

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS Y  
CONDUCTUALES EN HIPOCAMPO  
POR LA EXPOSICIÓN INHALADA A  
VANADIO**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

**HORTENCIA GERALDINE NIÑO CABRERA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA MELBA FORTOUL VAN DER GOES

MÉXICO, D.F.



ENERO, 2005

COORDINACIÓN

m. 33 9829



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN

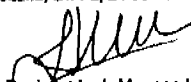
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Nifio Cabrera Hortencia Geraldine, con número de cuenta 90313929 con la tesis titulada: "Alteraciones Morfológicas y Conductuales en Hipocampo por la Exposición Inhalada a vanadio", bajo la dirección del(a) Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes.

Presidente:	Dra. Margarita Virginia González del Piago Olivares
Vocal:	Dra. María Rosa de Lourdes Ávila Costa
Secretario:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dr. Merio Agustín Altamirano Lozano

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a, 24 de noviembre del 2004

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Hortencia Geraldine Nifio Cabrera  
FECHA: 10-01-05  
FIRMA: [Firma]

## RECONOCIMIENTOS

A LA DRA. TERESA I. FORTOUL VAN DER GOES, POR TODO SU APOYO.  
A LA DRA. MARGARITA GONZÁLEZ DEL PLIEGO OLIVARES, AL DR.  
MARIO ALTAMIRANO LOZANO, AL DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA Y  
A LA DRA. MA. ROSA AVILA COSTA. POR EL TIEMPO DEDICADO A LA  
REVISIÓN Y COMENTARIOS DE ESTE TRABAJO.

A LA M EN C. PATRICIA BIZARRO NEVARES, A FRANCISCO PASOS  
NÁJERA Y A VICTOR DELGADO POR SU APOYO TÉCNICO EN LA  
REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

A JOSÉ SANABRIA, POR SU AYUDA TÉCNICA EN EL CUIDADO DE LOS  
RATONES QUE SE UTILIZARON EN EL PRESENTE TRABAJO.

A LAURA COLÍN BARENQUE POR HABERME ENSEÑADO LAS TÉCNICAS DEL  
LABORATORIO.

POR EL APOYO RECIBIDO DE CONACyT CON EL NÚMERO DE REGISTRO DE  
BECARIO: 172448.

POR EL APOYO QUE LA DGEP ME DIO AL SER BENEFICIARIA DE SU  
BECA.

AL PROYECTO QUE FINANCIÓ LA TESIS: PAPIIT IN 210301.

## INDICE

1. Introducción	1
1.1. Historia	1
2. Antecedentes	2
2.1. Vanadio	2
2.2. Abundancia y distribución	2
2.3. Usos	3
2.4. Toxicodinamia	4
2.5. Toxicocinética	5
2.5.1. Absorción	5
2.5.2. Distribución	5
2.5.3. Eliminación	5
2.6. Efectos del vanadio	6
2.6.1. Toxicidad	6
2.6.2. Hipocampo y exposición a vanadio	9
2.7. Organización anatómica y funcional del hipocampo	10
2.7.1. Espinas dendríticas	12
2.7.2. Sinapsis perforadas	13
2.7.3. Conexiones sinápticas en el hipocampo	14
2.7.4. Sinapsis de las colaterales de Schaffer	15
2.7.5. Neurotransmisión	16
2.7.6. Memoria	16
2.7.7. Potenciación a largo plazo	17
3. Justificación	20
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	21
5.1. Objetivos particulares	21
6. Método	22

6.1. Fase de entrenamiento en el Laberinto de agua de Morris	22
6.2. Procedimiento de Inhalación	24
6.3. Prueba de memoria espacial	25
6.4. Sacrificio de los animales	26
6.5. Procedimiento para el análisis citológico	26
6.6. Procedimiento para el análisis Ultraestructural	26
7. Resultados	28
7.1. Memoria espacial	28
7.2. Análisis Citológico	30
7.3. Análisis Ultraestructural	36
8. Discusión	45
8.1. Memoria espacial	45
8.2. Pérdida de espinas dendríticas	45
8.3. Sinapsis Perforadas	47
8.4. Muerte Neuronal	49
8.5. Relación Exposición-Efecto	50
9. Conclusiones	51
10. Referencias	52

## RESUMEN

El vanadio es un metal de transición el cual es liberado a la atmósfera en partículas suspendidas como consecuencia de la combustión de productos derivados del petróleo.

Individuos expuestos laboralmente a vanadio padecen alteraciones neurológicas como son disminución de habilidades viso-espaciales y de atención. Se ha señalado que la intoxicación en humanos se manifiesta como temblor y depresión del sistema nervioso central. También se han observado desórdenes motores y de aprendizaje en ratas expuestas a este metal; sin embargo no hay datos de las posibles alteraciones morfológicas en el hipocampo que pueda inducir el pentóxido de vanadio, así como de su correlación con la memoria espacial.

En este estudio se utilizaron 36 ratones macho de la cepa CD-1, de los cuales 30 fueron entrenados nueve días para encontrar una plataforma en el laberinto de agua de Morris para evaluar la memoria espacial. Los animales del grupo experimental fueron expuestos a pentóxido de vanadio, por vía inhalada a una concentración de 0.02 M; los 6 animales restantes inhalaron agua destilada. Tanto los ratones controles como los experimentales se sacrificaron 24 horas después de 1, 2, 4, 6 y 8 inhalaciones. De los dos grupos, se obtuvieron los hipocampos del área CA1, los de un hemisferio fueron procesados mediante la técnica rápida de Golgi y los hemisferios contralaterales se procesaron mediante la técnica ordinaria para microscopía electrónica. El análisis citológico consistió en el conteo del número de espinas de las dendritas secundarias en un área de 20  $\mu\text{m}$  de 5 dendritas secundarias tomadas de 20 neuronas de hipocampo CA1 de cada animal. El análisis ultraestructural, consistió en analizar 50 contactos sinápticos y contabilizar las sinapsis perforadas y el tipo de muerte celular. Los animales control, no mostraron cambios en ninguna de las variables analizadas. El vanadio provocó alteraciones en la memoria espacial, así como alteraciones citológicas que consistieron en una disminución en el número de espinas de las dendritas secundarias a medida que incrementaban las inhalaciones. Así mismo, se observaron alteraciones ultraestructurales como disminución de las sinapsis perforadas y muerte celular por necrosis. Los resultados indican que el daño producido por el pentóxido de vanadio en el hipocampo dorsal está relacionado con alteraciones en la memoria espacial, lo cual es característico de procesos neurodegenerativos, por lo tanto este es un modelo de inhalación, que permite estudiar este tipo de patologías.

## SUMMARY

Vanadium is a transition metal which is liberated to the atmosphere in suspended particles as a consequence of fuel combustion.

Workers exposed to vanadium suffer from neurological alterations such as: decrease in visuospatial abilities and attention and motor and learning disorders; however there are no data of the morphological alterations in the hippocampus that V might induce, as well as its correlation with the spatial memory.

Thirty six CD-1 male mice, were trained nine days to find an escape platform in the Morris water maze in order to evaluate spatial memory. Experimental group (n= 30) was exposed by inhalation to vanadium pentoxide (0.02 M). Six control animals inhaled only distilled water. Both groups were sacrificed at 24 h and after 1,2,4,6 and 8 inhalations. Hippocampus area CA1 was obtained from each animal and one hemisphere was processed for Golgi technique, and the other one was processed for TEM. Cytological analysis consisted in counting spines of the secondary dendrites in 20  $\mu$  of 5 secondary dendrites, from 20 CA1 hippocampus neurons. Ultrastructural study consisted on the analysis of 50 synaptic contacts, the count of perforated synapses and the presence of cell death. Control animals did not show changes in none of the analyzed variables. Vanadium induced alterations in space memory, and cytological alterations that consisted in a decreased number of dendritic spines which correlated with time of exposure, likewise ultrastructural alterations such as decrease in perforated synapses and necrosis. Results indicated that the alterations induced by vanadium in the dorsal hippocampus were related with spatial memory alterations which are characteristic of neurodegenerative processes.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. HISTORIA

El vanadio fue descubierto en 1802-1803 por Don Andrés Manuel del Río en México a partir del mineral de plomo pardo (vanadinita) llamado "pancromio", un nombre referido a la variedad de colores que el vanadio despliega cuando pasa por diversos estados de oxidación. Del Río lo rebautizó "eritronio" porque "las sales del nuevo elemento se tornan rojas cuando se tratan con fuego y ácidos". Poco después de su descubrimiento, del Río quedó aparentemente convencido de que tan solo había hallado una nueva forma del cromo, y se desdijo de su descubrimiento. El elemento fue redescubierto por el químico sueco N. G. Sefstrom en 1831, en minerales de hierro del sur de Suecia y lo llamó "vanadin" (vanadio) en honor de Vanadis, la diosa de la belleza de los antiguos arios. En el mismo año, Wohler estableció la identidad del eritronio como vanadio (Guevara, 1996; Tsiani y Fantus, 1997).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. VANADIO**

El vanadio es un elemento químico de símbolo V, su número atómico es 23, su peso atómico 50.942. El vanadio es poco soluble, sus estados de oxidación van desde -1,0,+2,+3,+4,+5 y los más comunes son +3,+4 y +5, siendo el más estable +4 (IPCS, 1990; Leonard y Gerber, 1994; Guevara, 1996; Nriagu, 1998; Wang y cols., 2001).

Es un elemento que se encuentra naturalmente en el ambiente como un metal blanco grisáceo, se encuentra generalmente en forma de cristales. El vanadio puro no tiene olor. Generalmente se combina con otros elementos tales como oxígeno, sodio, azufre o con cloruro. El vanadio y sus compuestos se encuentran en la corteza terrestre y en las rocas, en ciertos minerales de hierro y en depósitos de petróleo crudo (Lenntech, 2004).

### **2.2. ABUNDANCIA Y DISTRIBUCIÓN**

El vanadio es un elemento o metaloide muy difundido mundialmente, que conforma el 0,015% de la corteza terrestre. Las mayores reservas se hallan en Sudáfrica (42,2%), Rusia (39,2%) y China (12,7%). La concentración de vanadio en el agua oscila, según el lugar, entre 0,2 y 100  $\mu\text{g/l}$  en el agua dulce y entre 0,2 y 29  $\mu\text{g/l}$  en el agua de mar. La presencia de vanadio en el carbón y petróleo crudo varía de 1 a 1.500 mg/kg (OMS, 1987). Algunos reportes refieren que el petróleo mexicano, tipo "Maya" crudo contiene 243 ppm de vanadio (Nriagu y cols., 1998).

Se estima que se liberan anualmente al ambiente cerca de 65.000 t de vanadio por acción de emisores naturales (volcanes, etc.), unas 200 000 t por acción antrópica, (Lenntech, 2004),

principalmente por la incineración de combustibles de petróleo, (Eckardt, 1971; Sokolov, 1986) como son el diesel (Kleinman y cols., 1977; Levy y cols., 1984) y la gasolina. Este metal permanece largo tiempo en el aire, el agua o el suelo, no se disuelve muy bien en agua, y se combina con otros elementos y partículas (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2004). Se ha medido la cantidad de pentóxido de vanadio cercano a las fundidoras y se encuentra en concentraciones de 0.89 a 1.49 mg/m<sup>3</sup>. En el aire, la fuente natural son los aerosoles marinos y el polvo continental (0.001 a 0.002 mg/m<sup>3</sup>); en zonas rurales se encuentra con valores que van de 2 a 64 ng/m<sup>3</sup>. Este elemento se encuentra en la capa de la corteza terrestre en una concentración aproximada a los 0.05 g /Kg. (IPCS, 1990).

### **2.3. USOS**

El vanadio se emplea en un 90% combinado con otros metales formando aleaciones (80% como ferrovandio y 9% como compuestos no ferrosos en la industria aeroespacial). El vanadio en la forma de óxido de vanadio es un componente de un tipo especial de acero usado en partes de automóviles, resortes y rodamientos, en la producción de herramientas de acero para el campo, así como un elemento en materiales superconductores, para obtener amalgamas de hierro, en plantas generadoras de energía y por algunas otras actividades industriales; también algunos minerales contienen este elemento como en el caso del uranio (Paschoa y cols., 1987). El óxido de vanadio puede tomar la forma de un polvo amarillo anaranjado, con escamas color gris oscuro o cristales amarillos. El vanadio se mezcla con hierro para manufacturar partes para motores de aviones (Lenntech, 2004; Nriagu, 1998). El metal en estado puro se utiliza como cubierta para barras radiactivas. Se

aplica también como catalizador, especialmente el  $V_2O_5$  en la producción de ácido sulfúrico. Pequeñas cantidades de vanadio se utilizan para manufacturar caucho, plásticos, cerámicas y otros productos químicos (Lenntech, 2004).

#### **2.4. TOXICODINAMIA**

Se ha reportado que el vanadio entra a las células por un sistema de transporte aniónico, donde el glutatión reduce al pentóxido de vanadio a vanadil, siendo este último no reactivo relativamente (Barceloux, 1999). Tiene la capacidad de oxidarse, ya que interfiere con las enzimas que contienen fosfato (ATP fosfotransferasas, adenilato kinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, ribonucleasa, etc.). El incremento de la fosforilación de la proteína por vanadato puede ser contabilizado por la inhibición de fosfoprotein-fosfatasa (Krivanek, 1984), la cual estimula la fosforilación de proteínas endógenas de preparaciones de membranas sinaptosomales de cerebro de rata (Krivanek, 1984), también se ha observado que es un inhibidor no competitivo de la ATPasa  $Na^+/K^+$  (Barceloux, 1999; Sharma, 1986) y la glucosa-6-fosfatasa (Sharma, 1986), tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Bogden y cols., 1982; Higashino y cols., 1983; Krivanek, 1984.), sugiriendo que el vanadato puede tener un rol fisiológico en la regulación de esta enzima (Higashino y cols., 1983), además de inhibir la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico y varias fosfotransferasas (Krivanek, 1984), por lo que es posible que la inhibición de la actividad de la ATPasa por vanadato mantenga alta la concentración de ATP (Krivanek, 1984; Sharma, 1986; Macara, 1980; Horn, 1989).

