



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PRESENCIA DE RAGE EN HÍGADO DE RATÓN Y SU
RELACIÓN CON LAS ALTERACIONES
MORFOLÓGICAS OCASIONADAS POR LA
INHALACIÓN DE VANADIO Y EL CONSUMO DE
BEBIDAS AZUCARADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE MORALES RICARDES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ADRIANA ELIZABETH GONZÁLEZ
VILLALVA
CIUDAD DE MÉXICO, 2022**



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.

Agradecimientos técnicos

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Adriana Elizabeth González Villalva

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dra. Gabriela Piñón Zarate

Dra. Nora Gabriela Velasco Loyden

M. en C. Patricia Bizarro Nevares

A mi tutora, la Dra. Adriana E. González Villalva por siempre estar al pendiente y su constante apoyo en cada una de las etapas en la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Teresa Fortoul por permitirme realizar esta investigación en el laboratorio de Morfología y Toxicología del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM

Al Biol. Armando Zepeda Rodríguez y Técnico Académico Francisco Pasos Nájera del laboratorio de Microscopía Electrónica del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por su infinita paciencia, enseñanzas y todo el apoyo brindado para el uso de los microscopios y en la toma de fotomicrografías.

A la Técnica Académica Raquel Alquicira Guerrero del Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo en el procesamiento histológico.

1. Datos de la alumna
Morales
Ricardes
Guadalupe
5519307263
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311265271
2. Datos del tutor
Dra.
González
Villalva
Adriana Elizabeth
3. Datos del presidente
Dra.
Rivas
Manzano
Patricia
4. Datos del vocal
Dra.
Piñón
Zárate
Gabriela
5. Datos del sinodal 1
Dra.
Velasco
Loyden
Nora Gabriela
6. Datos del sinodal 2
M. en C.
Bizarro
Nevarés
Martha Patricia
7. Datos del trabajo escrito
Título: Presencia de RAGE en hígado de ratón y su relación con las alteraciones morfológicas ocasionadas por la inhalación de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas. **Número de páginas:** 68 **Año:** 2022

Índice

| | |
|--|----|
| Índice de cuadros y figuras..... | 4 |
| Índice de gráficas..... | 5 |
| Abreviaturas..... | 6 |
| Resumen | 7 |
| Introducción | 9 |
| Síndrome metabólico | 10 |
| Bebidas azucaradas | 12 |
| Advanced Glycation End Products (AGE) | 15 |
| RAGE | 16 |
| Contaminación atmosférica | 17 |
| Vanadio | 21 |
| Exposición y toxicocinética del Vanadio | 23 |
| Hígado | 25 |
| Histología | 25 |
| Alteraciones hepáticas | 28 |
| Estrés oxidante en hígado | 29 |
| Cuadro de antecedentes directos | 30 |
| Justificación | 31 |
| Hipótesis | 32 |
| Objetivo General | 32 |
| Objetivos particulares | 32 |
| Método | 33 |
| Resultados | 38 |
| Morfología del hígado | 38 |
| Cuantificación de cambios morfológicos | 42 |
| Inmunohistoquímica (IHQ) para RAGE | 44 |
| Discusión | 47 |
| Conclusiones | 57 |
| Perspectivas | 57 |
| Referencias bibliográficas | 58 |

Índice de cuadros y figuras

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Criterios de diagnóstico para SM considerando su definición | 11 |
| Cuadro 2. Rutas metabólicas que incrementan el estrés oxidante en la DM-II | 14 |
| Cuadro 3. Funciones del hígado | 25 |
| Cuadro 4. Severidad de la esteatosis según la lesión histológica..... | 29 |
| Cuadro 5. Antecedentes directos | 30 |
| Cuadro 6. Serie de soluciones para la rehidratación del tejido hepático..... | 35 |
| Cuadro 7. Tren de deshidratación. | 36 |
| | |
| Figura 1. Formación endógena de un AGE | 15 |
| Figura 2. Toxicocinética del Vanadio..... | 24 |
| Figura 3. Organización y estructura del lobulillo hepático..... | 26 |
| Figura 4. Estructura de los lobulillos clásicos y la división por zonas del acino hepático | 27 |
| Figura 5. Esquema-resumen del método | 34 |
| Figura 6. Fotomicrografía del corte longitudinal de hígado de ratón del grupo control | 39 |
| Figura 7. Hígado de ratón del grupo vanadio | 39 |
| Figura 8. Hígado de ratón del grupo sacarosa | 40 |
| Figura 9. Hígado de ratón del grupo vanadio+sacarosa | 40 |
| Figura 10. Infiltrados inflamatorios en hígado de ratón..... | 41 |
| Figura 11. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica para RAGE del hígado de ratón. A)Control B)Vanadio | 45 |
| Figura 12. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica para RAGE del hígado de ratón. C)Sacarosa D) V+S | 46 |

Índice de gráficas

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Media del porcentaje de hepatocitos con esteatosis. | 42 |
| Gráfica 2. Media del tamaño del núcleo de hepatocitos. | 42 |
| Gráfica 3. Media del porcentaje de hepatocitos binucleados. | 42 |
| Gráfica 4. Media de la cantidad de infiltrados inflamatorios por campo. | 43 |
| Gráfica 5. Media del porcentaje de hepatocitos con inclusiones nucleares. | 43 |
| Gráfica 6. Densidad integrada de la inmunohistoquímica para RAGE..... | 44 |

Abreviaturas

| | | | |
|--------|---|-------|--|
| AGE | Advanced glycation end products | S-100 | Proteína S-100 |
| BA | Bebidas azucaradas | TAGE | Toxic advanced glycation end products |
| CHC | Carcinoma hepatocelular | V | Vanadio |
| DM-II | Diabetes mellitus tipo 2 | VLDL | Lipoproteínas de muy baja densidad |
| EHGNA | Enfermedad del hígado graso no alcohólico | ZMVM | Zona Metropolitana del Valle de México |
| EO | Estrés oxidante | | |
| GA | Gliceraldehído | | |
| HMGB1 | Proteína de caja 1 de alta movilidad | | |
| HDL | High density lipoproteins | | |
| IR | Insulinorresistencia | | |
| LDL-ox | Low density lipoprotein oxide | | |
| NASH | Non-alcoholic steatohepatitis | | |
| NF-kB | Factor de transcripción nuclear kappa beta | | |
| OMS | Organización mundial de la salud | | |
| PM | Material particulado | | |
| PST | Partículas suspendidas totales | | |
| RAGE | Glycation end products receptor | | |
| RL | Radicales libres | | |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno | | |
| sRAGE | Receptor de productos de glicación avanzada soluble | | |
| SM | Síndrome metabólico | | |

Resumen

La exposición a compuestos exógenos como producto de las actividades humanas se ha asociado con el incremento de enfermedades crónicas no transmisibles como el síndrome metabólico. En estas enfermedades se pueden presentar alteraciones hepáticas que forman parte del espectro de algunas patologías. Desde que se demostró el aumento del vanadio en la atmósfera y se conoció su capacidad de adherirse a las partículas suspendidas ultrafinas para ingresar al organismo humano llamó la atención evaluar la toxicidad que implica este metal dentro del cuerpo por la vía inhalada. El principal mecanismo de daño descrito es el estrés oxidante, sin embargo, este tiene la capacidad de incrementar los productos de glicación avanzada endógenos (AGE, por sus siglas en inglés) y posiblemente estimular la expresión de su receptor RAGE lo que supondría otro mecanismo de daño que explique los efectos tóxicos en el hígado. Además, los AGEs se encuentran aumentados en personas con diabetes, obesidad y sobrepeso, enfermedades en las que uno de los principales factores de riesgo es el consumo de bebidas azucaradas y en el que México ocupa el primer lugar en su consumo. Debido a lo anterior y considerando que en la vida cotidiana estamos expuestos al V mediante las partículas suspendidas y la población mexicana ocupa el primer lugar en consumo de bebidas azucaradas, en este trabajo se planteó evaluar en el modelo murino de inhalación a vanadio si las alteraciones morfológicas como esteatosis, focos inflamatorios y cambios nucleares tienen relación con la presencia de RAGE en el hígado tras la exposición a vanadio y en la combinación con el consumo de una bebida azucarada.

Para realizar este estudio, se utilizaron 20 ratones CD1 divididos al azar en 4 grupos (control, vanadio, sacarosa y vanadio+sacarosa). El grupo control (C) inhaló el vehículo de solución salina (NaCl 0.9%) una hora al día dos veces por semana. El grupo sacarosa (S) inhaló el vehículo y se sustituyó el agua de consumo por una solución de sacarosa al 30% *ad libitum*. El grupo vanadio (V) inhaló solución de pentóxido de vanadio [1.56 mg/m^3] en una caja acrílica conectada a un nebulizador durante una hora dos veces por semana. El grupo vanadio+sacarosa (V+S) inhaló la solución de pentóxido de vanadio y tuvo libre acceso a la solución de sacarosa al 30%. A las 4 semanas se obtuvieron las muestras de hígado y se procesaron para microscopía de luz. El tejido se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 7 μm de grosor. Fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Para el análisis histológico

se evaluó la presencia de esteatosis, número de focos inflamatorios y descripción de su morfología, así como los cambios en número y tamaño de los núcleos de los hepatocitos. Se realizó inmunohistoquímica para RAGE, posteriormente el análisis densitométrico para obtener la densidad integrada de la marca para los cuatro grupos de experimentación.

Se encontraron cambios en la morfología del hígado en los grupos vanadio, sacarosa y vanadio+sacarosa consistentes en acumulación de grasa en el citoplasma de los hepatocitos principalmente en la zona 3 del acino hepático excepto en el grupo de la combinación; mega núcleos, aumento de hepatocitos binucleados y núcleos con inclusiones, estas condiciones son indicadores de la respuesta regenerativa del hígado. No se encontró alteración en la presencia de RAGE en el hígado, descartando este mecanismo de daño para las 4 semanas de exposición a vanadio y la combinación con bebidas azucaradas debido posiblemente a que el tiempo de exposición no es suficiente para la generación de AGEs o a que el vanadio induce cambios que impiden la expresión de este receptor. Un hallazgo relevante es la presencia de inclusiones en el núcleo que para futuras investigaciones con este modelo habría que evaluar para determinar el tipo de inclusión. Por otro lado, extender el estudio a las 8 semanas para determinar lo que ocurre con RAGE en el grupo de la combinación y si está involucrado como mecanismo de daño hepático.

Introducción

En el siglo XXI se han presentado cambios en los estilos de vida humana en los que la salud queda en estado vulnerable ya que nos encontramos expuestos a un ambiente hostil. En México los niveles de contaminación atmosférica han incrementado en comparación con los años 90 en donde los datos para ese entonces indican la dominancia de la emisión de ozono, mientras que actualmente, o al menos hasta el 2017 predominó la combinación de diferentes contaminantes entre los que destacan el ozono y las partículas suspendidas. Otro de los factores en aumento que ponen en riesgo la salud son las enfermedades metabólicas de las que sobresalen el sobrepeso, la obesidad y la diabetes mellitus tipo II (DM-II); las causas del aumento de estas enfermedades son multifactoriales, sin embargo, las bebidas azucaradas son las que se mencionan con mayor persistencia (Vallejo et al 2003, Singh et al 2015).

Es importante conocer las implicaciones de la exposición de la población a los factores de la contaminación atmosférica por partículas suspendidas y consumo de bebidas azucaradas ya que en muchas situaciones de la vida cotidiana se encuentran en combinación.

La exposición a distintos compuestos exógenos que se liberan a la atmósfera como producto de las actividades humanas, se ha asociado con el incremento de enfermedades crónicas no transmisibles que a su vez nos predisponen a desarrollar con mayor facilidad otras enfermedades de índole metabólico (Sánchez P. et al, 2020).

Desde que se encontró el aumento del vanadio en la atmósfera y se conoció su capacidad de adherirse a las partículas suspendidas finas y ultrafinas para ingresar

al organismo humano, llamó la atención estudiarlo para evaluar la toxicidad que implica este metal dentro del cuerpo por la vía inhalada. Se ha descrito su toxicidad en diferentes órganos como el riñón, pulmón, hígado, páncreas y timo; encontrando que los sitios de almacén son hígado, riñón y hueso (Cano-Gutiérrez, G., et al, 2012; Fortoul, T.I., et al, 2011; Rojas-Lemus, M., et al, 2021). Debido a las múltiples funciones que desempeña el hígado en el organismo humano y su importante papel para la detoxificación, se eligió a este órgano para estudiar la forma en que se afecta por la inhalación de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas.

El consumo de bebidas azucaradas se encuentra claramente asociado con el aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. Sin embargo, también la contaminación atmosférica se ha asociado de manera más reciente con este tipo de enfermedades, como el síndrome metabólico (Goethe Flórez, D. D., 2021).

En México el síndrome metabólico tiene una prevalencia del 13 al 56% dependiendo de la población en la se enfoque su estudio. Afecta en su mayoría a población adulta de 40 años en adelante (Wacher Rodarte, 2009) aunque también hay datos que apuntan hacia que 1 de cada 3 personas de 20 años cumple con los criterios de diagnóstico para el síndrome metabólico (Flores Molina et al, 2018). A pesar de que su asociación se debe principalmente a conductas de índole nutrimental cada vez hay más estudios como el de Goethe Flórez, D. D., 2021 en donde se sugiere que los contaminantes ambientales pueden aumentar el riesgo de presentar síndrome metabólico por exposiciones a largo plazo incorporando una posible causa más a la etiología de esta enfermedad de la que se hablará en el siguiente apartado.

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un término utilizado para referirse a un conjunto de condiciones de salud en las que el metabolismo se ve alterado, algunas de estas condiciones son la obesidad, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, DM-II, dislipidemia, esteatosis hepática y enfermedades cardiovasculares (Treviño et al, 2018).

De acuerdo con Lizarzaburu Robles 2013, después del consenso al que llegaron diferentes instituciones de salud, los criterios para el diagnóstico del SM se presentan en el cuadro 1 y se requiere la presencia de al menos tres criterios.

Cuadro 1. Criterios de diagnóstico para SM considerando su definición según la publicación de Harmonizing the Metabolic Syndrome en el 2009 (Lizarzaburu Robles, 2013).

- Incremento de la circunferencia abdominal: definición específica para la población y país.
- Elevación de triglicéridos: mayores o iguales 150 mg/dL (o en tratamiento hipolipemiante específico).
- Disminución del colesterol HDL: menor de 40 mg% en hombres o menor de 50 mg% en mujeres (o en tratamiento con efecto sobre el HDL).
- Elevación de la presión arterial: presión arterial sistólica (PAS) mayor o igual a 130 mmHg y/o PAD mayor o igual a 85 mmHg (o en tratamiento antihipertensivo).
- Elevación de la glucosa de ayunas: mayor o igual a 100 mg/dL (o en tratamiento con fármacos por elevación de glucosa).

La población más propensa es la que padece sobrepeso y obesidad ya que alguna de las condiciones de hipertensión, dislipidemias, insulinoresistencia, entre otras, pueden ser indicativo oportuno para evitar llegar al SM. En este sentido resulta

importante conocer todos los factores, además de los genéticos, en los estilos de vida que pueden favorecer el desarrollo de las alteraciones asociadas con el síndrome debido a que la etiología de esta enfermedad permanece poco clara y se continúa considerando multifactorial (Alpízar-Caballero L. B., 2013).

La Federación Internacional de Diabetes estima que el 25% de la población mundial adulta padece SM asociado con el incremento de peso y un elevado índice de masa corporal reflejado en la distribución del tejido adiposo visceral (Treviño et al, 2018). En México de acuerdo con los datos de la ENSANUT 2018, el porcentaje de adultos mayores a 20 años con obesidad y sobrepeso creció a 75.2% comparado con el año 2012 cuando el porcentaje era de 71.3%. En la encuesta del mismo año referente al consumo de alimentos no recomendables, el mayor porcentaje de consumo cotidiano lo ocupan las bebidas no lácteas endulzadas con un 85.8% en el grupo de adultos mayores a 20 años. Estos datos representan la importancia de evaluar en un modelo lo que ocurre en el organismo bajo un estímulo recurrente y al cual se le puede atribuir el desarrollo de enfermedades metabólicas como lo es el consumo de las bebidas azucaradas.

Bebidas azucaradas

En la actualidad, las bebidas azucaradas (BA) han sido un tema de mucha controversia y ha provocado la generación de estudios para determinar el grado de afectación a la salud y su papel en la progresión de enfermedades crónicas no transmisibles.

México es tomado como referencia para evidenciar el impacto en la salud que tienen estas bebidas además de colocarnos en el primer lugar en su consumo desde el año 2012 (Ramírez-Vélez, 2016).

De acuerdo con un estudio realizado con datos del año 2010 a nivel mundial se han atribuido 655,000 muertes al consumo de bebidas azucaradas, de las cuales 369,000 son por diabetes y 258,000 por enfermedades cardiovasculares. De manera particular, en México 6 de cada 10 muertes se atribuyen al consumo de bebidas azucaradas en adultos de menos de 45 años en donde se ha encontrado una tendencia de consumo de bebidas azucaradas caseras “frescas”, llegando a superar en consumo a los refrescos (Singh G. M. et al, 2015).

