, (c) pertenece al grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina, en el cual se observa marca de GAP-43 y DAPI similares al grupo control, y (d) pertenece al grupo carnosina, en el cual ambos marcadores se presentan similares al grupo control y al grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina.



* $p < 0.05$ Comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina

Gráfica 4. Número de núcleos en las mismas zonas donde se realizó el marcaje para GAP-43. El * representa diferencia significativa del grupo Vanadio comparado con los grupos Control, V+C y Carnosina.

VII. Discusión

Grupo expuesto a Vanadio

La exposición a agentes ambientales tales como metales, solventes, herbicidas y pesticidas que dañan directamente al sistema olfatorio son considerados como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas debido a que los xenobióticos pueden entrar por la vía olfatoria, participando en la disfunción olfatoria y secundariamente dañando a las regiones olfatorias del cerebro (Doty, 2012). Uno de los metales que se adosan a las PM_{2.5} es el V, el cual tiene efectos tóxicos en los sistemas biológicos como en el SNC, generando principalmente estrés oxidante, causado por la generación de radicales libres y ERO (Schroeder et al. 1987 Evangelou, 2002).

Las dendritas de las NRO poseen cuerpos basales formados por γ -tubulina, los cuales darán lugar a los cilios formados por microtúbulos que poseen dímeros de α y β tubulina, los cuales contienen a los receptores olfatorios necesarios para la transducción del estímulo del odorante. La membrana de estos cilios permite la detección del odorante (Sankaran et al., 2002), por lo que la alteración de los receptores olfatorios o de los lípidos de esta membrana puede alterar la función olfatoria (Jenkins, McEwen & Martens, 2009), por ejemplo la anosmia es una manifestación clínica de las ciliopatías asociada con la pérdida de cilios de las NRO (Joiner et al., 2015).

La membrana quimio-sensorial que recubre a los cilios de las NRO consiste de una bicapa de fosfolípidos, grupos de hidrocarbóno y grupos fosfato hidrofílicos, además el grupo fosfato es importante para la transducción olfatoria (Sankaran et al., 2002). La transducción olfatoria comienza en la unión del receptor olfatorio con el odorante, este receptor está acoplado a proteínas G, las cuales activan a la enzima adenilato ciclasa que produce segundos mensajeros (Fig. 12) llamados adenosín monofosfato cíclico (cAMP) dependientes de cinasa, el cual es capaz de fosforilar blancos proteínicos en la señalización olfatoria tales como los canales de Na⁺ y Ca²⁺ (Doty, 2001; Wetzel, Spehr & Hatt, 2001).

Como se mencionó anteriormente el V provoca alteración en el citoesqueleto debido a la pérdida de tubulina, posiblemente por su interacción directa en el huso mitótico durante la división celular, así como en los centrosomas alterando la polaridad de los microtúbulos y como inhibidor de ATPasas, interfiriendo de esta manera en la mitosis (Mussali-Galante et al., 2007). Antecedentes ante la inhalación de V reportan disminución de gama-tubulina y pérdida de cilios en las células ependimales (Ávila-Costa et al., 2005; Mussali-Galante et al., 2007), por lo cual esta alteración en el ciclo celular y en el citoesqueleto se podría relacionar con la disminución de núcleos, que se presentan en ambas subpoblaciones celulares del EO en los ratones expuestos a V.

Por otra parte, el V altera la homeostasis de calcio (debido a activación de los canales de Ca⁺² y a la afinidad del V por compuestos divalentes como el Ca²⁺) e interfiere con enzimas que contienen fosfato como las ATPasas ya que tiene efecto mimético con el grupo fosfato, alterando las reacciones de fosforilación (Aureliano, 2011; EPA, 2011; Barceloux, 1999; Mukherjee et al. 2004)..

Aureliano (2011) ha demostrado que el decavanadato altera la homeostasis de Ca^{2+} , el cual es un elemento que participa en la transducción de la señal olfatoria, ya que está involucrada en la generación del potencial de acción en los NRO hacia el BO a través del estímulo del odorante. También juega un papel importante en la respuesta neuronal al estrés y a xenobióticos, así como en la apoptosis en el EO (Klimmeck et al., 2008), estas alteraciones en consecuencia, podrían estar alterando la señalización olfatoria en primer orden a través de las NRO y en segundo orden sus blancos sinápticos, las células mitrales situadas en el BO, las cuales se encargan de llevar la información hacia la corteza olfatoria, lugar donde se interpreta la información (Doty, 2001).

Además se ha demostrado acumulación de otros metales como el Cd y Mn en las poblaciones celulares del EO, principalmente en las NRO (Tallkvist et al., 2002), como el Mn puede provocar alteraciones en la olfacción (en la identificación y discriminación del odorante y el umbral olfatorio) (Lucchini et al. 2012), el V podría acumularse en el EO y producir alteraciones olfatorias tales como la disminución de la capacidad olfatoria reportada en ratones expuestos a pentóxido de vanadio (Reséndiz 2014).

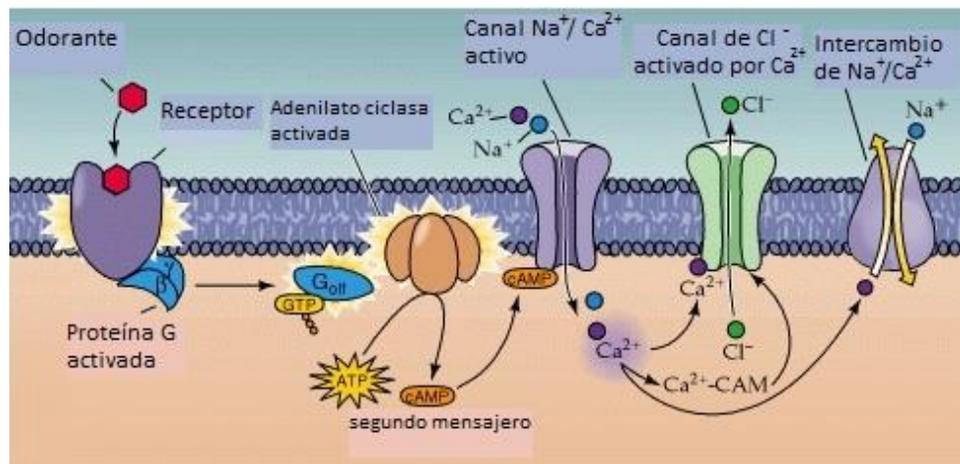


Fig. 12. Transducción olfatoria. Los odorantes se unen a los receptores localizados en las membranas de los cilios, esta asociación activa a la proteína G acoplada al receptor (Golf), la cual activa a la adenilato ciclasa generando AMP cíclico (cAMP). Un blanco de cAMP es el canal selectivo de cationes, que cuando se abre, permite el flujo de Na^+ y Ca^{2+} al interior del cilio, resultando una despolarización. El consecuente incremento de Ca^{2+} abre el canal de Cl^- activado por Ca^{2+} lo cual tiene un efecto depolarizante del potencial del receptor olfatorio, este potencial del receptor es reducido cuando se reduce la concentración de cAMP debido a la acción de fosfodiesterasas específicas. Al mismo tiempo, el Ca^{2+} forma complejos con la calmodulina (Ca^{2+} -CAM) reduciendo su afinidad para el cAMP. Finalmente, Ca^{2+} es expulsado a través del intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (Menini, 1999; Purves et al., 2001).

El EO está en contacto con partículas ultrafinas, metales y otras sustancias tóxicas provenientes del ambiente (Lindsay, Riddell & Barnett, 2010). Además, las partículas ultrafinas pueden alcanzar

el cerebro a través del transporte transináptico después de la inhalación a través de las NRO y a través de la captación por la BHE (Moulton & Yang, 2012).

Una de las vías de entrada del V al SNC es por el tracto respiratorio, (EPA, 2011) y por la ruptura de la BHE reportada previamente (Ávila-Costa et al., 2005). Sin embargo, la vía axónica podría estar involucrada en la entrada del V, ya que se ha reportado que metales como el Mn y Cd, por vía inhalada e intranasal respectivamente, se transportan a través de los axones hacia el BO y consecuentemente a regiones del cerebro tales como el hipotálamo e hipocampo, donde la acumulación de metal en estas zonas pueden provocar daño neuronal (Tallkvist et al., 2002; Dorman et al. 2002; Mizuno & Kawahara, 2014), por lo que posiblemente la vía axónica sea una de las rutas de entrada y toxicidad directa al EO del V (Afeseh et al., 2014).

Por otro lado, las uniones estrechas que poseen las células sustentaculares pueden estar involucradas en el mantenimiento del microambiente iónico necesario para la traducción de señal olfatoria (Steinke et al. 2008), ya que hay un complejo de señalización de calcio entre las NRO y las células sustentaculares en ratón (Russell et al., 2014).

