



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DAÑO OXIDANTE EN CORTEZA CEREBRAL Y PLEXO COROIDEO
DE RATONES EXPUESTOS A PENTÓXIDO DE
VANADIO POR VÍA INHALADA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RUBÉN SALVADOR JIMÉNEZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LAURA COLÍN BARENQUE



2009



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 Y DEDICATORIAS

El presente trabajo de tesis es el resultado de una investigación que desarrollé en el Departamento de Biología Celular y Tisular en la Facultad de Medicina de la UNAM. En dicha investigación tuve la oportunidad de aplicar, en el caso práctico que me ocupó, los conocimientos adquiridos durante mis estudios de la carrera de Biología de la Facultad de Ciencias de nuestra institución. En esta invaluable experiencia formativa recibí innumerables apoyos personales e intelectuales, mismos que me alentaron para continuar la investigación y precisar las conclusiones, además de ofrecerme valiosas orientaciones para preparar la versión final de este trabajo.

Es por ello que deseo externar un agradecimiento especial:

A la Dra. Laura Colín Barenque, por haber dirigido este trabajo de investigación. A mi mentora le agradezco profundamente su dirección y sus valiosas enseñanzas, que además de estar reflejadas en este trabajo, forman ya parte de mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes, por abrirme las puertas en el laboratorio y permitirme integrarme a ese gran grupo de trabajo del que estoy orgulloso de pertenecer.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, por sus valiosas aportaciones para mejorar los contenidos de este trabajo.

Al Dr. Paul Carrillo Mora, se agradece su comprensión y su apoyo para el perfeccionamiento del trabajo.

A la M. en C. Patricia Bizarro Nevares, por apoyarme en todo momento de este proceso.

Fue realmente un honor haber recibido sus aportaciones y consejos para la realización de este trabajo.

De igual forma, hago un agradecimiento especial:

A la M. en C. Gabriela Piñón Zárate, por haberme enseñado todas las técnicas utilizadas en el trabajo de laboratorio.

Al proyecto IN218808 apoyado por PAPIIT.

Al Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” (SDI-PTID.05.01)

A la M.V.Z. Silvia Reyes Maya por el registro de imágenes con el Microscopio confocal LEICA TC5-SP5.

Y a todos mis compañeros de trabajo en el laboratorio: Marce, Michelle, Carlos, Nelly, Carmen, Edgar, Nallely, Estephania, Mónica, Jesús, Sofía, Vianey, Lulú, Silvia, Armando, Adriana, por compartir el espacio de trabajo y contar con su apoyo.

A mis compañeros y amigos de la facultad, Santiago, Kiyoshi, Jessica, Hebe, Nicasio, Chelo, Queletzu, y muchos más, he pasado momentos muy especiales con ustedes.

Este trabajo está dedicado a mi familia, como un reconocimiento al cariñoso apoyo que me brindan en todo momento, y que constituye un aliento y motivación especial para continuar mi formación, orientándome para participar de manera activa y responsable en la vida social y política que me corresponde. También lo dedico especialmente a dos personas que ya no están presentes en vida, pero su cariño e imagen permanecen en mí en todo momento, Ana María López Monsalvo y Graciela Alcázar Alcalá, abuelitas, gracias por todo.

A mis queridos amigos de toda la vida, Armando, Toñin, Sobi, Aldo, Adriana, Citlali, pasarán los años y permanecerán nuestros lazos de amistad.

A Mónica Vásquez Medrano, has sido muy importante para mí en este proceso y en mi vida, te agradezco tu apoyo y tu cariño.

Daño oxidante en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada

INDICE

Tema	Página
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Contaminación atmosférica	11
1.2 Contaminación por metales	14
1.3 Vanadio	15
1.3.1 Historia	15
1.3.2 Generalidades	16
1.3.3 Distribución	16
1.3.4 Usos	17
1.3.5 Toxicocinética	18
1.3.6 Toxicodinamia	18
1.3.7 Efectos en la salud	19
1.3.8 Efectos tóxicos en sistema nervioso	20
1.4 Corteza Cerebral	22
1.5 Barrera hematoencefálica y plexo coroideo	27
1.6 Estrés Oxidante	31
1.7 Peroxidación de Lípidos	33
1.8 4-Hidroxinonenal (4-HNE)	37
1.8.1 4 - HNE presente en enfermedades neurodegenerativas	38
1.8.2 4 - HNE y Alzheimer	39
1.8.3 Enfermedad de Parkinson y HNE	40
2. JUSTIFICACIÓN	41
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVO	41
4.1 Objetivo general	41
4.2 Objetivos particulares	42
5. MÉTODO	43

6. RESULTADOS	45
6.1 Corteza Cerebral	45
6.2 Plexo Coroideo	51
7. DISCUSIÓN	56
7.1 Efecto del vanadio en la generación de estrés oxidante	56
7.2 Peroxidación de lípidos y HNE en Sistema Nervioso	58
7.3 Toxicidad de HNE en corteza cerebral	61
7.4 Toxicidad del vanadio y HNE en plexo coroideo	67
7.5 Enfermedades neurodegenerativas y su relación con la exposición a vanadio y HNE	70
8. CONCLUSIONES	73
9. ANEXO	74
10. BIBLIOGRAFÍA	75

ABREVIATURAS

4-HNE	4-Hidroxinonenal
Aβ	Péptido beta amiloide
ADN	Acido desoxiribonucleico
ALDH5A	5 aldehído deshidrogenasa
AcAr	Acido araquidónico
AP-1	Proteína activadora 1
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Adenosin Tri Fosfatasa
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca²⁺	Calcio
CAT	Catalasa
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenasa
CO₃²⁻	Carbonato
cFLA2	Fosfolipasa 2 citosólica
DAPI	4'-6-Diamidino-2-fenilindol
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
ER	Especies Reactivas
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FFAS	Acidos grasos libres
FLA2	Fosfolipasa A2
GSH	Glutación
Gpx	Glutación peroxidasa
GST	Glutación transferasa
GTP	Guanosin trifosfato
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HOCl	Acido hipocloroso
HO·	Radical hidroxilo

iFLA2	Fosfolipasa 2 independiente
JNK	Cinasa junos
K⁺	Potasio
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LOX	Lipooxigenasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
Mg²⁺	Magnesio
MDA	Malonaldehído
MMP-2	Metaloproteinasa 2
MMP-9	Metaloproteinasa 9
Na⁺	Sodio
NADP	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NaVO₃	Metavanadato de sodio
NF-kB	Factor nuclear-kb
NO	Oxido nítrico
O⁻	Anión superóxido
O₂	Oxígeno
OH⁻	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
PI-3K	Cinasas 3 fosfatidil inositol
RL	Radicales libres
ROO⁻	Peróxido
S₂	Sulfuro
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
sFLA2	Fosfolipasa 2 secretora
UV	Ultravioleta
VO²⁺	Vanadil
V₂O₅	Pentóxido de vanadio
V_(IV)-OOH	Vanadil hidroperóxido
V_(V)-OO⁻	Peroxivanadil

RESUMEN

La contaminación ambiental es un problema a nivel mundial y un factor de riesgo importante para la salud humana. La Zona Metropolitana de la Ciudad de México ha presentado un rápido crecimiento vehicular, considerada como la mayor causa de contaminación. Las emisiones gaseosas de los automóviles involucra la suspensión en el aire de partículas suspendidas que contienen mezclas gaseosas compuestas por elementos metálicos como níquel, zinc y vanadio. El vanadio es considerado un contaminante importante dado que se encuentra en altas concentraciones en el petróleo mexicano y sus derivados, como la gasolina. Entre los compuestos que puede formar este elemento, el más tóxico y abundante es el pentóxido de vanadio (V_2O_5), cuya principal vía de absorción es la inhalada, es transportado en el organismo por las proteínas transferrina y albúmina y puede llegar al sistema nervioso central, sobrepasando la barrera hematoencefálica. En estudios previos en nuestro grupo de trabajo, se reportó pérdida de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de corteza cerebral, pérdida de cilios y de uniones intercelulares de células endoteliales, además de desprendimiento de su membrana basal en el cuarto ventrículo de animales expuestos a V_2O_5 . Los efectos tóxicos que presenta el vanadio se han asociado a su capacidad inducir mayor producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), las cuales a su vez pueden generar estrés oxidante, que tiene como blanco preferencial a los lípidos, generando el proceso de peroxidación de lípidos. El objetivo del presente trabajo fue identificar el efecto del V_2O_5 en corteza cerebral y plexo coroideo, utilizando como marcador de daño oxidante al 4-Hidroxinonenal (4-HNE), el principal producto de la peroxidación de lípidos. Cuarenta ratones machos CD1 fueron expuestos a inhalación a V_2O_5 0.02M una hora 2 veces por semana durante un mes. Cada semana se sacrificó un subgrupo a la 2^a, 3^a y 4^a semana. Se trabajó con un grupo control, el cual se dividió en subgrupos que fueron sacrificados en los mismos tiempos. Los animales fueron sacrificados y los cerebros extraídos se procesaron mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando como anticuerpo primario el 4-HNE y como secundario el Alexa 488, además se utilizó

DAPI para marcar los núcleos de las células de la corteza y células endimarias de plexo coroideo. El análisis histológico se realizó en un microscopio confocal. Los resultados obtenidos mostraron mayor número de neuronas piramidales marcadas en corteza cerebral a la tercera y cuarta semana de inhalación a V_2O_5 . Además, la marca con DAPI mostró la presencia de núcleos apoptóticos, cuya presencia fue mayor a las 4 semanas de exposición. En plexo coroideo se observó que la densidad en la marca aumentó conforme el tiempo de exposición fue mayor. Se observaron desprendimiento de la membrana basal de las células del epéndimo y desprendimiento del endotelio, así como rompimiento de las uniones intercelulares de las células endimarias a las 3 y 4 semanas de inhalación. Los resultados obtenidos en corteza sugieren que el vanadio induce un aumento en la producción de ERO, que generan estrés oxidante, el cual tiene preferencia por los lípidos de membrana, sufriendo peroxidación y generando productos tóxicos como es el 4-HNE, el cual tiene la capacidad de inhibir proteínas que participan en la transmisión sináptica, como son el transportador de glutamato del astrocito, GLT-1, el transportador de glucosa neuronal, GLUT3 y la ATPasa de Na^+K^+ . La inhibición de estas proteínas puede generar muerte neuronal por excitotoxicidad. Los resultados obtenidos en el plexo coroideo sugieren que el vanadio inhibe proteínas que realizan reacciones de fosforilación, como son las fosfotirosinas, lo cual genera el rompimiento entre las uniones intercelulares de las células endimarias, alteración en la estructura del plexo y rompimiento de la barrera hematoencefálica.

Palabras clave: Contaminación ambiental, peroxidación de lípidos, estrés oxidante, pentóxido de vanadio, corteza cerebral, plexo coroideo, 4-Hidroxinonanal.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación atmosférica

La contaminación es un problema a nivel mundial, se presenta con mayor intensidad en las ciudades con poblaciones de más de 10 millones de personas, y a estas se les considera como megaciudades (Molina y Molina, 2004). En estas megalópolis, durante las últimas décadas han incrementado las fuentes contaminantes, principalmente como resultado de actividades antropogénicas, como son las emisiones industriales y las emisiones gaseosas de los automóviles.

La contaminación atmosférica está definida como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afectar estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Ballester, 2005). Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al ser depositada en el aire puede modificar sus características naturales. El humo, el polvo, los gases, las cenizas, las bacterias, y los residuos (Vargas, 2005) son algunas de las sustancias más comunes que flotan en la atmósfera de las grandes ciudades. Las actividades del hombre se llevan a cabo en su mayor parte dentro de los dos primeros kilómetros de la atmósfera. Los contaminantes producidos por estas actividades se depositan directamente en la tropósfera donde se mezclan y transportan (Vargas, 2005).

Actualmente, las principales fuentes contaminantes se presentan por residuos liberados por la combustión del diesel y de la gasolina de los automotores (Nadal et al., 2004), las industrias, incineración de basura y los solventes (Briggs, 2003). Estos contaminantes son liberados en forma de partículas suspendidas, compuestas de una capa inerte de carbono cubierta por capas de moléculas contaminantes como metales, sales de ácidos, compuestos de sulfuro, componentes orgánicos pequeños, etc (Molina y Molina, 2004). Estas mezclas complejas varían dependiendo de la época climática, la geografía, las condiciones

meteorológicas y las fuentes contaminantes, pero se sabe con certeza que llegan a ser tóxicas y volátiles (Ballester, 2005).

Las fuentes de contaminación naturales también son importantes, ejemplo de ellas son las emisiones resultantes de incendios forestales que liberan monóxido de carbono (CO), durante la combustión de la madera (Roubicek, 2007); emisiones de arsénico en las rocas cercanas a éstos, liberadas en lagos y lagunas (Briggs, 2003), la acumulación de metales pesados durante la erosión del suelo y otras emisiones liberadas en erupciones volcánicas, que pueden contener níquel, cobre, cadmio, vanadio, hierro, cobalto, antimonio y arsénico (Freeman, 1998).

Una de las clasificaciones de contaminantes más aceptada es aquella que diferencia contaminantes primarios y secundarios. Los contaminantes primarios están en la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o por actividades del ser humano, como es el CO. Los contaminantes secundarios son los que se forman en la atmósfera por medio de reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen algunos contaminantes primarios y otros elementos (Brunekreef y Holgate, 2002).