Las bebidas azucaradas pueden causar reacciones tóxicas provocando alteraciones como el aumento en los niveles de triglicéridos y la disminución en los niveles de HDL en sangre. Aunado al hecho de que la fuente endulzante en estas bebidas suele ser el jarabe de maíz alto en fructosa o la sacarosa, las elevadas concentraciones de estas azúcares pueden ser precursores de la lipogénesis hepática ya que proporcionan una fuente de carbohidratos no regulada (Denova-Gutierrez et al., 2010; Jensen et al, 2018). Por lo anterior, se ha relacionado tanto a la fructosa como a la sacarosa con la acumulación de grasa ectópica, es decir, aumenta el tejido adiposo visceral; aumento de riesgo cardiovascular y de enfermedades metabólicas favoreciendo también el desarrollo de hígado graso y de DM-II (Maersk M., et al 2012). La sacarosa es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de fructosa, se obtiene del proceso de centrifugación de la caña de azúcar; en términos biológicos su función dentro del organismo es la producción de energía, sin embargo, ante un frecuente y elevado consumo se producen cambios histopatológicos en el hígado al observarse esteatosis micro y macro vacuolar (Olguin, 2015).

Se sabe que una hiperglucemia prolongada provoca daño celular por el desequilibrio que genera entre los antioxidantes y los radicales libres, producto de la oxidación de la glucosa, principalmente el gliceraldehído (un intermediario del metabolismo de la

glucosa y de la fructosa) que induce daño celular debido a que tiene la capacidad de reaccionar con otras moléculas y formar AGEs (Glycation advanced end products, por sus siglas en inglés) intracelulares que alteran las funciones de la célula. De acuerdo con Takeuchi, M. et al, 2021 los niveles de TAGES (Toxic advanced glycation end products, por sus siglas en inglés) en sangre pueden ser un biomarcador oportuno para detectar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), en ese estudio los autores propusieron el término TAGE para hacer referencia a los AGEs de la formación *in vivo*.

En el consumo crónico de las bebidas azucaradas pueden estar implicadas las mismas rutas metabólicas que se han asociado a las complicaciones de los pacientes con DM-II provocadas por estrés oxidante y que resumo en el cuadro 2 con las consecuencias que generan en el organismo. El estrés oxidante es el mecanismo de daño con el cual convergen el consumo crónico de las BA y el modelo de estudio de inhalación a vanadio y del cual hablaré en otro capítulo.

Cuadro 2. Rutas metabólicas que incrementan el estrés oxidante en la DM-II. (Pérez J. et al 2007). Elaborado por Guadalupe Morales.

| Ruta identificada | Consecuencia |
|---|---|
| Ruta del sorbitol | Generación de sorbitol a partir de glucosa y NADPH alterando el potencial antioxidante del glutatión |
| Glucosilación no enzimática de proteínas | Alteración de la actividad biológica de las proteínas antioxidantes provocando la posterior pérdida en la función |
| Autooxidación de la glucosa | Incremento de radicales hidroxilo |
| Modificación de la protein- cinasa C (PKC) | Activación de vías de señalización por PKC como NFκB que incrementan el estrés oxidante |
| Metabolismo alterado de lipoproteínas | Disminución en la oxidación de ácidos grasos provocando complicaciones vasculares |
| Alteración de vías de citocinas | Inducción de inflamación crónica por la acumulación de citocinas proinflamatorias |

Advanced Glycation End Products (AGE)

La glicación es una reacción química no enzimática que puede ocurrir en el procesamiento de los alimentos, sobre todo en la cocción y sobrecocción de alimentos fritos o que tienen alto contenido de carbohidratos. Aunque también pueden ocurrir *in vivo* de forma endógena entre azúcares reductores como la glucosa o la fructosa. Los productos de glicación avanzada se forman por reacciones no enzimáticas entre el grupo amino libre (comúnmente lisina o arginina) de cualquier biomolécula y un grupo carbonilo electrófilo o azúcar reductor. Estos productos pasan por diferentes etapas que se muestran en la figura 1 hasta conformar el AGE (Cárdenas et al 2009).

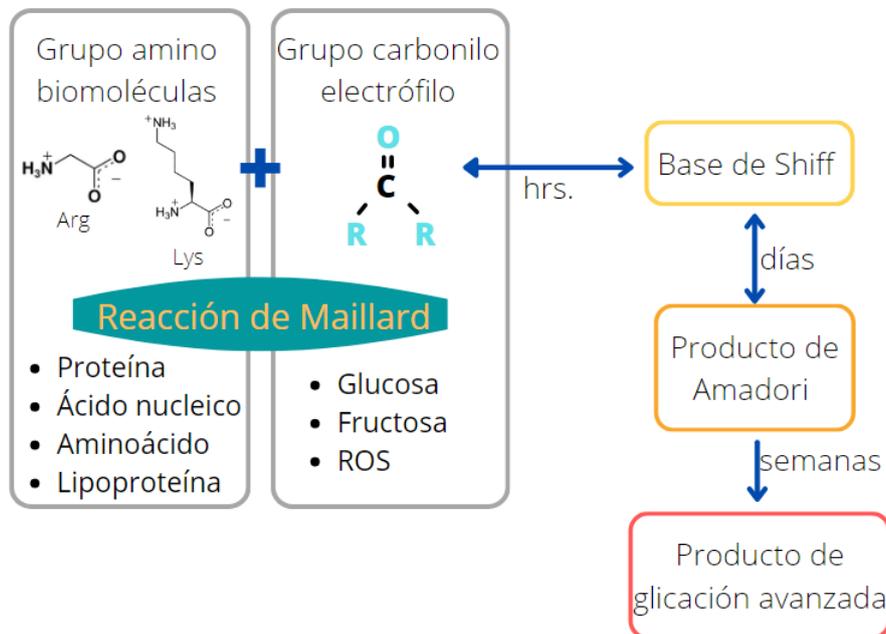


Figura 1. Formación endógena de un AGE. El grupo amino libre de los aminoácidos, principalmente la Arginina y la Lisina de las proteínas, lipoproteínas así como el grupo amino de los ácidos nucleicos puede reaccionar con el grupo carbonilo electrófilo de azúcares reductores como la glucosa o fructosa y de algunas ROS mediante la reacción no enzimática de Maillard. El producto de esta reacción es la base Schiff y puede ocurrir en horas, ésta tiene rearrreglos moleculares posteriores formando un producto de Amadori en cuestión de días y finalmente se genera el producto de glicación avanzada, cuya formación requiere semanas.

Los AGE tienen la capacidad de entrelazarse entre sí y con otras biomoléculas, en particular con las proteínas de vida media larga alterando la función de las células y

llegando a afectar a nivel de tejido. Debido a ello pueden activar múltiples mecanismos y pueden utilizar una amplia gama de receptores (Indyk D., et al 2021). Son diversas las consecuencias del incremento de AGEs en el organismo, por ejemplo Schmidt A. M. et al, 1996 menciona que los AGE en la superficie de los glóbulos rojos de pacientes diabéticos favorecen la unión al RAGE (Advanced Glycation End Products Receptor, por sus siglas en inglés) endotelial y dan como resultado un mayor estrés oxidante en la pared de los vasos sanguíneos. Algunas condiciones que propician la generación de AGEs son la edad o envejecimiento, el tabaquismo, la hiperglucemia y los mismos AGEs exógenos formados desde la cocción de los alimentos. De acuerdo con algunos estudios, el principal problema de los AGEs son los estilos de vida humana, sin embargo al estar relacionado el incremento del estrés oxidante con su producción, pone en la mira otro factor que hasta cierto punto está fuera de control del mismo humano como lo es la exposición crónica a la contaminación atmosférica y de la cual hablaré en otro capítulo.

RAGE

El receptor de productos de glicación avanzada (RAGE) es un receptor multiligando de la familia de las inmunoglobulinas. Presenta tres porciones, una extracelular compuesta del dominio V (variable) y los dominios C1 y C2 (dominios constantes), la porción transmembrana y la porción citosólica que se encarga de enviar la señal después de interactuar con sus ligandos (Mosquera Jesus, 2010). RAGE participa en condiciones fisiológicas en la maduración de osteoblastos, el desarrollo pulmonar, la inflamación, la apoptosis, la autofagia y la proliferación celular. Sin embargo, cuando se incrementan sus ligandos en el ambiente extracelular, se puede sobreestimar al receptor y provocar alteraciones en las funciones que desempeña, empeorando

situaciones de inflamación tal como ocurre en condiciones de hiperglucemia o alteración en los niveles de ROS (Díaz-Casasola, et al, 2016).

Al igual que por el efecto de estrés oxidante, el factor NF-kB es estimulado por la activación de las vías de señalización por RAGE lo que se traduce en el incremento de la producción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y la misma neoexpresión de RAGE (Cárdenas et al 2009).

Existe evidencia del papel de RAGE para el desarrollo de las complicaciones en pacientes diabéticos y en condiciones de hiperglucemia crónica (Sakasai-Sakai A. *et al*, 2019; Indyk D. *et al*, 2021). También hay estudios que involucran la alteración de RAGE como consecuencia de la exposición a metales como al zinc y manganeso *in vitro*. En células endoteliales aórticas bovinas tratadas primero con AGEs y posteriormente con los metales mencionados, se observó la disminución en la expresión de RAGE (Pinkas, et al, 2018). Contrario a lo descrito posteriormente por Lawes M. *et al*, 2020 donde se observó neurodegeneración a causa del aumento de RAGE en un modelo de *C. elegans* que expresa RAGE tras la exposición a cadmio y manganeso. Es claro que no se tiene un consenso sobre el efecto que puede traer la participación de este receptor ante condiciones tóxicas por los metales y por las bebidas azucaradas o por su combinación.

Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire que pueden alterar las condiciones climáticas y que en ciertas cantidades pueden ser perjudiciales para la vida (Vallejo M. *et al* 2003). El calor, la radioactividad y el ruido también son considerados contaminantes ambientales ya que tienen la capacidad de alterar las características naturales de un contaminante atmosférico debido a que

puede ser de origen químico o biológico dependiendo de la manera en que es agregado al aire. Los contaminantes se clasifican en primarios y secundarios, los primarios son aquellos que están en la atmósfera tal y como fueron emitidos, por procesos naturales o actividades del ser humano. Por otro lado, los contaminantes secundarios se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas en las que participan los contaminantes primarios (Vallejo M. et al, 2003).

Se han establecido Normas Oficiales para determinar los límites permitidos de exposición a los contaminantes atmosféricos que tienen un efecto en la salud, dentro de los cuales destacan las partículas suspendidas totales (PST). Las PST o partículas inhalables se suelen subdividir en gruesas, finas y ultrafinas con base en su diámetro aerodinámico que va de 10, ≤ 2.5 y < 0.1 micrómetros respectivamente. Las exposiciones agudas a estas partículas, ocasionan reacciones inflamatorias y malestares del sistema respiratorio en general, además de observarse efectos en todo el organismo algunos estudios hacen énfasis sobre todo en el sistema cardiovascular (García Lara, et al, 2015).

En un estudio publicado en 2001, realizado por Amador Muñoz con datos de 1993 en el área del Pedregal de San Ángel en la Ciudad de México se encontró que los promedios anuales de las concentraciones de PM_{10} y PST rebasaron desde ese entonces los límites anuales permitidos en la NOM-025-SSA1-2014 vigente, así como la identificación de sustancias indicadoras de que las fuentes fueron emisiones vehiculares y quema de basura al aire libre. Según los datos de 2017 tampoco se cumplió con lo establecido en la norma para PM_{10} salvo en las ciudades de Tulancingo y Zapotlán. Ninguna ciudad de la República Mexicana con monitoreo de la calidad del aire cumplió con la norma de $PM_{2.5}$, cabe mencionar que en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) las mediciones superaron las concentraciones permitidas

tanto en 24 horas, siendo de $175 \mu\text{g}/\text{m}^3$, como las de la media anual que fueron de $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$, cuando la NOM-025-SSA1-2014 estipula los niveles permisibles para $\text{PM}_{2.5}$ cuyo valor límite es de $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en exposición aguda y para exposición crónica es de $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual. Cabe mencionar que desde ese entonces también se superaron los límites recomendados por la OMS, 2021 para $\text{PM}_{2.5}$ que son $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio diario y $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual.

Al tomar en cuenta las características de altitud de la ZMVM, nos damos cuenta que permite que se vean disminuidas las concentraciones de oxígeno (-23%) en relación con el nivel del mar, lo que reduce la eficiencia de los motores de combustión interna, aumenta la concentración de monóxido de carbono y de hidrocarburos (fuente importante de emisiones de vanadio) favoreciendo la exposición a radiaciones capaces de transformar a los contaminantes primarios (Vallejo M. et al, 2003) o incrementando el riesgo a permanecer mayor tiempo en contacto con los contaminantes como las PST. Además de que las características del relieve de la ZMVM impiden la dispersión de los contaminantes ya que se encuentra rodeada de montañas.

Hay evidencia de que las partículas finas pueden ser más tóxicas que las gruesas debido a que pueden ser vehículo para otras sustancias tóxicas (Vallejo M. et al, 2002). De acuerdo con Bacardit N.S. et al, 2018 si son PM_{10} suelen llegar más allá de la faringe; las $\text{PM}_{2.5}$ pueden llegar hasta los alvéolos pulmonares y las partículas ultrafinas pueden llegar a difundir del alvéolo pulmonar a la sangre. Las partículas ultrafinas tienen la capacidad de permanecer mayor tiempo en flotación por lo que supone una mayor interacción con otros elementos presentes en el aire.

De acuerdo con lo publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) en el 2020 para el proyecto de la NOM-025-SSA1-2020 Salud ambiental, se plantea que: *"la exposición crónica a partículas se relaciona con una mayor probabilidad de desarrollar y sufrir muerte prematura por enfermedades cardiovasculares y respiratorias, al igual que cáncer de pulmón; y también se sugiere que contribuyen en enfermedades crónicas del sistema nervioso central, síndrome metabólico y diabetes y disfunciones renales. Estos efectos adversos son consecuencia de los mecanismos de toxicidad subyacentes relacionados con la respuesta inflamatoria y el estrés oxidante que inducen. La evidencia científica apoya una relación causal entre la exposición a PM_{2.5} en el aire ambiente e incremento en la prevalencia de cardiopatías isquémicas, enfermedades cerebrovasculares e incremento en infecciones de las vías respiratorias inferiores y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. A su vez, se ha reportado una asociación con la incidencia de diabetes tipo 2."*

En la misma publicación del DOF se menciona que *"la ley establece en el artículo 4º, párrafo cuatro de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos el derecho de toda persona a la protección de su salud, así como un medio ambiente sano para su desarrollo y bienestar; por lo que los artículos 116 y 117 de la Ley General de Salud, señalan que las autoridades sanitarias establecerán las normas, tomarán las medidas y realizarán las actividades tendientes a la protección de la salud humana ante los riesgos y daños dependientes de las condiciones del ambiente, para tal efecto, corresponde a la Secretaría de Salud del Ejecutivo Federal, determinar los valores de concentración máxima permisible para el ser humano de contaminantes en el ambiente"*. Sin embargo en el mismo DOF mencionan que de acuerdo con el Informe Nacional de Calidad del Aire del 2017 emitido por el INECC, de 140 estaciones con capacidad de medir PM₁₀ sólo 87 generaron información suficiente

para permitir evaluación y cumplimiento así como de las 102 estaciones con capacidad de medir PM_{2.5} sólo 48 generaron información, significa que hay un 48% y 68% de estaciones no funcionales en las que se debe averiguar los motivos que les impide generar la información requerida. A pesar de esto, los resultados son contundentes ya que las ciudades con monitoreo indican que se encuentran muy por encima de las recomendaciones de la OMS en cuanto a niveles de contaminación y la forma en que esto puede repercutir en la salud de la población obliga a los representantes gubernamentales a aplicar medidas inmediatas para la regulación en las emisiones e informar a la población de las consecuencias en la salud.

Debido a la prevalencia de las PST durante algunas estaciones del año y aunado a los elevados niveles de contaminación atmosférica de los últimos años debemos considerar las exposiciones crónicas a estas partículas y evaluar los efectos en la salud ante una exposición prolongada mediante uno de los contaminantes que se adosan a estas partículas y de los que se tiene registro que han incrementado, como lo son las emisiones de vanadio (Fortoul et al, 1996).

Vanadio

El vanadio es un metal dúctil blando. Su número atómico es 23, es el primer metal de transición y se encuentra en el período 5 de la tabla periódica. Se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una abundancia del 0.02%. Puede tener estados de oxidación que van de -3 a +5, sin embargo los que presentan actividad biológica son +3, +4 y +5 (Contreras Cadena, 2014).

De acuerdo con Contreras Cadena y colaboradores en 2014, los complejos de V muestran una amplia gama de características que les permiten ser desde micronutrientes hasta agentes tóxicos, sin embargo, esto depende de la naturaleza

de los enlaces del vanadio con otros compuestos, su estado de oxidación y la concentración a la que se encuentra.