Previamente en el mismo modelo por inhalación de V se reportó, desorganización celular y vacuolización de las glándulas de Bowman en la mucosa olfatoria (Arenas, 2011). La pérdida y desorganización focal de las NRO y células sustentaculares provocan disminución en el grosor del EO causadas por las PM (a las cuales se le pueden adosar metales pesados como el V), provocando pérdida de axones en la lámina propia (Calderón-Garcidueñas et al. 2002; Schroeder et al. 1987) ya que las células sustentaculares juegan un papel importante en la homeostasis y en la regulación de la proliferación de las NRO (Russell et al., 2014), el V podría interferir con la función de barrera protectora contra la captación de xenobióticos contenidos en el ambiente debido a la función de las células sustentaculares tales como el metabolismo y remoción de sustancias extrañas y el mantenimiento del microambiente de contacto del odorante en el EO (Calderón-Garcidueñas et al. 2002; Lindsay, Riddell & Barnett, 2010). Además, el EO presenta uniones estrechas (UE) entre las mismas NRO y entre las células de soporte (Miragall et al., 1994, Moran et al., 1982; Russell et al., 2014), incluso hay presencia de uniones estrechas y de tipo gap en la fila olfatoria entre las NRO y las CGO (Fig. 13) las cuales están posiblemente involucradas en la regeneración neuronal (Russell et al., 2014; Steinke et al. 2008). Dichas uniones podrían alterarse por acción del vanadio, como lo reportado en el epitelio endodermal, causando una ruptura en la BHE en el modelo por inhalación de V (Ávila-Costa et al., 2005).

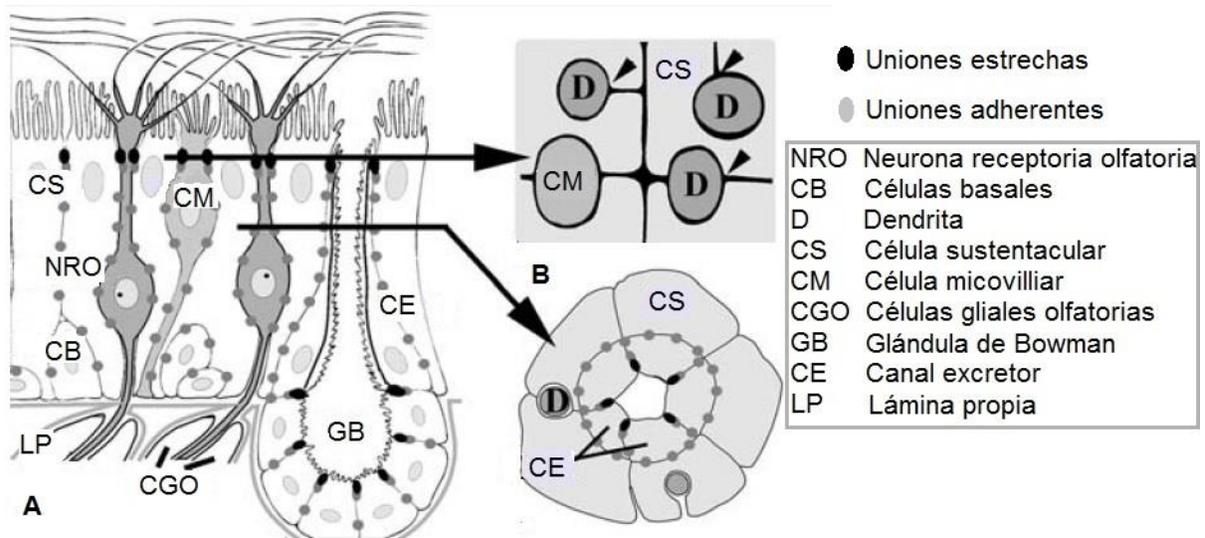


Fig. 13. (a) Esquema de la localización de uniones estrechas y de uniones adherentes en el EO, (b) situados en la parte superior del EO y los ductos excretorios de las GB (Modificado de Steinke et al., 2008).

Además se ha reportado que la inhalación de V causa alteraciones en la barrera hematotesticular, ya que hay pérdida de actina y tubulina, disminución y relocalización de la conexina 43 (Cx43), lo cual altera el citoesqueleto causando disrupciones en las uniones celulares en los túbulos seminíferos de ratones, así como la disminución de Cx43 en el miocardio de ratones (Bizarro-Nevarés et al., 2016; Fortoul et al., 2016). Las uniones tipo gap son canales transmembranales que facilitan la comunicación con células adyacentes por medio del intercambio de moléculas como Ca^{+2} , cAMP y ATP, están formados por dos hemicanales llamados conexones los cuales están constituidos de proteínas llamadas conexinas, una de las conexinas que expresan las NRO es la Cx43, la cual está involucrada en la supervivencia y muerte celular, así como en la regulación de la sensibilidad o inhibición de la respuesta del odorante donde la fosforilación es crucial para el funcionamiento de la Cx43 regulando la respuesta mediada por calcio. (Yu & Zhang, 2015). Alteraciones en las uniones tipo gap pueden estar asociadas a la reducción de sensibilidad olfatoria y percepción del olor alterando vías de señalización en el BO (Zhang, 2010).

Por otro lado Calderón-Garcidueñas y cols. (2002) reportaron hiperplasia de células globosas en el EO de perros en zonas contaminadas del SOZMCM, principalmente estas CBG son células madre del EO, dando origen a las NRO (Russell et al., 2014). En este mismo modelo por inhalación de V, Jiménez (2012) reportó que la proliferación celular, de astrocitos y de neuroblastos, disminuyó en la zona subventricular (ZSV) y tracto rostral migratorio (TRM), también reportó disminución de células periglomerulares del BO (donde se lleva a cabo la diferenciación neuronal), como el EO es capaz de regenerar poblaciones neuronales y no neuronales después de una lesión (Joiner et al., 2015) esta disminución en la proliferación celular y de neuroblastos podrían estar relacionados con la disminución de núcleos y de marca para ambas subpoblaciones en el EO.

Se ha reportado previamente la presencia de marcadores de estrés oxidante en el EO de pacientes con EA, tales como el 4-HNE y hemoxigenasa-1, además de la presencia de estrés nitrosante como 3-nitrotirosina (Perry et al. 2003). Estudios previos han demostrado que la toxicidad del vanadio es en gran medida ocasionada por la generación de estrés oxidante (Colín-Barenque et al., 2015) a través de la producción de ERO y radicales libres hidroxilo; este estrés oxidante está relacionado con una serie de fenómenos celulares, como la peroxidación lipídica (Soares et al., 2007) que contribuyen a la muerte celular, la cual se ha reportado en el BO y en el EO de ratones expuestos por vía inhalada a pentóxido de vanadio (Colín-Barenque et al., 2015; Arenas, 2011).

Todos estos mecanismos de toxicidad del V pueden estar contribuyendo a la muerte celular, reflejados en los resultados de este trabajo, ya que se encontró disminución de núcleos, así como los marcadores para las subpoblaciones maduras e inmaduras del EO, repercutiendo posiblemente en alteraciones olfatorias provocadas por el vanadio como ya se ha reportado previamente (Jiménez, 2012 ; Reséndiz, 2014).

Grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina

El suplemento de carnosina en humanos tiene efectos antioxidantes debido a su función como barredor de radicales libres y como agente quelante (Budzen & Rymaszewska, 2013). La carnosina está involucrada en el efecto antiinflamatorio, la quelación de metales especialmente con Cu y Zn, barredor de radicales libres e inhibidor de la glicosilación de proteínas, se considera como neuroprotector ante daño patológico y fisiológico mediados por estrés oxidante, tales como las EN e isquemia, siendo un posible compuesto candidato a ser usado en la prevención o tratamiento de estas alteraciones (Bellia et al., 2011).

En un cultivo de células epiteliales de plexo coroideo de ratón, se observó que la carnosina entra al plexo coroideo desde el líquido cefalorraquídeo y se acumula en las células epiteliales del plexo, donde la carnosina puede ser reciclada y regresar al líquido cefalorraquídeo por medio del transportador PEPT2. Considerando que el PEPT2 tiene un papel importante en la homeostasis de neuropéptidos en el SNC ya sea de manera dependiente o independiente de sodio (Teuscher et al., 2004), la carnosina puede regularse en el EO, teniendo un efecto benéfico en las subpoblaciones neuronales inmaduras y principalmente maduras, ya que se ha reportado expresión del PEPT2 en la parte apical del EO donde se encuentran los receptores olfatorios, donde está involucrada la captación y transporte de la carnosina (Boldyrev et al., 2013; Agu et al., 2011).

Por otro lado la carnosina está presente en las células endimarias, las cuales están involucradas en la regulación de células madre en el SNC (ya que son capaces de formar nuevas neuronas que migran hacia el BO por el TR, además de astrocitos y oligodendrocitos), también se encuentra en los tanicitos, el cual es un tipo particular de célula endimaria la cual recubre las cavidades ventriculares y en poblaciones de neuroblastos que tienen comportamiento migratorio, por ejemplo la presencia de la carnosina durante el desarrollo postnatal se observa en la región nasal

(De Marchis et al., 2000). Como se mencionó anteriormente, Jiménez (2012) reportó que la proliferación de astrocitos y de neuroblastos, disminuyó en la ZSV y el TRM en ratones expuestos a V por vía inhalada, de esta manera la carnosina podría estar involucrada en la diferenciación de las células madres del EO y consecuentemente en la neurogénesis, reflejándose en el aumento de ambas subpoblaciones neuronales del EO en ratones expuestos a vanadio y además tratados con carnosina, ya que se ha detectado carnosina en las células precursoras de las células endimarias en ratones, donde la carnosina puede estar involucrada en la neurogénesis (Bellia et al., 2011).