Dentro de los contaminantes secundarios podemos encontrar a las partículas suspendidas, las cuales presentan diferencias en cuanto a características físicas, químicas o biológicas. Respecto a su tamaño pueden clasificarse en:

- Partículas burdas o gruesas, con un diámetro menor de 10 μm (PM₁₀) y mayor de 2.5 μm . Estas compuestas principalmente por sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro y cloruros.
- Partículas finas, con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 μm (PM_{2.5}). Están compuestas por productos derivados de la combustión, particularmente del diesel, entre los cuales se incluyen metales como

plomo, cadmio, níquel, manganeso, carbono y vanadio. Estas partículas suelen ser más tóxicas que las gruesas.

- Partículas ultrafinas, aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor de 1 μm . Están compuestas por los productos de quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel. Tienden a unirse a partículas de mayor tamaño, por lo que permanecen aisladas en la atmósfera durante periodos muy cortos (Vallejo et al., 2003).

La Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) está considerada como una conurbación con los niveles de contaminación más altos en el mundo. Se encuentra en un área localizada en un valle de más de 3,500 km a una altitud de 2,200 metros snm. Está rodeada por altas montañas con alturas mínimas de 1,000m. La zona metropolitana, que abarca la Ciudad de México y cerca de 20 municipios conurbados del Estado de México, tiene alrededor de 20 millones de habitantes (SEMARNAT, 2000). Su contaminación ha sido intensa debido principalmente a las emisiones de las numerosas zonas industriales y a las emisiones vehiculares en un valle con cambios frecuentes en las condiciones meteorológicas que limitan la circulación de aire limpio (Calderón-Garcidueñas, 2002; SEMARNAT, 2000).

De acuerdo con los registros de la SEMARNAT en el año 2000, en la ZMCM hay más de 3.3 millones de automóviles registrados, de los cuales un 95% utilizan gasolina, el 4% diesel, y el 1% utiliza gases derivados como combustible. La contaminación se ha incrementado debido a que los procesos de combustión son menos eficientes en grandes altitudes, como el caso de esta metrópoli. La concentración de oxígeno está disminuida (-23%) en relación con la del nivel del mar, lo cual permite que se reduzca la eficiencia de los motores de combustión interna, aumentando las concentraciones de hidrocarburos en el aire, que favorece a su vez la exposición a radiaciones capaces de transformar compuestos oxidantes como óxidos metálicos. Además, debido a la altitud que presenta la

ciudad, puede recibir más radiación solar, lo cual puede facilitar reacciones fotoquímicas en la atmósfera (Vallejo et al., 2003; SEMARNAT, 2000).

1.2 Contaminación por metales

Los metales son elementos de origen natural y presentan una composición química característica (Chang, 1999). Los metales de transición en particular, se encuentran en el ambiente en forma de óxidos, son insolubles y cuando se acumulan pueden llegar a concentraciones tóxicas. Entre los más distribuidos en la corteza terrestre encontramos; cadmio, cromo, cobalto, cobre, hierro, cadmio, manganeso, sodio, potasio, titanio (Chang, 1999).

Los metales pesados son los que presentan mayor toxicidad. Aquellos que se originan de actividades antropogénicas se localizan en sedimentos, ríos y lagos, y aumentan sus índices de contaminación (Peng et al., 2008).

Como resultado de la combustión, los metales pesados se transportan hacia la atmósfera, adosados a partículas suspendidas. La exposición de la población a estos metales se combina con la exposición a emisiones de gases como son dióxido de sulfuro, óxidos de nitrógeno y CO (Fernández, 2008).

En un estudio realizado por Calderón-Garcidueñas y cols. en 2002 con caninos que habitaban en la zona del sureste del área metropolitana de la Ciudad de México y caninos que habitaban en la ciudad de Tlaxcala, la cual presenta características geográficas similares a la Ciudad de México pero con mucho menor contaminación, se encontró que las biopsias de los caninos de la Ciudad de México presentaron alteraciones en el epitelio respiratorio y en las mucosas olfatorias y respiratorias. En el caso de sistema nervioso central, mostraron alteraciones en las capas del bulbo olfatorio y en células gliales (astrocitos y microglia), así como una disfunción en la barrera hematoencefálica y en el transporte de lípidos además de la presencia de placas extracelulares de A β y marañas neurofibrilares en la corteza frontal.

Aunado a estos datos, las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson también se han asociado a la contaminación por metales (Valko et al., 2005), debido a que en las megaciudades se presenta el mayor número de personas que padecen dichas enfermedades. Dado que los metales son compuestos no biodegradables, persisten largo tiempo en la atmósfera, y forman compuestos poco solubles con otras moléculas como el hidróxido (OH^-), el carbonato (CO_3^{2-}) o el sulfuro (S_2) (Ghio y Samet, 1999).

La concentración de los metales en la atmósfera de la Ciudad de México ha aumentado significativamente, Fortoul y cols. (1996 y 2002) realizaron comparaciones en las concentraciones de metales en tejido pulmonar de necropsias de personas que vivieron en los 60's y en los 90's. Se observaron niveles elevados en tejido pulmonar de metales como cadmio, cobre, cobalto, níquel, plomo y vanadio en las necropsias de residentes de los 90's, destacando este último metal debido a que ha incrementado sus niveles considerablemente en los últimos años.

1.3 Vanadio

1.3.1 Historia

En 1802, Andrés Manuel del Río descubrió en una mina de México un mineral de plomo que contenía un nuevo metal similar al cromo y uranio, llamándolo panconium por la variedad de colores de sus sales, al cual le cambió el nombre posteriormente a erythronium, en alusión al color rojo de sus sales al tratarlo con ácidos. En 1831, Sefstrom y Berzelius descubrieron en Suecia el mismo metal que halló del Río y lo llamaron vanadio, en honor a Vanadis, diosa de la belleza, reconociendo la riqueza de colores de sus derivados (Nriagu 1998.).

1.3.2 Generalidades

El vanadio se encuentra dentro del grupo VB de la tabla periódica, en la posición 23. Puede encontrarse en estados de oxidación que van desde -1 a $+5$, pero sus valencias más comunes en el ambiente son $+3$, $+4$ y $+5$. Esta estructura química le permite al vanadio tener la capacidad de formar compuestos con otros elementos, como el oxígeno por ejemplo, para formar óxidos de vanadio. El vanadio metálico no existe de forma natural. Su estado de oxidación más tóxico es $+5$. El compuesto de vanadio más abundante, utilizado y tóxico es el pentóxido de vanadio (V_2O_5) (Barceloux, 1999). El vanadio derivado de la combustión del petróleo es emitido como óxido. El V_2O_5 conduce reacciones hidrolíticas en agua, generando soluciones de vanadato, éstas reacciones son más rápidas a pH básico que a un pH ácido. El V_2O_5 es muy poco soluble en agua, los óxidos de vanadio presentan propiedades de solubilidad similares. En soluciones acuosas, como puede ser el petróleo, el vanadio se encuentra como vanadil, su forma hidratada (VO^{2+}). En pH neutros, así como en condiciones ambientales, el vanadio se presenta en su forma pentavalente, característica que le permite entrar a la célula y ser reducido a vanadil por reductores biológicos, como son el tripéptido glutatión (GSH) y el ácido ascórbico (Valko et al., 2005).

1.3.3 Distribución

El vanadio es un elemento ampliamente distribuido en el mundo, conforma el 0.015% de la corteza terrestre. Sus concentraciones en el agua varían según el lugar, entre 0.2 y 100 $\mu\text{g/l}$ en agua dulce y entre 0.2 y 29 $\mu\text{g/l}$ en agua de mar.

Las concentraciones de vanadio en el petróleo crudo varían, sin embargo, el petróleo venezolano, que contiene 282 ppm de vanadio, y el petróleo mexicano tipo "Maya", con un contenido de 243 ppm, son los tipos de petróleo que presentan las mayores concentraciones de este metal (Nriagu, 1998). Una vez que el petróleo crudo es procesado en gasolina y ésta entra en combustión, puede

liberarse en la atmósfera hasta un 60% de V_2O_5 en forma de partículas suspendidas. Los óxidos de vanadio y otros compuestos del metal como los vanadatos son insolubles en agua y están altamente concentrados en la superficie terrestre. La mayoría de la producción del vanadio se realiza como coproductos en la extracción de otros elementos como son hierro, fósforo y uranio (Nriagu, 1998). La incineración de combustibles de petróleo, como el diesel y la gasolina, es la principal fuente emisora de vanadio en la atmósfera (Avila Costa et al., 2004). También puede ser liberado por actividad volcánica, erosión eólica y aerosoles marinos (Mugica et al., 2001). Para el personal que se ve expuesto a dichos niveles de vanadio, como son industrias o gasolineras, esto se convierte en una cuestión de emergencia (Byczkowsky y Kulkarni, 1998).

1.3.4 Usos

El vanadio presenta usos muy variados. Los óxidos de vanadio y vanadatos se usan en la producción de vidrios de varios tipos y colores. El pentóxido y otros compuestos de vanadio han sido usados desde 1874 como reveladores y agentes colorantes en la fotografía y cinematografía. Las sales solubles de vanadio son usadas como insecticidas, fungicidas, fertilizantes y como componentes activos en baterías de litio recargables (Nriagu, 1998).

Este metal se emplea en un 90 % combinado con otros metales formando aleaciones (80% como ferrovanadio y 9% como compuestos no ferrosos en la industria aeroespacial). Además, los óxidos de vanadio se emplean para las aleaciones de metales utilizadas en la industria metalúrgica, y como un componente de un tipo de acero usado en partes de automóviles, resortes en plantas generadoras de energía y algunas otras actividades industriales (Nriagu, 1998).

1.3.5 Toxicocinética

La fuente de absorción de vanadio más importante es por inhalación, dado que se puede absorber hasta el 35% de vanadio soluble, compuestos como el V_2O_5 se absorben después de la instilación en los pulmones (Barceloux, 1999), lo anterior resulta de importancia dado que el vanadio se ha convertido en uno de los principales contaminantes del aire en las grandes urbes. La absorción en el tracto gastrointestinal es escasa (sólo se absorbe del 0.5 al 2% de la cantidad ingerida). El vanadio también puede absorberse por la piel cuando se encuentra en forma de sales en solución acuosa. No obstante, en este caso la absorción es muy pobre (Barceloux, 1999).

El vanadio es transportado en el plasma y la distribución por la sangre es rápida (de 1 a 1.5 hrs. aproximadamente). Cerca del 90% de vanadio en la sangre se encuentra en el plasma, principalmente como vanadil unido a las proteínas transferrina y albúmina (Cortizo et al., 2000). Se ha reportado que la concentración de vanadio en el cerebro es del 5% de la concentración en sangre aproximadamente (Barceloux, 1999).

La principal ruta de eliminación del vanadio es mediante la excreción por la orina en un 90% y el resto por las heces (Barceloux, 1999). La excreción se da relativamente rápida, la eliminación del vanadio por la orina es de 20-40 hrs. Además, se sabe que la eliminación de óxidos de vanadio es bifásica, con una tasa rápida de 10-20 hrs, y una fase terminal larga de 40 a 50 días (Barceloux, 1999).

1.3.6 Toxicodinamia

El vanadio entra a la célula por canales inespecíficos mediante el mecanismo de transporte aniónico, en el cual, GSH y el ácido ascórbico reducen el V_2O_5 a vanadil, este último es no reactivo (Valko et al., 2005). Una vez que el vanadio entra a la célula, presenta un proceso de dos fases. El primero tiene un equilibrio

relativamente rápido del vanadato (v) por la vía de transporte de canales de aniones, y la fase lenta, reducción del vanadato (v) a vanadil (iv). El vanadio y vanadato se unen a los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos de proteínas y a fosfatos (Barceloux, 1999), y presentan una gran capacidad para oxidarse, reaccionando con enzimas que contienen fosfato (fosfohidrolasas de ATP, adenilato ciclasa, deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato, ribonucleasa, etc). El vanadio tiene la capacidad de inhibir la ATPasa de Na^+/K^+ y la glucosa 6-fosfatasa (Barceloux, 1999; Morinville, 1998).

El V_2O_5 interviene en la actividad de MAP kinasas como son ERK, JNK y p38, las cuales desencadenan vías de señalización que intervienen en la regulación de la respuesta inmune (Huang et al., 2000). Dicha activación de MAPKs pueden provocar una reducción en el crecimiento celular por bloqueo de ciertas fases del ciclo celular. (Morinville et al., 1998)

1.3.7 Efectos en la salud

Diariamente podemos estar expuestos a cantidades cercanas de 10 a 70 mg de vanadio, como resultado de la combustión del petróleo y sus derivados como el carbón, los aceites pesados y la generación de electricidad y calor (WHO, 2000). Los seres humanos también podemos acumular vanadio por ingestión de alimentos como el trigo, la semilla de soya, el aceite de oliva, el aceite de soya, los mariscos y los hongos. No obstante, el vanadio no es considerado como un elemento esencial, aunque lo puede ser para otros organismos, como las aves (Barceloux, 1999).