El vanadio es un elemento que en soluciones básicas tiene efecto competitivo con el fósforo por lo que puede alterar las reacciones de fosforilación y desfosforilación como en el caso de la Na^+ , K^+ ATPasa (Imtiaz et al, 2015)

El vanadio comenzó a llamar la atención por los efectos terapéuticos que se le encontraron a algunos compuestos, como el oxovanadio cuya administración por vía oral se ha estudiado para el tratamiento de la DM-II por la mimetización con la insulina (Treviño et al, 2019). Otro ejemplo, es su estudio como metalofármaco al ser un agente anticarcinogénico cuyo mecanismo de acción es la inducción de la apoptosis (Contreras-Cadena, 2014).

Como se mencionó anteriormente, Fortoul y colaboradores en 1996 encontraron mediante la medición de concentraciones de metales en muestras de pulmones obtenidas de autopsias de residentes de la Ciudad de México de los años 50 que compararon con las de los años 80, evidencia del incremento de vanadio en las emisiones de contaminantes atmosféricos, siendo el pentóxido de vanadio el principal compuesto emitido y que se atribuye a la quema de combustibles fósiles, además que de acuerdo con Barceloux, 1999, la forma más tóxica del V para los mamíferos son los componentes en forma pentavalente.

El pentóxido de vanadio es un polvo cristalino de color amarillento a marrón rojizo poco soluble en agua (Barceloux, 1999) por su tamaño de partícula <10 micrómetros se le atribuye la capacidad de adosarse a otras partículas y de esta forma ingresar al organismo.

Exposición y toxicocinética del Vanadio

Se puede estar expuesto al vanadio por su presencia en el suelo, aire, agua y comida. La manera más común de exposición al vanadio en el aire resulta de la quema de combustibles fósiles durante la generación de electricidad y calor por lo que la principal emisión proviene de fuentes antropogénicas, seguidas de las emisiones industriales siendo las emisiones volcánicas las de menor contribución a la atmósfera (Barceloux, 1999).

La exposición ocupacional con niveles muy altos en la concentración de óxidos de vanadio ocurre en la limpieza de las calderas de las industrias metalúrgicas cuyas concentraciones van de 50 a 500 mg V/m³ (Barceloux, 1999).

La incorporación del vanadio al agua es mediante la erosión del suelo y de las rocas que depende de la diferencia geográfica de los lixiviados y efluentes de fuentes naturales y antropogénicas. Las concentraciones en agua potable de vanadio van de 1 a 6 µg V/L hasta 20 µg V/L, aunque los ríos de agua dulce en algunas localidades tienen concentraciones de hasta 220 µg V/L (Barceloux, 1999).

La mayoría de los alimentos contienen bajas concentraciones de vanadio (<1 ngV/g) sin embargo, representan la mayor fuente de exposición a este metal ya que está presente en semillas, hongos, mariscos, espinacas, perejil, pimienta negra, entre otros (Barceloux, 1999). Se tienen registros de que la forma de preparación de los alimentos puede aumentar las concentraciones de vanadio (Myron D.R., et al 1977).

De acuerdo con el estudio de la toxicocinética del vanadio, la forma en la que este ingresa al organismo es muy importante ya que dependerá de ello el que se metabolice, almacene y/o se excrete como se muestra en la figura 2.

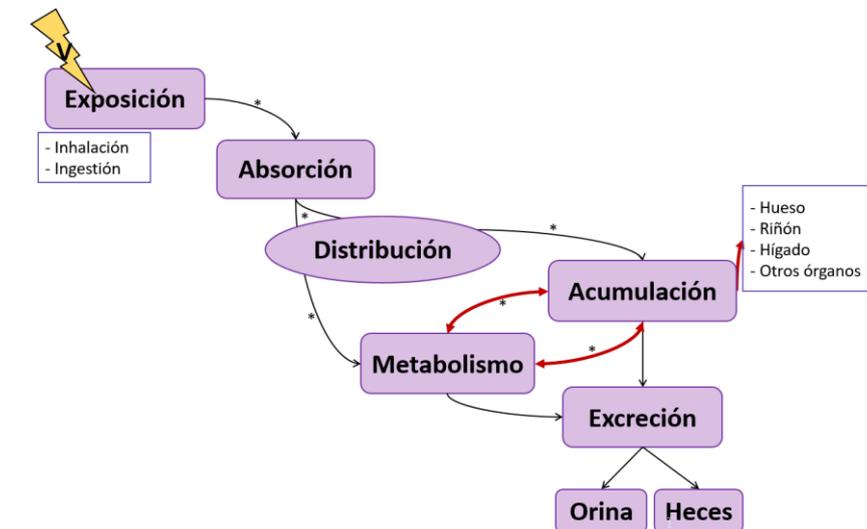


Figura 2. Toxicocinética del Vanadio. Los asteriscos indican momentos en los que se pueden llevar a cabo reacciones de biotransformación e interconversión entre especies de vanadio. Modificado de Rodríguez-Mercado et al, 2006. Elaborada por Guadalupe Morales.

Es importante tomar en cuenta que el vanadio debe pasar por diferentes entornos antes de llegar a la circulación en sangre por lo que en el proceso puede sufrir varios cambios de biotransformación y la interconversión entre especies de vanadio con alguna repercusión biológica (Treviño et al, 2019).

El principal mecanismo de toxicidad de los metales es que inducen la formación de estrés oxidante. De manera particular el vanadio participa en reacciones tipo Fenton liberando radicales hidroxilo. Hay estudios en donde se mide la cantidad de vanadio en diferentes órganos, siendo el hígado quien persiste dentro de los primeros tres con una mayor concentración. El hígado es un predictor sensible de la toxicidad inducida por sustancias químicas por su capacidad de metabolizar, desintoxicar, almacenar y eliminar los xenobióticos y sus metabolitos (Adeoye G.O. et al 2015). Esto a su vez lo convierte en un órgano diana para la toxicidad inducida por xenobióticos, por lo que, como se mencionó anteriormente se eligió al hígado para estudiar el efecto de la exposición a vanadio y bebidas azucaradas y del cual hablaremos en el siguiente apartado.

Hígado

El hígado está localizado en el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, tiene una fisiología compleja ya que se encarga del mantenimiento de la homeostasis metabólica del organismo; sus múltiples funciones se resumen en el cuadro 3.

| |
|--|
| Cuadro 3. Funciones del hígado. (Ross M. 2012) Elaborado por Guadalupe Morales. |
|--|

| |
|---|
| Almacenamiento de vitaminas y hierro Control del metabolismo del colesterol Formación y secreción de bilis Metabolismo de lípidos y secreción de lipoproteínas plasmáticas Metabolismo y detoxificación de fármacos y xenobióticos Modificación de las hormonas liberadas en otros órganos Regulación de la homeostasis de carbohidratos Síntesis de urea Síntesis de proteínas y enzimas |
|---|

Histología

El hígado está cubierto por una capa de tejido conjuntivo que se conoce como cápsula de Glisson de la cual salen proyecciones o trabéculas que dan soporte al parénquima hepático junto con las fibras reticulares que también proporcionan soporte para las células hepáticas.

El parénquima hepático se organiza en lobulillos con forma hexagonal, en el centro se encuentra la vena centrolobulillar a partir de la cual se disponen de forma radial las columnas de células hepáticas o hepatocitos como se observa en la figura 3.

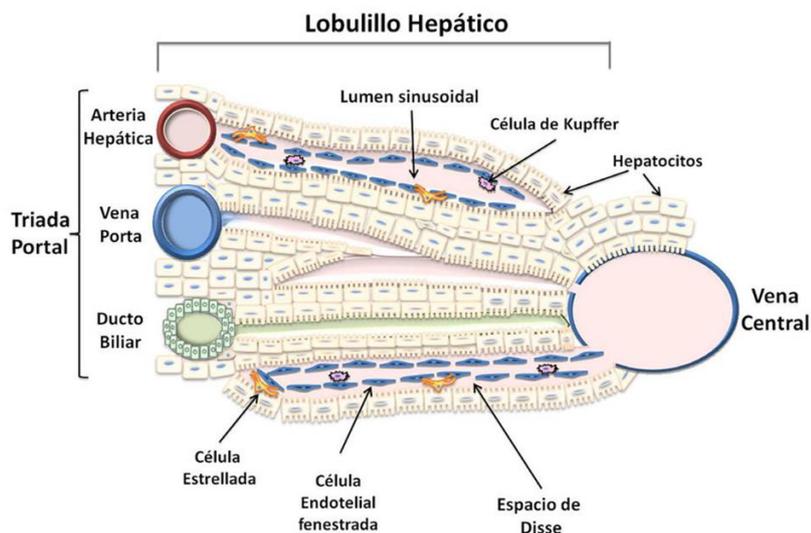


Figura 3. Organización y estructura del lobulillo hepático. Tomada de Delgado Coello et al 2017.

Los hepatocitos tienen forma poligonal, presentan un núcleo con un nucleolo evidente, aunque en algunos casos se pueden observar hasta dos núcleos en una misma célula. El citoplasma es de aspecto granular y eosinófilo. Entre las columnas de hepatocitos se encuentran los sinusoides por donde circula la sangre de manera centrípeta. Como se puede observar en la figura 3, en los vértices del lobulillo se encuentran los espacios porta conformados por las ramificaciones de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar, a este conjunto de estructuras también se le conoce como triada portal.

Otro elemento importante es el espacio de Disse delimitado por las células endoteliales del sinusoides y la membrana plasmática de los hepatocitos. En este espacio se encuentran las microvellosidades de los hepatocitos, las células de Kupffer cuya función es fagocitaria y las células de Ito cuya función es de almacenamiento de vitamina A, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (Delgado Coello, 2017). En algunas patologías como en la inflamación crónica, las células de Ito contribuyen a la progresión de fibrosis hepática al pertenecer a la familia de los miofibroblastos y relacionarse con la fibrogenesis (Krishna M., 2014).

Los canalículos biliares son los primeros conductos que reciben la bilis debido a que la membrana de los mismos hepatocitos forman sus paredes, se encuentran entre los hepatocitos y confluyen hacia los conductos de Hering que se caracterizan por presentar epitelio cúbico que desemboca en los conductos biliares interlobulillares de los espacios porta.

Desde el punto de vista patológico, otra forma de estudiar la estructura del hígado es como acino hepático que se visualiza como muestra la figura 4.

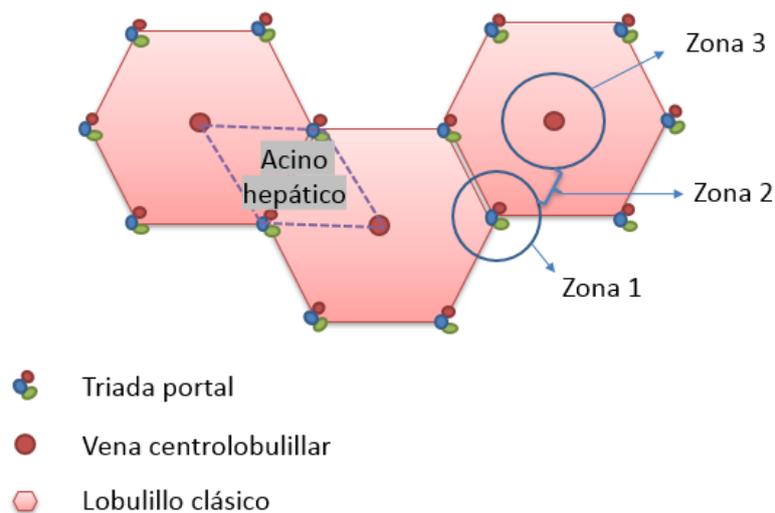


Figura 4. Estructura de los lobulillos clásicos y la división por zonas del acino hepático. Elaborada por Guadalupe Morales.

El acino hepático ocupa parte de dos lobulillos clásicos contiguos, de tal forma que se pueden describir tres zonas:

- Zona 1: la más cercana a la vena porta y arteria hepática. En esta zona hay mayor actividad mitótica cuando ocurre daño en el hígado.
- Zona 2: región entre las zonas 1 y 3 sin límites nítidos.
- Zona 3: la más cercana a la vena centrolobulillar. Posee mayor cantidad de lípidos y pigmentos.

Esta división en zonas permite la descripción e interpretación de los patrones de degeneración, regeneración y efectos tóxicos del parénquima hepático con relación

al tipo de irrigación de los hepatocitos, debido a que en las tres zonas varía el gradiente de oxígeno, actividad metabólica y distribución de enzimas hepáticas (Ross M. 2012).

Por el tipo de irrigación sanguínea hacia el hígado, este órgano es el primero en tener contacto con nutrientes, fármacos, vitaminas, metales y tóxicos ambientales, es por esto que algunas de las funciones pueden verse alteradas por lesiones hepáticas generadas por el tiempo de exposición a los tóxicos. La pérdida o alteración en las funciones del hígado puede conducir a la degeneración de otros sistemas (Klaassen D. et al 2001).

La histopatología nos proporciona información confiable sobre los tipos de lesiones producidas por productos químicos que pueden conducir a alteraciones en los parámetros bioquímicos (Adeoye G.O. et al 2015).

Alteraciones hepáticas

Una de las alteraciones por depósitos en el hígado es la esteatosis, que es resultado de la acumulación anormal de lípidos en las células hepáticas. Este tipo de acumulaciones lipídicas forman parte del espectro de EHGNA cuyo inicio es la esteatosis simple seguido de esteatohepatitis, fibrosis y cirrosis. Se puede diagnosticar la esteatosis mediante histología por la presencia de un cambio graso macrovesicular con o sin inflamación inespecífica (Sakasai A., et al 2019).

En los estudios de investigación para la determinación del grado de esteatosis se suele medir la severidad histológica mediante un sistema de puntuación numérica como se muestra en el cuadro 4 donde se analiza la intensidad del cambio morfológico (Carreras MP., 2001).

Cuadro 4. Severidad de la esteatosis según la lesión histológica. Modificado de Carreras MP, 2001.

| Estadio | Clasificación por Patrón/Característica | Clasificación por Grado |
|-------------------|---|--|
| Esteatosis simple | Macrovesicular Microvesicular Mixta | 0 Ausente 1 (<33%)* 2 (33-66%) 3 (>66%) |

* porcentaje de hepatocitos con grasa

Otra alteración del hígado por inclusiones es en los núcleos de los hepatocitos en situaciones específicas como la diabetes y la enfermedad de Wilson en el humano donde es común ver núcleos glucogenados (Krishna M., 2014) sin embargo esta alteración nuclear está poco estudiada y su etiopatogenia no es clara.

Estrés oxidante en hígado

El estrés oxidante (EO) ocurre cuando una célula tiene un aumento en la concentración de radicales libres y un desequilibrio en los antioxidantes que puedan neutralizarlos. Cuando este desequilibrio es crónico, se puede generar un estado de EO en el que la célula, en el mejor de los casos, deberá decidir si entra en apoptosis para evitar daño a nivel tisular y sistémico. El EO se ha relacionado con más de 100 patologías crónico-degenerativas entre ellas la DM (Pérez, et al 2007). Como se mencionó anteriormente, algunos estímulos como la contaminación por vanadio o el consumo de bebidas azucaradas generan una gran cantidad de intermediarios con capacidad de oxidar biomoléculas alterando su función tal como ocurre con los lípidos en la peroxidación lipídica.

Existen antecedentes de la generación de estrés oxidante tanto por la inhalación de vanadio (cuadro 5) como por la autooxidación de la glucosa, lo que podría incrementar

la formación de AGEs. Lo anterior permite considerar la participación de RAGE como un posible mecanismo de daño hepático en este modelo.