## 2.5. TOXICOCINÉTICA

### 2.5.1. ABSORCIÓN

Por vía inhalada puede absorberse hasta el 25% del vanadio soluble, se sabe que los componentes de vanadio soluble incluyendo el  $V_2O_5$  se absorbe después de la instilación en los pulmones (Barceloux, 1999; IPCS, 1990). Por vía oral casi no se absorbe y lo poco que pasa al torrente es eliminado por orina (IPCS, 1990). Una vez dentro del organismo, se ha reportado que el vanadato *in vivo* es reducido rápidamente a vanadil por una reductasa dependiente de NADH (Sharma, 1986).

### 2.5.2. DISTRIBUCIÓN.

El vanadio se transporta en el plasma, la distribución desde la sangre es rápida (aproximadamente de 1.5 a 1 hr.), incrementando las concentraciones de vanadio inicialmente en riñones, hígado, bazo y hueso. Aproximadamente el 90% de vanadio en la sangre se encuentra en el plasma, unido a vanadil por transferrina y albúmina (Barceloux, 1999; Cortizo y cols., 2000). Se ha reportado que la concentración de vanadio en el cerebro es aproximadamente del 5% de la concentración en sangre (Barceloux, 1999; Bogden y cols., 1982).

### 2.5.3. ELIMINACIÓN

La principal ruta de eliminación del vanadio es mediante la excreción de la orina aproximadamente del 90% y el restante es excretado por las heces (Barceloux, 1999).

La excreción de vanadio es relativamente rápida y en estudios realizados en animales indican que los riñones excretan alrededor de 40-60% de la dosis de vanadio en 1-3 días de la absorción. La vida media de vanadio en la orina es de 20-40 hrs. Aunado a esto se sabe que la eliminación de óxidos de vanadio es bifásico con una tasa rápida de 10-20 hrs. Y una fase terminal larga de 40 a 50 días (Barceloux, 1999; IPCS, 1990; Roshchin y cols., 1980).

## **2.6. EFECTOS DEL VANADIO**

La mayor acumulación de vanadio en los seres humanos tiene lugar a través de los alimentos como son el trigo, semilla de soya, aceite de oliva, aceite de girasol, manzanas y huevos, no obstante, normalmente inhalamos cerca de 1 mg de vanadio por día (French y Jones, 1993). En total recibimos cerca de 10-70 mg de vanadio diariamente, como resultado de la combustión del petróleo y sus derivados como el carbón, aceites pesados (aceite crudo y carbón fósil), y durante la generación de electricidad y calor (IPCS, 1990).

### **2.6.1. TOXICIDAD**

La toxicidad por vanadio depende de la ruta de administración, la dosis y el componente particular ya que el vanadio en su forma pentavalente es más tóxico (Barceloux, 1999), por lo que los efectos de este elemento están caracterizados por un gran espectro funcional y bioquímico (Syed Saleem Haider y cols., 1998), encontrando daños leves como conjuntivitis, rinitis, diarrea, irritación de piel y mucosas ( $0,1 \text{ mg/m}^3$  después de 8 horas (Horn, 1989); efectos moderados como síntomas y signos gastrointestinales, rash o eczema, etc, (Barceloux, 1999; Horn, 1989). Los síntomas de intoxicación por exposición crónica son:

bronquitis, neumonía, anemia, lesiones hepáticas y renales (concentraciones de 0,1 - 0,4 mg/m<sup>3</sup> por vía respiratoria) durante 10 años pueden generar cambios en las mucosas nasales, bronquitis crónica y decoloración de la lengua o lengua verde (Horn, 1989).

En cuanto a la toxicidad en el sistema nervioso central, se han observado alteraciones por exposición laboral, (Donald y cols., 1988; Golub y cols., 1989), presentándose cefalea, debilidad, náuseas, vómito, alteraciones en los reflejos y excitabilidad neuromuscular manifestada como temblor fino de los dedos y manos (Nriagu, 1998).

En el sistema nervioso el vanadio entra a la célula por medio de acarreadores o transportadores aniónicos inespecíficos; en donde es reducido por NADH, glutatión y otros reductores intracelulares, pero puede ser oxidado nuevamente por la mitocondria (Svoboda y cols., 1984).

En trabajadores expuestos a pentóxido de vanadio se ha observado que este puede inducir trastornos afectivos (WHO, 1988), ya que al mismo tiempo que la actividad de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de eritrocitos está disminuida, se presenta un 50% de incremento en la concentración de vanadato en plasma, por lo que se ha sugerido que el incremento de vanadio puede ser un factor etiológico causante de síndromes maniaco-depresivos, ya que se observó que en el cerebro el vanadio es un inhibidor efectivo de esta enzima, tanto en su forma oxidada como en la reducida y la terapéutica por medio de litio, ascorbato y antidepresivos, fueron efectivos en el restablecimiento de la actividad de esta enzima (Svoboda y cols., 1984; Naylor, 1983; Conri y cols., 1986). También se ha reportado la presencia de vanadio en el cabello de pacientes que padecen manías (Sánchez y cols., 1998), observando que las

concentraciones de vanadio en sangre disminuyen durante la recuperación de las enfermedades maniaco-depresivas (Barceloux 1999).

Estudios realizados en humanos que reportaban exposición laboral a vanadio, mostraron que este metaloide puede inducir deterioro neuro-conductual, disminuyendo las habilidades viso-espaciales y de atención (Barth y cols., 2002).

En cuanto a alteraciones observadas en modelos animales, Sánchez y colaboradores en 1998 reportaron que posterior a dos meses de administración de metavanadato de sodio vía oral en ratas, disminuía en forma significativa tanto la actividad motora general como el aprendizaje y la memoria.

A nivel bioquímico se han reportado alteraciones en el sistema nervioso central causadas por el vanadato que es un oxidante activo en condiciones fisiológicas, induciendo peroxidación lipídica en las aminas biogénicas como la noradrenalina (NE), dopamina (DA) y serotonina (5-HT), (Sharma, 1986; Syed Saleem Haider y cols., 1998; Vera Adam-Vizi y cols., 1980). También se ha observado un incremento de la peroxidación lipídica en el cerebro de ratón y rata por este metaloide (Vera Adam-Vizi y cols., 1980).

Haider y colaboradores en 1998, observaron que tras la administración intraperitoneal de metavanadato de sodio por 12 días se altera el metabolismo de los lípidos y la concentración de proteínas y peroxidación lipídica en el mesencéfalo, cerebelo, cuerpo estriado y corteza cerebral, también se ha reportado la acción protectora del  $\alpha$ -tocoferol contra la peroxidación lipídica estimulada por vanadio en estas estructuras. Aunado a esto, en



este estudio se observó que los constituyentes de fosfolípidos de la vaina de mielina son peroxidados (Syed Saleem Haider y cols., 1998).

Se ha reportado que la administración oral de ortovanadato de sodio por 30 días produjo alteraciones en la vía adrenérgica en el cerebro de rata. Estos mismos autores observaron que las concentraciones de NE y su producto metabólico el ácido vanilmandélico (VMA) se redujeron en el hipotálamo, región con altas concentraciones de estos químicos; aunado a esto se reporta una tendencia general de depleción de NE en varias regiones, como el mesencéfalo y estriado (Vera Adam-Vizi y cols., 1980).

Catalán y colaboradores en 1987, observaron por medio de cromatografía, que el vanadato es capaz de modificar el metabolismo de los lípidos alterando el radio de los fosfolípidos, provocando alteraciones en la fluidez de la membrana, incluyendo su viscosidad, modulando los efectos en las funciones de transporte, actividad enzimática e interacciones hormona-receptor.

Recientemente en nuestro laboratorio se reportó pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y la consecuente disminución de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado después de la inhalación de pentóxido de vanadio (Avila-Costa y cols., 2004).

#### 2.6.2. HIPOCAMPO Y EXPOSICIÓN A VANADIO

Nuestro interés por estudiar el hipocampo se debe a la vulnerabilidad que presenta esta estructura ya sea en condiciones patológicas como experimentales, especialmente el área CA1. Esta situación nos lleva a suponer que pueden existir alteraciones de

la memoria inducidas por la inhalación de pentóxido de vanadio, ya que hasta ahora no se han hecho estudios en roedores que involucren a esta estructura del sistema nervioso y estudien los efectos causados por la inhalación del metaloide.

## **2.7. ORGANIZACIÓN ANATÓMICA Y FUNCIONAL DEL HIPOCAMPO**

El hipocampo se encuentra en la base del lóbulo temporal y se conecta profusamente con otras estructuras corticales y subcorticales. Se sabe que es la única estructura que participa en funciones relativas a la memoria reciente (Brailowsky, 1995). Aunado a esto el hipocampo constituye sólo una parte del sistema límbico y se relaciona con aspectos emocionales relativos a la supervivencia del individuo y de la especie, así como respuestas vegetativas. También se le ha considerado como la más compleja de las áreas de asociación supramodal, ya que esta estructura recibe e integra información de todas las modalidades sensoriales (Brown y Zador 1990).

El hipocampo se divide principalmente en cuatro regiones (CA) 1 - 4 que en conjunto se denominan Cuerno de Ammon, donde las regiones CA1 y CA3 constituyen la mayor parte de esta estructura. Las regiones de esta estructura (CA 1-4) están compuestas de manera general por tres capas que son el estrato oriens, estrato piramidal y estrato lacunoso molecular (Brown y Zador; 1990), y el área entre el giro dentado y el estrato granuloso de la región CA3 es llamado hilus, las células de estas áreas tienen extensas proyecciones partiendo de CA3 hacia CA1 y posteriormente al giro dentado, (Ver figura 1), formando una circuitería reverberante (Sherpherd, 1998), es decir, la información recircula a través de esta vía (Johnston y Amaral, 1998), (Ver figura 2).

Las principales células del hipocampo son las neuronas piramidales, sus cuerpos celulares son cónicos (piramidales), de 20-40  $\mu\text{m}$  en la base y 40-60  $\mu\text{m}$  de alto; cada una tiene una dendrita apical gruesa de 5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro que pasan a través del estrato radiado al estrato lacunoso-molecular; poseen varias dendritas basales con un diámetro de 3-6  $\mu\text{m}$  las cuales poseen espinas dendríticas. La morfología de las células piramidales varía gradualmente, procediendo desde la región CA3 a la región CA1, el cuerpo de las células se vuelve más pequeño y las dendritas apicales más largas, más delgadas y más regulares en el patrón de sus ramificaciones (Shepherd, 1996) y son las neuronas que se analizarán en el presente trabajo, (Ver figura 1).

Las principales neuronas del giro dentado son las células granulares, sus cuerpos son considerablemente más pequeños que las piramidales con 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, sus dendritas se extienden perpendicularmente desde la capa granular a la capa molecular (Brown y Zador, 1990).

Las neuronas intrínsecas o interneuronas son neuronas sin espinas y con axones restringidos al área en donde se encuentran sus somas y liberan GABA, entre estas se encuentran las células en cesta en donde los axones de estas células inervan los somas de las células granulares en el giro dentado. Las interneuronas del hipocampo tienen sus somas neuronales cerca o dentro de la capa piramidal y son clasificadas de acuerdo a su blanco postsináptico: células axo-axónicas, estableciendo contactos sinápticos con los segmentos iniciales de los axones de las neuronas piramidales, modificando la acción inicial del potencial de acción. Las células en cesta hacen sinapsis con los somas de

las neuronas piramidales y células en candelabro establecen sinapsis con las dendritas apicales y basales de las neuronas piramidales, en donde la gran mayoría de las interneuronas GABAérgicas también contienen y liberan péptidos neuroactivos (Brown y Zador, 1990).

### 2.7.1. ESPINAS DENDRÍTICAS

Son pequeñas proyecciones sobre la superficie dendrítica (Sorra y cols., 1998), formando objetivos principales post-sinápticos de las sinapsis glutamatérgicas, tienen un volumen aproximado de  $0.01-1 \mu\text{m}^3$  y un diámetro aproximado de  $0.1 \text{ mm}^3$  en el cuello de la espina (Harris y Kater, 1994). Estas espinas se caracterizan por ser compartimientos químicos que parcialmente aíslan su citoplasma de la dendrita y estas pueden detectar individualmente las coincidencias temporales de la actividad pre y postsináptica, sirviendo como unidades funcionales básicas de la integración neuronal (Shepherd, 1996). Se pueden distinguir por la composición de sus organelos, como el retículo endoplásmico liso que forma el aparato espinoso, vesículas, cuerpos multivesiculares o polirribosomas, también poseen canales de calcio en la cabeza, siendo estas un reservorio para este elemento (Shepherd, 1996).

Por otra parte se ha observado que ante procesos patológicos disminuye el número de espinas de las neuronas piramidales del hipocampo en el área CA1 como en la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia, provocados por los altos niveles de glutamato tanto *in vivo* como *in vitro* causando regresión de espinas dendríticas inducida por un influjo de calcio (Desmond y Levi, 1990; Geinisman y cols., 1992; Mattson y cols., 1989), sin embargo, el número de espinas puede aumentarse ante mecanismos de plasticidad

cerebral como en el caso de la memoria y el aprendizaje (Shepherd, 1998; Johnston y Amaral, 1998; Sorra y cols., 1998). Estas estructuras poseen propiedades críticas para el procesamiento eficaz de la información, así como para los cambios plásticos lentos inherentes a la memoria y aprendizaje.

#### 2.7.2. SINAPSIS PERFORADAS

Calverley y Jones en 1987 han propuesto que las sinapsis perforadas son intermediarios estructurales en la plasticidad sináptica, y también en eventos que involucran mecanismos de memoria y aprendizaje (Petit, 1988). Se ha reportado que las sinapsis perforadas aumentan en número durante el desarrollo (Itarat y Jones, 1992) y bajo varias condiciones experimentales tales como ambientes complejos (Sirevaag y Greenough, 1985), entrenamiento conductual (Vrensen y Nuñez, 1981), estimulación eléctrica repetitiva (Geinisman y cols., 1992) y alteraciones hormonales (Hatton y Ellisman, 1982).