La carnosina presenta efectos protectores ante el estrés nitrosante y oxidante, así como en la desregulación de la homeostasis provocada por iones metálicos tales como el Cu y Zn que están involucrados en el desarrollo de las EN (Bellia et al., 2011). En la EP se reportó, que la carnosina incrementa la eficacia de la terapia básica de L-DOPA, inhibiendo la oligomerización de la α -sinucleína inducida por Cu, Zn-SOD y peróxido de hidrógeno, por lo que se propone como un adyuvante al tratamiento (Boldyrev et al., 2008).

Para el marcador OMP en el grupo expuesto a V y tratado con carnosina, se observó un aumento de marca significativamente mayor que el grupo expuesto a vanadio, y puede estar relacionado con las diferentes propiedades de la carnosina atribuido al grupo imidazol (Fig. 5), como la acción que posee de antioxidante mediante el mecanismo como barredor de las ERO, radicales peroxilo y radicales libres como el hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), al igual que la quelación de metales (Gariballa & Sinclair, 2000; Boldyrev et al., 2013).

Uno de los mecanismos de toxicidad del V en el SNC se le atribuye principalmente al estrés oxidante, a través de la producción de ERO y radicales libres hidroxilo que se relaciona con la muerte celular (Fortoul et al., 2014; Soares et al. 2007), se ha evidenciado aumento de peroxidación lipídica en el modelo por inhalación de V reportado por Jiménez (2009), donde reportó que el 4-HNE, marcador de estrés oxidante de lipoxidación en las neuronas piramidales de la corteza cerebral y en las células endimarias del plexo coroideo, por lo que considerando que la carnosina previene la peroxidación de lípidos y además es barredor de radicales libres (Gariballa & Sinclair, 2000; Quinn et al., 1992), posiblemente el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina podría estar relacionado con este efecto benéfico de la carnosina al prevenir la peroxidación lipídica (Gariballa & Sinclair, 2000) que podría estar provocando el V en el EO.

Por otra parte, la carnosina tiene un efecto benéfico en el crecimiento y longevidad en cultivos de fibroblastos humanos (De Marchis et al., 2000), así como en la longevidad de las neuronas dopaminérgicas, debido a su función antioxidante (Afshin et al. 2015), y considerando su propiedad antiapoptótica (Margolis & Grillo 1977), la carnosina podría promover la supervivencia y/o modulando la muerte celular de las subpoblaciones en el EO.

La oxidación intracelular de vanadato a vanadil, puede estar mediado por el glutatión y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), sin embargo, se ha reportado bajos niveles de glutatión y NADPH después de una inyección intraperitoneal en ratones, indicando presencia de estrés oxidante (Mahmoud et al. 2011), por otro lado, tras la inhalación de V, se reportó aumento

de GPx y GR en el BO, lo cual se ha asociado con muerte neuronal y disfunción olfatoria mediado por el estrés oxidante (Colín-Barenque et al., 2015; Gariballa & Sinclair, 2000), por lo que la carnosina podría estar ejerciendo protección ante el estrés oxidante generado por el V gracias a su papel como antioxidante en las subpoblaciones del EO.

Cuando un sistema celular se afecta por condiciones tóxicas como el estrés oxidante y exposición a metales pesados, varias proteínas protectoras aumentan como las enzimas redox, tales como el SOD (Bellia 2011) y CAT, así como la respiración mitocondrial induciendo incremento de ERO (Bellia et al., 2011). Se ha reportado que la carnosina es capaz de restaurar la actividad del citocromo C oxidasa y considerando que el V altera la cadena de respiración mitocondrial induciendo la expresión de citocromo C (Bellia et al., 2011; Zhao et al., 2014), el aumento de ambas subpoblaciones celulares del EO podría estar asociado a este efecto protector que tiene la carnosina sobre las mitocondrias aunado a su efecto antioxidante. En el mismo modelo por inhalación de V, se observaron alteraciones ultraestructurales de organelos, y muerte neuronal por apoptosis y necrosis de células granulosas del BO, que se pueden relacionar con la disfunción olfatoria reportada (Colín-Barenque et al. 2015).

Por otra parte, uno de los blancos del V es la mitocondria (Aureliano, 2011; 2009), ya que se reportó pérdida de las crestas mitocondriales, alteración de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo C en un cultivo de aislamiento de mitocondrias de hígado de ratón (Zhao et al. 2010), así como de la generación de peróxido de hidrógeno (Cuesta, Frances & García, 2011), por lo que la actividad de la catalasa (Pham, He & Pham, 2008) junto con la carnosina, podría estar contrarrestando el daño oxidante provocado por el V en las subpoblaciones del EO. Además, el efecto protector de la carnosina contra el daño oxidante también se ha reportado en la inhibición de la formación de ditirosina (biomarcador de oxidación proteínica presente en EN), la cual participa en la agregación de NF-L (neurofilamento-L) provocada por la oxidación que causa la reacción entre el citocromo C y el peróxido de hidrógeno, el NF-L es el principal componente del citoesqueleto neuronal esencial para la supervivencia, sin embargo, el NF-L es susceptible a la oxidación, debido a su abundancia en las neuronas y su contenido de tirosina, la agregación de NF-L se asocia con la disfunción mitocondrial y se encuentran en los cuerpos de Lewy observados en la sustancia nigra de pacientes con EP (Kim & Kang, 2007).

Estudios previos reportan que la carnosina reduce la excitotoxicidad generada por glutamato, regula la actividad de las MMPs, protegiendo el daño inducido por el MDA y previniendo el estrés oxidante como la peroxidación lipídica en modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro* (Bellia et al., 2011). Y en estudios previos se reportó que el V incrementa la actividad de las MMP, lo cual se asocia a la pérdida de espinas dendríticas y muerte celular en el BO (Colín-Barenque et al. 2008), debido al efecto regulador de la carnosina sobre la actividad de las MMPs, el aumento de las subpoblaciones de las NRO se podría asociar al efecto protector contra la muerte neuronal. Además tras la administración exógena de carnosina en episodio de isquemia, se incrementa los niveles de carnosina en los astrocitos (Rajanikant et al., 2007), por lo cual la administración

exógena de carnosina pudiera estar ayudando al aumento de la concentración de este compuesto en las NRO, teniendo efectos benéficos.

La propiedad antioxidante puede estar mediada también por el mecanismo de la quelación de metales ya que la carnosina en presencia de metales de transición (como el Zn, Cu, V, entre otros) llega a formar complejos contribuyendo a la disminución de daño causado por dichos metales, donde sus sitios de unión son: los dos nitrógenos de imidazol, un grupo carboxilo y uno amino y por último el enlace peptídico (Baran, 2000; Trombley et al., 2000), un ejemplo es el complejo de carnosina-zinc, que puede estimular la expresión de proteínas de estrés como la HSP 70, la cual puede suprimir la formación de proteínas alteradas (Hippkiss, 2007). Se ha visto que a pH fisiológico la carnosina puede formar complejos estables con el vanadato (V^{+4}) y con el oxovanadio (VO^{+2}), debido principalmente a los átomos de N del anillo de amidazol, tal como se reportó en la literatura con otros metales como por ejemplo el Cu y Zn (Baran, 2000; Elvingson et al., 1994). El complejo entre la carnosina y V podrían estar presente en el EO, causando disminución de daño en las subpoblaciones celulares provocado por el V.

En un modelo murino de la EP la carnosina, mostró neuroprotección contra la toxicidad del 6-hidroxidopamina (6-OHDA), este compuesto provoca apoptosis en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, además reacciona con el oxígeno produciendo radical $\bullet O^{2-}$ e $\bullet OH$, peróxido de hidrogeno y alterando el sistema de defensa antioxidante (Afshin et al. 2015), en este modelo la carnosina logró disminuir los niveles de MDA y aumentar la actividad de la catalasa y redujo el daño cromosomal. Estos estudios podrían relacionarse con el efecto antiapoptótico de las neuronas dopaminérgicas involucradas en la señalización olfatoria.

Cobra interés mencionar que, debido a que las NRO presentan síntesis de carnosina (Margolis & Grillo 1977) y ésta se considera como un neurotransmisor/modulador del olfato (Trombley et al., 2000), el aumento significativo respecto al grupo control de marca de OMP en el grupo expuesto a V y tratado con carnosina, solo se presentó en las neuronas maduras y no en las neuronas inmaduras (Gráfica 1 y 2).