Cuadro 5. Antecedentes directos

| Año | Autor | Modelo | Compuesto (s) y concentración | Órgano | Efecto |
|------|---------------------------|---|---|----------------|---|
| 2021 | Cervantes-Valencia, et al | Ratón macho CD1 | V ₂ O ₅ 0.02 M [1.4 mg/m ³] Sacarosa 30% | Hígado | Megalocitosis y hepatocitos binucleados Pruebas de funcionamiento hepático alteradas en los grupos V, S y V+S. Incremento de 4-HNE a las 4S mayor que a las 8S. Esteatosis y cambios regenerativos en el grupo V+S a las 8S. |
| 2018 | Usende I.L. et al | Rata gigante africana | Metavanadato de sodio 3 mg/kg intraperitoneal | Hígado y otros | Atrofia de los cordones hepáticos (zona 1), degeneración grasa (zona 3), necrosis severa (zona 1) con hemorragia leve y congestión sinusoidal difusa, hiperplasia de células de Kupffer. |
| 2017 | Espinoza-Zurutuza et al | Ratón macho CD1, inhalación por 1h/d 2 veces/semana durante 8 semanas | V ₂ O ₅ 0.02 M [2.57 mg/m ³] Sacarosa 30% | Riñón | Inflamación por ROS 4S pérdida de microvellosidades; protuberancias citoplasmáticas, desprendimiento celular. 8S Necrosis tubular, hiperplasia en células tubulares. Efectos más severos en grupo V+S |
| 2015 | Albarrán-Alonso J.C Tesis | Ratón macho CD1, inhalación por 1h/d 2 veces/semana | V ₂ O ₅ 0.02 M [1.46 mg/m ³] Sacarosa 30% | Páncreas | Hiperglucemia a las 8S (S) Hipoglucemia a las 8S (V+S), aumento de la mortalidad en este grupo Acumulación de insulina dentro de las células β (V+S) |
| 2011 | Cano-Gutierrez G., et al. | Ratón macho CD1, inhalación por 1h/d 2 veces/se | | Hígado | Esteatosis micro y macrovesicular Dilatación de RER Aumento en mega núcleos y hepatocitos binucleados Focos inflamatorios |

| | | | | | |
|------|-----------------------|---|--|--|--|
| | | mana durante 6 semanas | | | (eosinófilos, neutrófilos, células mononucleares) Aumento en la peroxidación lipídica Aumento en ALT y AST al doble comparado con controles. |
| 2005 | Acevedo-Nava S. Tesis | Ratón macho CD1, inhalación por 1 hr/d 2 veces/se m durante 10 semanas (aguda, subaguda y subcrónica) | V ₂ O ₅ 0.02 M [1.46 mg/m ³] | | |

Justificación

Se tiene evidencia de que las partículas suspendidas por contaminación atmosférica y el consumo de bebidas azucaradas pueden provocar enfermedades metabólicas e inducir daño hepático. El principal mecanismo por el cual ocurre es la generación de estrés oxidante que promueve un estado de inflamación, esto a su vez tiene la capacidad de incrementar la producción de AGEs endógenos y promover la expresión de su receptor. Hay algunos estudios donde se evalúa el papel de este receptor tras la exposición a metales presentes en la contaminación atmosférica y a condiciones de hiperglucemia en diferentes organismos. Sin embargo, se tienen resultados contradictorios y no queda claro si en la respuesta inflamatoria participa la vía mediada por RAGE. Debido a que ambos factores pueden interactuar en condiciones cotidianas, es importante analizar en un modelo murino la presencia de RAGE y correlacionar con las alteraciones morfológicas para observar si existe el mismo daño hepatotóxico evidenciado en las alteraciones morfológicas encontradas en estudios previos.

Hipótesis

Si el hígado de los ratones expuestos a la inhalación de vanadio y al consumo de bebidas azucaradas presenta alteraciones morfológicas, focos inflamatorios y aumento del estrés oxidante, entonces RAGE se encontrará aumentado por la exposición a ambos factores y su combinación.

Objetivo General

- Analizar las alteraciones morfológicas y la presencia de RAGE en el hígado de ratones expuestos a inhalación subaguda de vanadio, consumo de bebidas azucaradas y a la combinación de ambos factores.

Objetivos particulares

- Identificar el grado de esteatosis en hígado de ratones expuestos a la inhalación subaguda de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas.
- Identificar cambios nucleares en células hepáticas de ratones expuestos a la inhalación subaguda de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas.
- Cuantificar el número de focos inflamatorios y describir su morfología en hígado de ratones expuestos a la inhalación subaguda de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas.
- Identificar los cambios en la presencia de RAGE en el hígado de ratones con el efecto de la combinación del consumo de bebidas azucaradas y la inhalación subaguda de vanadio.

Método

Se obtuvieron veinte ratones macho de la cepa CD1 con un peso de 34 ± 1 g del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se mantuvieron en cajas de plástico con períodos de luz oscuridad (12:12 h), fueron alimentados con Purina Rodent Chow® con acceso a libre demanda al agua. Se dividieron al azar en cuatro grupos de 5 ratones cada uno. El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

El grupo control (C) inhaló el vehículo de solución salina (NaCl 0.9%) una hora al día dos veces por semana. El grupo sacarosa (S) inhaló el vehículo y se sustituyó el agua de consumo por una solución de sacarosa al 30% *ad libitum*. El grupo vanadio (V) inhaló solución de pentóxido de vanadio [1.56 mg/m^3] en una caja acrílica conectada a un nebulizador (Nebulizador ultrasónico Yue Hua WH-802) durante una hora dos veces por semana durante 4 semanas. El grupo vanadio+sacarosa (V+S) inhaló la solución de pentóxido de vanadio y tuvo libre acceso a la solución de sacarosa al 30% durante el mismo periodo de tiempo.

Para la obtención de muestras, a las 4 semanas se anestesiaron a los ratones por inyección letal intraperitoneal con solución de pentobarbital sódico, se perfundieron vía intracardiaca con solución salina, seguida de paraformaldehído al 4% (pH 7.4) tamponado con buffer de fosfatos. Se obtuvieron las muestras de hígado y se procesaron para microscopía de luz con la técnica histológica convencional. El tejido se incluyó en parafina y se realizaron cortes de $7 \mu\text{m}$ de grosor. Fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E).

Para el análisis morfológico se evaluó la presencia de esteatosis contando el número de hepatocitos con grasa y obteniendo el porcentaje en relación a los hepatocitos

totales en el campo. Se cuantificó el número de focos inflamatorios con el objetivo de 10x en 50 campos aleatorios de 3, 801,336 μm^2 así como la descripción de su morfología considerando la ubicación en el tejido hepático y las células presentes en el foco inflamatorio. Se cuantificó el número y tamaño del núcleo de los hepatocitos midiendo el núcleo de 300 hepatocitos por grupo con reglilla de 1 mm. Para la cuantificación y descripción de los cambios en la morfología del hígado se analizaron 9 campos de 237,582.94 μm^2 por grupo.

Posteriormente se tomaron las fotomicrografías con cámara digital Canon EOS 6D conectada al microscopio. Las fotomicrografías fueron tomadas con los objetivos de 10x y 20x.

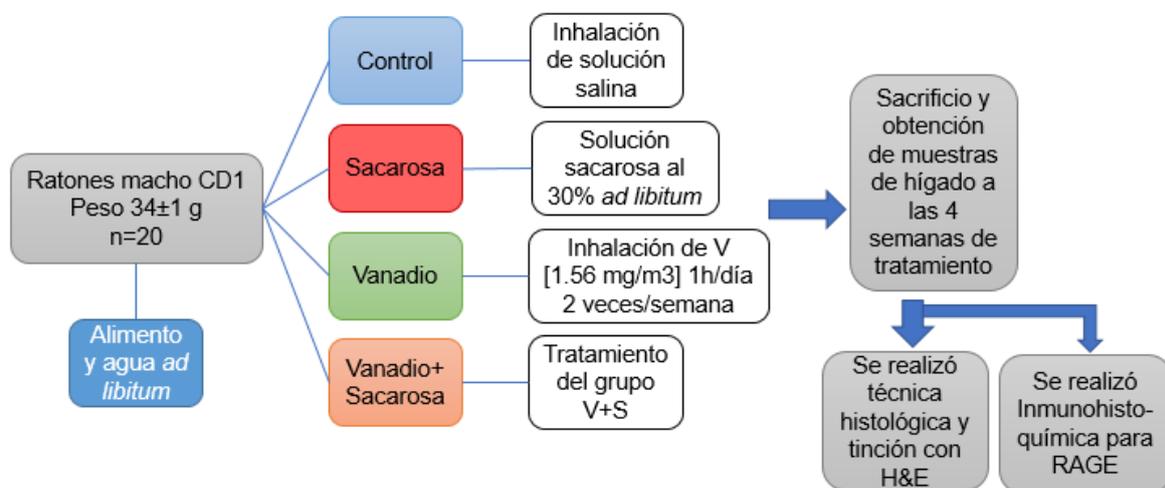


Figura 5. Esquema-resumen del método

Los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA con el programa PRISM 6 con prueba *post hoc* para determinar diferencias entre los grupos, con un nivel de significancia de probabilidad del 95% ($p \leq 0.05$).

Inmunohistoquímica (IHQ) para RAGE

Las laminillas con cortes de hígado de los 4 grupos (C, S, V y V+S) se desparafinaron durante 12 horas en estufa a una temperatura de 56-59°C. Se sumergieron en xilol y posteriormente en baños de alcohol a diferentes porcentajes para rehidratar los tejidos como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Serie de soluciones para la rehidratación del tejido hepático.

| No. baño | Solución | Tiempo (min.) |
|----------|----------------|---------------|
| 1 | Xilol | 5 |
| 2 | Alcohol 96% | 2 |
| 3 | Alcohol 70% | 2 |
| 4 | Alcohol 50% | 2 |
| 5 | Agua destilada | |

Se realizó el desenmascaramiento antigénico con buffer de citratos DIVA y en olla de presión hasta las 22 psi, se dejó enfriar a las laminillas y se realizaron 3 lavados de 2 minutos con agua destilada. Posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno preparado al 3%, nuevamente se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS-tween, enseguida se realizó el bloqueo de proteínas durante 30 minutos con solución al 2.5% de albúmina sérica bovina (BSA) posteriormente se colocaron las laminillas en cámara húmeda y se siguieron los pasos que se mencionan a continuación a temperatura ambiente:

1. Se incubó el anticuerpo primario para RAGE de GeneTex® durante 45 minutos a una dilución 1:100, añadiendo 100 µl a cada laminilla.
2. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS-tween.
3. Se incubó el anticuerpo secundario universal 4+ biotinilado durante 30 minutos,

añadiendo 1 gota por laminilla del kit 4+ HRP Universal Detection de Biocare Medical®.

4. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS-tween.
5. Se incubó la estreptavidina HRP durante 30 minutos, añadiendo 1 gota por laminilla del kit 4+ HRP Universal Detection de Biocare Medical®.
6. Se realizaron 3 lavados de 2 minutos con PBS-tween.
7. Se realizó el revelado utilizando el kit de Diaminobencidina (DAB-Plus substrate Kit de Invitrogen™), durante 60 segundos añadiendo 100 µl por laminilla, una vez transcurrido el tiempo se enjuagó con agua destilada.

Para realizar el contraste, las laminillas se sumergieron en hematoxilina y se enjuagaron con agua destilada. Enseguida se sumergieron en agua amoniacal durante 5 segundos y se volvieron a enjuagar en agua destilada. Se pasaron las laminillas con los tejidos por el tren de deshidratación como muestra el cuadro 7:

Cuadro 7. Tren de deshidratación.

| No. baño | Solución | Tiempo (min.) |
|----------|----------------|---------------|
| 1 | Agua destilada | |
| 2 | Alcohol 50% | 2 |
| 3 | Alcohol 70% | 2 |
| 4 | Alcohol 96% | 2 |
| 5 | Xilol | 2 |

Finalmente se realizó el montaje de las laminillas y se dejaron secar durante 48 hrs. Se tomaron fotomicrografías de 3 campos elegidos al azar de 3 ratones por grupo y se realizó la densitometría con el programa Fiji de Image J. En el programa Fiji se abrió la fotomicrografía, posteriormente se aplicó Colour Deconvolution

seleccionando la opción H-DAB para separar la imagen en diferentes canales quedándonos únicamente con el canal 2 que es el que refleja el color café obtenido por la IHQ para RAGE. En la imagen del canal 2 se seleccionó la opción Image→Adjust→Treshold y se determinó el umbral que reflejó la marca de la IHQ. Posteriormente se seleccionó la opción Analyze→Set measurements en donde se marcó la opción Integrated density→Measure.

Una vez que se obtuvo la densidad integrada de acuerdo con el protocolo de Crowe 2019, para la medición de la marca con DAB con el programa Fiji, se realizó el análisis estadístico Kruskal-Wallis utilizando el programa PRISM 6 con prueba *post hoc* con nivel de significancia de probabilidad del 95% ($p \leq 0.05$).

Resultados

Morfología del hígado

En las fotomicrografías de los cortes de hígado se pueden observar los cambios en la morfología (figuras 6 a 9). Se observaron cambios en los depósitos de grasa (gráfica 1) al pasar de la ausencia y gotas microvesiculares en el control a gotas microvesiculares y el incremento de las gotas macrovesiculares en el citoplasma de los grupos sacarosa y V (resultado no significativo para el grupo V) principalmente en la zona 3 del acino hepático, también llamada centrolobulillar. De acuerdo con la clasificación de la severidad histológica de Pérez Carreras 2001, la esteatosis del grupo sacarosa se encuentra en el estadio 3 al tener más del 60% de hepatocitos con esteatosis. También se observó un aumento significativo en el tamaño de los núcleos de todos los grupos expuestos (gráfica 2) y un incremento significativo en la cantidad de células binucleadas de los grupos sacarosa y vanadio+sacarosa (gráfica 3). Aunque el conteo de focos inflamatorios a este tiempo (4 semanas) no es significativo (gráfica 4), se observaron cambios cualitativos en cuanto al tamaño (con gran cantidad de células en el foco inflamatorio) y localización de los infiltrados inflamatorios principalmente en los grupos V, S y V+S (figura 10) cercanos a las venas centrales, periportales y entre el parénquima hepático. En los focos inflamatorios se identificaron macrófagos, neutrófilos y linfocitos. Otro de los cambios nucleares observados en los grupos expuestos fue la presencia de núcleos con inclusiones, aparentemente lipídicas, que fueron significativos en el grupo sacarosa (gráfica 5).

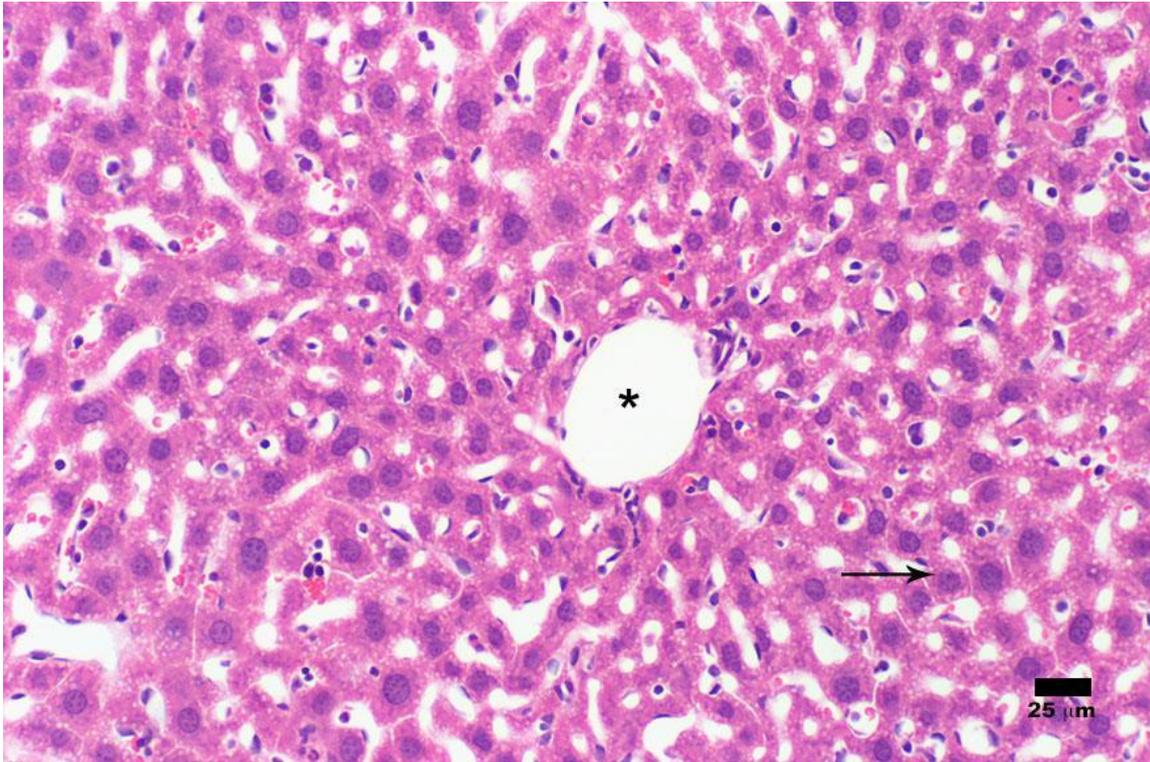


Figura 6. Fotomicrografía del corte longitudinal de hígado de ratón del grupo control. Se observa la disposición radial normal de los cordones de hepatocitos alrededor de la vena central (*), la flecha señala un hepatocito con morfología normal dentro del parénquima hepático.