Los compuestos de vanadio pueden presentar una variedad de efectos tóxicos dependiendo de la naturaleza de la especie, la dosis y la vía de administración. Los óxidos de vanadio son más tóxicos que las sales de vanadio (Valko et al., 2005). Los efectos que puede presentar este elemento se caracterizan por un gran espectro funcional y bioquímico.

Se han realizado estudios en personas ocupacionalmente expuestas a V_2O_5 , quienes presentaron diversas alteraciones como son lengua verde, pérdida de peso y necrosis de hígado (Al Bayati et al., 1992), irritación de los ojos (Chen et al., 2001) y de la piel (Carter et al., 1997). La inhalación de vanadio es la vía de mayor absorción, por lo que el tracto respiratorio se daña y produce estornudos, dolores de pecho y de garganta (Byczkowski y Kulkami, 1998).

El vanadio también se ha relacionado con enfermedades como la *diabetes mellitus*, que es una patología asociada al incremento en la producción de radicales libres (RL). En un estudio realizado en ratas hembras diabéticas, se demostró que el vanadio tiene la capacidad de mimetizar la acción de la insulina a través de rutas de señalización, reduciendo significativamente los niveles de glucosa en sangre de ratas, no obstante, su administración incrementa los niveles de GSH en el cerebro de las ratas diabéticas (Yanardag y Tunali, 2006).

El músculo cardíaco es susceptible a los efectos tóxicos del vanadio, como se demostró en un estudio realizado en *Sparus aurata*, una especie de pez, donde se observó que el vanadato produce peroxidación lipídica en el tejido cardíaco (Soares et al., 2007).

Una vez que el vanadio entra al organismo y es reducido a vanadil, reacciona con moléculas para formar radicales libres, por lo que el vanadio es presentado como un metal generador de estrés oxidante.

1.3.8 Efectos tóxicos en sistema nervioso

La entrada del vanadio al sistema nervioso central se da mediante transportadores aniónicos inespecíficos, y puede generar reacciones de óxido reducción en la mitocondria, e inducir la generación de estrés oxidante. En la intoxicación laboral por este metal se ha observado cefalea, debilidad, náuseas, vómito, alteraciones en los reflejos y excitabilidad neuromuscular manifestada en temblor de dedos y manos (Nriagu, 1998).

En otras aportaciones realizadas para conocer el papel que juega el vanadio en el sistema nervioso, se ha observado que este elemento comparte características químicas con el fósforo, por lo que puede competir con éste, siendo un factor importante que perturba el metabolismo del fósforo en el tejido nervioso (Parsadanian et al., 1998).

En estudios realizados en humanos que presentaron exposición laboral a este metal, se demostró que puede inducir deterioro neuroconductual, mediante disminución en habilidades de atención y viso-espaciales (Barth et al., 2002). Además, el V_2O_5 puede inducir trastornos afectivos en trabajadores expuestos a este compuesto (WHO, 2000). El V_2O_5 altera la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ , disminuyendo su actividad en eritrocitos y al mismo tiempo incrementa en un 50% la concentración de vanadato en plasma, por lo que se sugiere que el incremento del vanadio en el cerebro y los efectos producidos en esta ATPasa pueden ser factores en la etiología de enfermedades maniaco depresivas, y se requieren medicamentos terapéuticos a base de litio, ascorbato y antidepresivos para reestablecer la actividad de la enzima (Svoboda et al., 1984; Conri et al., 1986).

Catalán y colaboradores en 1987, observaron por cromatografía, que el vanadato es capaz de modificar el metabolismo de los lípidos, alterando su estructura, provocando alteraciones en la fluidez de la membrana.

En otro estudio realizado para determinar el efecto tóxico inducido por el vanadio en ratas Wistar lactantes, se demostró que la administración del vanadio ($NaVO_3$) en las ratas produjo un retraso en la apertura del párpado y decremento en la fuerza muscular y locomoción en crías de ambos sexos. También se observó disminución en la mielina del cuerpo calloso y cerebelo, sugiriendo que el vanadio podría inducir neurotoxicidad en el desarrollo del sistema nervioso central de las ratas (Soazo y García, 2007).

En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios en un modelo de exposición por inhalación a V_2O_5 en ratones; se ha observado que el vanadio induce decremento significativo en el número de neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra y en la densidad de espinas dendríticas del estriado (Avila-Costa et al., 2004). En otro trabajo realizado por Avila-Costa y cols. en 2005, se registró alteración del epitelio ependimal del cuarto ventrículo de ratones, pérdida de cilios en las células ependimarias, separación de su membrana basal y pérdida de uniones entre ellas. Colín-Barenque y cols. en 2007 analizaron el efecto del vanadio en la actividad de las metaloproteinasas (MMPs) en corteza prefrontal, estriado, hipocampo y bulbo olfatorio y observaron niveles incrementados de MMP-9 en todas las estructuras analizadas mientras que la MMP-2 incrementó en hipocampo y estriado.

Los datos observados en estos trabajos, sugieren que el vanadio induce importantes alteraciones celulares. Dichas observaciones están implicadas en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE). También se determinó que el vanadio está involucrado en la alteración de la memoria espacial y pérdida de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, así como necrosis y alteraciones del neuropilo (Avila Costa et al., 2006). En otro estudio previo se observó que el vanadio induce pérdida de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral de ratones (Aley et al., 2004).

1.4 Corteza cerebral

La corteza cerebral, es una estructura que constituye la capa externa de los hemisferios cerebrales, e integra toda la información para posteriormente ser procesada. Para esto, participan distintas áreas de asociación. El funcionamiento de la corteza es global e integrado, donde se analiza, sintetiza, correlaciona, integra y se modifican acciones que realiza el organismo. Cada hemisferio está dividido en cuatro lóbulos, denominados según los huesos del cráneo que se ubican sobre ellos. Estos lóbulos son el lóbulo frontal, que contiene principalmente

la corteza motora primaria; el lóbulo parietal, que contiene la corteza somatosensorial primaria, y está relacionado con la sensación corporal; y los lóbulos temporal, relacionado con la audición, y lóbulo occipital, relacionado con la visión. Además de su papel en el procesamiento de la información, cada lóbulo de los hemisferios cerebrales tiene funciones cognitivas características. Por lo tanto, el lóbulo frontal es fundamentalmente para planificar la conducta, el lóbulo parietal para percibir estímulos como dolor, calor, etc, el lóbulo temporal para el reconocimiento de objetos y el lóbulo occipital para distintos análisis visuales (Purves, 2006). Diversas áreas de la corteza se ocupan del procesamiento de la información sensitiva o de la emisión de órdenes motoras. Los principales tipos celulares de la corteza cerebral se clasifican como células piramidales, células granulosas y células fusiformes.

Las células piramidales representan a la población de neuronas más abundante de la corteza cerebral. Sus axones constituyen la principal fuente de sinapsis glutamatérgicas corticales, las espinas dendríticas representan el principal elemento postsináptico de las sinapsis excitadoras en la corteza cerebral. Las células piramidales son elementos clave en el mecanismo del enlace global de la percepción sensorial que es el fenómeno mediante el cual el cerebro integra simultáneamente la información procesada en distintas áreas corticales para producir una percepción unificada, continua y coherente. Son las únicas neuronas de proyección, ya que la información que se procesa en la corteza sale de ella a través de los axones de las células piramidales, para alcanzar otras áreas corticales o núcleos subcorticales (DeFelipe y Fariñas, 1992; Felleman y Van Essen, 1991). Las neuronas piramidales tienen la forma que las designa, con una dendrita apical y numerosas dendritas basales que se proyectan horizontalmente desde el cuerpo celular. Estas células varían en tamaño desde 10 a 50 μm . Las células granulosas o estrelladas tienen forma poligonal, escaso citoplasma y un tamaño de 4 a 8 μm . Estas células poseen numerosas dendritas y un axón corto.

Las células fusiformes presentan un eje más largo vertical a la superficie, numerosas dendritas se originan en los polos de estas células. Otros tipos celulares que se encuentran en la corteza son las células horizontales de Cajal y las células de Martinotti, que son células pequeñas multiformes con dendritas cortas y axones ascendentes (Purves, 2006; Kandell, 2000).

La corteza cerebral está organizada en capas celulares (Figura 1) (Esquema 1).

Los detalles de la organización de las capas varían en toda la corteza. La corteza contiene 6 capas celulares, numeradas desde la superficie hasta la sustancia blanca, de la siguiente forma:

Capa I- Molecular- Conformada por abundantes dendritas apicales de células piramidales más profundas, además de escasas células de Cajal.

Capa II- Granulosa externa- compuesta fundamentalmente por pequeñas células granulosas densamente agrupadas.

Capa III- Piramidal externa- Conformada por neuronas piramidales. Su tamaño aumenta desde el límite superficial hasta el límite más profundo. Las dendritas pasan hasta la capa molecular y los axones hasta la sustancia blanca.

Capa IV- Granulosa interna- Compuesta por gránulos un poco más grandes a los de la capa II, muchas de las cuales tienen axones cortos que se ramifican dentro de la capa.

Capa V- Piramidal interna- Constituida por neuronas piramidales mayores que las de la capa III. Sus dendritas apicales ascienden hacia la capa molecular. Los axones de estas células salen de la corteza principalmente como fibras de proyección.

Capa VI- Polimorfa o multiforme – Constituye la capa más profunda donde predominan las células fusiformes y algunas células de Martinotti. Contiene también dendritas basales de neuronas de la capa III, y muchas fibras nerviosas que entran en la sustancia blanca subyacente.

En todas las regiones de la corteza cerebral se originan fibras de proyección. En el caso de las áreas corticales motoras, estas proyecciones conducen impulsos relacionados con la función motora, la modificación del tono muscular y participan en la regulación de la actividad reflectora, sus somas tienen una distribución laminar específica. Sus fibras se proyectan hacia la médula espinal, para inervar a los músculos esqueléticos, o proyectar hacia varios núcleos del tronco del encéfalo y el tálamo (Purves, 2006). En la corteza cerebral se identifican distintas áreas motoras: el área motora primaria, cuya función es la ejecución de movimientos, dándoles fuerza y dirección, y las áreas premotora y motora suplementaria, la primera localizada en posición rostral a la corteza motora y la segunda en la cara medial del lóbulo frontal, tienen la función de programar y ejecutar secuencias de movimientos complejos (Purves, 2006; DeFelipe y Fariñas, 1992).

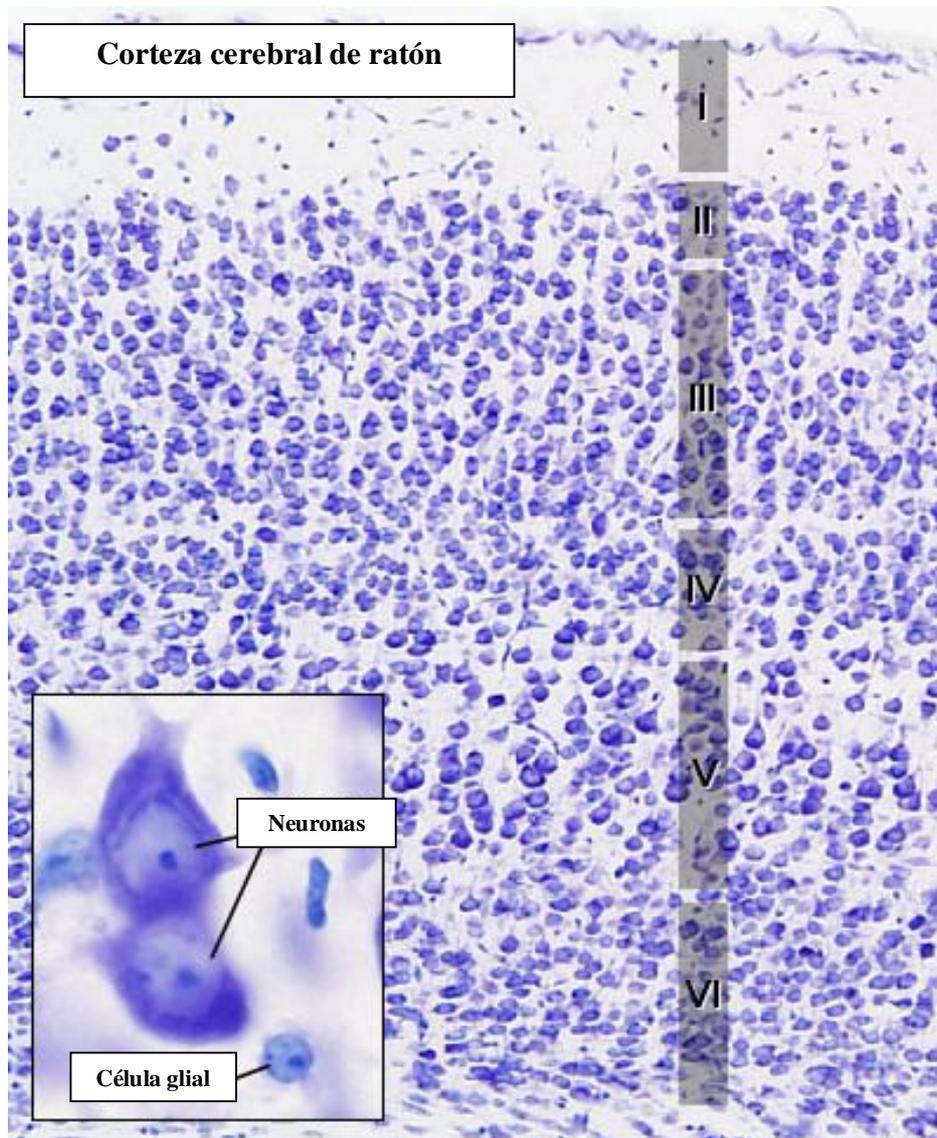


Figura 1- Imagen histológica de la corteza cerebral de ratón, se observa la estructura de las 6 capas celulares (modificado de www.javeriana.edu.co)

separa dos grandes compartimentos del SNC, el encéfalo y el LCR, del sistema sanguíneo vascular, regula el transporte de sustancias químicas entre estos dos compartimentos, por lo tanto es muy importante para la protección y homeostasis del SNC, (Radisky y Kaplan, 1999).