La liberación de la carnosina está potenciada por la presencia del zinc, sin embargo la liberación sináptica de Zn o Cu juega un papel importante en la fisiología de las rutas de transmisión de aminoácidos. La carnosina puede ser considerada como neuromodulador debido a su papel en la maduración glial y regulación del glutamato en terminales neuronales (Bakardjiev & Bauer, 2000). La presencia de la carnosina en las NRO está posiblemente relacionado con los insultos ambientales, por lo que también es considerada como neuroprotectora, además modula la interacción con los efectos del Zn y Cu en la excitabilidad neuronal (De Marchis et al., 2000) así que el V puede estar favoreciendo la liberación de la carnosina (Trombley et al., 2000), y por lo tanto incrementando su función antioxidante, quelante y como neuromodulador, por lo que en el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina se observa mayor marca de OMP con respecto al grupo control.

El vanadio provoca disminución de TH, por lo que altera los niveles de dopamina, la cual está involucrada en la olfacción, ya que la capa glomerular en el BO tiene neuronas dopaminérgicas alterado así la señalización olfatoria (Afeseh et al., 2014), considerando que la carnosina es un modulador de dopamina (Afshin et al. 2015) la carnosina puede estar favoreciendo la señalización olfatoria y por lo tanto estar reflejado en el aumento de marca de las NRO. Cabe mencionar que las NRO pueden expresar carnosina ante la pérdida de comunicación con el BO, ya que tras una denervación de las NRO, hay mayor actividad de la carnosina sintetasa, donde la carnosina es transportada del EO al BO por la vía axonal actuando como neurotransmisor (De Marchis et al., 2000)

Se ha reportado que la carnosina inhibe la muerte neuronal causada por el Zn en un modelo de isquemia con ratas e *in vitro* con cultivos de neuronas del hipotálamo y de astrocitos, por lo que se considera que la carnosina posee un efecto neuroprotector (Bae & Majid, 2013), como el V provoca muerte celular (Arenas, 2011), posiblemente este efecto neuroprotector esté reflejado en el número de núcleos del grupo expuesto a vanadio y además tratado con carnosina, similares al grupo control implicando en el mantenimiento de las subpoblaciones celulares del EO.

La carnosina tiene propiedades antiapoptóticas y está involucrada en la plasticidad sináptica, modulando el efecto del Cu y Zn en los receptores NMDA y GABA, por lo que probablemente la carnosina involucre mecanismos protectores en el SNC manteniendo el balance entre la estimulación e inhibición, este efecto neurotrófico de la carnosina en cultivos de corteza olfatoria, actúa en los receptores glutamatérgicos modulando su actividad inhibitoria y la actividad excitatoria del glutamato, actuando en los receptores de AMPA y NMDA (Khama-Murad, Pavlinova, & Mokrushin, 2008). En un modelo de EA, la carnosina revierte la neurotoxicidad provocada por el β -amiloide, inhibiendo la actividad glutamatérgica y disminuyendo los niveles de β -amiloide en la región del hipocampo, así como también tiene un efecto protector en la funcionalidad de la mitocondria en hipocampo y corteza (Bellia et al., 2011). Como se ha visto que la inhalación de PM puede provocar excitotoxicidad glutamatérgica (Morgan et al., 2011), de esta manera la carnosina podría estar modulando el efecto del V, actuando en el mantenimiento en las poblaciones celulares del EO, así como el incremento de OMP, ya que las NRO liberan glutamato en las terminales dendríticas de las células en penacho y mitrales que se encuentran en el BO (Fig. 14) (Francoise & Pierre-Marie, 2011).

Así mismo también se ha reportado efecto neuroprotector en las células de la granulosa del BO de ratones expuestos a V y tratados con carnosina (Reséndiz, 2014), reforzando la idea de que en el sistema olfatorio la carnosina tiene efecto neuroprotector, debido a la protección contra la pérdida de espinas, involucradas en la señalización del olfato (Sankaran et al., 2002). Además como la carnosina se considera un antiapoptótico (Khama-Murad, Pavlinova, & Mokrushin, 2008), la carnosina puede estar atenuando la pérdida celular en el BO reportada por Jiménez (2012), favoreciendo de esta manera la señalización olfatoria y por lo tanto a las NRO.

En el mismo modelo por inhalación de V, Arenas (2011) reportó vacuolización de los haces de axones de las NRO, consecuencia de la peroxidación lipídica de membranas (Soares et al., 2007), por lo que considerando que la carnosina puede prevenir la disfunción en el transporte axonal y dendrítico (Bellia et al., 2011), junto con su efecto antioxidante, la carnosina puede estar regulando la señalización de las NRO que probablemente este alterando el V, y además podría estar disminuyendo o evitando la vacuolización.

Las propiedades de la carnosina como antioxidante por medio de la quelación de metales y como barredor de radicales libres, la función de neuromodulador y neurotransmisor en las NRO, contribuyen a la neuroprotección, que podría reflejarse por el aumento en el número de núcleos y de las marcas de las subpoblaciones del EO en el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina.

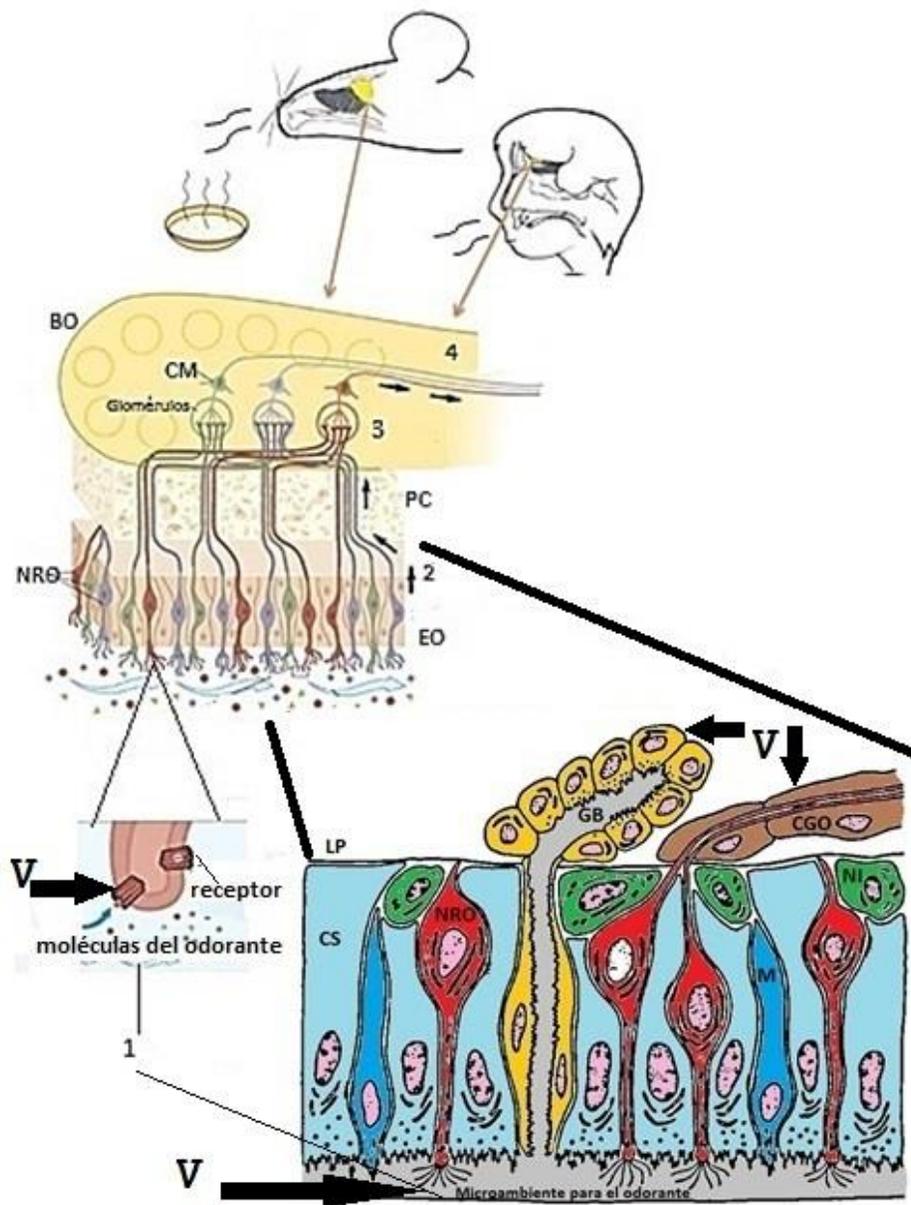


Fig.14. Se muestra un esquema integrativo de la señalización olfatoria. Cuando el odorante se une a los receptores ubicados en las dendritas de las NRO (1), éstas emiten una señal hacia el BO (2), en los glomérulos los axones de las NRO hacen sinapsis con las células mitrales (3), las cuales se encargan de emitir una señal hacia el cerebro (4). Las flechas en color negro indican sitios del epitelio olfatorio donde el vanadio podría estar ejerciendo su potencial tóxico. EO: epitelio olfatorio, CS: célula sustentacular, M: células microvillarias, NRO: neurona receptora olfatoria, CGO: células gliales olfatorias, GB: glándulas de Bowman, LP: lámina propia, PC: Placa cribosa, BO: bulbo olfatorio, CM: células mitrales, V: vanadio (Modificado de Hadley, 2004).