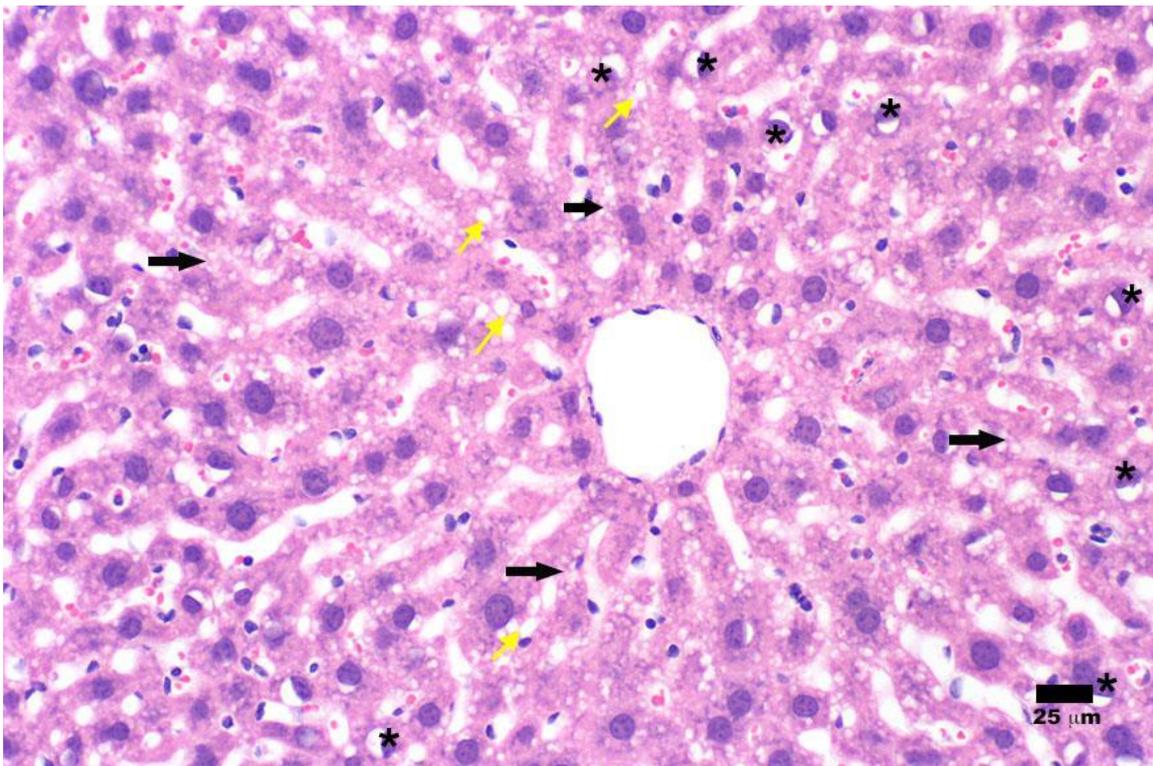


Figura 7. Hígado de ratón del grupo vanadio. Se observa la presencia de esteatosis microvesicular (flechas negras) y macrovesicular (flechas amarillas) así como la presencia de aparentes inclusiones nucleares en algunos hepatocitos (*).

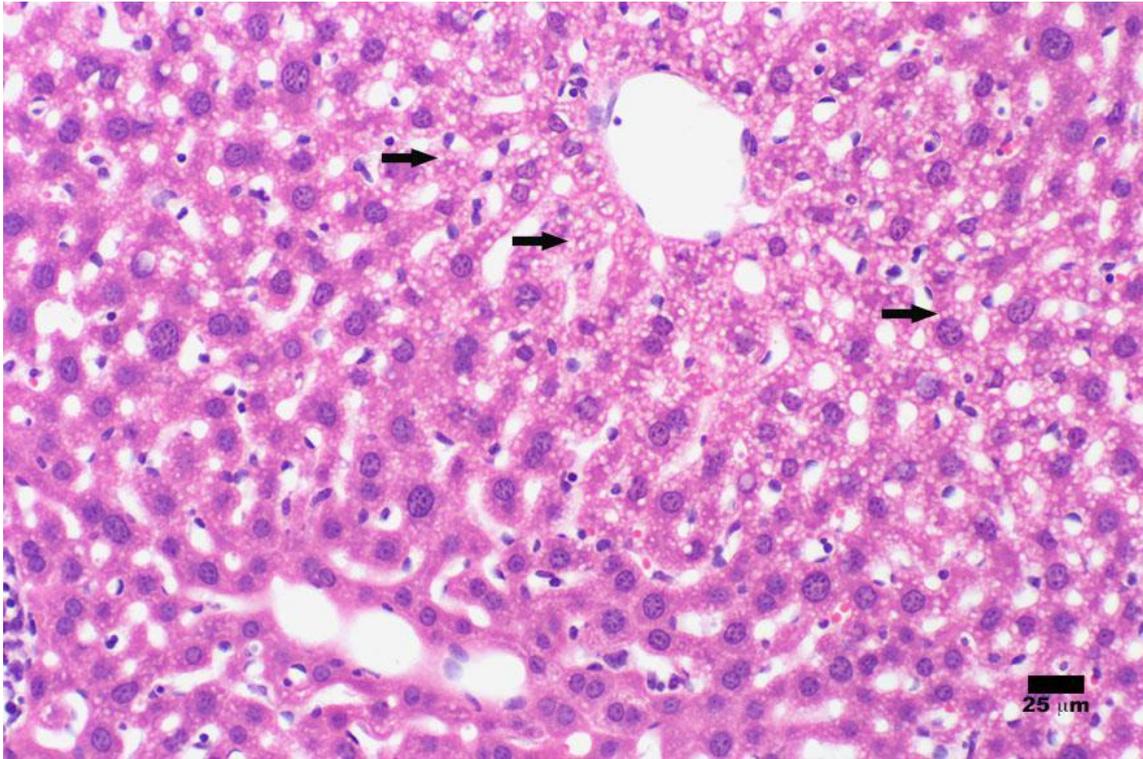


Figura 8. Hígado de ratón del grupo sacarosa. Se observan hepatocitos con esteatosis microvesicular (flechas negras) en la zona 3 del acino hepático; del lado inferior izquierdo se observa un foco inflamatorio en la zona 2 del acino.

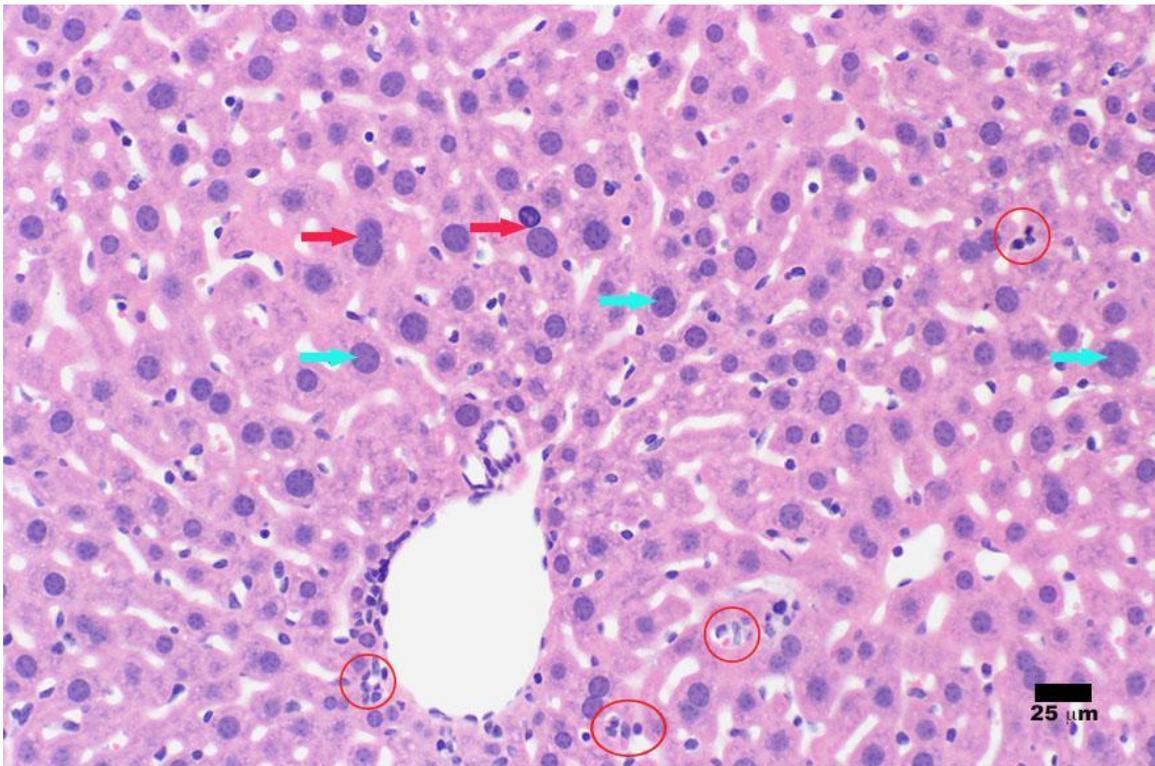


Figura 9. Hígado de ratón del grupo vanadio+sacarosa. Se observan infiltrados inflamatorios en parénquima hepático (círculo rojo), núcleos agrandados (flechas azules), hepatocitos binucleados con núcleos agrandados (flechas rojas).

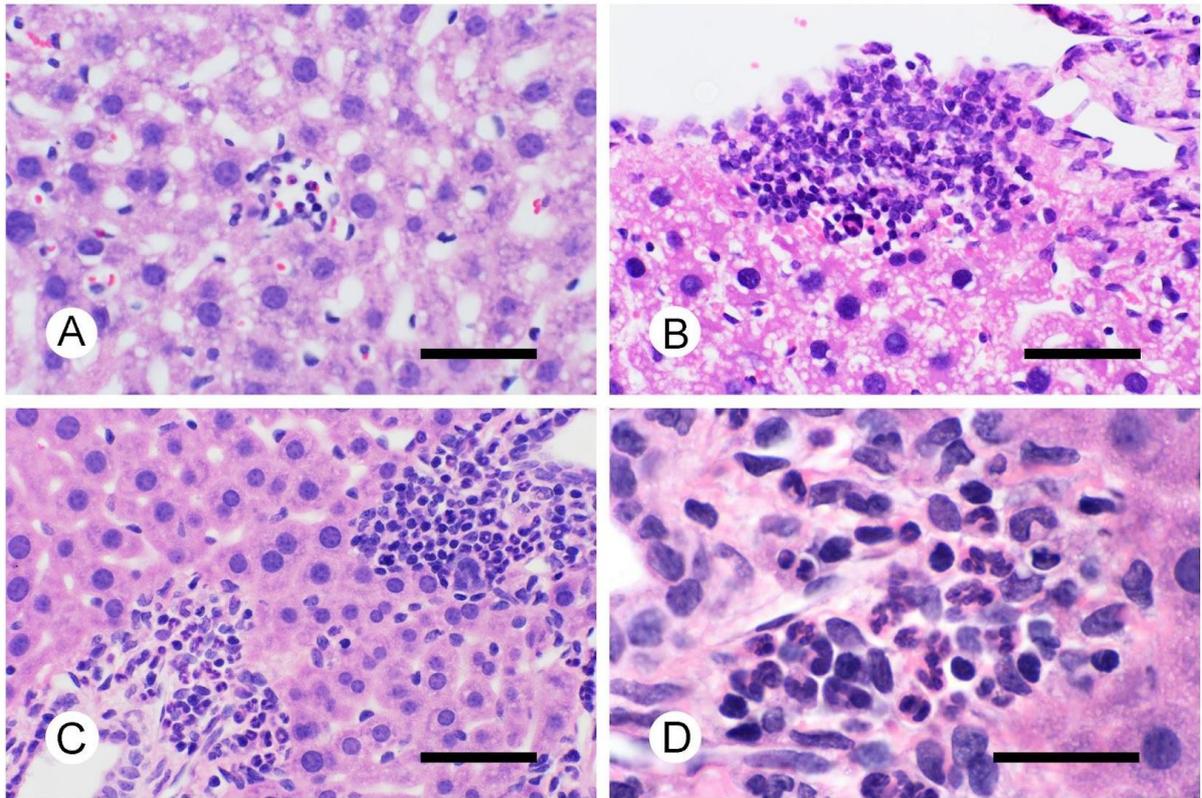
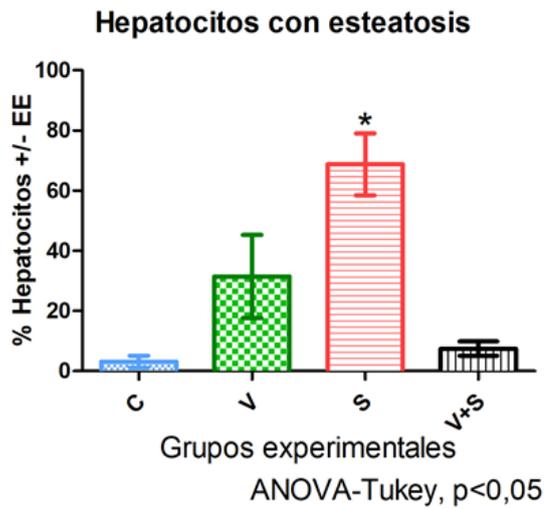
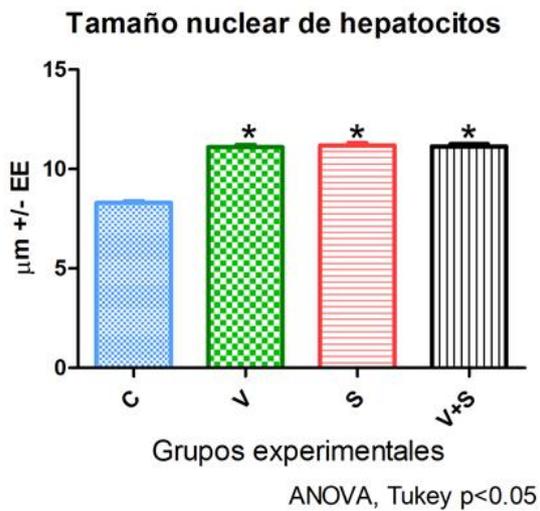


Figura 10. Infiltrados inflamatorios en hígado de ratón. A) Vanadio, B) Sacarosa y C) V+S. Se observan los infiltrados principalmente junto a venas centrales y en zonas periportales así como en parénquima hepático. D) Vista a detalle de un foco inflamatorio del grupo V+S. Se identificaron macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Barra en A, B y C = 50 μ m. Barra escala en D= 25 μ m.

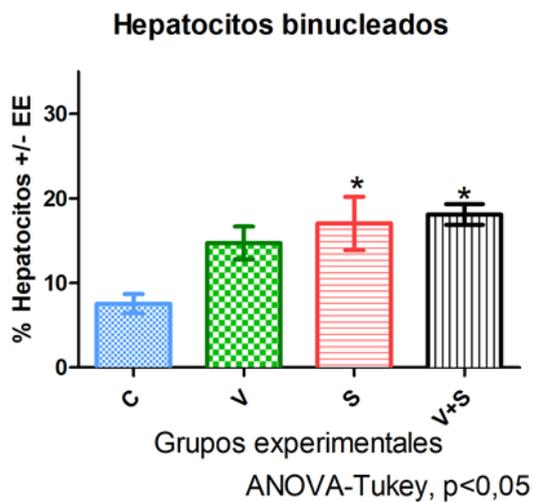
Cuantificación de cambios morfológicos



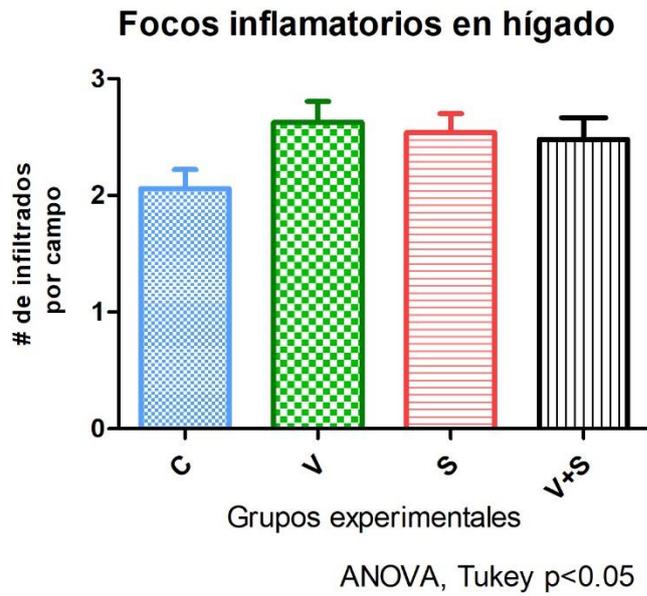
Gráfica 1. Media del porcentaje de hepatocitos con esteatosis. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control.



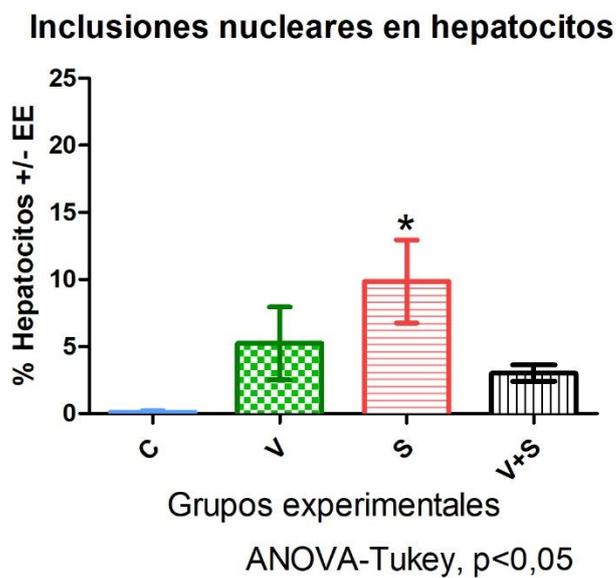
Gráfica 2. Media del tamaño del núcleo de hepatocitos. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control.