De acuerdo con Calverley y Jones en 1987 las sinapsis perforadas poseen las siguientes características: el sitio de perforación se proyecta hacia adentro de la terminal presináptica; la zona activa posee uno o más componentes curvados, los cuales están separados por una región central de la zona activa que se proyecta dentro de la terminal presináptica; la densidad presináptica está estrechamente asociada con el aparato espinoso o a una extensión de él.

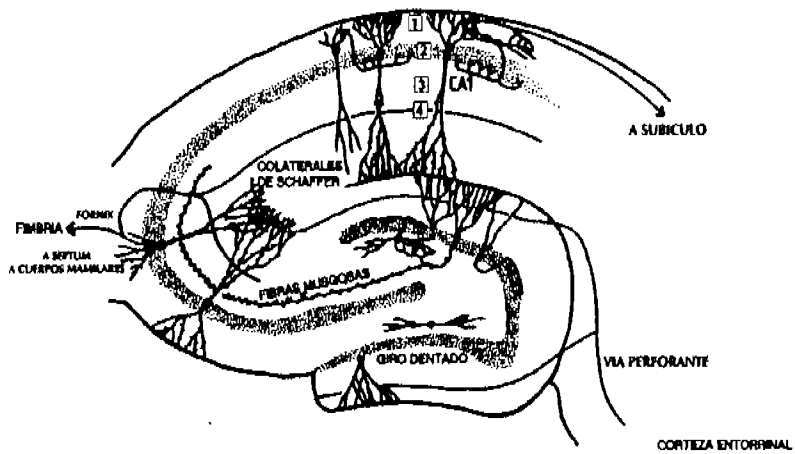


Figura 1. Esquema de un corte sagital de hipocampo de rata. Elementos neuronales de la formación hipocampal. El hipocampo en CA está dividido en estrato oriens (1), estrato piramidal (2), capa de cuerpos neuronales, estrato radiado (3), y estrato lacunoso molecular (4), (Brown y Zador, 1990).

También se ha sugerido que un complemento preservado de las sinapsis perforadas hipocampales se requiere para el mantenimiento de la memoria espacial durante el envejecimiento (Geinisman y cols., 1992).

### 2.7.3. CONEXIONES SINÁPTICAS EN EL HIPOCAMPO

Las conexiones sinápticas en el hipocampo son generalmente axoespinosas, axodendríticas, y en menor proporción axoaxónicas (Brown y Zador, 1990).

## CONEXIONES HIPOCAMPALES

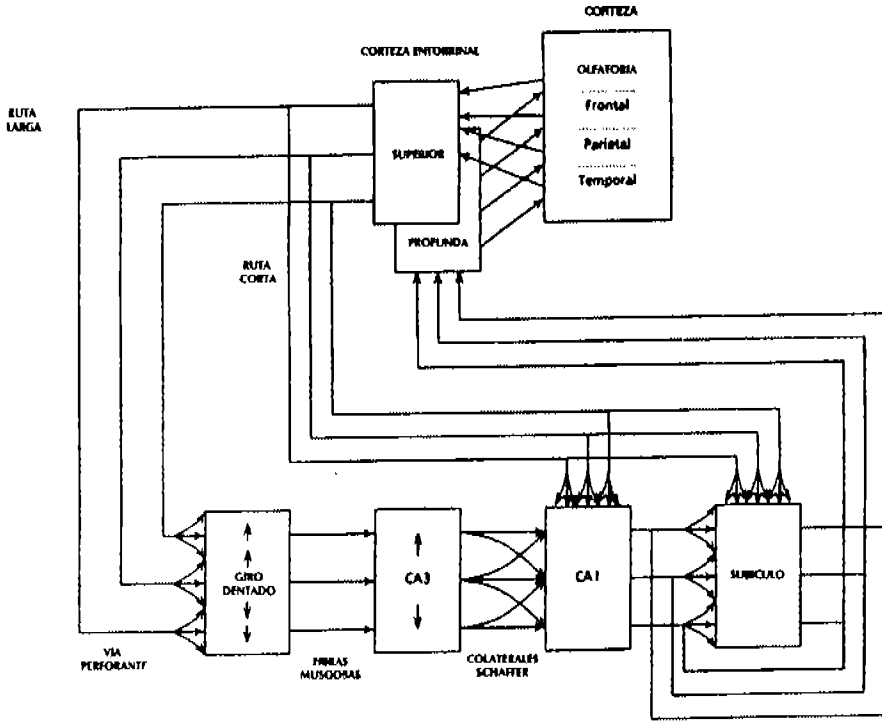


Figura 2. Diagrama esquemático de las conexiones bidireccionales de la información entre las áreas corticales de asociación y los componentes del sistema hipocampal, aunado a las conexiones hipocampales con áreas subcorticales. Nótese la interacción del área CA1 con diversas estructuras. El circuito que conforma el hipocampo permite una reverberación de la información (Cohen y Eichenbaum, 1993).

### 2.7.4. SINAPSIS DE LAS COLATERALES DE SCHAFFER

Los axones de las colaterales de Schaffer de las neuronas piramidales de la región CA3 están parcialmente mielinizadas, de cada nodo emergen de uno a tres axones desmielinizados y se desvían para alinearse paralelos a las fibras de origen, las

cuales hacen contacto con espinas dendríticas (Brown y Zador, 1990).

Las sinapsis de las colaterales de Schaffer se caracterizan por su membrana asimétrica gruesa y su contenido de vesículas redondas. Las sinapsis de las colaterales de Schaffer son generalmente sobre espinas dendríticas (Brown y Zador, 1990).

#### 2.7.5. NEUROTRANSMISIÓN

Un gran número de neurotransmisores y neuromoduladores han sido estudiados en el hipocampo. El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante y el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en esta estructura, los cuales están distribuidos en todo el hipocampo; también se encuentran varios neuromoduladores como algunos opioides, serotonina y el péptido intestinal vasoactivo VIP (Bayer, 1985).

#### 2.7.6. MEMORIA

Cuando hablamos de memoria nos referimos a una serie de aprendizajes y contenidos adquiridos de manera sensorial, estos son mantenidos en el cerebro y pueden ser evocados posteriormente. Este proceso sigue un orden establecido, en el cual el primer paso es la adquisición de la información por medio de los sentidos y las cortezas sensoriales primarias, para así posibilitar su asimilación; el siguiente paso es la realización de una imagen cerebral del conocimiento adquirido para su consolidación; una vez cumplido lo anterior se crea un "archivo de almacenaje" del cual pueden ser evocados estos conocimientos o aprendizajes (Kandel y Schwartz, 1985).



La memoria se clasifica en tres tipos; la denominada memoria inmediata, en la que el individuo es capaz de guardar cierta información y evocarla dentro de un periodo limitado, que puede durar algunos minutos, así mismo, se cree que la corteza de asociación auditiva interviene en este proceso. Otro tipo de memoria es la de corto plazo, que se le relaciona con la porción profunda del lóbulo temporal. En esta memoria se almacena información de mayor grado de complejidad y durante un mayor periodo de tiempo, hasta 1 hora; por último la memoria de largo plazo es capaz de almacenar grandes cantidades de información por extensos periodos de tiempo, que van desde años hasta décadas (Purves y cols., 2001). La razón de este almacenamiento, parece ser el robustecimiento de ciertas sinapsis por medio de un mayor acopio de calcio en las neuronas post-sinápticas piramidales, esto se denomina potenciación a largo plazo (LTP), (Shepherd, 1998). De manera experimental se ha visto que el hipocampo y la corteza adyacente de los lóbulos temporales mediales, así como la corteza frontal tienen un papel activo en el ordenamiento de la memoria de largo plazo (Kandel y Schwartz, 1985; Brown y Zador, 1990; Cammarota y cols., 2000).

#### 2.7.7. POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO (LTP).

La LTP es un mecanismo fisiológico en el que participan ciertas formas de aprendizaje y memoria. En donde se ha observado que el receptor glutamatérgico NMDA está implicado en este proceso. Este posee un canal heterométrico, compuesto por subunidades NR1, NR2 y NR2A-D. Se ha reportado que el NR1 en CA1 es importante en la adquisición de la memoria espacial y en menor medida NR2B y A, ya que estas proteínas son esenciales para el funcionamiento del canal porque regulan la separación o dependencia del  $Mg^{2+}$  (Cammarota y cols., 2000).

El estudio de la memoria hipocampal se basa en dos puntos generales

1. Algunos tipos de representaciones organizadas de estímulos múltiples dependen de la función hipocampal.
2. Evidencias experimentales indican que el hipocampo está críticamente relacionado con la organización de la memoria espacial y no espacial, y de manera particular en la habilidad de expresar la memoria de manera flexible; es decir, en la resolución de nuevos problemas (Beggs y cols., 1999).

Existen diferentes pruebas estandarizadas para evaluar la memoria después de alguna manipulación experimental, un ejemplo de estas es el laberinto de agua de Morris. En esta prueba, los roedores son entrenados para encontrar una plataforma de escape sumergida justo debajo de la superficie del agua, en una pila de agua turbia. Como no existen pistas del sitio de escape, el roedor debe de aprender su ubicación basándose en relaciones espaciales de pistas que pueden verse fuera de la pila de agua. Los roedores con daño hipocampal, se encuentran severamente disminuidos en sus capacidades para realizar esta prueba. Esta prueba ha sido de gran utilidad al formular las teorías actuales de la función hipocampal en animales (Beggs y cols., 1999).

Los cambios cognitivos que siguen a una lesión hipocampal, proveen de una gran evidencia de que el hipocampo y estructuras relacionadas son críticas para el procesamiento normal de la memoria.

Estudios en roedores muestran que el efecto del daño hipocampal, es la alteración de la función de memoria reciente en los

diferentes comportamientos concluyendo que los sistemas hipocampales dañados están imposibilitados en muchos tipos de exploración espacial y aprendizaje (Beggs y cols., 1999).

Por lo antes mencionado, se propone que la inhalación del vanadio constituye una agresión al hipocampo, que podría ocasionar alteraciones funcionales y morfológicas debidas a las características de este metal.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La exposición de la población al vanadio es el resultado de la combustión del petróleo y sus derivados como el carbón fósil, aceites pesados, y así también como efecto de la generación de electricidad. Aunado a esto, se sabe que el vanadio ha aumentado en la ciudad de México aproximadamente en un 23% de acuerdo con un estudio realizado por Fortoul y colaboradores en 2002 en tejido pulmonar obtenido de necropsias de personas que vivieron en la década de los 90's, comparadas con las de personas que vivieron en los 60's. Por otra parte, no existen estudios en los que la vía de inhalación sea evaluada como una ruta de ingreso de este elemento hacia el hipocampo, por lo que resulta novedoso el análisis morfológico en el área CA1 y su correlación con la memoria espacial.

### 4. HIPÓTESIS

Si la inhalación aguda y subaguda de vanadio, ocasiona alteraciones en la memoria espacial, es posible que se detecten alteraciones morfológicas en las neuronas piramidales del hipocampo área CA-1.

20

Analizar las posibles alteraciones de la memoria espacial después de la inhalación aguda y subaguda de pentóxido de vanadio y correlacionarlas con los cambios morfológicos encontrados en las neuronas piramidales del hipocampo área CA1.

#### 5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar las modificaciones en la memoria espacial de ratones expuestos a  $V_2O_5$  utilizando la metodología del laberinto de agua de Morris.
2. Evaluar las posibles alteraciones citológicas, producidas por la exposición al vanadio, utilizando el método rápido de Golgi en las neuronas del hipocampo área CA1.
3. Identificar los cambios ultraestructurales en el área CA1.

21

## 6. MÉTODO

Los experimentos se llevaron a cabo en 36 ratones macho CD-1 con edad entre 8 a 12 semanas y un peso de aproximado de 35 g, mantenidos en un ciclo luz oscuridad 12:12, con agua y alimentación *ad libitum*.

Los ratones fueron divididos en dos grupos, el grupo experimental (n=30) en donde los animales fueron entrenados nueve días para encontrar una plataforma de escape en el laberinto de agua de Morris, posteriormente los animales fueron expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio a una concentración de 0.02 M; los sujetos del grupo control (n=6) no se entrenaron e inhalaron agua destilada.

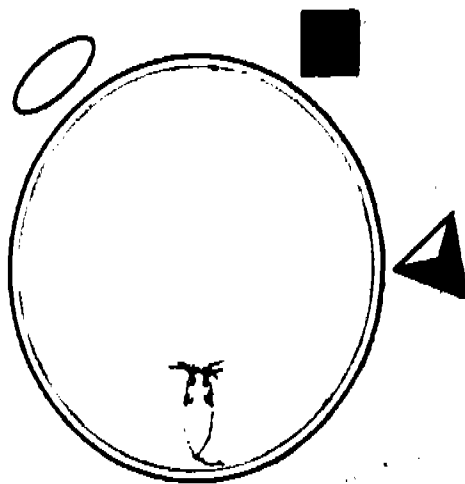
CONTROL	EXPERIMENTAL
N=6	N= 30

### 6.1. FASE DE ENTRENAMIENTO EN EL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS

El laberinto de agua para ratones mide 100 cm de diámetro y 30 cm de profundidad con una plataforma de 10 cm de diámetro y una altura de 29 centímetros, la cual se localizó en el centro del mismo. El laberinto contenía agua opaca, coloreada con pintura vegetal comestible, de color blanco.