Grupo tratado con carnosina

En este grupo no se encontraron diferencias significativas respecto del control en la marca OMP y GAP-43 como también al número de núcleos, por lo que se puede considerar que cumple el rol de un buen control positivo para ambas subpoblaciones celulares, ya que la carnosina administrada (antes de la inhalación) de manera exógena (1mg/kg) en el modelo por inhalación de vanadio no afectó negativamente en el número de núcleos y marca de las subpoblaciones celulares del EO.

VIII. Conclusión

En este trabajo la disminución de núcleos y de las marcas OMP para neuronas maduras y GAP-43 para las inmaduras, en el EO de ratones expuestos a V, se podría atribuir en gran medida a la toxicidad del vanadio probablemente por el mecanismo de estrés oxidante y por la ruta de exposición (vía inhalada), ya que ofrece contacto directo entre el ambiente y el SNC lo cual cobra importancia ya que, la contaminación por PM y metales de transición asociadas a éstas como el V, posiblemente estén involucrados en el incremento de la expresión de marcadores asociados a enfermedades neurodegenerativas, por lo que la contaminación se considera como un factor de riesgo a desarrollar EN, cabe mencionar que los valores de $PM_{2.5}$ contenido en el ambiente están excediendo los límites permisibles en la Ciudad de México.

Por otro lado en el grupo expuesto a V y tratado con carnosina, se pudo observar el mantenimiento de ambas subpoblaciones en el EO, reflejado en el número de núcleos y en la densitometría de ambos marcadores, atribuido a las propiedades de la carnosina tales como neurotransmisor/modulador del olfato, antioxidante, quelante con habilidad de formar complejos con metales como el V, se le atribuyen efectos benéficos en el SNC en el modelo por inhalación de V, como se había visto anteriormente en las células granulosas del BO. Sin embargo, el grupo expuesto a V y tratado con Carnosina, mostró valores significativamente mayores de OMP respecto del grupo control y grupo V, posiblemente este fenómeno se presenta debido a la capacidad de síntesis de carnosina que poseen las NRO.

Hay que destacar que la administración de carnosina exógena se ha propuesto como un adyuvante de tratamientos para EN y en modelos de isquemia.

Anexo 1

Protocolo de doble inmunofluorescencia en cámara húmeda.

- 1.- Desparafinar las laminillas con Xilol (2 horas)
- 2.- Pasar por el tren de Xilol-Alcohol
- 3.- Realizar un lavado de laminillas con H₂O normal (5 min.)
- 4.- Colocar las laminillas en un Koppling con PBS 1x + Buffer de citratos (Diva Decloaker) dilución 1:20
– 2 mL de Diva Decloaker en 38 mL H₂O (agua desionizada)
- 5.- Colocar 500 mL de agua en la olla *Decloaking Chamber* y situar dentro el Koppling con las laminillas (10 min.)
- 6.- Dejar enfriar el Koppling con las laminillas
- 7.- Colocar las laminillas en cámara húmeda
- 8.- Incubar con solución de bloqueo a T° (30 min.)
– Solución de bloqueo: PBS 1x + Suero de Burro 10% + Tritón X-100 3%
- 9.- Incubar anticuerpo primario OMP (1:50) diluido en solución de bloqueo toda la noche a T°
- 10.- Al día siguiente hacer tres lavados de PBS 1x + Tween²⁰ 0.05% a T° ambiente (5 min c/u)
– Solución de lavado: PBS 1x + Tween²⁰ 0.05%
- 11.- Incubar anticuerpo secundario Alexa 647 (1:200) diluido en solución de lavado durante 1 hr.
- 12.- Hacer tres lavados de PBS 1x + Tween²⁰ 0.05% (5 min c/u)
- 13.- Fijar con PFA 4% por 10 min.
- 14.- Hacer un lavado con PBS 1x (5 min.)
- 15.- Incubar con solución de bloqueo (30 min.)
- 16.- Incubar anticuerpo primario GAP-43 (1:100) diluido en solución de bloqueo 2 hr. a 37°C
- 17.- Hacer tres lavados de PBS 1x + Tween²⁰ 0.05% (5 min c/u)
- 18.- Incubar anticuerpo secundario Alexa 488 (1:200) diluido en solución de lavado durante 1 hr.
- 19.- Hacer tres lavados de PBS 1x + Tween²⁰ 0.05% (5 min c/u)
- 20.- Hacer un lavado con PBS 1x (5 min.)
- 21.- Colocar de 1 a 2 gotas de DAPI con medio de montaje, después de 5 min. montar las laminillas y etiquetarlas
- 22.- Observar laminillas en microscopía confocal

IX. Referencias

- Afeseh N. Hilary, Kanthasamy Arthi, Jin Huajun, Anantharam Vellareddy, Kanthasamy Anumantha G. (2014). Vanadium exposure induces olfactory dysfunction in an animal model of metal neurotoxicity. *NeuroToxicology*, vol. 39(1) pp. 1-9
- Afshin-Majd, Khalili Mohsen, Roghani Mehrdad & Mehranme Narges. (2015). Carnosine Exerts Neuroprotective Effect Against 6-Hydroxydopamine Toxicity in Hemiparkinsonian Rat. *Mol Neurobiol*, vol. 51 pp. 1064-1070
- Agu Remigius, Cowley Elizabeth, Shao Di, MacDonald Christopher, Kirkpatrick David, Renton Ken & Massoud Emad. (2011). Proton-Coupled Oligopeptide Transporter (POT) Family Expression in Human Nasal Epithelium and Their Drug Transport Potential. *Mol Pharmaceutics*, vol. 8 pp. 664-672
- Altamirano-Lozano Mario, Valverde Mahara, Álvarez-Barrera Lucia, Molina Bertha & Rojas Emilio. (1999). Genotoxic Studies of Vanadium Pentoxide (V₂O₅) in Male Mice. II. Effects in Several Mouse Tissues. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, vol. 19(4) pp. 243-255
- Annick Persuy M., Baly Christine, Monnerie Régine, Souquere Sylvie, Bevilacqua Claudia, Dubacq Caroline, Pierron Gérard, Caillol Monique & Remy Jean-Jacques. (2011). A unique transcriptome at the brain–environment interface: Local translation in the rat olfactory epithelium. *Brain Research*, vol. 1405 pp. 1-14
- Arenas Amaya A. (2011). Efecto de la exposición por inhalación de vanadio sobre la mucosa olfatoria en un modelo murino. Diferencias por sexo. Tesis de Licenciatura, UNAM. México D.F.
- Aureliano Manuel. (2011). Recent perspectives into biochemistry of decavanadate. *World J Biol Chem*, vol. 2(10) pp. 215-225
- Aureliano Manuel (2009). Decavanadate: a journey in a search of a role. *Dalton Transactions*, vol. 2009(42) pp. 9093-9100
- Ávila-Costa M., Colín-Barenque L., Zepeda Rodríguez A., B. Antuna S., Saldivar O L., Espejel Maya G., Mussal Galante P., Ávila Casado M., Reyes Olivera A., Anaya Martínez V., Fortoul T. I. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience Letters*, vol. 381(1-2) pp. 21-25
- Ávila-Costa M., Fortoul T. I., Niño Cabrera G., Colín-Barenque L., Bizarro Nevares P., Gutiérrez Valdez A., Ordóñez Librado J., Rodríguez Lara V., Mussali Galante P., Díaz Bech P., Anaya Martínez V. (2006). Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V₂O₅) promote memory deterioration. *NeuroToxicology*, vol. 27(6) pp. 1007-1012