La BHE está formada por endotelio capilar, que posee uniones estrechas entre células endoteliales contiguas, astrocitos y pericitos, que envuelven las células endoteliales de los capilares. La pared de un capilar encefálico consiste sólo en células endoteliales aplanadas sobre una membrana basal, rodeada por una delgada capa adventicia. Las uniones estrechas entre las células endoteliales de los capilares encefálicos restringen la difusión intercelular, lo cual le da propiedades de permeabilidad como en una membrana plasmática (Radisky y Kaplan, 1999).

Además de estas uniones estrechas entre células endoteliales, los “pies terminales” de los astrocitos, regiones que constituyen el otro elemento de la barrera, rodean el exterior de las células endoteliales capilares, por lo que hay una influencia importante de los astrocitos sobre la formación y el mantenimiento de la barrera (Purves, 2006).

El pasaje de moléculas a través de la barrera hematoencefálica comprende procesos de difusión, transporte mediado por proteínas (transportadoras) y transporte activo con un gasto de energía. El agua es la sustancia más importante que entra al encéfalo por difusión; su velocidad de intercambio es alta pero está limitada por la permeabilidad del endotelio capilar y por la magnitud del flujo sanguíneo cerebral. De esta forma, el endotelio capilar, la membrana basal homogénea y continua y las numerosas prolongaciones astrocíticas constituyen la única separación entre el plasma y el espacio extracelular dentro del SNC. Los ventrículos cerebrales y los plexos coroideos comprenden la barrera hemocefaloraquídea (Purves. 2006; Carpenter, 1995).

El LCR es considerado como un ultrafiltrado del plasma, por la semejanza que poseen ambos, salvo diferencias en la concentración de sus proteínas (plasma 6500 mg/100g) (LCR 25 mg/100g). En general, el LCR posee mayores concentraciones de Na^+ , Cl^- y Mg^{2+} y menores de K^+ , Ca^{2+} y glucosa. Se ha sugerido que el LCR es un producto de secreción que comprende mecanismos de transporte activo controlados por procesos enzimáticos. Alrededor del 70% del LCR es secretado por el plexo coroideo, en los ventrículos cerebrales. El 30% restante del LCR procede de la producción metabólica del agua, como la oxidación de la glucosa y el ultrafiltrado capilar. El LCR se forma con una presión hidrostática de 15 mm de H_2O , suficiente para impulsar su circulación a través de los ventrículos y del espacio subaracnoideo. Las pulsaciones del plexo coroideo también contribuyen al movimiento del LCR dentro del sistema ventricular, este líquido se forma y elimina de manera constante (Radisky y Kaplan, 1999).

El plexo coroideo es una estructura que se extiende desde la superficie ventricular hacia el LCR (Esquema 2, inciso A). El plexo consiste en una capa de epitelio cúbico de células endimarias, asentada sobre una membrana basal que cubre una extensa red capilar incluida en un estroma de tejido conjuntivo (Figura 2) (Esquema 2, inciso B). Por esto, los plexos coroideos son estructuras altamente vascularizadas. Los capilares del estroma de tejido conjuntivo poseen fenestraciones endoteliales, pero las uniones estrechas en las regiones apicales de las células endimarias forman una barrera para el intercambio de proteínas y solutos hidrofílicos entre la sangre y el LCR. El plexo coroideo regula la producción y composición del LCR. Una bomba de intercambio de Na^+ - K^+ catalizada por una ATPasa de Na^+ - K^+ , bombea Na^+ hacia la superficie ventricular del plexo y K^+ en la dirección contraria. De esta forma se elimina K^+ del LCR, mientras que el Na^+ se introduce de forma activa. También regula Mg^{2+} y Ca^{2+} . El LCR secretado por el plexo, en comparación con el ultrafiltrado del plasma, contiene una concentración mayor de Mg^{2+} y menor de Ca^{2+} . Alrededor del 25 % del volumen sanguíneo que fluye al plexo coroideo es secretado normalmente en forma de LCR (Purves, 2006; Kandell, 2000).

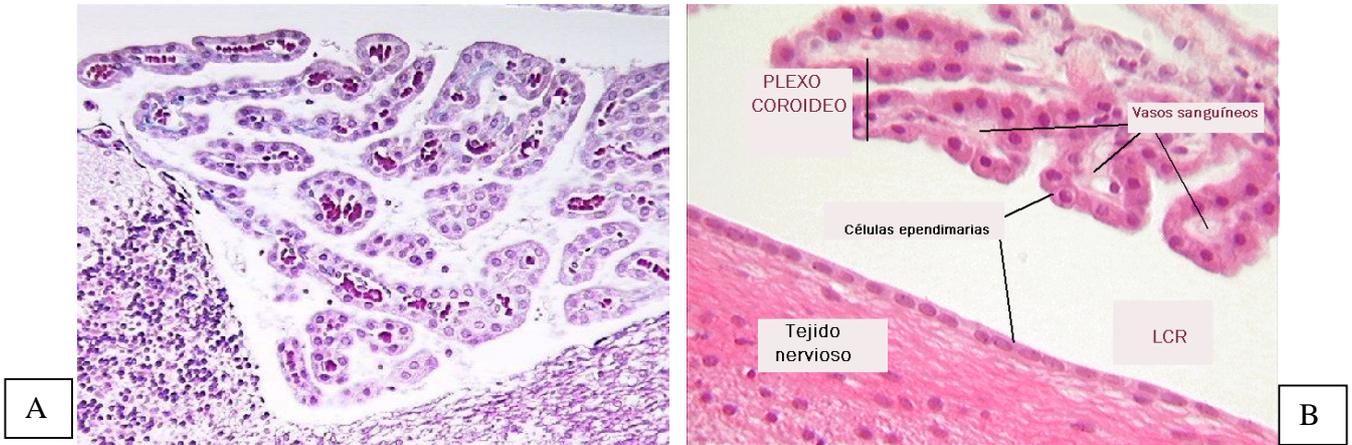
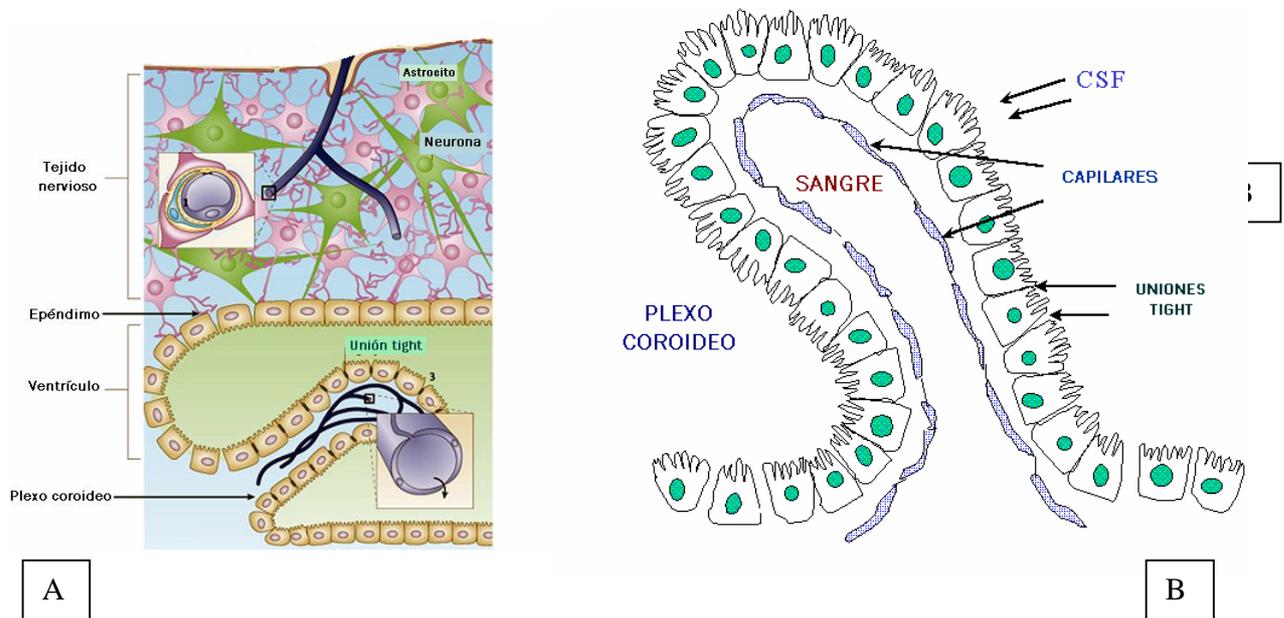


Figura 2- Cortes histológicos que muestran A) la estructura del plexo coroideo, B) señalando las uniones de las células ependimarias y los vasos sanguíneos (modificado de www.vet.uga.edu).



Esquema 2 – A) Se ilustran los componentes de la BVE y B) un esquema de la estructura del plexo coroideo, con sus capilares y las uniones de células ependimarias. Los plexos coroideos son los responsables de la producción del LCR (Modificado de www.daviddarling.info y www.kcl.ac.uk).

Está ampliamente documentado que el vanadio es generador de radicales libres (RL), lo que produce estrés oxidante (Evangelou, 2002). García y cols., en 2004 demostraron la susceptibilidad de la mielina del SNC al vanadio en ratas adultas. Encontraron que la administración de metavanadato de sodio produjo cambios en la actividad locomotora de las ratas, además de una alteración en la composición de la mielina y presencia de peroxidación lipídica. Con este trabajo, se demostró que la mielina puede ser un blanco preferencial para el vanadio, desencadenando la peroxidación lipídica, uno de los procesos que se generan en presencia de estrés oxidante.

1.6 Estrés oxidante

El oxígeno es indispensable para el metabolismo y las funciones del organismo, sin embargo, puede formar moléculas que llegan a ser tóxicas. De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con una estructura electrónica que se conoce como estado basal o triplete, sin embargo, por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por efecto de fuentes como calor, radiaciones UV, etc, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular (Gutiérrez, 2002).

Estas moléculas formadas reciben el nombre de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), un término que involucra a aquellas moléculas derivadas de la reducción molecular del oxígeno y RL de oxígeno, que son especies químicas que en su estructura atómica presentan uno o más electrones desapareados (Valko et al., 2006). Dentro de estas especies están el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), anión superóxido ($O^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}) y radicales derivados de compuestos orgánicos, como son peroxilo y alcoxilo, entre otros (Gutiérrez, 2002). Debido a su estructura química, las ERO tienen una vida media corta, por lo que actúan cercanamente al sitio en que se forman, y son

producidas por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial y la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal. Hay RL de oxígeno y de nitrógeno, siendo los de oxígeno los más comunes. Cuando están presentes en cantidades excesivas, son tóxicos y llegan a oxidar moléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos), las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular (Valko et al., 2006).

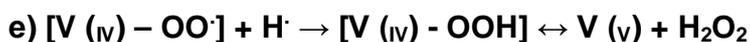
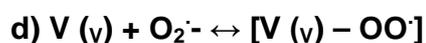
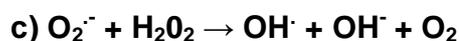
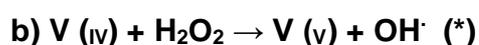
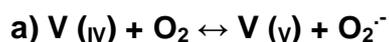
Los RL de oxígeno presentan funciones fisiológicas como intermediarios en reacciones de óxido-reducción, participan en procesos como fagocitosis, síntesis de colágena, síntesis de prostaglandinas, activación de enzimas de la membrana celular y en las glándulas suprarrenales disminuyen la síntesis de catecolaminas (Gutiérrez, 2002).

Para contrarrestar los efectos de los radicales, existe un sistema antioxidante, que son moléculas que previenen la formación descontrolada de RL o inhiben sus reacciones. Dentro de los antioxidantes endógenos podemos encontrar la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), GSH, glutatión peroxidasa (GPx), etc.

El estrés oxidante se presenta en las células como consecuencia de un desbalance entre las especies reactivas (ER) y los antioxidantes, causando daño a macromoléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Zhang et al., 2001).