El primer día de adquisición se colocó a cada ratón con las patas hacia abajo y la cabeza orientada hacia dentro del laberinto. Se registró el tiempo de latencia en segundos, que es el tiempo que le toma a los sujetos en llegar a la plataforma sumergida (Wenk, 2001), se ayudó a los animales a llegar a la plataforma solo en caso necesario (si tardaban más de 120 seg.). Se permitió que los ratones permanecieran en ésta de 10 a 15 segundos, después se

colocaron en su caja habitación por 5 minutos, repitiéndose esta misma acción y condiciones cuatro veces para cada ratón el primer día, a partir del segundo día se incrementó el número de ensayos a ocho. Se registró el tiempo en que los ratones tardaron en llegar a la plataforma, cambiando el lugar de inicio del laberinto de forma aleatoria para cada día (norte, sur, este y oeste), hasta que su desempeño fue estable (9 días) y la latencia baja (menos de 7 segundos), para esta prueba el tiempo registrado al noveno día de los ratones experimentales fue utilizado como tiempo control (Wenk, 2001).



Laberinto de agua de Morris. Se muestran las referencias espaciales alrededor del laberinto (cuadrado, elipse y prisma), así como la plataforma de escape (círculo punteado en el centro) y un lugar de inicio (de cuatro posibles).

## **6.2. PROCEDIMIENTO DE INHALACIÓN**

Para la inhalación ambos grupos (experimental y control) se colocaron en una caja de acrílico transparente de 0.0308 m<sup>3</sup> conectada a un ultranebulizador (Ultra Neb 99 DeVilbis), con un flujo de 10 litros por minuto. Los animales experimentales (n=30) se expusieron a pentóxido de vanadio (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) a una concentración de 0.02 M, (0.9095 g disueltos en 250 ml de agua destilada), 6 sujetos fueron expuestos a la inhalación aguda (una inhalación) y para el caso de las inhalaciones subagudas los sujetos restantes se dividieron en 4 grupos, de 6 ratones cada uno. Un grupo recibió 2 inhalaciones, otro grupo recibió 4 inhalaciones, un grupo más recibió 6 inhalaciones y el grupo restante fue expuesto a 8 inhalaciones, todos los grupos inhalaron el metal durante 60 minutos por cada inhalación; mientras que los ratones control (n=6) fueron expuestos solo a agua destilada en las mismas condiciones.

## **6.3. PRUEBA DE MEMORIA ESPACIAL**

Una vez realizada la inhalación al pentóxido de vanadio, se dio a los sujetos un tiempo de 60 minutos antes de ser colocados en el laberinto de agua y se contabilizó el tiempo que tardaron en llegar a la plataforma de escape siguiendo las mismas condiciones descritas para el segundo día de la etapa de adquisición, para ello se tomó en cuenta lo descrito en la literatura (Wenk, 2001).

**ESQUEMA DE INHALACIÓN DE PENTÓXIDO  
DE VANADIO Y SACRIFICIO**

<b>INHALACIÓN</b>  <b>AGUDA</b>	<b>MARTES</b> 1-INHALACIÓN 1 HORA	<b>PRIMERA</b>  <b>SEMANA</b>
	<b>MIÉRCOLES</b> <b>SACRIFICIO</b>	
<b>INHALACIÓN</b>	<b>JUEVES</b> 2-INHALACIÓN 1 HORA	<b>SEGUNDA</b>  <b>SEMANA</b>
	<b>VIERNES</b> <b>SACRIFICIO</b>	
<b>SUBAGUDA</b>	<b>MARTES</b> 3-INHALACIÓN 1 HORA	<b>TERCERA</b>  <b>SEMANA</b>
	<b>JUEVES</b> 4-INHALACIÓN 1 HORA	
	<b>VIERNES</b>	
	<b>MARTES</b> 5-INHALACIÓN 1 HORA	<b>CUARTA</b>  <b>SEMANA</b>
	<b>JUEVES</b> 6-INHALACIÓN 1 HORA	
	<b>VIERNES</b>	
	<b>MARTES</b> 7-INHALACIÓN 1 HORA	<b>QUINTA</b>  <b>SEMANA</b>
	<b>JUEVES</b> 8-INHALACIÓN 1 HORA	
	<b>VIERNES</b>	



#### **6.4. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES**

Los sujetos fueron sacrificados 24 horas después de la 1°, 2°, 4°, 6° y 8° inhalaciones, los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico (0.35 ml) por vía intraperitoneal. Una vez anestesiados se perfundieron por vía intracardiaca con solución salina isotónica al 0.9 % y posteriormente fueron fijados utilizando glutaraldehído y paraformaldehído al 2% amortiguado en buffer de cacodilatos de sodio a 0.1 M, pH 7.4.

#### **6.5. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS CITOLÓGICO**

Los hipocampos contralaterales fueron procesados con el método de Golgi rápido, como lo reporta Colín-Barenque y cols., 1999.

El análisis citológico consistió en el conteo del número de espinas de las dendritas secundarias en 20  $\mu$ m, de 5 dendritas secundarias tomadas de 20 neuronas del hipocampo CA1 de cada animal.

#### **6.6. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL**

Una vez perfundidos, se extrajeron los hipocampos y se colocaron en fijador durante dos horas.

Se tomó uno de los hipocampos para procesamiento de microscopía electrónica de transmisión, como lo reporta Colín-Barenque y

cols., 1999. Posteriormente los cortes se analizaron en un microscopio electrónico Zeiss EM 10.

El análisis ultraestructural consistió en analizar 50 botones presinápticos y contabilizar las sinapsis perforadas y de 50 neuronas piramidales, la presencia y el tipo de muerte celular.

Los resultados fueron analizados con la prueba de ANOVA para todos los parámetros evaluados, excepto para el número de neuronas en proceso de muerte celular, el cual se reportó en porcentajes.

## 7. RESULTADOS

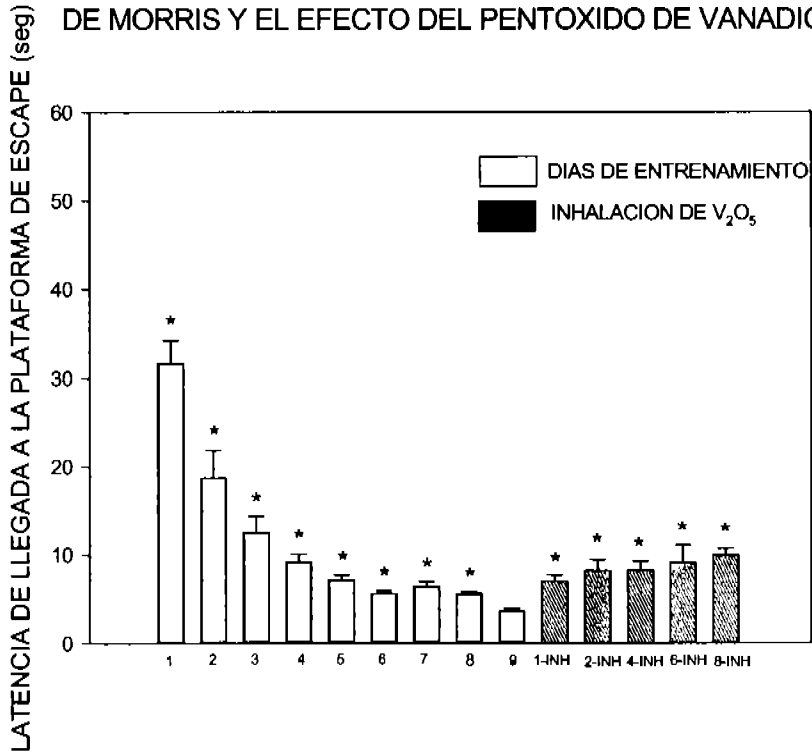
### 7.1. MEMORIA ESPACIAL

Posterior a la inhalación del metaliode se evaluó la memoria espacial y se observó un incremento en la latencia de llegada a la plataforma de escape, comparada a la latencia control en todos los tiempos, encontrando diferencias significativas en todas las inhalaciones comparadas con el control de ( $p \leq 0.001$ ), (Ver tabla 1 y gráfica 1).

Tabla 1. Efecto del  $V_2O_5$  en la memoria espacial. Se muestra el número de inhalaciones y la media obtenida del tiempo en que los ratones llegaron a la plataforma de escape. \* $\Rightarrow$   $P < 0.001$  (ANOVA).

Tratamiento	Media $\pm$ e.e
Control	3.5 $\pm$ 0.3
1-Inhalación	6.9 $\pm$ 0.3*
2-Inhalaciones	8.2 $\pm$ 1.3*
4-Inhalaciones	8.3 $\pm$ 0.9*
6-Inhalaciones	9.1 $\pm$ 1.9*
8-Inhalaciones	9.9 $\pm$ 0.7*

ETAPA DE ENTRENAMIENTO EN EL LABERINTO DE AGUA DE MORRIS Y EL EFECTO DEL PENTOXIDO DE VANADIO.



Gráfica 1. En esta gráfica se muestra la media de la latencia de llegada a la plataforma de escape en el grupo experimental (n=30), desde el primer día de entrenamiento, tomando el día 9 como latencia control y la latencia posterior a la inhalación aguda y subaguda. \* = P<0.001 (ANOVA).

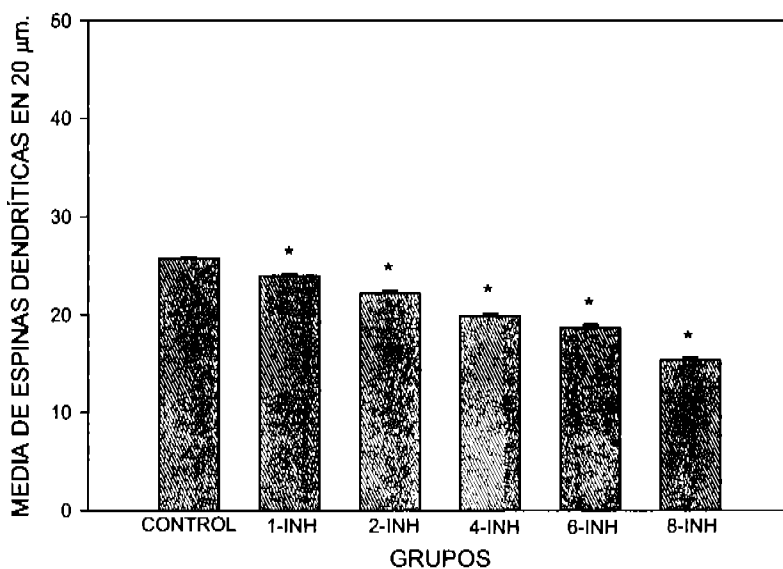
## 7.2. ANÁLISIS CITOLÓGICO

En el conteo del número de espinas dendríticas se encontró disminución a medida que se incrementaban las inhalaciones, teniendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.001$  ANOVA), entre el grupo experimental y control, (Ver tabla 2, gráfica 2 y Figuras 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4).

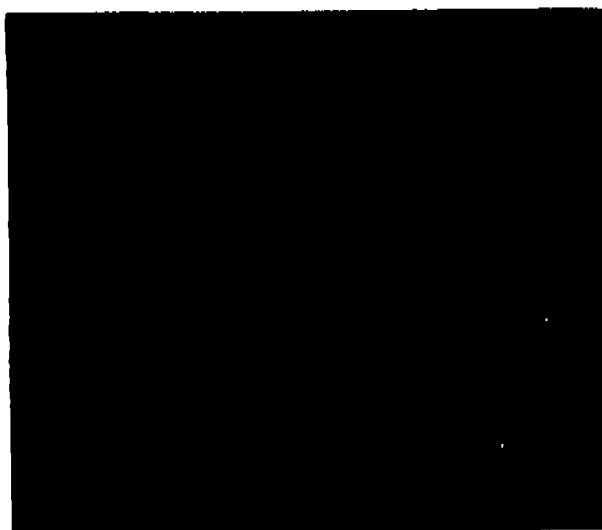
Tabla 2. Efecto del pentóxido de vanadio en el número de espinas de las dendritas secundarias. Se muestra el número de inhalación y la media del número de espinas obtenidas de cada grupo. \* =  $P < 0.001$  (ANOVA).

Tratamiento	Media $\pm$ e.e
Control	25.8 $\pm$ 0.1
1-Inhalación	24.0 $\pm$ 0.17*
2-Inhalaciones	24.1 $\pm$ 0.3*
4-Inhalaciones	19.5 $\pm$ 0.3*
6-Inhalaciones	18.7 $\pm$ 0.3*
8-Inhalaciones	16.0 $\pm$ 0.3*

## EFFECTOS DEL $V_2O_5$ EN DENDRITAS SECUNDARIAS DEL AREA CA1 DEL HIPOCAMPO



Gráfica 2. En esta gráfica se muestra la media del número total de espinas de las dendritas secundarias, de los grupos control y experimental. \*=  $P < 0.001$  (ANOVA).

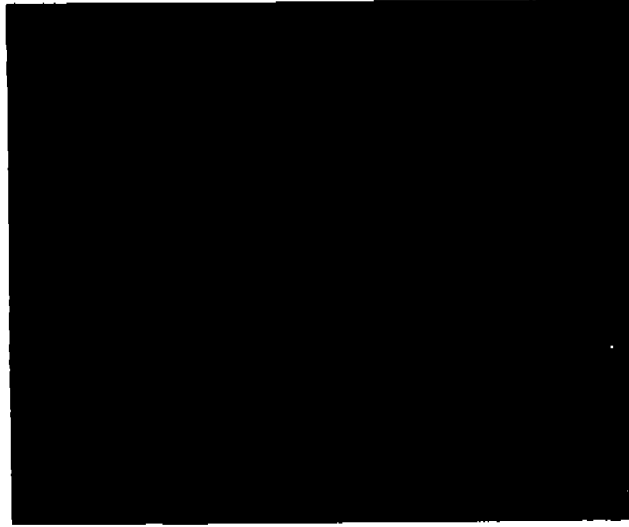


CONTROL 100X

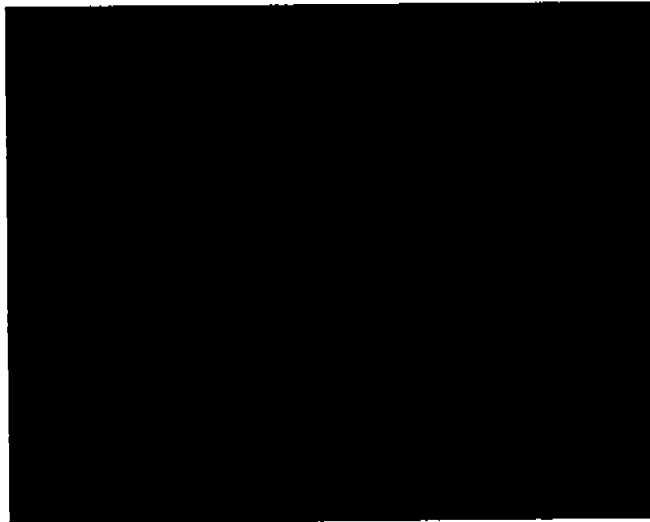


2 INHALACIONES 100X

Figura 3.1. Microfotografías con impregnación de Golgi de dendritas de neuronas piramidales del área CA1, donde se muestra la pérdida de espinas dendríticas del grupo de 2 inhalaciones de pentóxido de vanadio, comparadas con el grupo control.