Gráfica 3. Media del porcentaje de hepatocitos binucleados. El * indica diferencias significativas con respecto al grupo control.



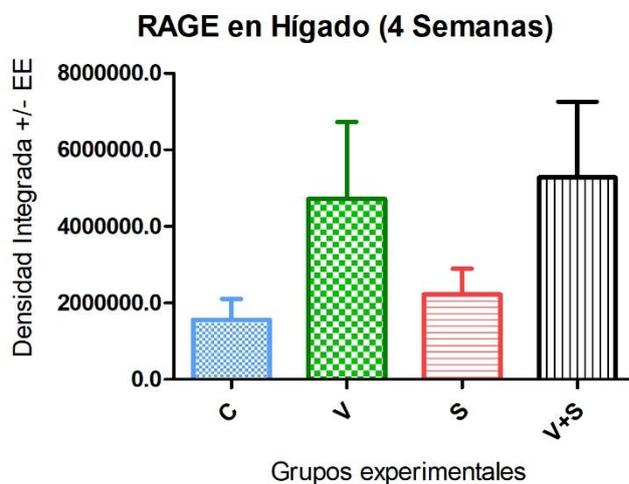
Gráfica 4. Media de la cantidad de focos inflamatorios en $3\ 801\ 336\ \mu\text{m}^2$. No se encontraron diferencias significativas.



Gráfica 5. Media del porcentaje de hepatocitos con inclusiones nucleares. El * indica diferencia significativa con respecto al grupo control.

Inmunohistoquímica para RAGE

No se encontraron cambios estadísticamente significativos de la presencia de RAGE en el hígado de los ratones de todos los grupos comparados con el control y entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observaron cambios en cuanto al sitio de la marca de RAGE en el tejido hepático. En el grupo control se observó la marca principalmente rodeando gotas lipídicas y en el citoplasma de los hepatocitos. En el grupo V se observó marca principalmente hacia la membrana de los hepatocitos y en los vasos sanguíneos (figura 11). En el grupo sacarosa se observó la predominancia de la marca rodeando las gotas lipídicas de los hepatocitos en la zona 3 del acino. En el grupo V+S se observó la marca en citoplasma, endotelio y membrana plasmática de hepatocitos centrolobulillares y en células inflamatorias. En los grupos vanadio y V+S se observa que hay una tendencia hacia el incremento del RAGE (gráfica 6, figura 12) comparados con el grupo control.



Kruskal-Wallis $p < 0.05$

Gráfica 6. Densidad integrada de la expresión inmunohistoquímica para RAGE. No se obtuvieron diferencias significativas a las 4 semanas de los tratamientos.

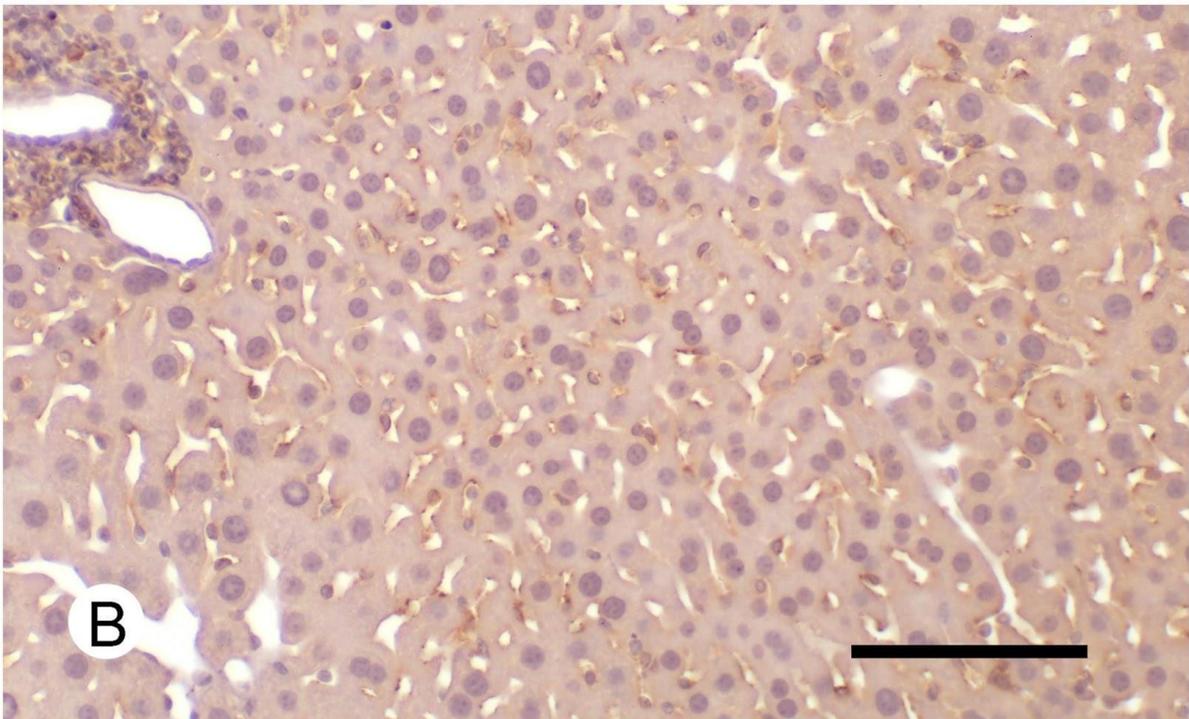
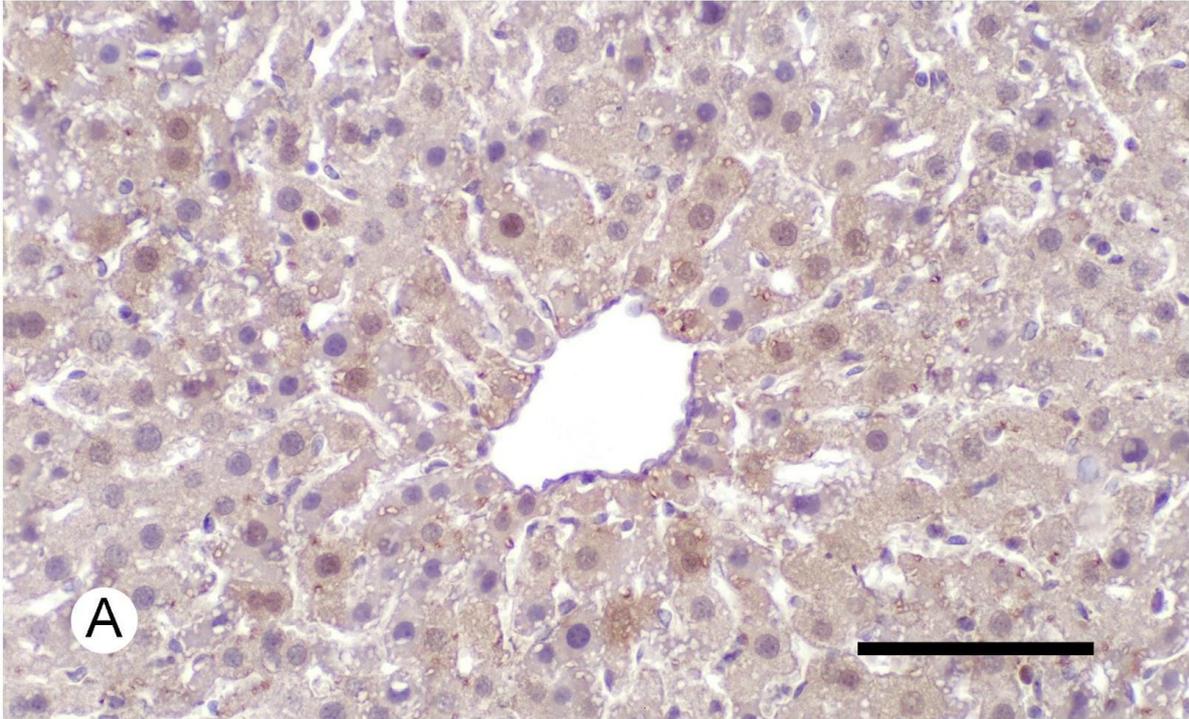


Figura 11. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica para RAGE del hígado de ratón. A) Control, se observa la marca color café en células inflamatorias y en el citoplasma de los hepatocitos. B) V. Se observa la marca color café en células inflamatorias, en membrana de hepatocitos y células endoteliales. Barra escala 100 μ m.

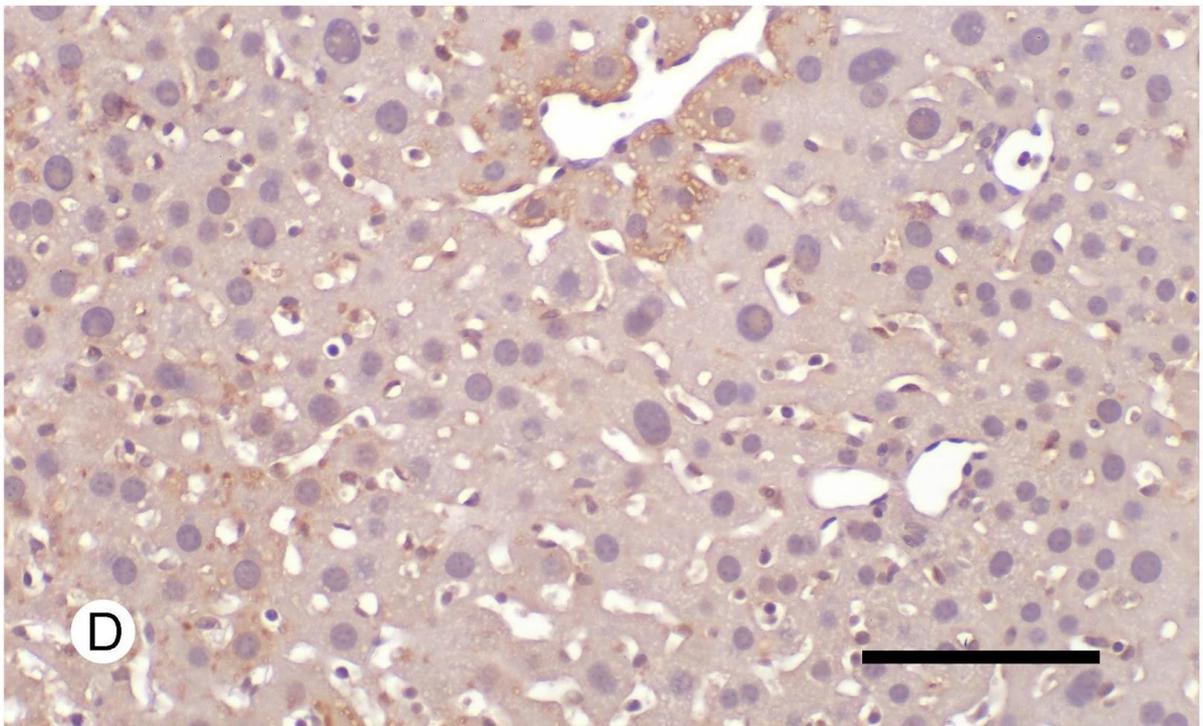
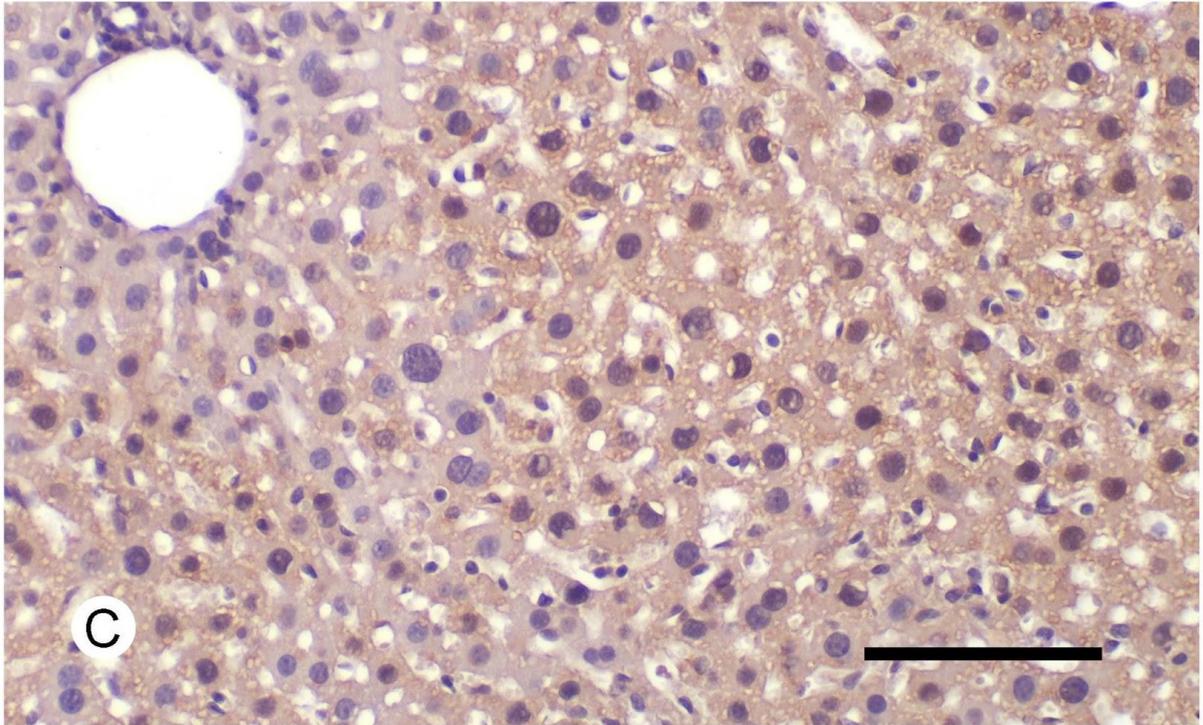


Figura 12. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica para RAGE del hígado de ratón. C) Sacarosa, se observó la marca color café en el citoplasma de hepatocitos en la zona 3 del acino hepático y alrededor de las gotas de lípidos. D) V+S, se observó la marca en el citoplasma y en células endoteliales. Barra escala 100 μ m.

Discusión

En este experimento se encontraron datos de hepatotoxicidad tanto por la inhalación de V como por el consumo de bebidas con sacarosa y en la combinación de ambos factores. El tipo de daño encontrado involucra esteatosis, inflamación y alteraciones nucleares, esto es relevante debido a que son cambios que pueden presentarse en el hígado de personas con síndrome metabólico. En los últimos años se han ampliado las líneas de investigación alrededor del síndrome metabólico debido al incremento en su prevalencia y a que es una condición multifactorial que suele presentarse en personas adultas (Koehler E.M., 2013 en Stahl C., et al 2018). Una de estas líneas de investigación es la que asocia la presencia de biomarcadores de inflamación crónica y el desarrollo de DM-II, ocasionado por las especies reactivas generadas del metabolismo de una prolongada hiperglucemia (Pérez J. et al, 2007). Así como también por la exposición a elementos presentes en partículas suspendidas como el vanadio que representa una fuente para la generación de especies reactivas durante su metabolismo al ingresar al organismo por vía inhalada (Ding S. et al, 2019; Fortoul, et al 2011). La contaminación atmosférica puede ser un elemento importante que no es tan considerado como factor de riesgo para la EHGNA pero que puede estar contribuyendo al aumento de esta patología.

Las alteraciones morfológicas encontradas en este estudio, se relacionan con lo observado por Cervantes-Valencia et al, 2021, con una dosis menor por vía inhalada y por Nnama, A.U., et al, 2022, bajo administración oral de pentóxido de vanadio aun cuando se ha visto que los cambios son dependientes de la dosis, tiempo y vía de exposición. Uno de los cambios evidentes derivado del consumo prolongado de bebida azucarada es la generación de esteatosis a las 4 semanas, que como se observó, predomina en la zona 3 del acino hepático debido a que en esta zona se

pueden presentar en fases tempranas los cambios morfológicos ocasionados por daño en el hígado (López Panqueva et al, 2014). Estos cambios en la zona 3 también se han documentado en modelos donde se administran dietas altas en grasas y por consumo elevado de bebidas endulzadas con jarabe de maíz alto en fructosa o sacarosa, provocando cambios en el almacenamiento de lípidos en el hígado considerados una alteración que conduce a EHGNA (Neuschwander-Tetri, 2017). El V tiene la capacidad de dañar a las mitocondrias, provocando alteración en sus funciones como en la β -oxidación. Este daño en las mitocondrias del hígado puede resultar en acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (Hosseini, M. et al, 2013). La alteración en el almacenamiento de lípidos es una condición que es tomada en cuenta para el diagnóstico del síndrome metabólico.