Se sabe que los metales presentan características de óxido reducción y esto les permite aumentar la concentración de radicales libres que generan estrés oxidante. El vanadio puede participar en reacciones de formación ERO, y genera estrés oxidante, por medio de las siguientes reacciones:

a) La autooxidación del vanadio(IV) con el O₂ del aire produce anión superóxido y vanadio(V), b) el anión superóxido puede dismutarse espontáneamente o enzimáticamente (por acción de SOD), produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂), este puede reaccionar con el vanadio (IV) produciendo radical hidroxilo por medio de la reacción tipo Fenton. c) Teóricamente, el anión superóxido puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para generar radical hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss. d) Por otra parte, el superóxido puede mantener el complejo junto con el vanadio, formando peroxivanadil, e) Sin embargo, en contraste al superóxido, este peroxivanadil probablemente desaparece muy rápido bajo ciertas condiciones biológicas, por la abstracción de un hidrógeno de las biomoléculas. Esta reacción, a través del pervanadato (vanadil hidroperóxido), puede generar vanadio nuevamente y agua, los cuales realizarán continuas reacciones redox (Byczkowski y Kulkarni, 1998).



(*) Reacción tipo Fenton

1.7 Peroxidación de lípidos

Los lípidos como componentes celulares son importantes debido a que forman bicapas que proveen una integridad estructural necesaria para funciones de proteínas de membranas. También funcionan como reserva de energía, en el caso de los triglicéridos, y además, una característica importante es que pueden ser precursores para el metabolismo de segundos mensajeros como el ácido araquidónico (AcAr), ceramida, diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico y ácido lisofosfatídico (Adibhatla y Hatcher, 2007).

El estrés oxidante interviene en diversas funciones celulares en las que están implicadas cascadas de señalización que lleva a la célula a proliferar, induce respuestas inflamatorias y la producción de moléculas quimioatrayentes. Muchos de los efectos de disfunción celular inducidas por estrés oxidante son mediadas por productos de reacciones no enzimáticas, como es la oxidación y degradación de lípidos de ácidos grasos polinsaturados, proceso denominado peroxidación de lípidos. Este mecanismo se lleva a cabo mediante reacciones en cadena en las cuales se forman lípidos hidroperóxidos y otros productos. La peroxidación de lípidos es particularmente más dañina debido a que sus productos permiten una rápida propagación de reacciones de radicales libres (Yang et al., 2003). Esta peroxidación provoca disfunciones celulares en varios sistemas. Sin embargo, uno de los más susceptibles a ser dañado por este proceso es el SNC, debido a que es un sistema que presenta altas concentraciones de ácidos grasos, presentes en la mielina de los axones neuronales. Además, las neuronas consumen grandes cantidades de oxígeno para la producción de energía, y presentan bajas concentraciones de antioxidantes comparados con otros órganos, en especial de CAT y SOD (Adibhatla y Hatcher, 2007).

El estrés oxidante y la peroxidación lipídica se asocian con enfermedades neurodegenerativas y otros desórdenes, presentándose degeneración neuronal progresiva e irreversible, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, Esclerosis Múltiple, Esclerosis lateral amiotrófica, esquizofrenia y epilepsia, y también se asocian con otros daños al SNC como daño a médula espinal asociada a daños isquémicos, los cuales generan la despolarización de la membrana y apertura de canales dependientes al voltaje, permitiendo una liberación masiva de neurotransmisores como el glutamato, generando que la neurona muera por excitotoxicidad. (Adibhatla y Hatcher, 2007).

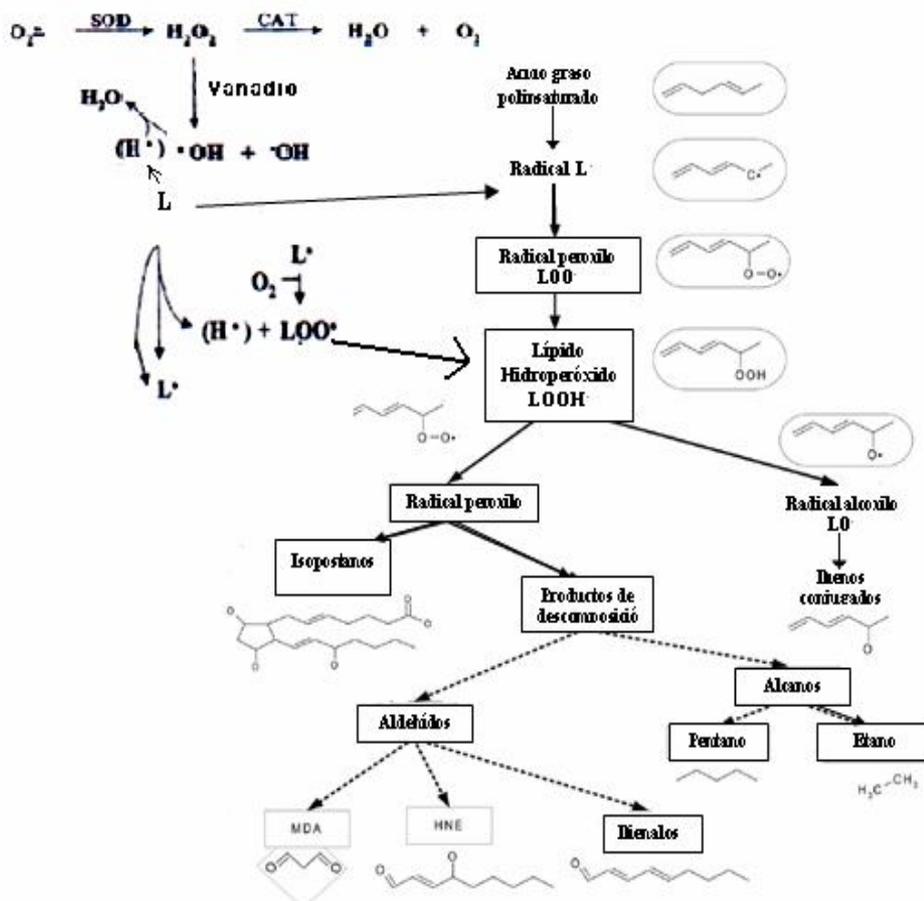
Las ERO también son producidas por procesos metabólicos oxidantes celulares incluyendo la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria, xantina oxidasa, monoamino oxidasa, NAD(P)H oxidasas, y el metabolismo de ácido araquidónico

(AcAr) por las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas (COX/LOX) (Adibhatla. 2008). Dado que los lípidos son moléculas que juegan un papel importante en el metabolismo de las enzimas, la peroxidación lipídica induce aumento en la producción de ERO y causa severos daños sobre estas proteínas, dando lugar a la formación de diversos productos, como son aldehídos tóxicos, algunos de ellos son el 4-Hidroxinonenal (4-HNE), el malonaldehído (MDA) y la acroleína. Estos aldehídos se unen a proteínas preferentemente a través de la reacción con los grupos thiol de éstas y alteran su función (Adibhatla y Hatcher, 2007).

La peroxidación de lípidos presenta tres etapas, que son:

- Etapa de iniciación: Este proceso inicia por el ataque de una especie reactiva para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metil (-CH₂-) de la cadena hidrocarbonada de un ácido graso mono o saturado. Entonces, la remoción de un átomo de hidrógeno deja al átomo de carbono (originalmente atacado), con un electrón desapareado, dando origen a un radical alquilo, el cual tiende a estabilizarse para producir un dieno conjugado, que reacciona con mucha facilidad con una molécula de oxígeno para formar radical peróxido.
- Etapa de propagación: El radical peróxido puede combinarse con otros radicales o pueden atacar a proteínas; también tienen la capacidad de sustraer átomos de hidrógeno de otras moléculas lipídicas adyacentes. Una vez que ha iniciado esta etapa, se genera la reacción en cadena. La extensión de esta etapa depende de muchos factores, como son la relación lípido/proteína que hay en la membrana, la composición de los ácidos grasos, la concentración de oxígeno y la presencia de antioxidantes en la membrana.

- Etapa de terminación: Un posible destino de los radicales peróxido es el recibir un átomo de hidrógeno y formen lípidos hidroperóxidos, moléculas estables a temperaturas fisiológicas, pero en presencia de complejos con metales de transición, su descomposición se cataliza, sufren fragmentación y producen diversos productos. Esta etapa se refiere a los sistemas que poseen las células para eliminar las ERO y protegerse del efecto destructivo de sus reacciones (Abuja y Albertini, 2005; Acevedo-Nava, 2005) (Esquema 3).



Esquema 3– Rutas y productos de las reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos. Se muestra las estructuras de las moléculas generadas en este proceso y las ERO que participan en la peroxidación. Además se ilustra la participación de un metal de transición, como es el vanadio, para catalizar la oxidación de los lípidos generando lípidos hidroperóxidos, que a su vez generarán productos altamente tóxicos como el 4-HNE (modificado de Yang et al., 2003; Dotan et al., 2004).

1.8 4-Hidroxinonenal (4-HNE)

El 4-HNE es el principal producto formado por peroxidación de lípidos (Siems y Grune, 2003), el cual deriva de los ácidos grasos poliinsaturados como el AcAr y el ácido linoléico. Presenta alta actividad biológica, donde puede actuar como componente citotóxico y genotóxico (Eckl, 2003). En presencia de estrés oxidante, se encuentra en altas concentraciones, como se ha observado en pacientes con enfermedades reumatológicas severas como la artritis reumatoide, en la esclerosis sistémica y en daños renales crónicos (Zarkovic, 2003)

Se descubrió en 1982 por Esterbauer y cols. a partir de la oxidación del AcAr (Esterbauer, 1991). Es un aldehído perteneciente a la familia de los 4-hidroxicanos, de los cuales el 4-HNE es el más representativo. En comparación con los radicales libres, los aldehídos como el 4-HNE derivados de la peroxidación son muy estables y pueden permanecer o migrar fuera de la célula y atacar blancos preferenciales de los radicales libres, también se sugiere que éstos no son sólo productos terminales o residuos de la peroxidación, sino que pueden actuar como mediadores para los radicales libres que iniciaron la peroxidación (Esterbauer, 1991).

Por otra parte, se sabe que el 4-HNE es un potente agente alquilador que puede reaccionar con una variedad de sitios nucleofílicos en el ADN y las proteínas, generando varios tipos de aductos (Eckl, 2003). Puede inducir muerte celular por apoptosis, mediante la activación de MAPKs, como JNK, y la activación de c-jun y caspasa 3. También modula la expresión de varios genes, incluyendo c-myc, procolageno tipo I, aldosa reductasa, c-myb y el factor de crecimiento β 1 (Leonarduzzi et al., 2000).

Además, este aldehído produce alteraciones en la homeostasis de calcio, alteración de la ATPasa de Na^+/K^+ , sobreactivación de fosfolipasa A2 (FLA2) y alteraciones del citoesqueleto por inhibición de tubulina citosólica. El 4-HNE produce también un efecto en funciones catabólicas de la célula, como es la

respiración mitocondrial, afectando la liberación de Ca^{2+} por inhibición de reacciones que permitan la oxidación de NADH a NAD^+ , provocando una sobrecarga de la mitocondria con Ca^{2+} e inhibición de enzimas mitocondriales dependientes de Ca^{2+} . Por lo tanto, su citotoxicidad se dirige en parte a funciones mitocondriales (Keller et al., 1997)

Otro de los efectos directos como consecuencia de un aumento significativo en las concentraciones de 4-HNE es el bloqueo de la segunda línea de defensa antioxidante, en la cual están implicadas enzimas como la SOD, la CAT y GPx. GSH es la molécula encargada de degradar al 4-HNE de la célula, sin embargo, cuando aumentan las concentraciones de este aldehído, disminuyen considerablemente las concentraciones de GSH (Yang et al., 2003).

1.8.1 4-HNE presente en enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas se han asociado al estrés oxidante, sin embargo, en la actualidad permanece incierto si este estrés es causa o consecuencia, debido a que los factores como ERO, los procesos de oxidación y los productos de éstos pueden presentarse en etapas tempranas o tardías de la enfermedad (Kubatova et al. 2007). En las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson se ha compilado mayor evidencia, encontrándose un desbalance metabólico, presencia de estrés oxidante, alteraciones celulares crónicas y muerte neuronal. En estas enfermedades, las áreas del cerebro afectadas como son el hipocampo en el caso de enfermedad de Alzheimer y la substantia nigra en enfermedad de Parkinson contienen niveles anormales de metales como el hierro, cobre, aluminio, etc, los cuales presentan actividad redox. Un exceso de estos metales, se sabe que pueden producir estrés oxidante y dañar proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, ADN y ARN en ambas enfermedades. De esta forma, la toxicidad de los productos de la peroxidación en especial, presenta mucha importancia, como es el caso del 4-HNE. (Sayre et al., 2008).

1.8.2 Alzheimer y 4-HNE

El Alzheimer es una enfermedad progresiva caracterizada por un daño cognitivo progresivo e irreversible. Entre las alteraciones patológicas se encuentran: pérdida neuronal, gliosis, marañas neurofibrilares de la proteína tau y placas extracelulares del péptido β -amiloide en corteza cerebral. Los síntomas de la enfermedad resultan de la degeneración y muerte de poblaciones específicas de neuronas. Hay evidencias de que p53, una proteína mediadora de muerte neuronal, incrementa sus niveles cuando las neuronas sufren alteración y como consecuencia mueren (Cenini et al., 2008).