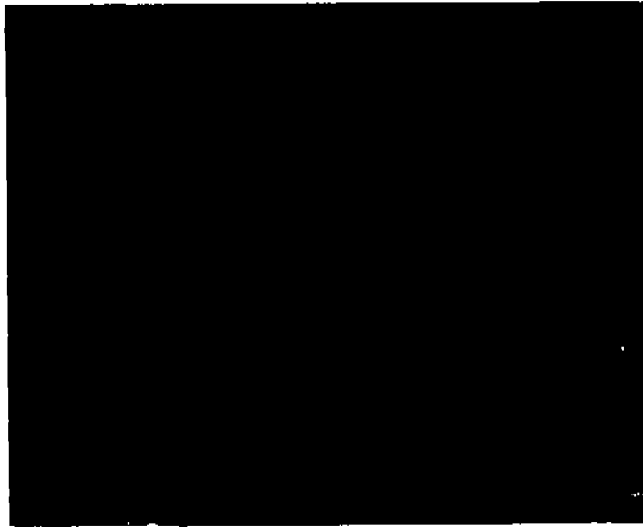
CONTROL 100X



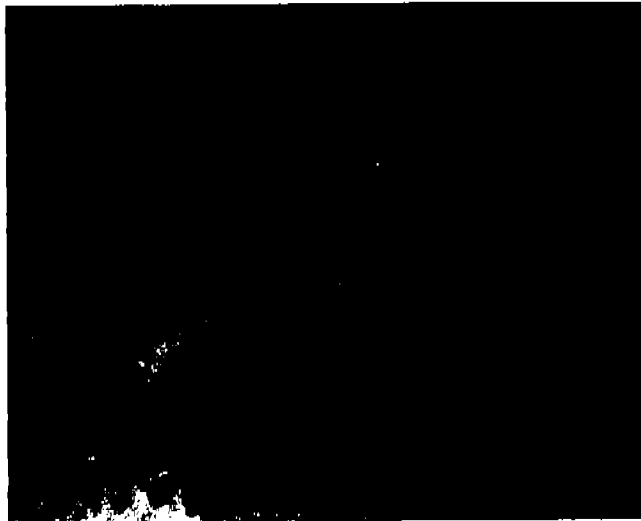
4 INHALACIONES 100X

Figura 3.2. Microfotografías con impregnación de Golgi de dendritas de neuronas piramidales del área CA1, donde se muestra la pérdida de espinas dendríticas de 4 inhalaciones, comparadas con el grupo control.



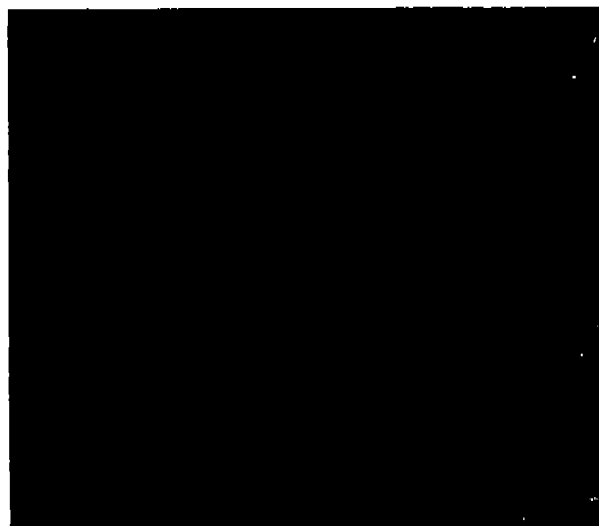


CONTROL 100X

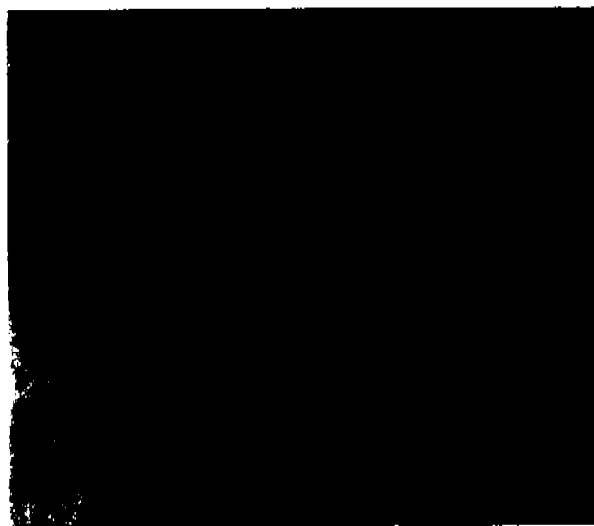


6 INHALACIONES 100X

Figura 3.3. Microfotografías con impregnación de Golgi de dendritas de neuronas piramidales del área CA1, donde se muestra la pérdida de espinas dendríticas después de 6 inhalaciones de pentóxido de vanadio, comparadas con el grupo control.



CONTROL 100X



8 INHALACIONES 100X

Figura 3.4. Microfotografías con impregnación de Golgi de dendritas de neuronas piramidales del área CA1, donde se muestra la pérdida de espinas dendríticas de 8 inhalaciones, comparadas con el grupo control.

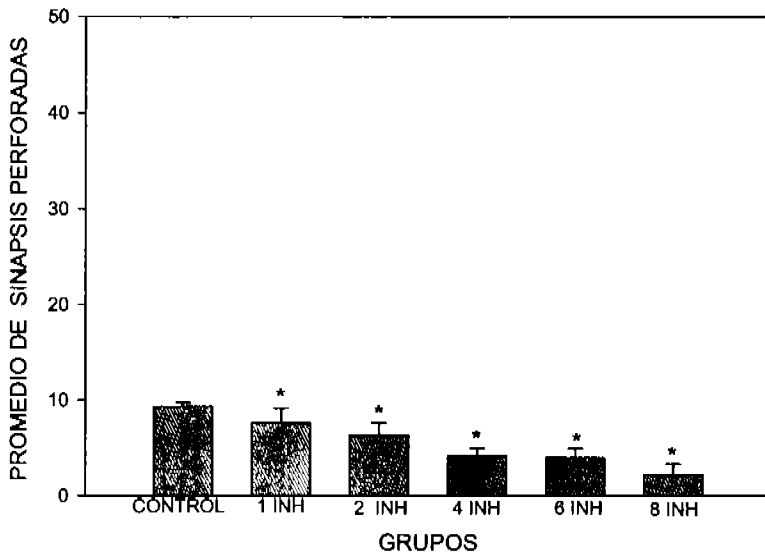
### 7.3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL

El análisis mostró que las neuronas de los animales expuestos a  $V_2O_5$  presentaron menor número de sinapsis perforadas aumentando este efecto a medida que se incrementaban las inhalaciones, por lo que se encontraron diferencias significativas comparando entre el grupo experimental y control (\* $p < 0.001$ , ANOVA), (Ver tabla 3, gráfica 3 y Figuras 4.1, 4.2, 4.3).

Tabla 3. Promedio de sinapsis perforadas observadas en el grupo control y experimental en cada una de las inhalaciones. \* =  $P < 0.001$  (ANOVA).

Tratamiento	Media $\pm$ e.e
Control	9.3 $\pm$ 0.4
1-Inhalación	7.7 $\pm$ 1.5*
2-Inhalaciones	6.3 $\pm$ 1.3*
4-Inhalaciones	4.2 $\pm$ 0.8*
6-Inhalaciones	4.0 $\pm$ 0.9*
8-Inhalaciones	2.2 $\pm$ 1.1*

### SINAPSIS PERFORADAS



Gráfica 3. Esta gráfica muestra el promedio de las sinapsis perforadas encontradas en 50 contactos sinápticos, comparados con el grupo control  $* = P < 0.001$  (ANOVA).

## SINAPSIS PERFORADA

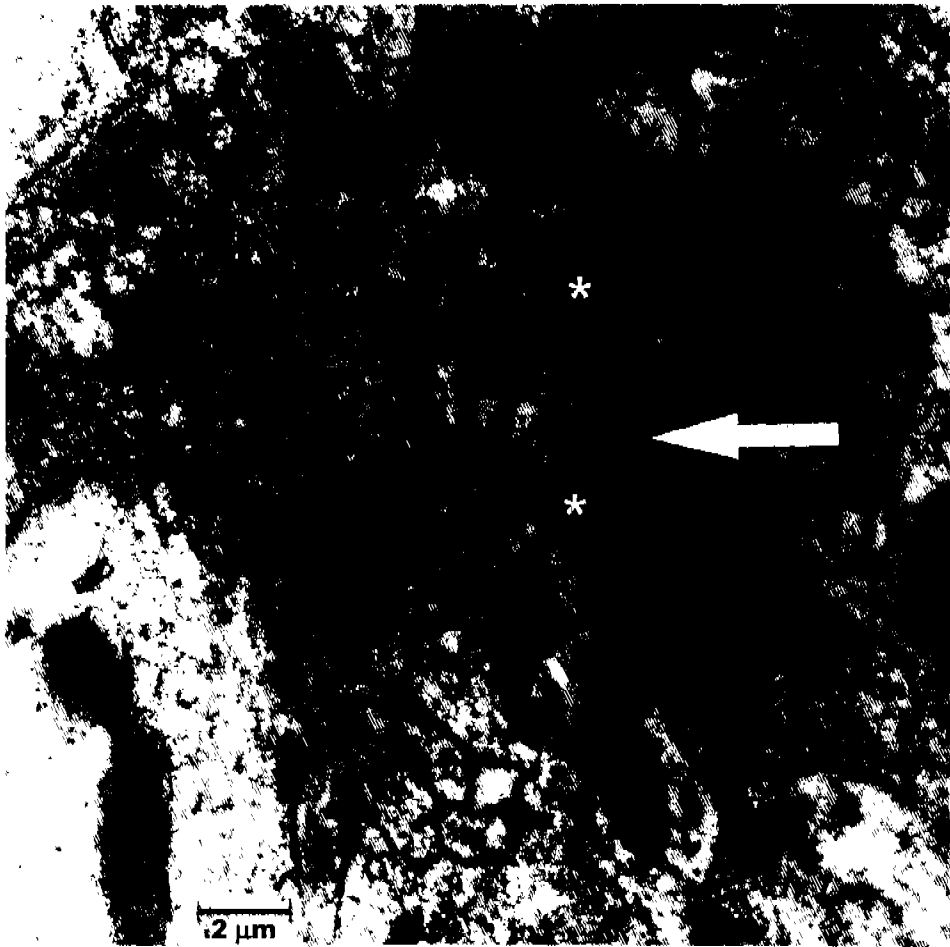


Figura 4.1. Micrografía donde se observa una sinapsis perforada, la cual se caracteriza por el sitio de perforación que se proyecta hacia la terminal presináptica (flecha), la zona activa posee dos componentes curvados, señalados con asteriscos.

## SINAPSIS PERFORADA



Figura 4.2. Micrografía donde se observa una sinapsis perforada, la cual se caracteriza por el sitio de perforación que se proyecta hacia la terminal presináptica (flecha gruesa), la zona activa posee dos componentes curvados, señalados con asteriscos, se muestra en la terminal presináptica, el aparato espinoso (flecha delgada).

## SINAPSIS MACULAR



Figura 4.3. Micrografía donde se observan sinapsis maculares, señaladas por flechas, las cuales se caracterizan por tener una zona activa continua.

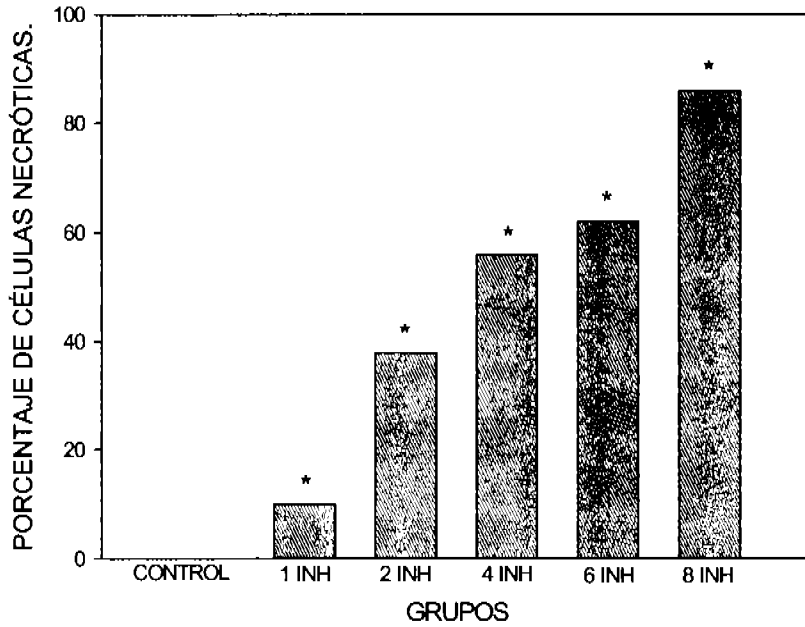
En cuanto a los efectos del pentóxido de vanadio en las neuronas piramidales de CA1, nosotros pudimos observar en el tejido de sujetos control neuronas piramidales con núcleo, organelos y citoplasma de características normales; sin embargo, el porcentaje de células necróticas presentó diferencias significativas entre el grupo experimental y el control, ( $*p < 0.001$ , ANOVA), como citoplasma electrodensó, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico y aparato de Golgi, en donde se observa claramente el efecto dosis-respuesta al pentóxido de vanadio. (Ver gráfica 4, tabla 4 y Fig. 5).