- Ávila-Costa M., Montiel Flores E., Colín-Barenque, Ordone J.L., Gutierrez A.L., Nino-Cabrera H., Mussali-Galante & Fortoul T.I. (2004). Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem Res*, vol. 29 pp. 1365-1369
- Averback, P. (1983). Two new lesions in Alzheimer's disease. *Lancet*, vol. 322(8360) pp. 1203
- Bae Ok-Nam & Majid Arshad. (2013). Role of histidine/histamine/carnosine-induced neuroprotection during ischemic brain damage. *Brain Research*, vol. 1527 pp. 246–254
- Bakardjiev A. & Bauer K. (2000). Biosynthesis, Release, and Uptake of Carnosine in Primary Cultures. *Biokhimiya*, vol. 65(7) pp. 917-920
- Baran E. J. (2000). Metal Complexes of Carnosine. *Biochemistry (Mosc)*, vol. 65(7) pp. 789-97
- Barceloux Donald. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*, vol. 37(2) pp. 265-278
- Bellia Francesco, Vecchio Graziella, Cuzzocrea Salvatore, Calabrese Vittorio, Rizzarelli Enrico. (2011). Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 32(4-6) pp. 258-266
- Bernstein A. (2004). Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*, vol 114(5) pp. 1116-1123
- Bizarro-Nevarés P., Rojas-Lemus M., Colín-Barenque L., Gonzalez-Villalva A. & Fortoul Teresa I. (2016). Inhalation of vanadium modifies gap junctions in mouse seminiferous tubules. *Toxicological & Environmental Chemistry*, vol. 98(2) pp. 266-278
- Boldyrev Alexander, Fedorova Tatiana, Stepanova Maria, Dobrotvorskaya Irina, Kozlova Eugenia, Boldanova Natalia, Bagyeva Gulbakhar, Ivanova Smolenskaya, Illarioshkin Serguey. (2008). Carnosine Increases Efficiency of DOPA Therapy of Parkinson's Disease: A Pilot Study. *Rejuvenation Research*, vol. 11(4) pp. 1-8
- Boldyrev A., Aldini G. & Derave W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*, vol. 93 pp. 1803-1845
- Boulassel Brahim, Sadeg Nouredine, Roussel Olivier, Perrin Martine & Belhadj-Tahar H. (2011). Fatal poisoning by vanadium. *Forensic Science International*, vol. 206 pp. e79-e81
- Budzeń Sandra & Rymaszewska Joanna. (2013). The Biological Role of Carnosine and Its Possible Applications in Medicine. *Adv Clin Exp Med*, vol. 22(5) pp. 739-744
- Calabrese V., Colombrita C., Guagliano E., Sapienza M., Ravagna A., Cardile V., Scapagnini G., Santoro A.M., Mangiameli A., Butterfield D.A., Giuffrida Stella A.M. & Rizzarelli E. (2005). Protective Effect of Carnosine During Nitrosative Stress in Astroglial Cell Cultures. *Neurochemical Research*, vol. 30 pp. 797-807

- Calderón-Garcidueñas, Azzarelli B., Acuna H., Garcia R., Gambling T., Osnaya N., Monroy S., Tizapantzi M., Carson J., Villarreal-Calderón & Rewcastle B. (2002). Air Pollution and Brain Damage. *Toxicologic Pathology*, vol. 30(3) pp. 373-389
- Calderón-Garcidueñas, Franco-Lirac, Henríquez-Roldán, Osnaya Norma, González-Maciél, Reynoso-Robles, Villarreal-Calderon, Herritt Lou, DianeBrooks Diane, Keefe Sheyla, Palacios-Moreno, Villarreal-Calderon, Torres-Jardón, Medina-Cortina, Delgado-Cháveg, Aiello-Mora, R. Maronpot R. & Doty Richard. (2010). Urban airpollution: Influences on olfactory function and pathology in exposed children and young adults. *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 62 pp. 91-102
- Calderón-Garcidueñas, Kulesza Randy, Doty Richard, D'Angiulli Amedeo & Torres-Jadón. (2015). Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environmental Research*, vol. 137 pp. 157-169
- Calderón-Garcidueñas, Maronpot Robert, Torres-Jardón, Henriquez Roldan C., Schoonhoven Robert, Acuna Ayala H., Villarreal Calderon A., Nakamura Jun, Fernando Reshan, Reed William, Azzarelli Biagio & Swenberg James A. (2003). DNA Damage in Nasal and Brain Tissues of Canines Exposed to Air Pollutants Is Associated with Evidence of Chronic Brain Inflammation and Neurodegeneration. *Toxicologic Pathology*, vol. 31(5) pp. 524-538
- Calderón-Garcidueñas, Osorno Velázquez, Bravo Alvarez, Delgado Chavez & Barrios Marquez. (1992). Histopathologic Changes of the Nasal Mucosa in Southwest Metropolitan Mexico City Inhabitants. *American Journal of Pathology*, vol. 140(1) pp. 225-232
- Calderón-Garcidueñas, Valencia-Salazar, Rodríguez-Alcaraz, M. Gambling, Raquel García, Norma Osnaya, Villarreal-Calderón, B. Devlin & L. Carson. (2001). Ultrastructural Nasal Pathology in Children Chronically and Sequentially Exposed to Air Pollutants. *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 24 pp. 132-138
- Chandra A.K., Ghosh R., Chatterjee A. & Sarkar M. (2007). Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities. *J Inorg Biochem*, vol. 101(6) pp. 944-956
- Cheng Jin, Wang fang, Yu Dan F., Wu Peng F., Chen Jian G. (2011). The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*, vol. 650(1) pp. 184-194
- Concise International Chemical Assessment (CICADs). Vanadium Pentoxide and Other Inorganic Vanadium Compounds, Document 29. WHO; 2001.
- Colbek I. & Lazaridis M. (2010). Aerosols and environmental pollution. *Naturwissenschaften*, vol. 97 pp. 117-131

- Colín-Barenque L., Pedraza-Chaverri, Medina-Campos, Jiménez-Martínez, Bizarro-Nevarés, Gonzalez-Villalva, Rojas-Lemus & Fortoul T. (2015). Functional and Morphological Olfactory Bulb Modifications in Mice after Vanadium Inhalation. *Toxicol Pathol*, vol. 43(2) pp. 282-91
- Colín-Barenque L., Martínez-Hernández, Baiza-Gutman, Ávila-Costa, Ordóñez-Librado, Bizarro-Nevarés, Rodríguez-Lara, Piñón-Zarate, Rojas-Lemus, Mussali-Galante & Fortoul T. I. (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation. *J Appl Toxicol*, vol. 28 pp. 718-723
- Chen Y., Getchell T. V., Sparks D. L. & Getchell M. L. (1994). Cellular localization of carnosinase in the human nasal mucosa. *Acta Otolaryngol*, vol. 114(2) pp. 193-198
- Cooper Ross. (2007). Vanadium pentoxide inhalation. *Indian J Occup Environ Med*, vol. 11(3) pp. 97-102
- Cuesta S., Frances D., and García G. B. (2011). ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol and Teratol*, vol. 33 pp. 297–302.
- De Marchis S., Modena C., Peretto P., Migheli A., Margolis F. L. & A. Fasolo. (2000). Carnosine-Related Dipeptides in Neurons and Glia. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 65(7) pp. 824-833
- Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P. & Marsden, C. D. (1989). Basal Lipid Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, vol. 52 pp. 381-389
- DOF (Diario oficial de la federación): 20/08/2014. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación. (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014&print=true)
- Doorn Karlijn J., Goudriaan Andrea, Blits Huizinga C., G.J. John, J. Rozemuller A., V.J. Hoogland, Lucassen Paul J., Drukarch Benjamin, D. J. Wilma, Van Dam A. (2013). Increased Amoeboid Microglial Density in the Olfactory Bulb of Parkinson's and Alzheimer's Patients. *Brain Pathology*, vol. 23(6) pp. 1-14
- Dorman D. C., Brenneman K. A., McElveen A. M., Lynch S. E., Roberts K. C. & Wong B. A. (2002). Olfactory transport: a direct route of delivery of inhaled manganese phosphate to the rat brain. *J Toxicol Environ Health A*, vol. 65(20) pp. 1493-511
- Doty Richard L. (2012). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiology of Disease*, vol. 46(3) pp. 527-552
- Doty Richard L. (2001). Olfaction. *Annu Rev Psychol*, vol.52 pp. 423-452

- Elvingson K., Fritzsche M., Rehder D., & Pettersson L. (1994). Speciation in Vanadium Bioinorganic Systems. 1. A Potentiometric and 51V NMR Study of Aqueous Equilibria in the H+Vanadate(V)--L-alpha-Alanyl-L-histidine System. *Acta Chem Scand*, vol. 48 pp. 878-885
- Evangelou Angelos M. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 42(3) pp. 249-265
- EPA, Environmental Protection Agency (2011). Toxicological review of vanadium pentoxide (V2O5). EPA/635/R-11/004^a
- Fortoul T.I., Bizarro-Nevarés, Acevedo-Nava, Pinon-Zarate, Rodríguez-Lara, Colín-Barenque, Mussali-Galante, Ávila-Casado M del C., Ávila-Costa N. & Saldivar-Osorio. (2007). Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. *Reprod Toxicol*, vol. 23(4) (2007) 588-592
- Fortoul T. I., Piñón-Zarate G., Diaz-Bech M., González-Villalva A., Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Colín-Barenque L., Martínez-Pedraza M. & Montaña Luis F. (2008). Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histol Histopathol*, vol. 23 pp.1321-1326
- Fortoul T. I., Rodríguez Lara V., González Villalva A., Rojas Lemus M., Cano Gutiérrez G., Ustarroz Cano M., Colín-Barenque L., Bizarro Nevarés P., García Pealez, Montaña L. F., Jiménez Martínez R, López Valdez N., Ruiz Guerrero M., Meléndez García N., García Ibarra F., Martínez Baez V., Zapata Alfaro D., Muñoz Rivera C., López Zepeda L., Quezada Maldonado E. & Cervantes Yépez S. (2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chimica Acta*, vol. 420 pp. 8-15
- Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutierrez G., Ustarroz-Cano M., Colín-Barenque L., Montaña L. F., García-Pelez I., Bizarro-Nevarés P., López-Valdez N., C. I. Falcon-Rodriguez, Jiménez-Martínez R. S., Ruiz-Guerrero M. L.,1 L. S. López-Zepeda, Morales-Rivero A., & Muñoz-Rivera-Cambas A. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011 pp. 1-11
- Fortoul T. I., Soto-Mota Adrian, Rojas-Lemus Marcela, Rodríguez-Lara Vianey, Gonzalez-Villalva Adriana, Montaña Luis F., Paez Araceli, Colin-Barenque Laura, López-Valdez Nelly, Cano-Gutiérrez Gumaro, Bizarro-Nevarés Patricia & Ustarroz-Cano Martha. (2016). Myocardial Connexin-43 and N-Cadherin decrease during vanadium inhalation. *Histol Histopathol*, vol. 31(4) pp. 433-439
- Francoise Lazarini & Pierre-Marie Lledo. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in Neurosciences*, vol. 34(1) pp. 20-30