De acuerdo con Stahl C. et al 2018, los cambios en la morfología del hígado pueden estar relacionados con alteraciones en la cantidad de mitocondrias, disminución del área del retículo endoplásmico, acumulación de lipofuscina en el citoplasma; así como con el aumento en la ploidía de los hepatocitos que suele asociarse al envejecimiento. En este trabajo se pudo observar una tendencia al incremento en la binucleación de los grupos expuestos a la sacarosa y en el grupo de la combinación. El grupo V no mostró diferencias significativas a las 4 semanas contrario a lo descrito por Cano-Gutiérrez, 2012, debido a que en ese estudio el experimento duró 6 semanas y como lo indica la literatura el daño incrementa con respecto al tiempo de exposición. También se observó el agrandamiento de los núcleos, esto puede implicar alteraciones en la ploidía de los hepatocitos. La poliploidización es un mecanismo por el cual el hígado busca recuperar condiciones fisiológicas (Celton-Morizur S. et al 2009) esto se puede ver incrementado si se considera la capacidad del vanadio para interferir en completar la citocinesis del ciclo celular (Barceloux, 1999). Esto llama la

atención para este modelo debido a que se ha visto que la generación de células poliploides puede desencadenar la transformación celular y permite la formación de tumores en situaciones tales como hepatectomía parcial y en condiciones de estrés oxidante (Celton-Morizur S. et al 2009).

En el estudio de Gentric G. et al 2015, se demostró la relación entre la poliploidización en el hígado graso y el estrés oxidante con la progresión de EHGNA. Los resultados de este estudio confirmaron que el consumo elevado de BA promueve la acumulación de grasas en el citoplasma de los hepatocitos, situación que pone en riesgo al hígado de volverlo graso que aunado a la binucleación e incremento del tamaño del núcleo puede contribuir al desarrollo de EHGNA y CHC.

Un hallazgo novedoso en esta investigación son las inclusiones de los núcleos que fueron significativas en el grupo sacarosa. Esta alteración está descrita que se debe a la presencia de glucógeno o lípidos intranucleares en condiciones patológicas como la diabetes o la enfermedad de Wilson. En algunas patologías, la inclusión de glucógeno se conoce como núcleos glucogenados (Méndez Sánchez et al, 2010). Respecto a los lípidos intranucleares, se tiene evidencia de que algunos fosfolípidos como la fosfatidilcolina y la esfingomiélin pueden tener cambios en sus fracciones cuando hay proliferación celular o incremento en la actividad metabólica dependiendo del tipo celular (Shwertheim S., et al, 2020; Sołtysik K., et al, 2019). Debido al incremento en la binucleación en el grupo sacarosa, así como el aumento del tamaño de los núcleos y, dado que se observa como un espacio vacío en algunos núcleos, podríamos inferir que se trata de una inclusión lipídica. Sin embargo, el origen de esta inclusión permanece pendiente ya que son necesarias más pruebas para determinar el tipo, así como su posible origen.

Anteriormente en este grupo de trabajo, Cervantes-Valencia y colaboradores 2021 reportaron en este modelo en la combinación de ambos factores, con inhalación de vanadio a una concentración de 1.46 mg/m³ e ingesta de sacarosa al 30%, el desarrollo de esteatosis, megalocitosis, alteración de los parámetros bioquímicos de AST y ALT, dejando ver el daño hepático causado por ambos factores a las 8 semanas. En contraste con el incremento en la concentración de vanadio a 1.56 mg/m³ para el presente estudio, a las 4 semanas no se encontró esteatosis de manera significativa en el grupo vanadio más sacarosa, sugiriendo dos posibles hipótesis. La primera es que el V podría inhibir el efecto de la sacarosa, ya que la capacidad hipoglucemiante del V ha sido ampliamente estudiada con algunos compuestos dependiendo la concentración y la dosis (Treviño S., 2018; Treviño S., 2019). Como se mencionó anteriormente, al ingresar al organismo el V puede sufrir biotransformaciones e interconversiones entre especies de V por lo que se debe tomar en cuenta que la forma química de los complejos de V determinan el mecanismo de acción y toxicidad (Kowalski S. et al, 2020). La segunda hipótesis es que haya un sinergismo en la respuesta del hígado ante la exposición del vanadio más bebida azucarada, como se ha reportado en modelos donde los niveles de estrés se encuentran incrementados (Ding S, et al 2019), por lo que se promueve la activación de genes antiinflamatorios así como el aumento de enzimas antioxidantes. Sin embargo, en estudios donde se evalúa la combinación de dieta alta en grasas y la exposición a material particulado se han encontrado cambios en la expresión de genes para el metabolismo lipídico, así como el aumento en la inflamación hepática y el estímulo de infiltración de macrófagos al parénquima hepático (Ding S. et al 2019). Aquí se pudo observar que los focos inflamatorios difieren en cuanto a la ubicación dentro del parénquima hepático ya que se encontraron hacia las venas centrales y

zonas periportales en los grupos V y sacarosa, pero en el grupo V+S también se forman entre los cordones hepáticos sugiriendo la activación en la migración de los macrófagos a nivel de los sinusoides.

Se ha demostrado mediante pruebas con inmunohistoquímica la presencia del marcador 4 hidroxinonenal (4-HNE) para estrés oxidante en riñón e hígado por inhalación de V y el consumo de bebida endulzada con sacarosa (Cervantes-Valencia, 2021; Espinoza-Zurutuza, 2017; Cano-Gutierrez, 2012). Este marcador es utilizado debido a que ante la sobreproducción de ROS puede haber reacciones de oxidación de ácidos grasos de las membranas celulares y uno de los productos de estas reacciones de peroxidación lipídica es el 4-HNE. En estos trabajos se planteó que debido al incremento en el estrés oxidante en este modelo de inhalación a un contaminante ambiental y posteriormente en la combinación con el consumo de BA, el receptor de productos de glicación avanzada podría activarse y participar en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, en este estudio se encontró que no hay cambios en cuanto a la presencia de este receptor a las 4 semanas de exposición.

De la misma forma que ocurre por la exposición a otros metales como el Cd (Sarmiento Ortega, 2021) los focos inflamatorios con un gran número de células, encontrados en los grupos expuestos parecen ser ocasionados por los elevados niveles de ROS. Las ROS pueden generarse de manera independiente por mecanismo Fenton en los grupos con V y la autooxidación de la glucosa en los grupos con sacarosa. El estrés oxidante promueve la inflamación y viceversa y se podría asumir que la combinación de factores que incrementan los niveles de ROS provocaría la aceleración en la formación de AGEs y por lo tanto activaría a RAGE (Byun, K. et al 2017). Sin embargo, comprobamos que la presencia del RAGE no se

altera en ninguno de los grupos expuestos con la concentración de 1.56 mg/m³ a V más el consumo de bebida azucarada al 30%, al menos a las 4 semanas posiblemente porque el tiempo es aún insuficiente para la producción de AGEs.

Se ha reportado la asociación entre las alteraciones morfológicas y el daño inducido en varios órganos como consecuencia de la inhalación de V, así como también se han relacionado las alteraciones morfológicas en riñón e hígado por estrés oxidante tras la exposición a V y consumo de BA (Fortoul et al, 2014; Cervantes-Valencia et al, 2021; Espinosa-Zurutuza et al, 2017).

Además hay evidencia de estrés nitrosante como lo demuestra el estudio de Ustarroz-Cano, et al 2019 en timo mediante la medición del marcador 3-nitrotirosina (3-NT), que al igual que las ROS tienen la capacidad de dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El incremento del estrés nitrosante se relacionó con los cambios morfológicos en el timo así como con el daño en la respuesta del sistema inmune de los ratones expuestos a inhalación de V.

Una de las consecuencias de un prolongado estado de estrés oxidante o nitrosante se relaciona con el incremento en la probabilidad de producir AGEs endógenos provocando la unión del AGE con RAGE (Byun, K. et al 2017).

En condiciones normales RAGE se encuentra en la membrana plasmática, ya que es un receptor multiligando que además de los AGEs, también se acopla a proteínas como HMGB1, S-100 y proteína β -amiloide. Entre sus funciones destacan la proliferación celular, detección y coordinación de la respuesta celular ante condiciones de estrés, adhesión celular, entre otras, es por ello que podemos observar marca de este receptor en el grupo control en este estudio y su expresión es mínima en comparación bajo condiciones patológicas (Yamagishi S.I., et al 2015).

Existe un antecedente de exposición a otros metales como el As, Zn y Mn en el que se ha visto que hay una disminución en la expresión del RAGE debido a una posible metilación del ADN en la región promotora que impide la transcripción de los genes involucrados para este receptor, lo que conlleva a una disminución en su presencia (Lantz, R.C. et al, 2007). Mientras que en condiciones donde hay un incremento tanto en la expresión como en las respuestas mediadas por RAGE se exagera la toxicidad y degeneración de las células en donde se ha medido su expresión (Lawes, M. et al, 2020).

En este sentido, el tiempo para la generación de AGEs debe tomarse en cuenta en este trabajo, ya que para considerar la formación final de un AGE cuya reacción con la proteína u otra macromolécula es irreversible, puede tardar de semanas a meses. Sin embargo, las reacciones previas a la formación final del AGE como son la formación de la base de Schiff que se lleva a cabo en horas, posteriormente el producto de Amadori que alcanza el equilibrio en días (Cárdenas, et al, 2009) se pueden estar llevando a cabo a las 4 semanas en el grupo sacarosa y en el de la combinación, por lo que en estos casos se observa la marca para RAGE en el citoplasma de los hepatocitos y rodeando a las gotas lipídicas.

Además del estudio del papel del RAGE en las complicaciones de la inflamación en la diabetes y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Sparvero L.J., et al, 2009; Jianling Xie, et al, 2013), también se ha descrito el papel de RAGE para la eliminación y degradación de AGEs (Cárdenas et al, 2009), ya que se han identificado numerosas isoformas del RAGE. Una de ellas es RAGE soluble (sRAGE) que carece de la porción transmembrana e intracelular cuya función es la captación de productos de glicación avanzada, de esta forma neutraliza o inhibe los efectos

dañinos de los AGEs que pueden estar en proceso de formación de manera intracelular o endógena. Hay evidencia de que el aumento de sRAGE reduce la inflamación, mejora la supervivencia celular y puede prevenir el desarrollo y/o progresión de EHGNA (Kamyar A., et al, 2019).

En este estudio, se observó que en el grupo sacarosa, V y V+S la marca del RAGE por inmunohistoquímica, cambió de localización ya que al comparar el grupo control con los expuestos, se observó la marca no sólo en el citoplasma y en células inflamatorias sino en membrana citoplasmática de los hepatocitos, células endoteliales y rodeando gotas lipídicas; esto puede explicarse porque en estos grupos hay evidencia de estrés oxidante y peroxidación lipídica. Esto promueve la generación de AGEs endógenos en los hepatocitos, lo que sugiere que a las 4 semanas este receptor puede participar como uno de los mecanismos en la respuesta aguda que emplea el hígado para capturar, en la membrana, a los precursores de AGEs y posteriormente endocitarlos para su degradación (Castro Díaz, 2020). Este proceso de captura de AGEs está bien documentado que ocurre de manera independiente, tanto en condiciones de hiperglucemia, como por exposición a metales (Sakasai-Sakai, A., et al, 2019; Lai, C.H., et al, 2020; Takeuchi, M., et al, 2021).

Con respecto a la inflamación, anteriormente en el pulmón, posterior a la inhalación de V se reportó infiltrado inflamatorio en el epitelio peribronquiolar, además del incremento en las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α que se asoció con los cambios morfológicos consistentes en el engrosamiento de la capa de músculo liso bronquiolar e hiperplasia epitelial bronquiolar de células no ciliadas (Fortoul, et al 2011). La inflamación pulmonar inicial también puede afectar de manera sistémica, como se ha reportado en otros órganos en el modelo de inhalación de V, lo que hace

recordar que el estrés oxidante promueve la inflamación y ésta a su vez genera mayor estrés oxidante.

Dentro de los mediadores que pueden actuar como activadores de macrófagos se han descrito a las citocinas, proteasas, AGEs, radicales libres y algunos ligandos de RAGE como S100 y HMGB1 (Byun, K. et al 2017). Los macrófagos activados que participan en la respuesta inflamatoria, como las células de Kupffer del hígado, pueden secretar moléculas como interleucinas, óxido nítrico, ROS, productos de oxidación lipídica, AGEs, s100 y HMGB1. Por lo tanto, la activación de macrófagos contribuye al incremento de los ligandos de RAGE y como se mencionó anteriormente este incremento en sus ligandos, promueve la expresión de su receptor. RAGE se puede presentar en las células endoteliales como se observó en los grupos V y V+S debido a que es uno de los sitios donde las proteínas AGE se acumulan además del plasma, el interior de los macrófagos así como en la matriz extracelular (Cárdenas León, 2009).

De acuerdo con Lai, C.H y colaboradores 2020, en un estudio realizado en una población por exposición ocupacional a PM_{2.5} caracterizada por metales, entre ellos el V, se asoció el aumento del biomarcador de inflamación IL-6 en sangre con el incremento de los niveles de RAGE en el organismo, derivado de la formación de AGEs por la exposición a los metales. En este mismo trabajo se concluye que los niveles de metal que se midieron en orina están asociados al aumento de AGE-RAGE en esa población siendo este eje el que llama la atención para estudiar la amplificación de la respuesta inflamatoria debido a que como lo menciona Lai, C.H., et al, 2020 *“una vez que los metales se absorben en el torrente sanguíneo a través de los alvéolos estos podrían acelerar la generación de AGE e interactuar con RAGE*

endotelial, generando la subsiguiente inducción de ROS intracelulares, activación de NFkB, seguida de la activación transcripcional de genes proinflamatorios y la derivación de la cascada oxidativa-inflamatoria”

El planteamiento de Lai C.H., et al 2020 de AGE-RAGE como posible biomarcador para monitorear la contaminación por metales y su contribución a aumentar el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles marca un área de investigación para determinar si este mecanismo participa en la combinación de factores como se evaluó en este proyecto. Los resultados de Cervantes-Valencia, et al en 2021 y los de este proyecto permiten continuar considerando a este eje como uno de los posibles causantes de las alteraciones en el hígado y, para este proyecto en particular, ampliar el tiempo de exposición que considere la formación de AGEs y no solo de sus precursores.

Conclusiones

La inhalación de vanadio y el consumo de bebidas azucaradas son hepatotóxicos evidenciado en la alteración de la morfología del hígado y en la generación de esteatosis hepática contribuyendo al espectro de la progresión de EHGNA.

El efecto de la combinación de variables a las 4 semanas no genera un cambio significativo en la presencia de RAGE en el hígado, por lo que, en este tiempo de exposición, el eje AGE-RAGE aparentemente no tiene un papel importante para explicar el daño morfológico en el hígado. Sin embargo, el cambio de localización del RAGE puede indicar el inicio de la activación de este eje, que se puede estudiar en un tiempo mayor de exposición.

Perspectivas

Las tendencias de incremento de RAGE en los grupos vanadio y de la combinación a las 4 semanas permiten considerar un seguimiento hasta las ocho semanas para conocer si este receptor podría estar involucrado como mecanismo de daño hepático en este modelo.

Realizar pruebas para la identificación de indicadores de generación de AGEs en este modelo.

Medir la concentración de sRAGE en plasma para realizar la comparación entre grupos y determinar si tiene implicaciones en la toxicidad del vanadio y el consumo de bebidas azucaradas.

Realizar un análisis comparativo de la IHQ para RAGE entre poblaciones celulares del hígado.

Referencias bibliográficas

- Acevedo Nava S. (2002) Alteraciones morfológicas en hígado de ratón por inhalación de vanadio. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Adeoye GO, Alimba CG, Oyeleke OB (2015) La genotoxicidad y la toxicidad sistémica de un efluente farmacéutico en ratas Wistar pueden implicar la inducción de estrés oxidativo. *Toxicol Rep* 2: 1265–1272 : <https://www-sciencedirect-com.pbidi.unam.mx:2443/science/article/pii/S2214750015300585?via%3Dihub#bib0080>
- Albarrán Alonso J.C. (2015) Inhalación de vanadio e ingesta de bebidas altas en sacarosa. Estudio de la morfofisiología del páncreas y su relación con los niveles de glucosa en sangre. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alpízar Caballero, L. B. (2013). El síndrome metabólico en niños y adolescentes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42(4), 464-471.
- Amador Muñoz O., Delgado Rodríguez A., Villalobos Pietrini R., Munivecolín Z., Ortiz Marttelo R., Díaz González G., Bravo Cabrera J.L., Gómez Arroyo S. (2001) Partículas Suspendidas, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y Mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México, *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17 (4) 193-204.
- Bacardit N. S., Bargalló E. V., Ugena J. A., Vila L. C. (2018). Contaminación atmosférica, riesgo cardiovascular e hipertensión arterial. *Hipertensión y riesgo vascular*, 35(4), 177-184.
- Barceloux Donald G., (1999) Vanadium, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37: 2, 265-278, DOI: 10.1081 / CLT-100102425
- Byun K., Yoo Y., Son M., Lee,J., Jeong G. B., Park Y. M., Lee B. (2017) Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 177, 44-55.