Tabla 4. Porcentaje de neuronas necróticas observadas en los grupos control y experimental.

Tratamiento	Porcentaje
Control	0
1-Inhalación	10
2-Inhalaciones	30
4-Inhalaciones	56
6-Inhalaciones	62
8-Inhalaciones	86



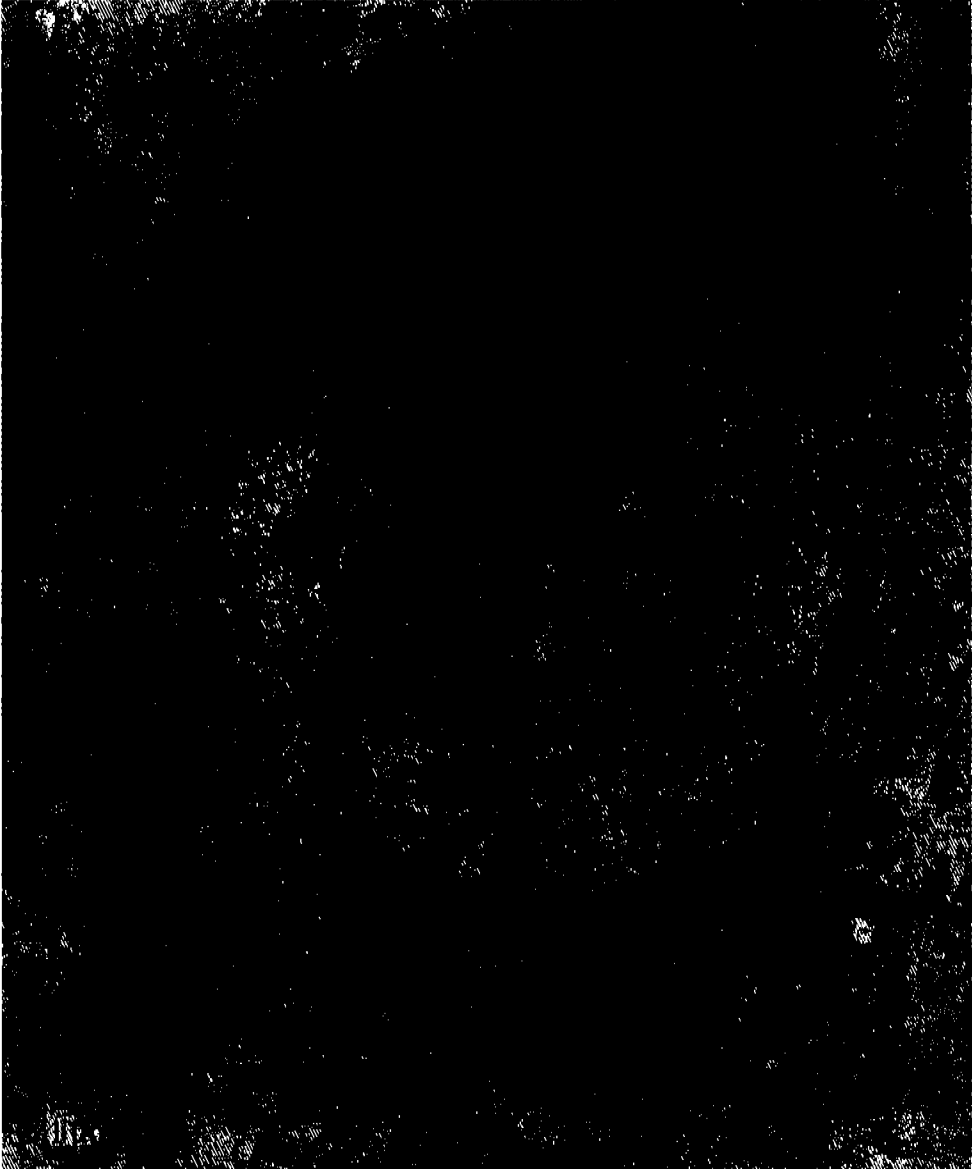
## NECROSIS INDUCIDA POR LA INHALACIÓN AGUDA Y SUBAGUDA DE PENTÓXIDO DE VANADIO



Gráfica 4. Esta gráfica muestra el porcentaje de células necróticas observadas en 50 neuronas piramidales. (\* $p < 0.001$ ).

NEURONA CONTROL

A



B

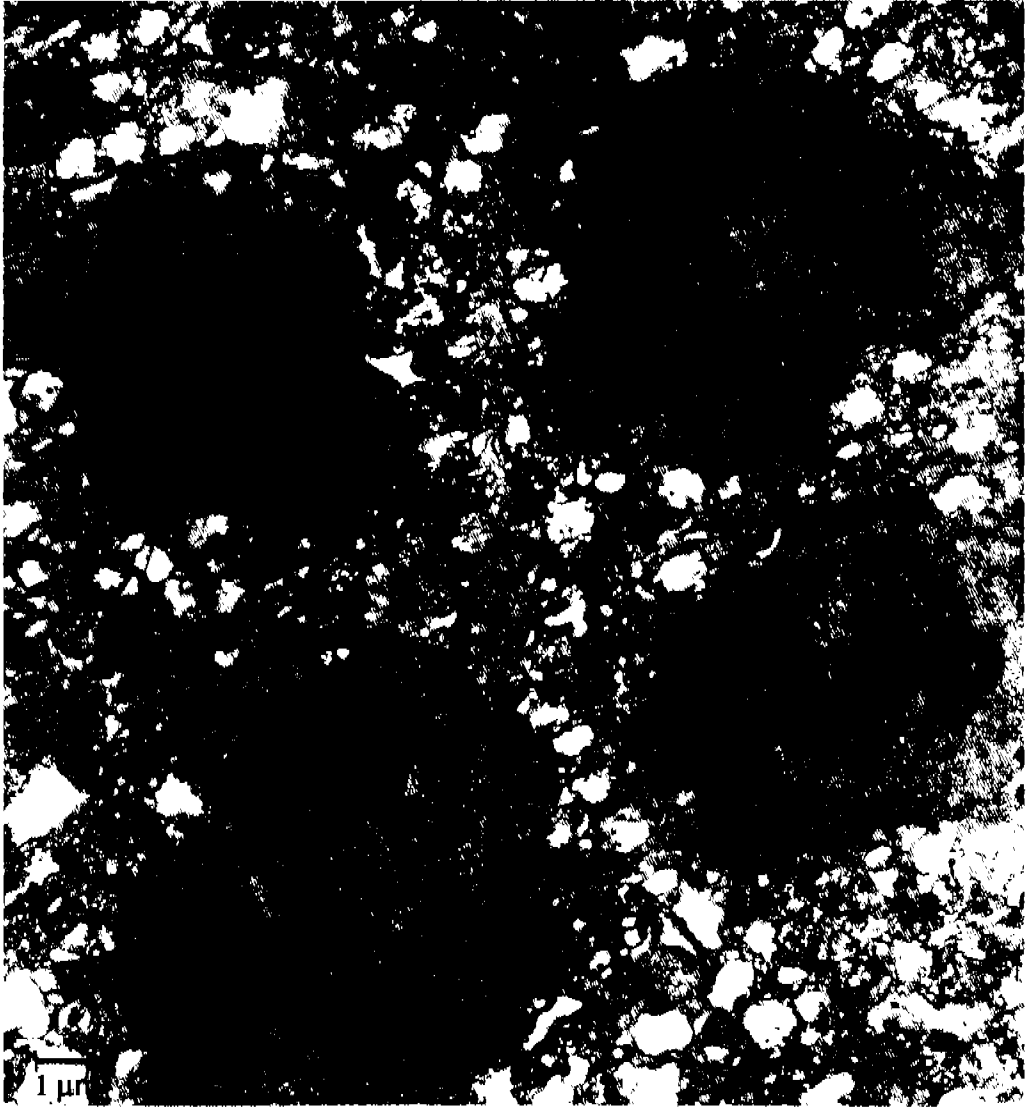


Figura 5. Micrografías de neuronas hipocámpales del área CA1 (A) Neurona del grupo control con núcleo, organelos y citoplasma de características normales y (B), Neuronas necróticas observadas a la 8<sup>o</sup> inhalación con citoplasma denso y en el neuropilo se observan grandes vacuolas que rodean al núcleo de las neuronas.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. MEMORIA ESPACIAL**

En este estudio se observó la alteración de la memoria espacial, inducida por la inhalación de vanadio, la cual se acrecentó a medida que se incrementaba el tiempo de exposición, obteniendo diferencias significativas con respecto al grupo control. Este déficit de memoria espacial también se ha reportado ante la administración de etanol (Wright y cols., 2003), en un modelo de epilepsia temprana inducida por la aplicación unilateral de toxina tetánica (Lee y cols., 2001); en la inducción de Kindling, en el hipocampo dorsal (Hannesson y cols., 2001); por la administración de altas dosis de zinc (Turner y Soliman, 2000) y ante el bloqueo de  $\beta$ -adrenoreceptores en el hipocampo área CA1 (Ji y cols., 2003). Varios autores han sugerido que el estrés oxidativo está relacionado con los desórdenes neurodegenerativos, y con la disminución de la memoria en estas enfermedades, lo que evidencia que este estado de estrés oxidativo produce un deterioro en la memoria (Fukui y cols., 2000; Urano y cols., 1998; Stadtman, 1992). Estos hallazgos probablemente apoyan los nuestros ya que como mencionamos anteriormente el vanadio es un prooxidante y el deterioro que observamos probablemente sea un efecto de la peroxidación lipídica alterando la memoria espacial.

### **8.2. PÉRDIDA DE ESPINAS DENDRÍTICAS**

La inhalación de  $V_2O_5$  produjo pérdida de las espinas de las dendritas secundarias del hipocampo dorsal, esta pérdida también se ha encontrado en las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado, bajo las mismas condiciones que las utilizadas en el presente trabajo (Avila-Costa y cols., 2004). Se ha reportado que ante procesos patológicos como

malnutrición y exposición a tóxicos, las espinas disminuyen su número (Shepherd, 1996; Johnston y Amaral, 1998; Fiala y cols., 2002).

En otros estudios se ha observado deterioro en la memoria a largo plazo correlacionado con la reducción en la densidad de espinas dendríticas hipocampales inducido por un modelo de estrés oxidativo (Avila-Costa y cols., 1999).

Mattson y colaboradores en 1989, observaron degeneración selectiva de neuronas piramidales del hipocampo en el área CA1, en varias patologías como son Alzheimer y epilepsia, encontrando que estos cambios celulares son provocados por altos niveles de glutamato en neuronas de esta región tanto *in vivo* como *in vitro*, causando regresión de espinas dendríticas de neuronas piramidales inducida por un influjo de calcio por excitotoxicidad (Shepherd, 1996; Johnston y Amaral, 1998). Esta disminución en las espinas dendríticas probablemente se debe a que disminuyen las posibilidades plásticas de la célula de forma que éstas tratan de mantener su homeostasis (Hosokawa y cols., 1995; Dykens, 1999), otra posibilidad es que la espina se pierda por falta o exceso de contactos sinápticos, entonces puede absorberse y la neurona se daña mas por el calcio que tienen las espinas, es decir el calcio aumentaría en la neurona por la entrada de calcio de la espina ya que como mencioné anteriormente la espina es un compartimiento de calcio que está restringido a esta zona y al perderse esta estructura por absorción lo que ocurriría es que habría una entrada extra de calcio lo cual daña a la célula, o se pierden y son fagocitadas, como un mecanismo de defensa, es decir se ha reportado que todo lo que se encuentra a nivel extracelular está controlado, ya que si un pedazo de membrana fuera liberado al medio este sería inmediatamente fagocitado (Shepherd, 1998).

Otros autores también han reportado que la pérdida de espinas se debe a un estado de estrés oxidativo, lo cual produce daño y muerte neuronal ya que el tejido cerebral es uno de los más lábiles por el alto consumo de oxígeno, su alta tasa metabólica, bajos niveles de superóxido-dismutasa, glutatión peroxidasa, la casi ausencia de catalasa y el alto contenido de ácidos grasos polin saturados, los cuales son altamente susceptibles a la oxidación de las moléculas que forman parte de la membrana celular alterando la permeabilidad selectiva, e induciendo una pérdida del equilibrio osmótico con la entrada no controlada de agua y sodio que en una primera fase causa edema, posteriormente se inicia una cadena de reacciones alterando canales iónicos y aumentando la liberación de calcio. Ante esta reacción, la célula trata de mantener los niveles adecuados de este ion atrapándolo en el retículo endoplásmico y en la mitocondria, cuando esta respuesta es insuficiente para contrarrestar este aumento, se forma un poro de transición en la mitocondria que la destruye produciendo un déficit de ATP, que incrementa el estado de estrés oxidativo y lleva a la muerte celular (Shepherd, 1998; Dikens, 1999; Cabazos y cols., 1991).