En particular, el 4-HNE, se encuentra en concentraciones elevadas en pacientes con la enfermedad. Al ser muy reactivo con componentes celulares, especialmente con péptidos, proteínas y ADN, se sugiere que favorece la formación de las placas de péptido β -amiloide ($A\beta$) asociadas con esta enfermedad, de esta forma, el 4-HNE, modifica covalentemente el $A\beta$, provocando su agregación (Siegel, 2007). El $A\beta$ a su vez induce más peroxidación lipídica en sinaptosomas. El $A\beta$ y el 4-HNE también alteran el transporte de glutamato en sinaptosomas. La acumulación de estos compuestos dañan la función mitocondrial (Keller et al., 1997). El 4-HNE también causa alteración en la homeostasis de Ca^{2+} , daño membranal y muerte celular (Esterbauer, 1991). Los mecanismos por los cuales el 4-HNE induce muerte celular por apoptosis son alterando la función mitocondrial, llevando a la liberación de citocromo-c y activación subsecuente de caspasas. Este aldehído también altera membranas celulares, provocando que se afecten funciones de proteínas transmembranales, y puede interactuar con tau e histonas. El incremento en los niveles de 4-HNE es un índice de un aumento en el daño oxidante producido en esta enfermedad. Además, el 4-HNE presenta activación de p53 en el lóbulo parietal de pacientes con la enfermedad. Se sugiere que la peroxidación se puede generar en etapas avanzadas de la enfermedad, al igual que los efectos tóxicos del 4-HNE (Siegel, 2007).

1.8.3 Enfermedad de Parkinson y 4-HNE

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra, y la consecuente alteración de la vía nigro estriatal. La neurodegeneración está ligada a una disfunción mitocondrial y excitotoxicidad, que puede ser causada por un aumento en la generación de RL, produciendo peroxidación lipídica, la cual puede inducir un metabolismo acelerado de la dopamina, alterando la actividad de la monoamino oxidasa, que resulta en una formación excesiva en los niveles de ERO. Otro de los factores responsables de esta enfermedad se le atribuye a la activación de fosfolipasas en la sustantia nigra. Uno de los marcadores de daño oxidante, como es el 4-HNE, puede producir apoptosis por activación de caspasas y fragmentación de ADN, inhibe rutas de señalización de NF- κ B (Jenner et al., 2003). El 4-HNE formado como consecuencia del incremento de los radicales y de ERO, reacciona con proteínas que perjudican la viabilidad celular, como son los proteosomas, que ayudan a degradar las proteínas. El 4-HNE altera la estructura del proteosoma e impide que se degraden proteínas con ubiquitina, volviéndolas vulnerables a los efectos del incremento de ERO. Estos procesos son seguidos por reducción en los niveles de GSH y alteración de la actividad mitocondrial, y mayor presencia de daño oxidante a lípidos, proteínas y ADN. Finalmente, la apoptosis ocurre con una liberación de citocromo c y caspasa 3, hay pérdida de integridad de membrana y muerte celular (Ji et al., 2001). Esta secuencia de eventos sugiere que la acumulación de proteínas ubiquitinizadas aunado con la alteración de enzimas proteosomales puede inducir muerte apoptótica en neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra (Jenner et al., 2003).

2. JUSTIFICACIÓN

Los niveles de vanadio se han incrementado en la Ciudad de México. Este metal es considerado como un contaminante importante. Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo indican que en un modelo por inhalación de V_2O_5 se ha observado daño y muerte neuronal en corteza cerebral y alteraciones en la barrera hematoencefálica.

Existen evidencias que muestran al vanadio como un metal generador de estrés oxidante. El estrés oxidante tiene como blanco preferencial a los lípidos, los cuales se encuentran en altas concentraciones en sistema nervioso, lo que lo hace muy susceptible al estrés oxidante, mediante el proceso de peroxidación lipídica, cuyo producto principal es el 4-Hidroxinonenal. Debido a estos antecedentes, es importante evaluar el daño oxidante generado por exposición subcrónica a V_2O_5 en corteza cerebral y plexos coroideos, que son estructuras que también pueden verse altamente afectadas en relación con los antecedentes presentados, utilizando como marcador de daño oxidante al 4-HNE.

3. HIPÓTESIS

Si la inhalación de V_2O_5 induce daño oxidante en la corteza motora y en el plexo coroideo, de ratón, entonces conforme aumente el tiempo de exposición, aumentará el daño producido por 4-HNE en las neuronas de la corteza y las células endoteliales del plexo coroideo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar el daño oxidante en la corteza cerebral y en los plexos coroideos de ratones expuestos a V_2O_5 por vía inhalada

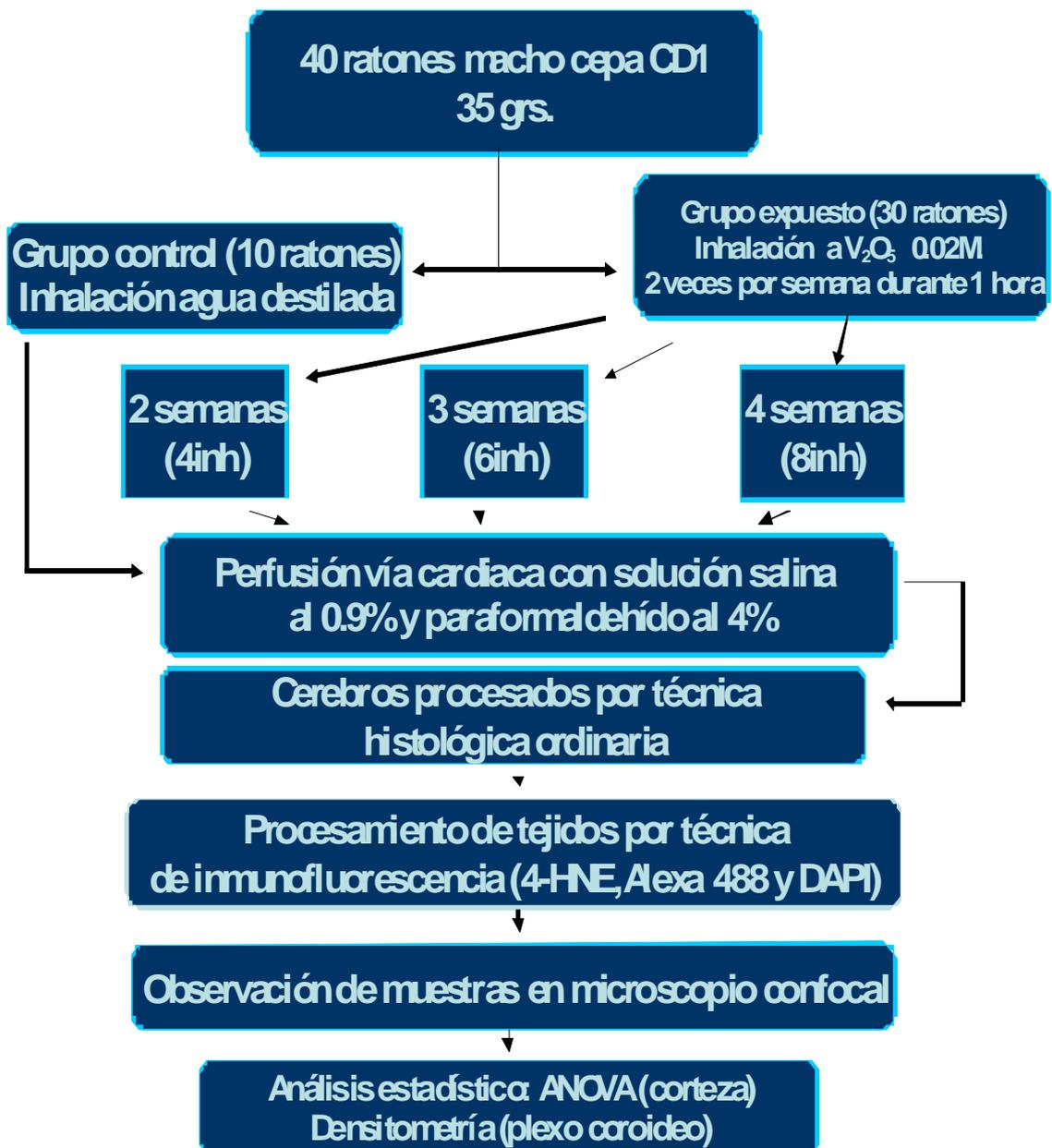
4.2 Objetivos particulares

- Determinar daño oxidante por exposición a V_2O_5 (0.02M) en la corteza cerebral motora y plexos coroideos de ratones mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando como marcador de daño oxidante el 4-HNE
- Relacionar los cambios efectuados en ambas estructuras respecto al tiempo de exposición

5. MÉTODO

Se utilizaron 40 ratones macho de la cepa CD-1 de 35 gr. de peso corporal. Se formaron dos grupos, en uno de los cuales 10 ratones fueron expuestos a inhalación de agua destilada y se les consideró el grupo control, mientras que el otro grupo compuesto de 30 ratones estuvo expuesto a una concentración 0.02 M de V_2O_5 (Aldrich) por vía inhalada. La inhalación de los animales se realizó en una caja de acrílico conectada a un ultranebulizador durante un mes, 2 veces por semana durante una hora. Cada semana, se sacrificó a un subgrupo de 10 ratones al azar hasta finalizar el tratamiento. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (35mg/Kg), posteriormente se perfundieron los ratones vía cardiaca primero con solución salina 0.9%, después con paraformaldehído al 4%. Posteriormente se les extrajo el cerebro, se les colocó en solución de paraformaldehído y fueron procesados mediante la técnica histológica ordinaria. Las laminillas con cortes de tejido de 5 μ m de grosor se procesaron mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizándose como anticuerpo primario el 4-HNE (R and D Systems, Inc.) y como anticuerpo secundario fluorescente Alexa 488 (Ver anexo). Además, se utilizó DAPI para observar los núcleos de neuronas de corteza cerebral y de células endoteliales del plexo coroideo.

Las muestras obtenidas fueron observadas en microscopio confocal modelo Leica TCSP5. Se contó el número de células que presentaban marca fluorescente en corteza cerebral motora, se observaron un total de 40 campos en cada uno de los grupos inhalados y en el control, posteriormente a los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA). En el plexo coroideo, se compararon las imágenes del control con los grupos expuestos, se captaron las imágenes y posteriormente se realizó un análisis densitométrico con el programa Image Pro Plus 2.0. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre el grupo y los expuestos (ver diagrama).



6. RESULTADOS

6.1 Corteza cerebral

Los datos obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia muestran que conforme aumenta el número de inhalaciones de V_2O_5 , aumenta el número de neuronas marcadas con 4-HNE (Gráfica 1). Podemos observar que la marca es específica en los somas neuronales, siendo las capas piramidales de la corteza las que presentaron mayor marca fluorescente (Figura 3).

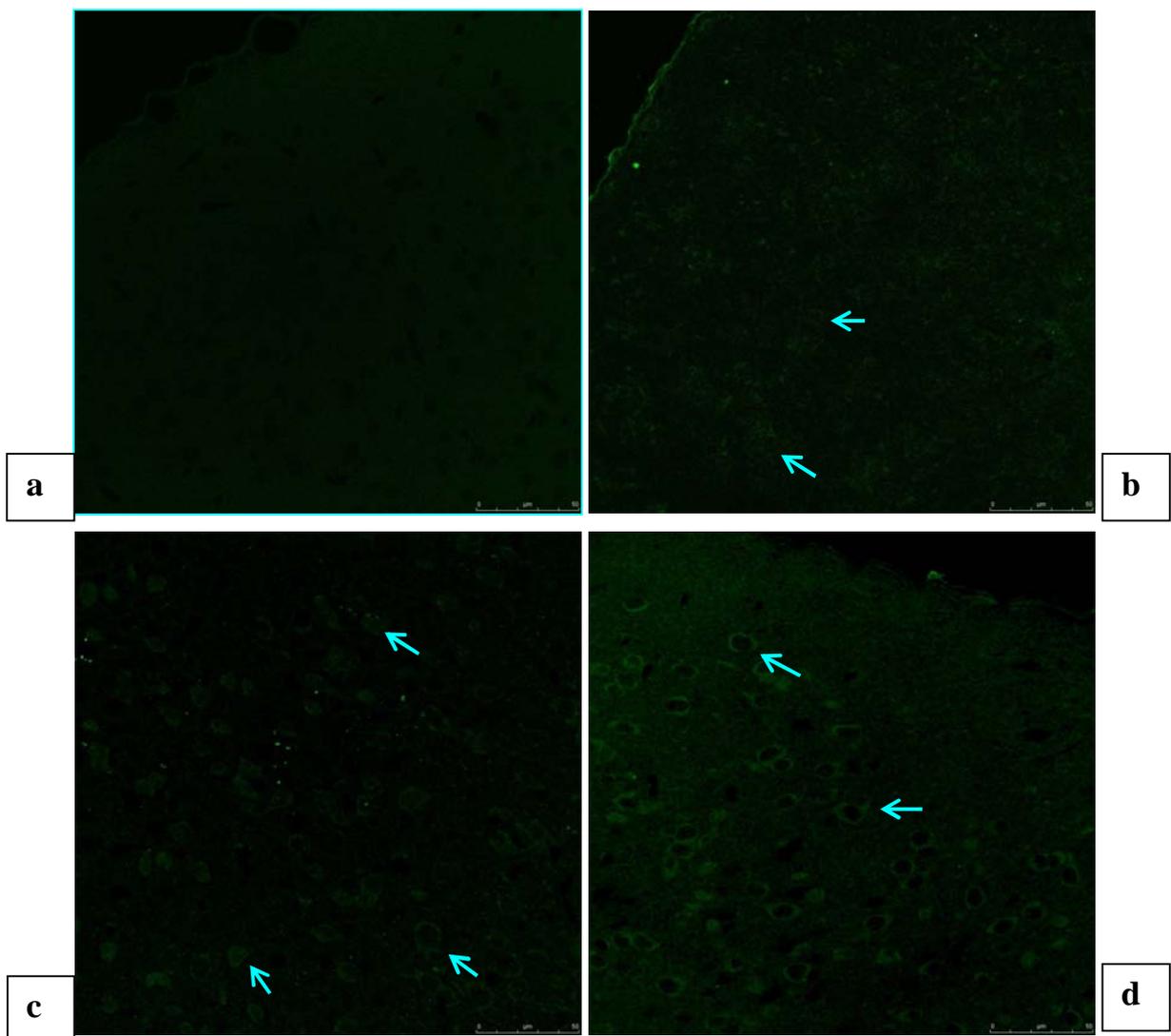


Figura 3- a) Corteza cerebral de ratón del grupo control, b) corteza cerebral de ratón con 2 semanas de inhalación a V_2O_5 , se observan algunas neuronas marcadas por HNE (flechas) c) corteza cerebral de ratón con 3 semanas de inhalación, aumenta el número de neuronas piramidales marcadas por HNE (flechas) d) El número de neuronas piramidales marcadas

por HNE en corteza cerebral con 4 semanas de inhalación es mayor que a las 2 y 3 semanas de inhalación a V_2O_5

En la figura 4, podemos observar mediante la marca obtenida con DAPI los núcleos de los somas neuronales de la corteza de un animal control comparado con los de un animal con 2 semanas de inhalación, tiempo en el cual se empiezan a observar núcleos apoptóticos comparados respecto con el animal control.