- García Graciela B., Quiroga Quiroga, Stürtz Nelson, Martínez I. Alejandra & Biancard María E. (2004). Morphological Alterations of Central Nervous System (CNS) Myelin in Vanadium (V)-Exposed Adult Rats. *Drug and Chemical Toxicology*, vol. 27(3) pp. 281-293
- Gariballa Salah E. & Sinclair Alan J. (2000). Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and Ageing*, vol. 29(3) pp. 207-210
- Getchell M.L., Shah D.S., Bucha S.K., Davis D.G. & Getchell T.V. (2003). 3-Nitrotyrosine immunoreactivity in olfactory receptor neurons of patients with Alzheimer's disease: implications for impaired odor sensitivity. *Neurobiology of Aging*, vol. 24 pp. 663-673
- González-Villalva, Piñón-Zarate, Falcón-Rodríguez, López-Valdez, Bizarro-Nevarés, Rojas-Lemus, Rendón-Huerta, Colín-Barenque & Fortoul. (2014). Activation of Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway involved in megakaryocyte proliferation induced by vanadium resembles some aspects of essential thrombocythemia. *Toxicol Ind Health*, vol. 2014 pp. 1-11
- Guerra Araiza C., Álvarez Mejía A., Sánchez Torres S., Farfan García E., Mondragón Lozano R., Pinto Almazán R. & Salgado Ceballos H. (2013). Effect of natural exogenous antioxidants on aging and on neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, vol. 47(6-7) pp. 451-462
- Hadley Kevin, Orlandi Richard R. & Fong Karen J. (2004). Basic anatomy and physiology of olfaction and taste. *Otolaryngol Clin N Am*, vol. 37(6) pp. 1115-1126
- Harkema Jack, Carey Stephan & Wagner James. (2006). The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium. *Toxicologic Pathology*, vol. 34 pp. 252-269
- Hipkiss A. (2007). Could Carnosine or Related Structures Suppress Alzheimer's Disease? *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 11 pp. 229-240
- Hipkiss A., Worthington V., Himsworth D., Herwig W. (1998). Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Biochim Biophys Acta*, vol. 12 (1380) pp. 46-54.
- Hirsch James D., Grillo Mary & Margolis Frank L. (1978). Ligand binding studies in the mouse olfactory bulb: Identification and characterization of al-[3H]carnosine binding site. *Brain Research*, vol. 158(2) pp. 407-422
- Herculano B., Tamura M., Ohba A., Shimatani M., Kutsuna N. & Hisatsune T. (2013). β -Alanyl-L Histidine Rescues Cognitive Deficits Caused by Feeding a High Fat Diet in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 33 pp. 983-997
- Horning Michelle S., Blakemore Laura J. & Trombley Paul Q. (2000). Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. *Brain Research*, vol. 852 pp. 56-61

- Jenkins Paul M., McEwen Dyke P. & Martens Jeffrey R. (2009) Olfactory Cilia: Linking Sensory Cilia Function and Human Disease. *Chem Senses*, vol. 34 pp. 451-464
- Jiménez Martínez R. (2009). Daño oxidante en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada. Tesis de licenciatura. UNAM. México D.F.
- Jiménez Martínez R. (2012). Neurogénesis en bulbo olfatorio en un modelo de exposición a vanadio por vía inhalada. Diferencias por sexo. Tesis de maestría. UNAM. México D.F.
- Joiner Ariell M., Green Warren W., McIntyre Jeremy C., Allen Benjamin, Schwob James E. & Martens Jeffrey R. (2015). Primary Cilia on Horizontal Basal Cells Regulate Regeneration of the Olfactory Epithelium. *J Neurosci*, vol. 35(40) pp. 13761-13772
- Katsouyanni Klea. (2003). Ambient air pollution and health. *British Medical Bulletin*, vol. 68 (1) pp. 143-156
- Kawahara Masahiro, Koyama Hironari, Nagata Tetsuya & Sadakane Yutaka. (2011). Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126. *Metallomics*, vol. 3 pp. 726-734
- Khama-Murad A. X., Pavlinova L. I., & Mokrushin A. A. (2008). Neurotropic Effect of Exogenous L-Carnosine in Cultured Slices of the Olfactory Cortex from Rat Brain. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 146(1) pp. 1-3
- Kim Nam H. & Kang Jung H. (2007). Protective Effects of Histidine Dipeptides on the Modification of Neurofilament-L by the Cytochrome c/Hydrogen Peroxide System. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 40(1) pp. 125-129
- Klimmeck D., Mayer U., Ungerer N., Warnken U., Schnölzer M., Fringsa S. & Möhrlena F. (2008). Calcium-signaling networks in olfactory receptor neurons. *Neuroscience*, vol. 151 pp. 901-912
- Kott Jon N. & Westrum Lesnick E. (1996). Developmental localization of gap-43 and olfactory marker protein in rat olfactory bulb transplants. *Int. J. Devl Neuroscience*, vol. 14(7-8) pp. 961-970
- Kovács Tibor. (2004). Mechanisms of olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, vol. 3 pp. 215-232
- Krzyzanowski M., Apte J., Bonjour S., Brauer M., Cohen A., Prüss-Ustun A. (2014). Air Pollution in the Mega-cities. *Curr Envir Health Rpt*, vol. 1(3) pp. 185-191
- Li Hong, Zhou Dinglun, Zhang Qin, Feng Chengyong, Zheng Wei, He Keping & Lan Yajia (2013). Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers. *NeuroToxicology* vol. 36 pp. 49-54

- Lindsay S., Riddell J., & Barnett S. (2010). Olfactory Mucosa For Transplant-Mediated Repair: A Complex Tissue for a Complex Injury? *Glia*, vol. 58(2) pp. 125–134
- Lucchini Roberto G., Guazzetti Stefano, Zoni Silvia, Donna Filippo, Peter Stephanie, Zacco Annalisa, Salmistraro Marco, Bontempi Elza, Zimmerman Neil J., Smith Donald R. (2012). Tremor, olfactory and motor changes in Italian adolescents exposed to historical ferro-manganese emission. *NeuroToxicology*, vol. 33 pp. 687–696
- Mahmoud, K. E., Shalahmetova, T., Deraz, S., and Umbayev, B. (2011). Combined effect of vanadium and nickel on lipid peroxidation and selected parameters of antioxidant system in liver and kidney of male rat. *African J Biotechnol*, vol. 10 pp. 18319–18325.
- Margolis, F.L. (1980). Carnosine: an olfactory neuropeptide. En: Baker, J.L., Smith, T. (Eds.), *The Role of Peptides in Neuronal Function* (pp. 545-572). New York: Dekker
- Margolis F. L. & Grillo M. (1977). Axoplasmic transport of carnosine (β -alanyl-L-histidine) in the mouse olfactory pathway. *Neurochemical Research*, vol. 2 pp. 507-519
- Menini Anna. (1999). Calcium signalling and regulation in olfactory neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 9(4) pp. 419-426
- Miller M.L., Andringa A., Evans J.E & Hastings L. (1995). Microvillar cells of the olfactory epithelium: morphology and regeneration following exposure to toxic compounds. *Brain Research*, vol. 669 pp. 1-9
- Mizuno Dai & Kawahara Masahiro. (2014). Carnosine: A Possible Drug for Vascular Dementia. *J Vasc Med Surg*, vol. 2(3) pp. 1-7
- Miragall Fernando, Krause Dorothee, De Vries Uwe & Dermietzel Rolf. (1994). Expression of the tight junction protein ZO-1 in the olfactory system: Presence of ZO-1 on olfactory sensory neurons and glial cells. *Journal of Comparative Neurology*, vol. 341(4) pp. 433-448
- Moran David T., Carter Rowley J., Jafek Bruce W. & Lovell Mark A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology* vol. 11 pp. 721-746
- Morgan Todd E., Davis David A., Iwata Nahoko, Tanner Jeremy A., Snyder David, Ning Zhi, Kam Winnie, Hsu Yu-Tien, Winkler Jeremy W., Chen Jiu-Chiuan, Petasis Nicos A., Baudry Michel, Sioutas Constantinos & Finch Caleb E. (2011). Glutamatergic Neurons in Rodent Models Respond to Nanoscale Particulate Urban Air Pollutants in Vivo and in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, vol. 119(7) pp. 1003-1009
- Moulton Paula Valencia & Yang Wei. (2012). Air Pollution, Oxidative Stress, and Alzheimer's Disease. *Journal of Environmental and Public Health*, vol. 2012 pp. 1-9