### **8.3. SINAPSIS PERFORADAS**

Se ha encontrado que la existencia de sinapsis perforadas hipocampales es necesaria para el mantenimiento de la memoria durante toda la vida (Geinisman y cols., 1992). Se ha propuesto que las sinapsis perforadas son intermediarios estructurales en la plasticidad sináptica (Calverley y cols., 1987), tanto en eventos que involucran mecanismos de memoria como de aprendizaje (Petit, 1988). Se ha reportado que las sinapsis perforadas aumentan en número durante el desarrollo (Itarat y Jones, 1992), y bajo diferentes condiciones experimentales tales como ambientes

complejos (Sirevaag y Greenough, 1985), en entrenamiento conductual (Vrensen y Nunez, 1981), en estimulación eléctrica repetitiva (Geinisman y cols., 1992), en alteraciones hormonales (Hatton y Ellisman, 1982); ante el aumento de la actividad neuronal como lo es la potenciación a largo plazo (Muller y cols., 2000); y por la disminución de dopamina unilateral en el cuerpo estriado después de la inyección de 6-OHDA (Avila-Costa y cols., 2004). También se ha reportado un incremento en las sinapsis perforadas por la inducción de Kindling hipocámpico (Geinisman y cols., 1992), por lesión unilateral de la corteza entorrinal (Nieto-Sampedro y cols., 1982), y otras lesiones cerebrales (Carlin y Siekevitz, 1983). Se ha sugerido que las perforaciones pueden tener la función de incrementar la superficie de la densidad postsináptica y también la eficiencia de la neurotransmisión (Avila-Costa y cols., 2004). La explicación sugerida por varios autores del incremento en el número de sinápsis perforadas es que la liberación masiva vesicular en un periodo corto (de segundos a minutos), estimulada por agentes bloqueadores del reciclaje de vesículas presinápticas induce el crecimiento rápido y perforación de densidades postsinápticas (Wojtowicz y cols., 1994; Sorra y cols., 1998); sin embargo el análisis ultraestructural a las inhalaciones de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> mostró pérdida de sinapsis perforadas de forma significativa, lo cual probablemente esté correlacionado con la cantidad de neuronas muertas, en donde al disminuir el número de neuronas se disminuye el número de sinapsis perforadas, otra posible causa puede ser la alteración del citoesqueleto de la espina en donde se presenta la sinapsis perforada, el cual está compuesto por filamentos de actina (Luo, 2002; Lisman, 2003; Zhang y Benson, 2000; Rao y Craig, 2000; Deller y cols., 2000), el acortamiento y alargamiento de estos filamentos es regulado por ATP y ADP principalmente (Gartner y Hiatt, 2002). Como se

mencionó en la introducción, existe una similitud química del vanadio al fósforo ((Barceloux, 1999; Sharma, 1986; Bogden y cols., 1982; Higashino y cols., 1983; Krivanek, 1984.)), lo cual permite que este metaloide ocupe el lugar del fósforo, inhibiendo a esta enzima, evitando la formación de sinapsis perforadas.

#### **8.4. MUERTE NEURONAL**

En el área CA1 se encuentran neuronas piramidales que poseen numerosos receptores a glutamato, básicamente los NMDA que al activarse, permiten la entrada de calcio, al aumentar la cantidad de glutamato en la hendidura sináptica, se inicia una entrada masiva de calcio provocando muerte por excitotoxicidad (Johnston y Amaral, 1998; Shepherd, 1996; Dikens, 1999; Cabazos y cols., 1991). En el presente trabajo se observó muerte celular por necrosis, probablemente debido a este tipo de alteración.

Otra posible explicación es que el vanadio produce peroxidación lipídica en los cerebros de rata y ratón (Sharma, 1986), debido a que el sistema nervioso es vulnerable a la peroxidación de lípidos por su alto contenido de ácidos grasos polinsaturados (Sheriff, 1991; Stohs y Bagchi, 1995), en donde probablemente la ruptura del equilibrio oxidativo desempeña un papel importante durante los eventos que desencadenan el daño y la muerte celular. Esto puede ser producido por el desbalance entre el vanadio y la capacidad de las células para reparar el daño, la cual se ve rebasada, induciendo peroxidación lipídica y como consecuencia la muerte celular. Otra probable causa de la muerte neuronal es la inducción de excitotoxicidad por alteración de interneuronas presentes en el área CA1 (axo-axónicas, células en cesta y biestratificadas), considerando que la mayoría de estas células contienen GABA y neuropéptidos como somatostatina,



colecistoquinina, sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Bayer, 1985), los cuales al recibir una entrada excitatoria de las colaterales de Schaffer y fibras de la vía perforante, liberan su contenido en las neuronas piramidales del área CA1, propiciando inhibición el GABA, (Shepherd, 1998) y la producción de respuestas postsinápticas lentas dadas por los péptidos, en donde la información de entrada es modulada o regulada por un flujo global de la actividad o el control de varios tipos de plasticidad neuronal (Chan-Palay y cols., 1989), por lo que al existir una alteración de estas células por el pentóxido de vanadio se puede perder esta homeostasis y por lo tanto se incrementaría la excitabilidad y se induciría muerte por excitotoxicidad.

#### **8.5. RELACIÓN EXPOSICION-EFECTO**

La inhalación de  $V_2O_5$  produjo daño significativo en el hipocampo dorsal, dejando ver un deterioro desde la primera inhalación que iba en aumento a medida que se incrementó el número de inhalaciones, este efecto se relaciona con los datos publicados por Hamel y Duckworth, en 1995, en donde al administrar el metaloide por vía oral a 1.6, 80 y 160  $\mu$ moles de V/Kg peso corporal/día, observaron que en el tejido nervioso, el vanadio se incrementa al aumentar la dosis. Una posible explicación a las alteraciones observadas, es que el vanadio tiene una vida media en el sistema nervioso de 11 días (Hamel y Duckworth, 1995; Hamel, 1998), por lo que los efectos del vanadio se prolongan y a su vez se incrementa el daño. Además, en el caso de este modelo la concentración se mantuvo porque la exposición fue continua. En este trabajo se reporta que el pentóxido de vanadio en el hipocampo área CA1 induce la alteración en la memoria espacial, lo cual se correlaciona con las modificaciones a nivel citológico y ultraestructural que se reportaron.

## 9. CONCLUSIONES

- La exposición aguda y subaguda al pentóxido de vanadio en una concentración de 0.02 M produjo alteraciones morfológicas en el hipocampo del área CA1.
- La memoria espacial de ratones CD-1 que inhalaron  $V_2O_5$  disminuyó de forma significativa después de cada inhalación.
- Después de la inhalación de  $V_2O_5$  se observó pérdida de espinas dendríticas secundarias del hipocampo dorsal.
- El análisis ultraestructural mostró muerte de neuronas piramidales del área CA1, así como pérdida de sinapsis perforadas.
- En este modelo de inhalación de vanadio, se encontraron cambios morfológicos y déficit de memoria que son característicos de procesos neurodegenerativos, lo cual proporciona un modelo muy accesible y confiable para el estudio de este tipo de patologías.

## 10. REFERENCIAS

- Altamirano-Lozano, M; Alvarez-Barrera, L; Roldán-Reyes, E. **Cytogenetic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice**. Med. Sci. Res. 1993; 21: 711-713.
- Altamirano-Lozano, M. y Roldán-Reyes, E. 1998. **Genetic toxicology of vanadium compounds**. En: Vanadium in the environment. Vol. 31; Parte 2: Health effects. Editado por Nriagu, J.O. Ed. John Wiley & Sons. Inc. pp: 159-179.
- Altamirano-Lozano, M., Valverde, M. Alvarez-Barrera, L., Molina, B. y Rojas, E. **Genotoxic studies of vanadium pentoxide (V2O5) in male mice**. II. Effects in Several mouse tissues. Teratog Carcinog Mutagen 1999; 19(4):243-55.
- Al-Bayati, A., Giri, S.N. Raabe, O.G., Roseblatt, L.S. y Shifrine, M. **Time and dose-response study of the effects of vanadate on rats: Morphological and biochemical changes in organs**. JEPTO. 1989; 9(5-6):435-55.
- Avila-Costa, M.R., Colín-Barenque, L., Fortoul, T.I., Machado-Salas, J.P., Espinosa-Villanueva, J., Rugerio-Vargas, C. y Rivas-Arancibia, S. **Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat hippocampus CA1**. Neurosc. Letters. 1999; 270: 107-109.
- Avila-Costa, M.R., Montiel-Flores, E., Colín-Barenque, L., Ordoñez-Librado, J.L., Gutierrez-Valdez, A.G., Niño-Cabrera, H.G., Mussali-Galante, P. y Fortoul, T.I. **Nigrostratal modifications after vanadium inhalation: An Immunocytochemical approach**. Neurochemical Research. 2004; 29: 1357-1362.
- Avila-Costa, M.R., Colín-Barenque, L., Aley-Medina, P., Gutierrez Valdez, A.G., Ordoñez Librado, J.L., Martínez Flores E. y Fortoul, T.I. **Bilateral increase of perforated synapses alter unilateral dopamine depletion**. En prensa.
- Barceloux, D.G. **Vanadium**. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1999; 37(2): 265-278.
- Barth, A., Schaffer, W., Konnaris, C., Blauensteiner, R., Winker, R., Osterode, W. y Rüdiger, H.W. **Neurobehavioral effects of vanadium**. J. Toxicol. Environmental Health. Part. A. 2002; 65: 677-683.
- Bayer, S.A. 1985. **Forebrain and midbrain. Hippocampal region**. En: The rat nervous system, Ed. Paxinos G. Academic Press. Vol. 1: 335-352.
- Beggs, J.M., Brown, T.H., Byrne, J.H., Crow, T., LeDoux, J.E., LeBar, K. y Thompson, R.F. 1999. **Learning and memory: Basic Mechanisms**. En: Fundamental Neuroscience. Eds: Zigmond, J.M., Bloom, E.F., Story, C.L., Squine, L.R. Capítulo 55, pp: 1411-1486.

Bogden, J.D., Higashino, H., Lavenhar, M.A., Bauman, J.W., KempF.W. y Avivi, A. **Balance and tissue distribution of vanadium after short-term ingestion of vanadate.** J. Nutrition. 1982; 112: 2279-2285.

Brailowsky, S. 1995. **Organización del sistema nervioso.** En: Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. Capítulo II. Ed. Fondo de Cultura Económica. Méx. pp. 21-31.

Brown, T.H. y Zador, A.M. **Hippocampus.** En: The synaptic organization of the brain. Ed: Shepherd, G.M. tercera Ed. 1990. Oxford University Press. N.Y. pp: 346-388.

Calverley, R.K.S. y Jones, D.G.A. **Serial-section study of perforated synapses in rat neocortex.** Cell Tissue Res. 1987; 247: 565-572.

Cammarota, M., Levi de Stein, M., Paratcha, G., Bevilacqua, L.R.M., Izquierdo, I. y Medina, J.H. **Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus.** Neurochem. Res. 2000; 25: 567-572.

Carlin, R.K. y Siekevitz, P. **Plasticity in the central nervous system: Do synapses divide?.** Proc. Natl. Acad. Sci. 1983; 80:3517-3521.

Catalán, R.E., Martínez, A.M., Aragonés, M.D., Robles, A. y Miguel, B.G. **Alterations in brain lipid composition caused by vanadate.** Life Sciences. 1987; 40: 799-806.

Chan-Palay, V. y Köhler, C. 1989. **Neurology and neurobiology.** The hippocampus new vistas. Vol. 52, Alan R. Liss, Inc, N.Y. Capítulos 2-5. Pp: 18-71.

Colín-Barenque, L., Avila-Costa, M.R., Fortoul, T., Rugerio-Vargas, C., Machado-Salas, J.P., Espinosa-Villanueva, S. y Rivas-Arancibia, S. **Morphologic alteration of the olfactory bulb alter acute ozone exposure in rats.** Neuroscience Letters. 1999; 274:1-4.

Conri, C., Simonoff, M., Fleury, B. y Moreau, F. **Variations in serum vanadium levels during the treatment of mental depression.** Biol. Psychiatry. 1986; 21: 1335-1339.

Cortizo, A.M., Bruzzone, L., Molinuevo, S. y Etcheverry, S.B. **A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** Toxicology. 2000; 147:89-99.

Davolio, C.J. y Greenamyre, J.T. **Selective vulnerability of the CA1 region of hippocampus to the indirect excitotoxic effects of malonic acid.** Neuroscience Letters. 1995; 192: 29-32.

Deller, T., Mundel, P. y Frotscher, M. **Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus.** Hippocampus. 2000; 10: 569-581.

Desmond, N. y Levy, W. **Morphological correlates of long-term potentiation imply the modification of existing synapses, not synaptogenesis, in the hippocampal dentate gyrus.** Synapse. 1990; 5:139-143.

Donald, J.M., Bradley, M., O'Grady, J.E., Cutler, M.G. y Moore, M.R. **Effects of low-level lead exposure on 24 hr activity patterns in the mouse.** Toxicol. Lett. 1988; 42: 137-147.

Dykens, J.A. 1999. **Free radicals and mitochondria dysfunction in excitotoxicity and neurodegenerative disease.** En: E.V. Koliastos y R.R. Ratan (eds) Cell Death and Diseases of the nervous system. Humana Press, New Jersey: 147-201.

Eckardt, R.E. **Petroleum fuel and airborne metals.** Arch. Environ. Health. 1971; 23: 166-170.

Elberg, G., Li, J. y Shechter, Y. **Vanadium activates or inhibits receptor and non-receptor protein tyrosine kinases in cell-free experiments, depending on its oxidation state. Possible role of endogenous vanadium in controlling cellular protein tyrosine kinase activity.** Journal of Biological Chemistry. 1994; 269: 9521-9527.

Fortoul, T.I., Mendoza, M.L., Avila-Casado, M.C., Quan-Torres, A., Saldivar-Osorio, L., Espejel-Maya, G., Sánchez, I., López, E.I., Bizarro, P., Avila-Costa, M.R., Colín-Barenque, L., Navarro-Villanueva, D. y Olaiz-Fernandez, G. **Is vanadium in the air a problem? Lung tissue as a source of information: Study in Mexico City residents Autopsies from the sixties and nineties.** Arch. Environ Health. 2002. 57:446-449.