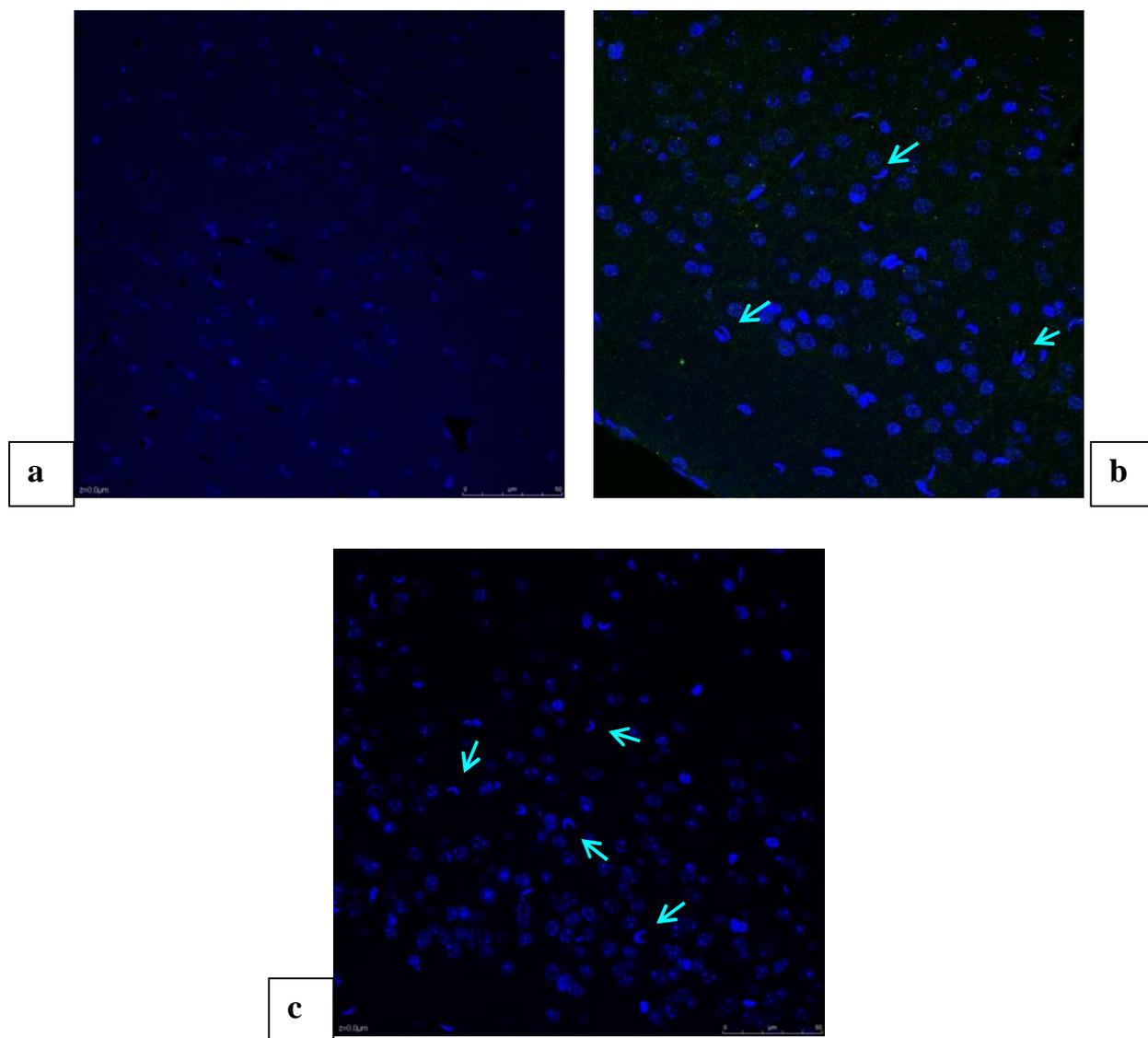


Figura 4- Núcleos neuronales marcados con DAPI. a) núcleos neuronales de corteza de un animal control, b) , c) núcleos neuronales de corteza de ratón con 2 semanas de inhalación a pentóxido de vanadio, se observa la presencia de varios núcleos apoptóticos (flechas).

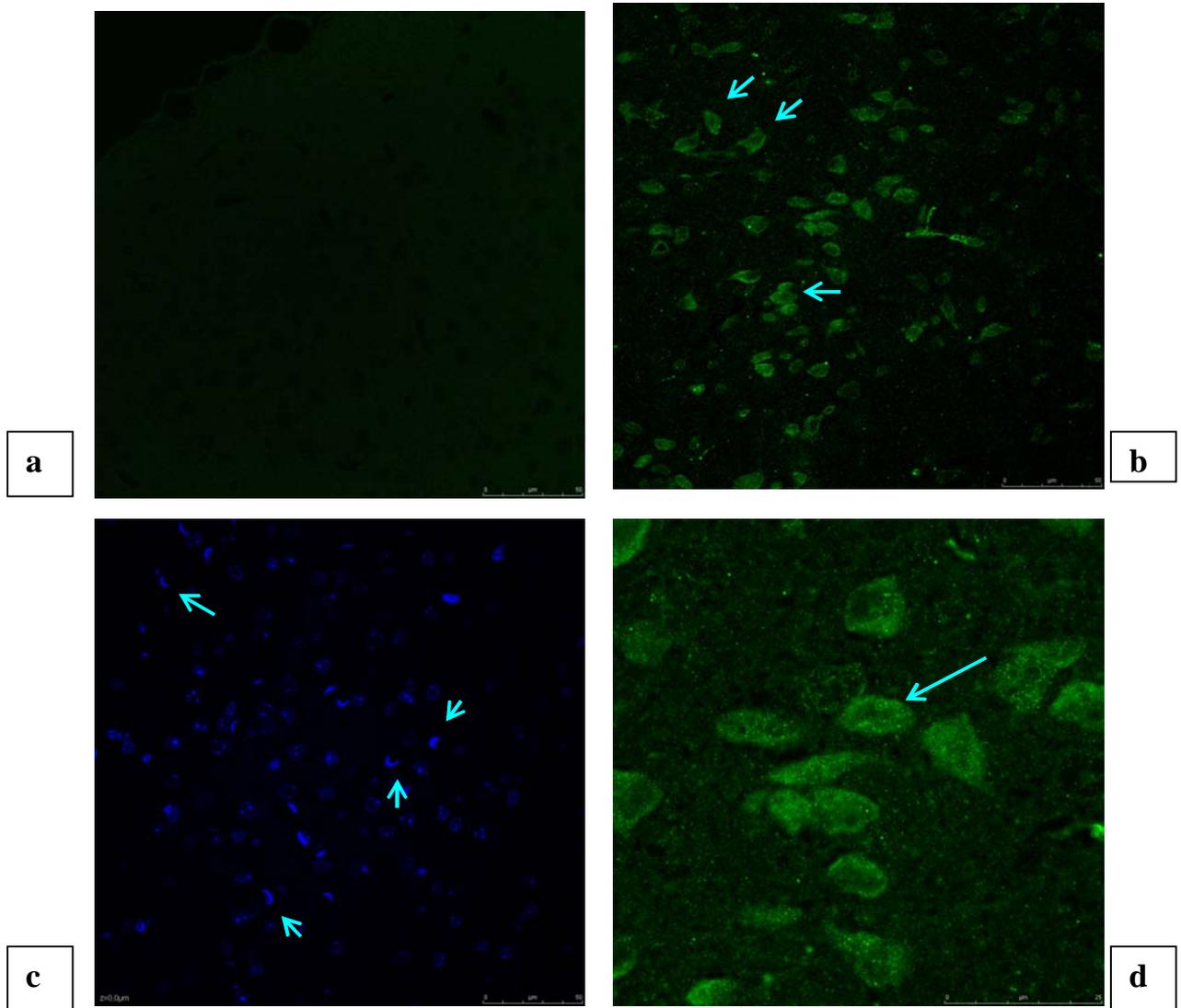


Figura 5 – a) Corteza cerebral de ratón de grupo control , b) Corteza cerebral de ratón con 3 semanas de inhalación a pentóxido de vanadio, se observa aumento considerable de neuronas marcadas por HNE (flechas) en comparación con el grupo control, c) núcleos de neuronas de corteza con 3 semanas de inhalación, mostrándose un aumento en el número en presencia de núcleos apoptóticos (flechas) , d) Imagen a mayor aumento de neuronas piramidales marcadas con HNE (flecha) de 3 semanas de inhalación.

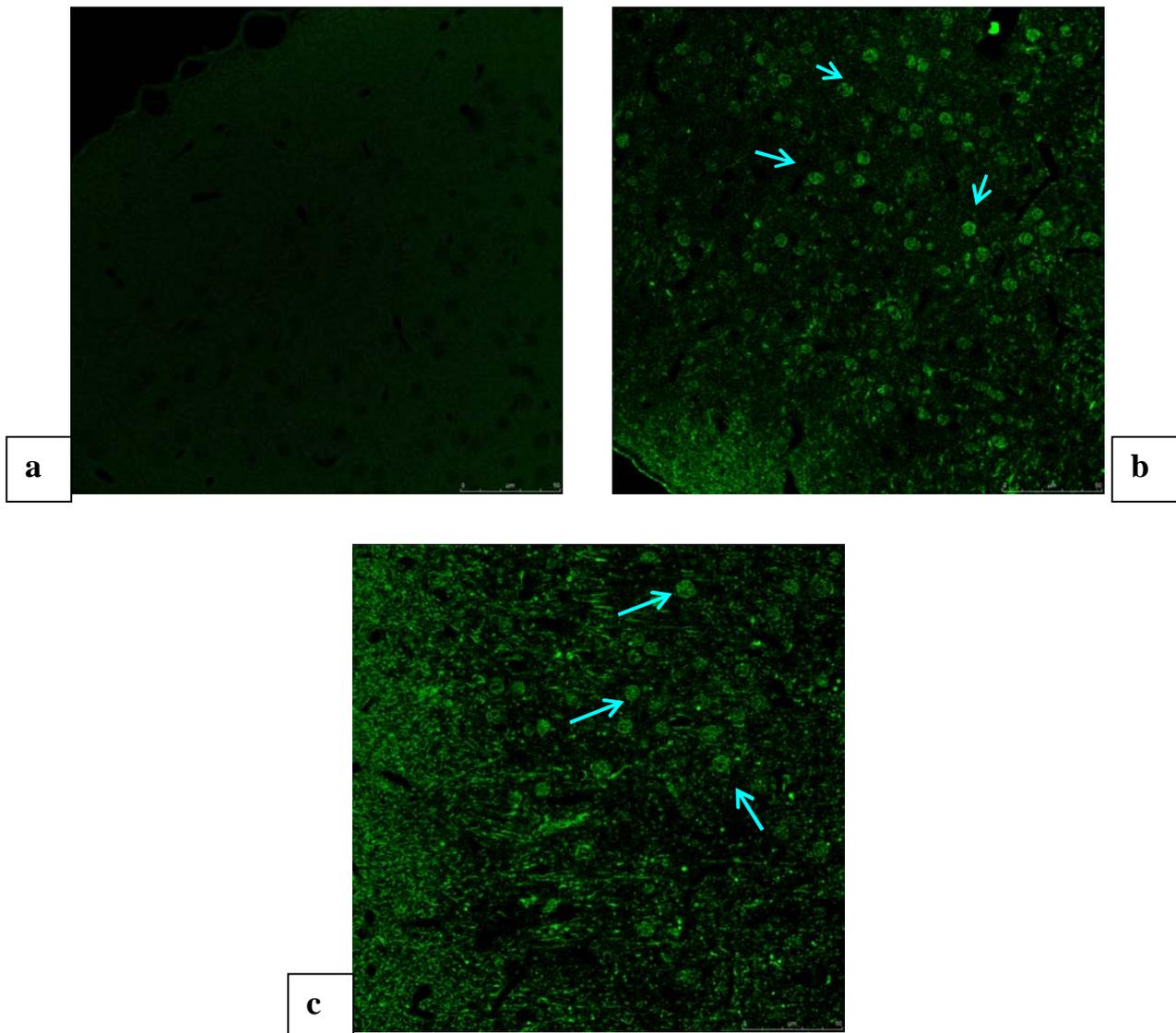


Figura 6- a) Corteza cerebral de un ratón del grupo control. b) y c) corteza cerebral de ratones con 4 semanas de inhalación a pentóxido de vanadio, tiempo en el cual se presentó el mayor número de neuronas corticales marcadas por HNE. Se observa un notable incremento de somas neuronales con esta marca (flechas)

Los resultados obtenidos que presentan mayor relevancia, están dirigidos a la localización de la marca obtenida por HNE, la cual se observó alrededor del núcleo, o abarcando todo el soma. Esta marca se presentó con mayor frecuencia en el grupo de ratones con 4 semanas de inhalación a V_2O_5 (Gráfica 1). Además, algunas neuronas presentaron muerte, observada mediante los núcleos apoptóticos obtenidos gracias a la marca del DAPI.