- Carreras M. P. (2001) Estudio anatomoclínico y fisiopatológico de una serie de 85 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Cano-Gutiérrez G., Acevedo-Nava S., Santamaría A., Altamirano-Lozano M., Cano-Rodríguez MC, & Fortoul TI (2012). Megalocitosis hepática por inhalación de vanadio: participación del estrés oxidativo. *Toxicología y Salud Industrial* , 28 (4), 353-360.
- Cárdenas L. M., Díaz-Díaz E., Argüelles-Medina R., Sánchez-Canales P., Díaz-Sánchez V., Larrea F. (2009). Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento. *Revista de investigación clínica*, 61(6), 505-520.
- Castro Díaz R. (2020). Bioquímica y biología celular de las complicaciones de la hiperglucemia (diabetes tipo II), Tesis, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna.
- Celton-Morizur Séverine, Merlen Grégory, Couton Dominique, Germain Margall-Ducos, Chantal Desdouets, (2009), The insulin/Akt pathway controls a specific cell division program that leads to generation of binucleated tetraploid liver cells in rodents, *J Clin Invest.* 2009;119(7):1880-1887. <https://doi.org/10.1172/JCI38677>. <https://www.jci.org/articles/view/38677>
- Cervantes-Valencia M.E., González-Villalva A., Cano-Gutiérrez G., Albarrán-Alonso JC y Fortoul, TI (2021). Efectos de la inhalación de vanadio y la ingestión de bebidas azucaradas en ratones: cambios morfológicos y bioquímicos en el hígado. *Revista Internacional de Toxicología*. <https://doi.org/10.1177/10915818211030858>
- Contreras-Cadena D.A., Gómez-Pech C., Rangel-García M., Ruiz-Hernández A., Martínez-Bulit P., Barba-Behrens N. (2014), La importancia del vanadio en los organismos vivos, *Educación Química*, Volumen 25, Número E1: 245-253.
- Crowe A. R., Yue W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol.

Bio-protocol, 9(24).

Delgado Coello B. A, Jaime Mas O., (2017), Avances en el estudio experimental de la bioquímica hepática, Instituto de Fisiología Celular UNAM, México, 190 pp.
http://www.ifc.unam.mx/docencia/pdf/bioquimica_hepatica.pdf

Denova-Gutiérrez E., Talavera J., Huitrón-Bravo G., Méndez-Hernández P., Salmerón J. (2010) Consumo de bebidas endulzadas y mayor riesgo de síndrome metabólico en adultos mexicanos. *Nutrición de salud pública*, 13 (6), 835-842.
doi: 10.1017 / S1368980009991145
<https://www.cambridge.org/core/journals/public-health-nutrition/article/sweetened-beverage-consumption-and-increased-risk-of-metabolic-syndrome-in-mexican-adults/6D5634D609BCBD3FF326B9504BFE0681/core-reader>

Díaz-Casasola L., Luna-Pichardo D. (2016). Productos finales de glicación avanzada en la enfermedad cardiovascular como complicación de la diabetes. *Medicina e Investigación*, 4(1), 52-57.

Ding S, Yuan C, Si B, Wang M, Da S, Bai L, et al. (2019) Combined effects of ambient particulate matter exposure and a high-fat diet on oxidative stress and steatohepatitis in mice. *PLoS ONE* 14(3): e0214680. <https://doi.org/10.1371/>

Diario Oficial de la Federación (2017) PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-025-SSA1-2020, Salud ambiental. Criterio para evaluar la calidad del aire ambiente, con respecto a las partículas suspendidas PM10 y PM2.5. Valores normados para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente, como medida de protección a la salud de la población. Recuperado de:
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5601339&fecha=28/09/2020

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018, consultado en:
https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Espinosa-Zurutuza M., González-Villalva A., Albarrán-Alonso J. C., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Rojas-Lemus M., López-Valdéz N., & Fortoul T. I. (2017). Oxidative Stress as a Mechanism Involved in Kidney Damage After Subchronic Exposure to Vanadium Inhalation and Oral Sweetened Beverages in a Mouse Model. *International Journal of Toxicology*, 37(1), 45–52. <https://doi.org/10.1177/1091581817745504>

Flores Molina C., Delgado Jacobo D. P. (2018) Factores asociados al síndrome metabólico en estudiantes de la UNAM. *Psic-Obesidad*, 8(29). Recuperado el 18 de Mayo de 2022 de: <http://revistas.unam.mx/index.php/psic/article/view/80727/71090>

Fortoul T. I., Osorio L. S., Tovar A. T., Salazar D., Castilla M. E., Olaiz-Fernández G. (1996). Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: comparison of cases from the 1950s and the 1980s. *Environmental Health Perspectives*, 104(6), 630-632.

Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., González-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutiérrez G., Ustarroz-Cano M., Muñoz-Rivera-Cambas A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.

Fortoul, T. I., Rodríguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutiérrez, G., Ustarroz-Cano, M., Cervantes-Yépez, S. (2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chimica Acta*, 420, 8-15.

García Lara C.M, Lagunés Quevedo C., Bermúdez Pérez D., Vera Toledo P., Nájera Aguilar H. A., González Herrera R., Vázquez Sánchez R.A., (2015), Medición de partículas atmosféricas en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas utilizando sensores pasivos, *LACANDONIA*, año 9, vol. 9, no. 2: 67-72.

Gentric G., Maillet, V., Paradis V., Couton D., L'hermitte A., Panasyuk G., Desdouets C. (2015) El estrés oxidativo promueve la poliploidización patológica en la enfermedad del hígado graso no alcohólico. *El diario de investigación clínica*, 125 (3), 981-992.

- Goethe Flórez, D. D. (2021) Asociación de la exposición a contaminantes atmosféricos y el síndrome metabólico en adultos: una revisión sistemática y un metaanálisis (Tesis de maestría, Corporación Universidad de la Costa).
- Hosseini M. J., Shaki F., Ghazi-Khansari M., Pourahmad J. (2013) Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics*, 5(2), 152-166.
- Imtiaz M., Rizwan M. S., Xiong S., Li H., Ashraf M., Shahzad S. M., Tu S. (2015) Vanadium, recent advancements and research prospects: a review. *Environment International*, 80, 79-88.
- Indyk D., Bronowicka-Szydelko A., Gamian A. (2021) Productos finales de glicación avanzada y sus receptores en suero de pacientes con diabetes tipo 2. *Sci Rep* 11, 13264. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/s41598-021-92630-0>
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Informe Nacional de Calidad del Aire 2017, México. Coordinación General de Contaminación y Salud Ambiental, Dirección de Investigación de Calidad del Aire y Contaminantes Climáticos. Ciudad de México. Diciembre 2018. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447270/INFORME_NACIONAL_DE_CALIDAD_DEL_AIRE_2017.pdf
- Jensen T., Abdelmalek M. F., Sullivan S., Nadeau K. J., Green M., Roncal C., Johnson R. J. (2018) Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*, 68(5), 1063-1075.
- Jianling Xie, J. D., Méndez-Valenzuela V., Aguilar-Hernández M.M., Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE), *Cellular Signalling*, Volume 25, Issue 11, 2013, Pages 2185-2197, ISSN 0898-6568, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.013>.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656813001885>)
- Kamyar Asadipooya, Kamran B. Lankarani, Rishi Raj, Mohammadreza Kalantarhormozi, (2019), "RAGE is a Potential Cause of Onset and Progression of Nonalcoholic Fatty Liver Disease", *International Journal of Endocrinology*,

vol. 2019, Article ID 2151302, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/2151302>

Klaassen Curtis D., John B. (2001) Watkins Manual de toxicología: la ciencia básica de los tóxicos (5a. Ed.) McGraw-Hill Interamericana.

Krishna M. (2014). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical liver disease*, 2(Suppl 5), 109–112. <https://doi.org/10.1002/cld.287>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6448680/>

Kowalski S., Wyrzykowski D., Inkielewicz-Stępnia I. (2020). Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. *Molecules*, 25(7), 1757.

Lai C. H., Chou C. C., Chuang H. C., Lin G. J., Pan C. H., Chen W. L. (2020). Receptor for advanced glycation end products in relation to exposure to metal fumes and polycyclic aromatic hydrocarbon in shipyard welders. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110920.

Lantz R.C., Lynch B.J., Boitano S., Poplin G.S., Littau S., Tsapraillis G., Burgess J.L. (2007). Biomarcadores pulmonares basados en alteraciones en la expresión de proteínas tras la exposición al arsénico. *Perspectivas de salud ambiental*, 115 (4), 586-591.

Lawes M., Pinkas A., Frohlich B. A., Iroegbu J. D., Ijomone O. M., Aschner M. (2020). Metal-induced neurotoxicity in a RAGE-expressing *C. elegans* model. *NeuroToxicology*, 80, 71-75.

Lizarzaburu Robles, J. C. (2013). Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 74(4), 315-320. Recuperado el 23 de julio de 2020, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009&lng=es&tlng=es.

López Panqueva, R. D. P. (2014) Enfermedad hepática grasa: Aspectos patológicos. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 29(1), 82-88.

López Panqueva, R. D. P. (2014). Aspectos morfológicos de la enfermedad hepática

inducida por drogas. Revista Colombiana de Gastroenterología, 29(4), 449-460.

Maersk M., Belza A., Stodkilde-Jorgensen H., Ringgard S., Chabanova E., Thomsen H., Pedersen S.B., Astrup A., Richelsen B., (2012) Sucrose-sweetened beverages increase fat storage in the liver, muscle and visceral fat depot: a 6-mo randomized intervention study. AM J Clin Nut. 95: p. 283-9.

Méndez Sánchez N., Gutiérrez Grobe Y., Chávez Tapia N. C., Kobashi Margain R. A., Uribe M. (2010). Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. Rev Gastroenterol Mex, 75(2), 143-8.

Mosquera Jesús A. (2010). Papel del receptor para compuestos de glicosilación avanzada (RAGE) en la inflamación. Investigación Clínica, 51(2), 257-268. Recuperado en 26 de octubre de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332010000200007&lng=es&tlng=es.

Myron D. R., Givand S. H., Nielsen F. H. (1977) Vanadium content of selected foods as determined by flameless atomic absorption spectroscopy. Journal of agricultural and food chemistry, 25(2), 297-300.

Neuschwander-Tetri B.A. (2017) Enfermedad del hígado graso no alcohólico. BMC Med 15, 45. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0806-8>

Nnama A.U., Ekeh F.N., Aguzie I.O., Udegbonam S.O., Nwani C.D. (2022) El pentóxido de vanadio induce estrés hematológico, oxidativo y cambios histológicos en *Oryctolagus cuniculus*. Revista de avances en materiales peligrosos , 100048.

Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2014, Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM₁₀ y PM_{2.5} en el aire ambiente y criterios para su evaluación.

Olguin M. C., Posadas M. D., Revelant G. C., Labourdette V., Marinozzi D. O., Venezia M. R., Zingale M. I. (2015) Efectos del consumo elevado de fructosa y sacarosa sobre parámetros metabólicos en ratas obesas y diabéticas. Revista chilena

de nutrición, 42(2), 151-156. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200006>
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S071775182015000200006&script=sci_arttext

Organización Mundial de la Salud (OMS) 2021, WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345329>. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Pérez Carreras M.M, (2001) Estudio Anatomoclínico y fisiopatológico de una serie de 85 pacientes con esteatohepatitis no alcohólica, Tesis de doctorado, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Pérez J. R., Núñez V. M. M. (2007). Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*, 32(2), 58-69.

Pinkas A., Cunha Martins A., Aschner M. (2018) *C. elegans*—An Emerging Model to Study Metal-Induced RAGE-Related Pathologies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(7), 1407. doi:10.3390/ijerph15071407

Ramírez-Vélez R., Ojeda M. L., Tordecilla M. A., Peña J. C., & Meneses J. F. (2016) El consumo regular de bebidas azucaradas incrementa el perfil lipídico-metabólico y los niveles de adiposidad en universitarios de Colombia. *Revista Colombiana de Cardiología*, 23(1), 11-18. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563315000959>

Rodríguez-Mercado J. J., Altamirano-Lozano M. A. (2006) Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 22(4), 173-189.

Rojas-Lemus M., López-Valdez N., Bizarro-Neves P., González-Villalva A., Ustarroz-Cano M., Zepeda-Rodríguez A., Fortoul TI (2021) Efectos tóxicos del vanadio inhalado adherido a partículas: una revisión de la literatura. *Revista*

Internacional de Investigación Ambiental y Salud Pública , 18 (16), 8457.

Ross M. H., Pawlina W., Negrete J. H., & Ross, M. H. (2012). *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular* (6a edición). Editorial Médica Panamericana.

Sakasai-Sakai A., Takata T., Takino J. y Takeuchi M. (2019). La relevancia de la citotoxicidad de los AGE tóxicos (TAGE) para la patogenia de la EHNA: una mini revisión. *Nutrientes* , 11 (2), 462. doi: 10.3390 / nu11020462 <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/2/462/htm>

Sánchez P., Zanabria M., Latorre S., Calvache J., Coy A., Rojas W. (2020). Disruptores endocrinos y su camino hacia el desequilibrio metabólico. *Revista Colombiana De Endocrinología, Diabetes y Metabolismo*, 7(1), 38-42. Consultado de <http://www.revistaendocrino.org/index.php/rcedm/article/view/567>

Sarmiento Ortega V. E. (2021). Tesis: Papel de la inflamación y el estrés oxidativo promovido por la exposición a cadmio sobre el desarrollo de resistencia hepática a insulina, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Shwertheim S., Kälsch J., Jastrow H., Schaefer C. M., Theurer S., Ting S., Canbay A., Wedemeyer H., Schmid K. W. & Baba H. A., (2020) Characterization of two types of intranuclear hepatocellular inclusions in NAFLD, *Scientific Reports, Nature Research*, (2020) 10:16533, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71646-y>

Singh G. M., Micha, R., Khatibzadeh S., Lim, S., Ezzati M., Mozaffarian D., & Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE) (2015). Estimated Global, Regional, and National Disease Burdens Related to Sugar-Sweetened Beverage Consumption in 2010. *Circulation*, 132(8), 639–666. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.010636> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4550496/>

Schmidt A. M., Osamu Hori R. C., Shi Du Y., Jerold Brett J., Satoshi Ogawa K. K.,

- Masayasu Matsumoto D. S. (1996) RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* 45 (Suplemento 3) S77-S80; DOI:10.2337 / diab.45.3.S77 https://diabetes.diabetesjournals.org/content/45/Supplement_3/S77.short
- Sparvero L. J., Asafu-Adjei D., Kang R., Tang D., Amin N., Im J., Lotze M. T. (2009). RAGE (Receptor for Advanced Glycation End products), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *Journal of translational medicine*, 7(1), 1-21.
- Softysik K., Ohsaki Y., Fujimoto T., (2019) Duo in a Mystical Realm—Nuclear Lipid Droplets and the Inner Nuclear Membrane, *Contact Volume 2: 1–11* (2019), DOI: 10.1177/2515256419896965journals.sagepub.com/home/ctc
- Stahl E. C., Haschak M. J., Popovic B., Brown B. N. (2018) Macrophages in the aging liver and age-related liver disease. *Frontiers in immunology*, 9, 2795.
- Takeuchi M., Sakasai-Sakai A., Takata T., Takino J. I., Koriyama Y., Kikuchi C., Matsunaga T. (2021) Intracellular Toxic AGEs (TAGE) Triggers Numerous Types of Cell Damage. *Biomolecules*, 11(3), 387.
- Treviño S., Díaz A., Sánchez-Lara E., Sarmiento-Ortega V. E., Flores-Hernández J. A., Brambila E., Meléndez F. J., González-Vergara E., (2018) Pharmacological and Toxicological Threshold of Bisammonium Tetrakis 4-(N,N-Dimethylamino)pyridinium Decavanadate in a Rat Model of Metabolic Syndrome and Insulin Resistance, *Hindawi, Bioinorganic Chemistry and Applications Vol: 2018*, 13 pp.
- Treviño S., Díaz A., Sánchez-Lara E., Sanchez-Gaytan B. L., Perez-Aguilar J. M., González-Vergara E., (2019) Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus, *Biological Trace Element Research* 188:68–98
- Usende I. L., Alimba C. G., Emikpe B. O., Bakare A. A., Olopade J. O. (2018) Intraperitoneal sodium metavanadate exposure induced severe clinicopathological alterations, hepato-renal toxicity and cytogenotoxicity in

African giant rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse, 1840). *Environmental science and pollution research international*, 25(26), 26383–26393. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2588-8>

Ustarroz-Cano M., López-Ángel M.; López-Valdez N.; García-Peláez I.; Fortoul TI (2019) El efecto de la contaminación atmosférica en el timo. Rezaei, N., Ed.; IntechOpen: Londres, Reino Unido; págs. 103–109.

Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermosillo A.G., Márquez M.F., Cárdenas M. (2003) Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gac Med Mex* 139: 57–63.

Wacher Rodarte, N. (2009). II. Epidemiología del síndrome metabólico. *Gaceta médica de México*, 145(5), 384-391.

Yamagishi S. I., Matsui T. (2015) Role of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in liver disease. *European journal of medical research*, 20(1), 1-7.