- Mukherjee B., Patra Balaram, Mahapatra Sushmita, Banerjee Pratik, Tiwari A. & Chatterjee Malay. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, vol. 150 pp. 135-143
- Murphy Claire. (1999). Loss of Olfactory Function in Dementing Disease. *Physiology & Behavior*, vol. 66(2) pp. 177-182
- Murphy Claire, Gilmore Magdalena M., Seery Catherine S., Salmon David P. & Lasker Bruce R. (1990). Olfactory Thresholds Are Associated With Degree of Dementia in Alzheimer' s Disease. *Neurobiology of Aging*, vol. 11 pp. 465-469
- Mussali-Galante, P., V. Rodriguez-Lara, M. R. Ávila-Costa y T. I. Fortoul. (2007). Mechanisms of Vanadium Toxicity. p.p. 7-19, en: T. I. Fortoul y M. R. Ávila-Costa. (eds.) *Vanadium: It's Impact on Health*. Nova Science Publishers, E. U. A.
- Musk A.W., Tees J.G. (1982). Asthma caused by occupational exposure to vanadium compounds. *Med. J. Aust*, vol. 1(4) 183-4
- National Toxicology Program (2002) NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). National Toxicology Program Technical Report Series 507 pp. 1-343
- Ota Y. (1998). Study of the fifth-type cell in the olfactory epithelium. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*, vol. 101(10) pp. 1234-1249
- Perry George, Castellani Rudy J., Smith Mark A., Harris Peggy L., Kubat Zvezdana, Ghanbari Kasra, Jones Paul K, Cordone Giovanni, Tabaton Massimo, Wolozin Benjamin & Ghanbari Hossein. (2003). Oxidative damage in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, vol. 106 pp. 552-556
- Pham-Huy L., He Hua & Pham-Huy C.(2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, vol. 4(2) pp. 89-96
- Preston J.E., Hipkiss A.R., Himsworth D.T., Romero I.A. & Abbott J.N. (1998). Toxic effects of beta-amyloid 25–35. on immortalised rat brain endothelial cell: protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine. *Neurosci. Lett* vol. 242 pp. 105–108.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Figure 15.6, [Olfactory transduction and olfactory receptor...]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11039/figure/A1015/>
- Quinn Peter J., Boldyrev Alexander & Formazuyk Vitaly. (1992). Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Molec. Aspects Med*, vol. 13(5) pp. 379-444

- Radian International, Semarnap. (1997). Manuales del programa de inventarios de emisiones de México, volumen II, fundamentos de inventarios de emisiones.
- Rajanikant G.K., Zemke Daniel, Senut Marie-Claude, Frenkel Mark B., Chen Alex F., Gupta Rishi & Majid Arshad. (2007). Carnosine Is Neuroprotective Against Permanent Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Stroke*, vol. 38(11) pp. 3023-3031
- Rehder D. (2003). Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications*, vol. 6 pp.604–617
- Reséndiz Avendaño S. (2014). Neuroprotección de la carnosina en la función y citología del bulbo olfatorio en un modelo murino expuesto a la inhalación de vanadio. Diferencia por sexo. Tesis de Licenciatura, UNAM. México D.F.
- Riederer Peter & Laux Gerd. (2011). MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol*, vol. 20(1) pp. 1–17
- Rochel S. & Margolis F. L. (1982). Carnosine Release from Olfactory Bulb Synaptosomes Is Calcium-Dependent and Depolarization-Stimulated. *J Neurochem*, vol. 38(6) pp. 1505-14
- Rodríguez-Lara V., Morales-Rivero A., Rivera-Cambas A.M. & Fortoul T.I. (2013). Vanadium inhalation induces actin changes in mice testicular cells *Toxicol. Ind. Health*, vol. 2013 pp. 1-8
- Rodríguez Mercado J. & Altamirano Mario A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad Lozano Mario Agustín. *Rev. Int. Contam. Ambient*, vol. 22(4) pp. 173-189
- Russell C., Kachramanoglou C., Li D., Andrews P. & Choi D. (2014). Anatomy and Cellular Constituents of the Human Olfactory Mucosa: A Review. *J Neurol Surg B*, vol. 75 pp. 293–300
- Sakai M., Yoshida M., Karasawa N., Teramura M., Ueda H. & Nagatsu I. (1986). Carnosine-like immunoreactivity in the primary olfactory neuron of the rat. *Experientia*, vol. 43 pp. 298-300
- Sankaran Sindhuja, Khota Lav R. & Panigrahi Suranjan. (2002). Biology and applications of olfactory sensing system: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171– 172 pp. 1– 17
- Schroeder W., Dobson M., Kane D. & Johnson N. (1987). Toxic Trace Elements Associated with Airborne Particulate Matter: A Review. *JAPCA*, vol. 37(11) pp. 1267-1285
- Soares S.S., Martins H., Duarte R.O., Moura J.J., Coucelo J., Gutiérrez-Merino C. & Aureliano M. (2007). Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration. *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 101 pp. 80–88
- Steinke A., Meier-Stiegen S., Drenckhahn D. & Asan E. (2008). Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. *Histochem Cell Biol*, vol. 130(2) pp. 339-361

- Sunderman F. William. (2001). Nasal Toxicity, Carcinogenicity, and Olfactory Uptake of Metals. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 31(1) pp. 3-24
- Talamo B. R., Rudel R. A., Kosik K. S., Lee V. M-Y., Neff S., Adelman L. & Kauer J. S. (1989). Pathological changes in olfactory neurons in patients with Alzheimer's disease. *Nature*, vol. 337 pp. 736-739
- Tallkvist Jonas, Persson Eva, Henriksson Jörgen & Tjälve Hans. (2002). Cadmium-Metallothionein Interactions in the Olfactory Pathways of Rats and Pikes. *Toxicological Sciences*, vol. 67 pp. 108-113
- Teuscher Nathan S., Shen Hong, Shu Cathaleen, Xiang Jianming, Keep Richard F. & Smith David E. (2004). Carnosine uptake in rat choroid plexus primary cell cultures and choroid plexus whole tissue from PEPT2 null mice. *Journal of Neurochemistry*, vol. 89 pp. 375-382
- Todorich Bozho, Olopade James O., Surguladze Nodar, Zhang Xuesheng, Neely Elizabeth, Connor James R. (2011). The Mechanism of Vanadium-Mediated Developmental Hypomyelination Is Related to Destruction of Oligodendrocyte Progenitors Through a Relationship with Ferritin and Iron. *Neurotox Res*, vol. 19 (3) pp. 361–373
- Trombley P.Q., Horning M.S. & Blakemore L.J. (1998). Carnosine modulates zinc and copper effects on amino acid receptors and synaptic transmission. *Neuroreport.*, vol. 9(15) pp. 3503-3507
- Trombley P., Horning M. & Blakemore L. (2000). Interactions between Carnosine and Zinc and Copper: Implications for Neuromodulation and Neuroprotection. *Biochemistry (Moscow)*, vol. 65(7) pp. 807-81
- Vaishnav Radhika A., Getchell Marilyn L., Huang Liping, Hersh Matthew A., Stromberg Arnold J. & Getchell Thomas V. (2008). Cellular and Molecular Characterization of Oxidative Stress in Olfactory Epithelium of Harlequin Mutant Mouse. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 86 pp. 165–182
- Valko M., Rhodes C.J, Moncol J., Izakovic M. & M. Mazura. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160 pp. 1–40
- Wang X. & Michaelis E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*, vol. 2(12) pp. 1-13
- Wetzel CH, Spehr M, Hatt H. (2001). Phosphorylation of voltage-gated ion channels in rat olfactory receptor neurons. *Eur J Neurosci*, vol. 14(7) pp. 1056-64.
- WHO, May 2014. Ambient Air Pollution Database.
- Wrobel Bozena B. & Leopold Donald A. (2005). Olfactory and Sensory Attributes of the Nose. *Otolaryngol Clin N Am*, vol. 38(6) pp. 1163–1170

- Yegambaram Manivannan, Manivannan Bhagyashree, Beach Thomas G. & Halden Rolf U. (2015). Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Current Alzheimer Research*, vol. 12 pp. 116-146
- Yu Yiqun & Zhang Chunbo. (2015). The role of connexin 43 in mediating odor response. *European Journal of Cell Biology*, vol. 94 pp. 267–275
- Zhang Chunbo. (2010). Gap junctions in olfactory neurons modulate olfactory sensitivity. *BMC Neuroscience*, vol. 11 pp. 1-16
- Zhao, Y., Ye, L., Liu, H., Xia, Q., Zhang, Y., Yang, X., and Wang, K. (2010). Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition porw (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem*, vol. 104 pp. 371–78.
- Zhao J., Wang J & Wu J. (2014). Roles of cytochrome c, caspase-9, and caspase-3 in pentavalent vanadium-induced neuronal apoptosis. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, vol. 32(9) pp. 664-667