Fiala, J.C., Spacek, J. y Harrys, K.M. **Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders?.** Brain Res. Rev. 2002; 39: 29-54.

French, R.J. y Jones, P.J. **Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations.** Life Sci. 1993; 52(4): 339-346.

Geinisman, Y., Morrell, F. y de Toledo-Morrel, L. **Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling.** Brain Res. 1992; 569: 341-347.

Golub, M.S., Donald, J.M., Gershwin, M.E. y Keen, C.L. **Effects of aluminum ingestion on spontaneous motor activity of mice.** Neurotoxicol. Teratol. 1989; 11: 231-235.

Guevara-García, J.A. **Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio.** Educación Química. 1996; 7(4): 185-189.

Haider, S.S., Andel-Gayoum, A.A., El-Fahri, M. y Ghwarsha, K.M. **Effect of selenium on vanadium toxicity in different regions of rat brain.** Human and Experimental Toxicology. 1998; 17:23-28.

Hamel, F. G. 1998. **Endocrine control of vanadium accumulation.** En: Vanadium in the Environment. Vol. 2: Health effects. Editor Jerome O. Nriagu. Ed. John Wiley & Sons. Inc. Pp: 265-276.

Hannesson, D.K., Mohapel, P. y Corcoran, M.E. **Dorsal hippocampal kindling selectively impairs spatial learning/short-term memory.** Hippocampus. 2001; 11(3):275-86.

Harris, K.M. y Kater, S.B. **Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function.** Annu. Rev. Neurosci. 1994; 17: 341-371.

Hatton, J.D. y Ellisman, M.H. **A restructuring of hypothalamic synapses is associated with motherhood.** J. Neurosci. 1982;2: 704-707.

Higashino, H., Bogden, J.D., Lavenhar, M.A., Bauman, J.W. Hirotsu, T. y Aviv, A. **Vanadium, Na-K-ATPase, and potassium adaptation in the rat.** Am. Physiol. Society. 1983; 244: F105-F111.

Hosokawa, T., Rusakov, D.A. Bliss, T.V.P. y Fine, A. **Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP.** J. Neurosci. 1995: 5560-5573.  
IPCS, International Programme on Chemical Safety Environmental Health. **Vanadium.** 1990.

Itarat, W. y Jones, D.G. **Perforated synapses are present during synaptogenesis in rat neocortex.** Synapse. 1992; 11: 279-286.

Ji, J.Z., Zhang, X.H. y Li, B.M. **Deficient spatial memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in the hippocampal CA1 region.** Behav Neurosci. 2003; 117(6):1378-84.

Johnston, D. y Amaral, D.G. 1998. **Hippocampus.** En **The synaptic organization of the brain.** Shepher, G.M. (Ed). Cuarta edición. Oxford. pp: 417-458.

Kandel, E.R. y Schwartz, J.H. **Hypothalamus, Limbic system, and Cerebral Cortex: Homeostasis and Arousal.** En: Principles of neural science. Segunda Edición. Ed. Elsevier. 1985, U.S.A.: 609-625.

Kleinman, M.T., Bernstein, D.M. y Kneip, T.J. **An apparent effect of the oil embargo on total suspended particulate matter and vanadium in New York City air.** J. Air Pollut. Control. Assoc. 1977; 27: 65-67.

Krivanek, J. **Effect of vanadate on brain protein phosphorylation.** Neurochem. Research. 1984; 9: 1627-1640.

Lee, C.L., Hannay, J., Hrachovy, R., Rashid, S, Antalffy, B., y Swann, J.W. **Spatial learning deficits without hippocampal neuronal loss in a model of early-onset epilepsy.** Neuroscience. 2001;107(1):71-84.

Leonard, A. y Gerber G.B. **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds.** Mutation Research. 1994; 317:81-88.

Levy, B.S., Hoffman, L. y Gottsengen, S. **Boilermakers bronchitis. Respiratory tract irritation associated with vanadium pentoxide exposure during oil-coal conversion of a power plant.** J. Occup. Med. 1984; 26:567-570.

Lisman, J. **Actin's actions in LTP-Induced synapse growth.** Neuron. 2003; 38:361-365.

Luo, L. **Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity.** Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2002; 18: 601-635.

Macara, I.G., Kustin, K. y Cantley, L.C. **Glutathione reduces cytoplasmic vanadate: Mechanism and physiological implications.** Biochim Biophys. Acta. 1980; 629: 95-106.

Mattson, M.P., Guthrie, P.B., Kater, S.B. **Intrinsic factors in the selective vulnerability of hippocampal pyramidal neurons.** Prog. Clin. Biol. Res. 1989; 317: 333-51.

McDonald, R.J. y White, N.M. **Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus.** Behavioral Neural of Biology. 1994; 61: 260-270.

Moser, M.B., Trommald, M. y Andersen, P. **An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggest the formation of new synapses.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. 91: 12673-12675.

Naylor, G.J. **Vanadium and affective disorders.** Biol. Psychiatry. 1983; 18: 103-112.

Nieto-Sampedro, M., Hoff, S.F. y Cotman, C.W. **Perforated postsynaptic densities: probable intermediates in synapse turnover.** Proc. Natl. Acad. Sci. 1982; 79:5718-5722.

Nriagu, J.O. y Pirrone, N. 1998. **Emission of vanadium into the atmosphere.** En: Nriagu J, ed. Vanadium in the environment. Parte 1: Chemistry and biochemistry. New York, NY, John Wiley & Sons, pp. 25-36.

Nriagu, J.O. y Pacyna, J.M. **Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals.** Nature. 1988; 333:134-139.

Paschoa, A.S., Warenn, M.E., Singh, N.P., Bruenger, F.W., Miller, S.C., Cholewa, M. y Jones, K.W. **Localization of vanadium-containing particles**

**in the lungs of uranium/vanadium miners.** Biol. Trace Element Res. 1987; 13:275-282.

Petit, T.L. 1988. **Synaptic plasticity and the structural basis of learning and memory.** En: Neurology and Neurobiology. Neural Plasticity: A life time Approach, Vol. 36. Eds. Petit T.L., Ivy, G.O. Liss, New York, pp, 201-234.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., Lamantia, A.S. y McNamara, J.O. 2001. **Invitación a la neurociencia.** Ed. Panamericana. Argentina.

Ramírez, P., Eastmond, D.A., Laclete, J.P., Ostrosky-Wegman, P. **Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide.** Mutat. Res. 1997; 386: 291-298.

Rao, A. y Craig, A.M. **Signaling between the actin cytoskeleton and the postsynaptic density of dendritic spines.** Hippocampus. 2000; 10 527-541.

Rivas-Arancibia, S., Colín-Barenque, L., Dorado, M.C. y Fortoul, T. 2001. **Estrés oxidativo y neurodegeneración.** En: Temas selectos de neurociencias II. Ed. Javier Velásquez Moctezuma. UAM-PUIS. pp: 351-374.

Roshchin, A.V., Ordzhonikidze, E.K. y Shalganova, I.V. **Vanadium-toxicity, metabolism, carrier state.** J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1980; 24(4): 377-383.

Sanchez, D.J., Colomina, M.T. y Domingo, J.L. **Effects of vanadium on activity and learning in rats.** Physiol. And Behavior. 1998; 63(3): 345-350.

Sharma, R.P., Coulombe, R.A. y Srisuchart, B. **Effects of dietary vanadium exposure on levels of regional brain neurotransmitters and their metabolites.** Biochem. Pharmacology. 1986; 35. 461-465.

Shepherd, G.M. 1998. **Synaptic circuits.** En: The synaptic organization of the brain. Ed: Shepherd, G.M. Cuarta Ed. Oxford University Press. N.Y. pp:1-36.

Sheriff, D.S. **Effect of vanadium on rat liver and testicular glutathione (GSH) and lipid peroxide levels.** Reproductive Toxicology. 1991; 5: 513-515.

Sirevaag, A.M. y Greenough, W.T. **Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. II. Synaptic morphometry.** Dev. Brain Res. 1985; 19: 215-226.



Sokolov, S.M. **Methodological aspects of assessing atmospheric contamination with metal aerosols in the vicinity of thermal power complexes.** J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1986; 30: 249-254.

Sorra, K.E., Fiala, J.C. y Harris, K.M. **Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation.** J. C. Neurology. 1998; 398: 225-240.

Stadtman, E. **Free radicals and the Alzheimer's disease.** Ann. N.Y. 1992; 695:73-76.

Stohs, S.J. y Bagchi, D. **Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions.** Free Radical Biology & Medicine. 1995; 18: 321-336.

Strong, R., Mattamal, M., y Andorn, A. 1993. **The aging brain and age-related neurodegenerative disorders.** En: Free radicals in aging (ed) Yu, B.P. CRC Press. Boca Ratón, F.L. pp: 223-246

Stupien, G., Florian, C. y Rouillet, P. **Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice.** Neurobiology of Learning and Memory. 2003; 80: 32-41.

Svoboda, P., Tesinger, J., Pilar, J. y Vyskocil, F. **Vanadyl (VO<sub>2</sub><sup>+</sup>) and vanadate (VO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ions inhibit the brain microsomal Na, K-ATPase with similar affinities. Protection by transferrin and noradrenaline.** Biochem. Pharmacology. 1984; 33: 2485-2491.

Syed-Saleem-Haider., Abdel-Gayoum, A.A., El-Fakhri, M. y Ghwarsha, K.M. **Effect of selenium on vanadium toxicity in different regions of rat brain.** Human and Exp. Toxicology. 1998; 17: 23-28.

Thinus-Blanc, C., Save, E., Poucet, B. y Buhot, M.C. **The effects of reversible inactivations of the hippocampus on exploratory activity and spatial memory.** Hippocampus. 1991; 1: 365-372.

Tsiani, E. y Fantus, I.G. **Vanadium compounds.** Biological actions and potential as pharmacological agents. Trends in Endocrinology and Metabolism. 1997; 8:31-58.

Trommald, M., Jensen, V. y Andersen, P. **Analysis of dendritic spines in rat CA1 pyramidal cells intracellularly filled with a fluorescent dye.** J. Comp. Neurol. 1994; 353: 260-274.

Turner, T.Y., y Soliman, M.R. **Effects of zinc on spatial reference memory and brain dopamine (D1) receptor binding kinetics in rats.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2000 Oct;24(7):1203-17.

Upreti, R.J. **Membrane-vanadium interaction: A toxicokinetic evaluation.** Molecular and Cellular Biochemistry. 1995; 153: 167-171.

Urano, S.Y., Otonari, T., Makabe, S., Suzuki, S., Ogata, M. y Endo, T. **Aging and oxidative stress in neurodegeneration.** Biofactors. 1998; 7:103-12.

Vera-Adam-Vizi., Ordogh, M., Horváth, I., Somogyi, J. y Vizi, E.S. **Effect of noradrenaline and vanadium on Na+K+ Activated ATPase in rat cerebral cortex synaptosomal preparation.** J. Neural Transmission. 1980; 47: 53-60.

Vrensen, G. y Nuñez, J. **Changes in size and shape of synaptic connections alter visual training: an ultrastructural approach of synaptic plasticity.** Brain. Res. 1981; 218:79-97.

Wang, J., Yuen, V.G. y McNeill, J.H. **Effect of vanadium on insulin sensitivity and appetite.** Metabolism. 2001; 50:667-673.

Weitowicz, J.M., Marin, H.L. y Atwood. **Activity-induced changes in synaptic release sites at the crayfish neuromuscular junction.** J. Neurosci. 1994; 14: 3688-3703.

Wojtowicz, J.M., Marin, L. y Atwood, H.L. **Activity-induced changes in synaptic release sites at the crayfish neuromuscular junction.** J. Neurosci. 1994; 14: 3688-3703.

Wright, J.W., Masino, A.J., Reichert, J.R., Turner, G.D., Meighan, S.E., Meighan, P.C., y Harding, J.W. **Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases.** Brain Res. 2003 Feb 14;963(1-2):252-61.

Zhang, W. y Benson, D.L. **Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses.** Hippocampus. 2000; 10: 512-526.

#### **FUENTES ELECTRÓNICAS**

**Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades.** División de Toxicología ToxFAQs. TM 1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30333 U.S.A. ([http://www.11er1.isciii.es/es/toxfaqs/es\\_tfacts58.pdf](http://www.11er1.isciii.es/es/toxfaqs/es_tfacts58.pdf))

CEPIS. Vanadio. Derecho ambiental internacional. Guías para la salud y la seguridad. **Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas** No. 42 Vanadio. <http://144.16.93.203/energy/hc270799/HDL/ENV/envsp/Vol349.htm#6> (<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsci/e/fulltext/orienta2/cap5c.pdf>).

Horn, K. 1989. **Fundamentos de la higiene del aire,** Berlín Oriental (<http://ces.iisc.ernet.in/energy/Hc270799/HDL/ENV/envsp/Vol356.htm#Bibliografia%20y%20fuentes%20de%20referencia>)

Lenntech Vanadio. **Lenntech water- en luchtbehandeling holding BV** Rotterdamseweg402.M2629.HH.DelfttheNetherlandsTel.+31-15-261.09.00 (<http://www.lenntech.com/espanol/formulario-de-consulta.htm>).

Wenk, G.L. 2001. Behavioral neuroscience. **Learning and memory: Use of Morris water maze task to test spatial memory**. En: Current Protocols in Neuroscience. Cap. 8. John Wiley & Sons. Inc. University of Arizona. Tucson, Arizona.  
(<http://www.wiley.com/legacy/cp/cpns/ns0805.htm>).

World Health Organization Geneva, 1988. **INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Vanadium**. The International Programme Environmental Health. Criteria 81.  
(<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc81.htm>).

WHO. 2000. **Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds**. En: International programme on chemical safety concise international chemical assessment document. Concise International Chemical Assessment. Document 29 VANADIUM PENTOXIDE AND OTHER INORGANIC VANADIUM COMPOUNDS. (<http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad29.htm>).