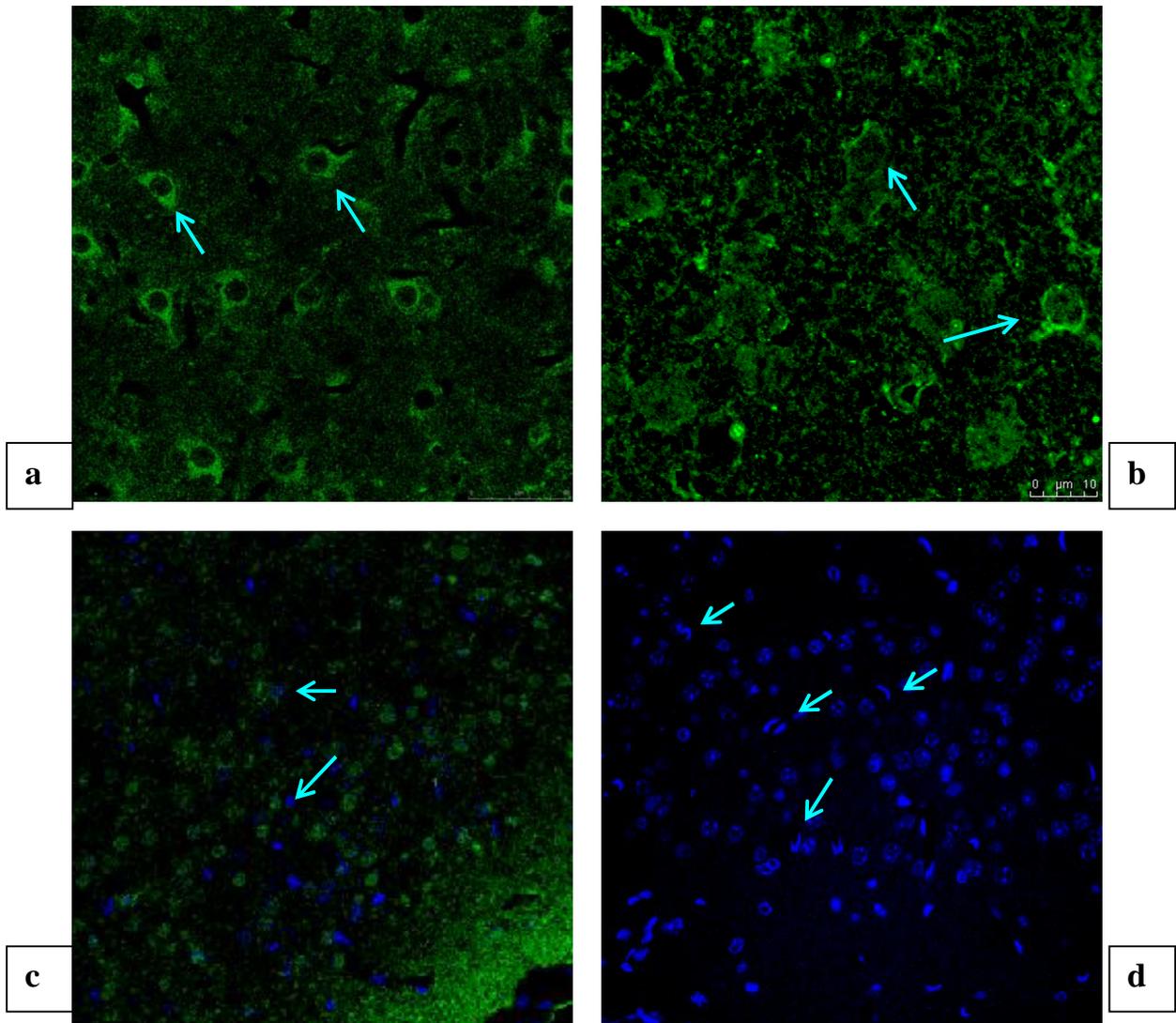


Figura 7- a) y b) Neuronas piramidales de la capa V (piramidal interna) con marca de HNE (flechas) de corteza cerebral de ratones con 4 semanas inhalación, c) Imagen con marcas sobreexpuestas de HNE y DAPI (flechas) de corteza cerebral de ratón con 4 semanas exposición al V_2O_5 , d) el número de núcleos apoptóticos aumenta en corteza cerebral con cuatro semanas de exposición al vanadio (flechas)

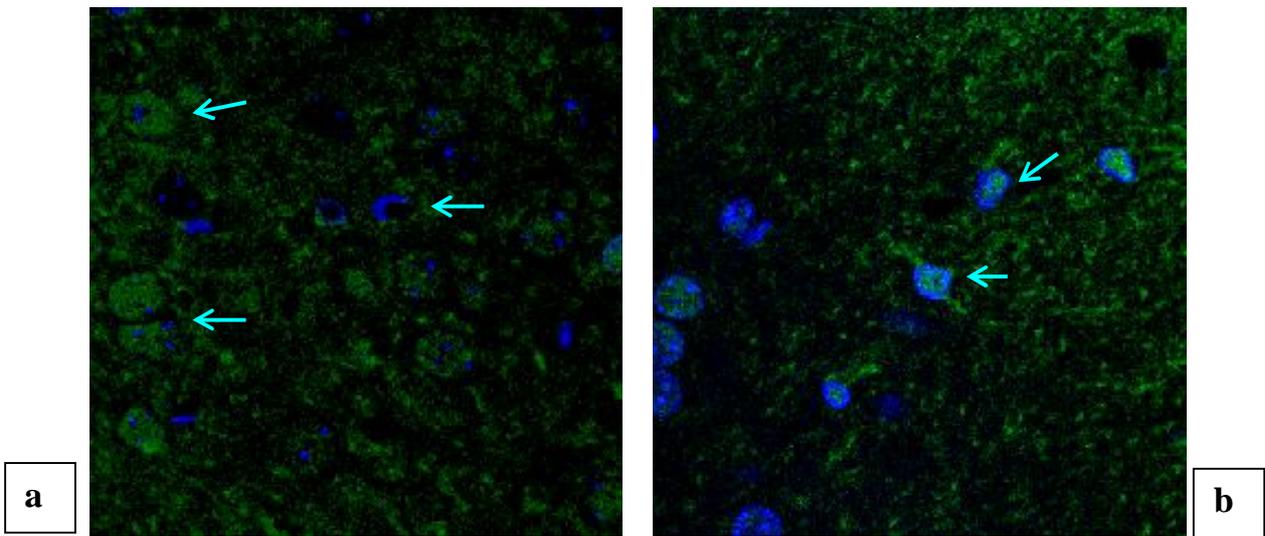


Figura 8- a), b) Imágenes sobreexpuestas con marcas de HNE en somas neuronales de corteza cerebral de ratones con 4 semanas de inhalación y núcleos marcados con DAPI. se observa la marca de HNE en todo el soma neuronal y la presencia de algunos núcleos apoptóticos (flechas)

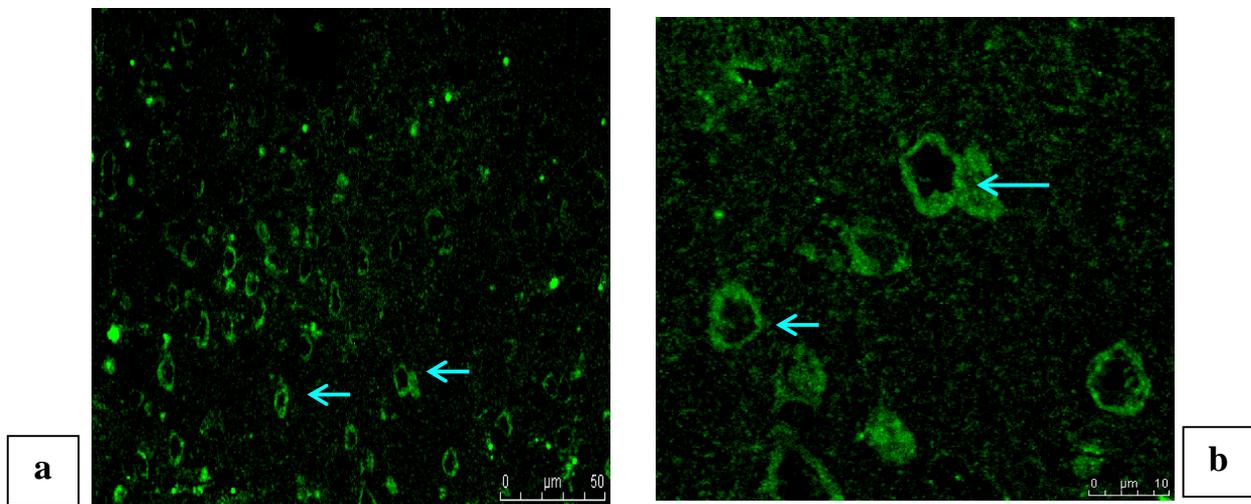
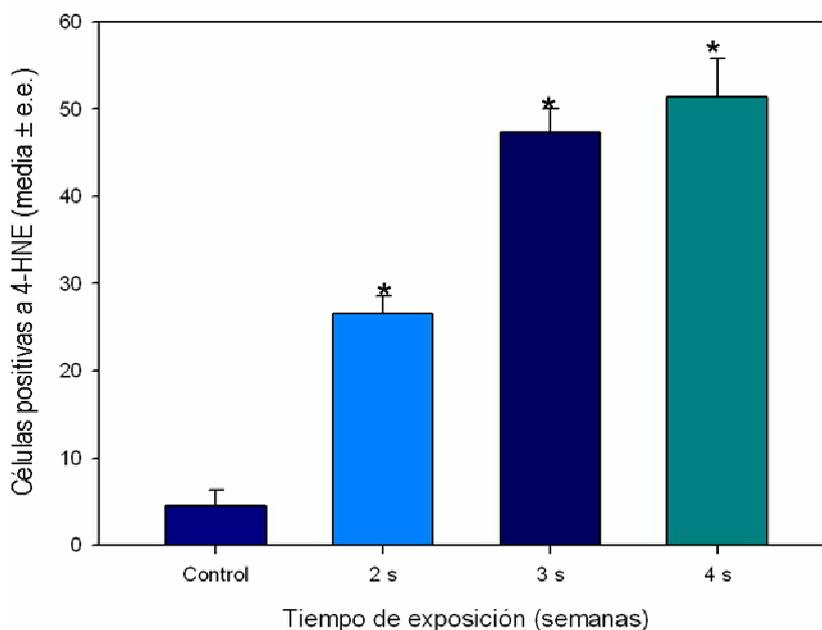


Figura 9- a) Somas de neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral de ratones con 4 semanas de inhalación a V_2O_5 con marca de HNE alrededor de núcleo(flechas), b) los mismos somas marcados con HNE vistos a un mayor aumento (flechas)

Neuronas corticales de ratón marcadas con HNE de ratones expuestos a V₂O₅



Gráfica 1- Comparación de grupos expuestos con el grupo control, mediante una prueba de ANOVA, $p^* < 0.05$.

6.2 Plexo coroideo

Los resultados obtenidos en plexo coroideo muestran que la densidad de la marca se incrementó conforme aumentó el número de inhalaciones, como sucedió en la corteza motora (Gráfica 2). Mientras el número de inhalaciones fue mayor, hubo alteraciones notorias en cuanto a la estructura del plexo, observándose a las 3 semanas de inhalación un desprendimiento de la membrana basal de las células endimarias y a las 4 semanas de inhalación desprendimiento del endotelio (Figura 10). Además, las células endimarias mostraron a las cuatro semanas una mayor densidad en la marca de HNE al igual que el epéndimo, que forma la pared ventricular.

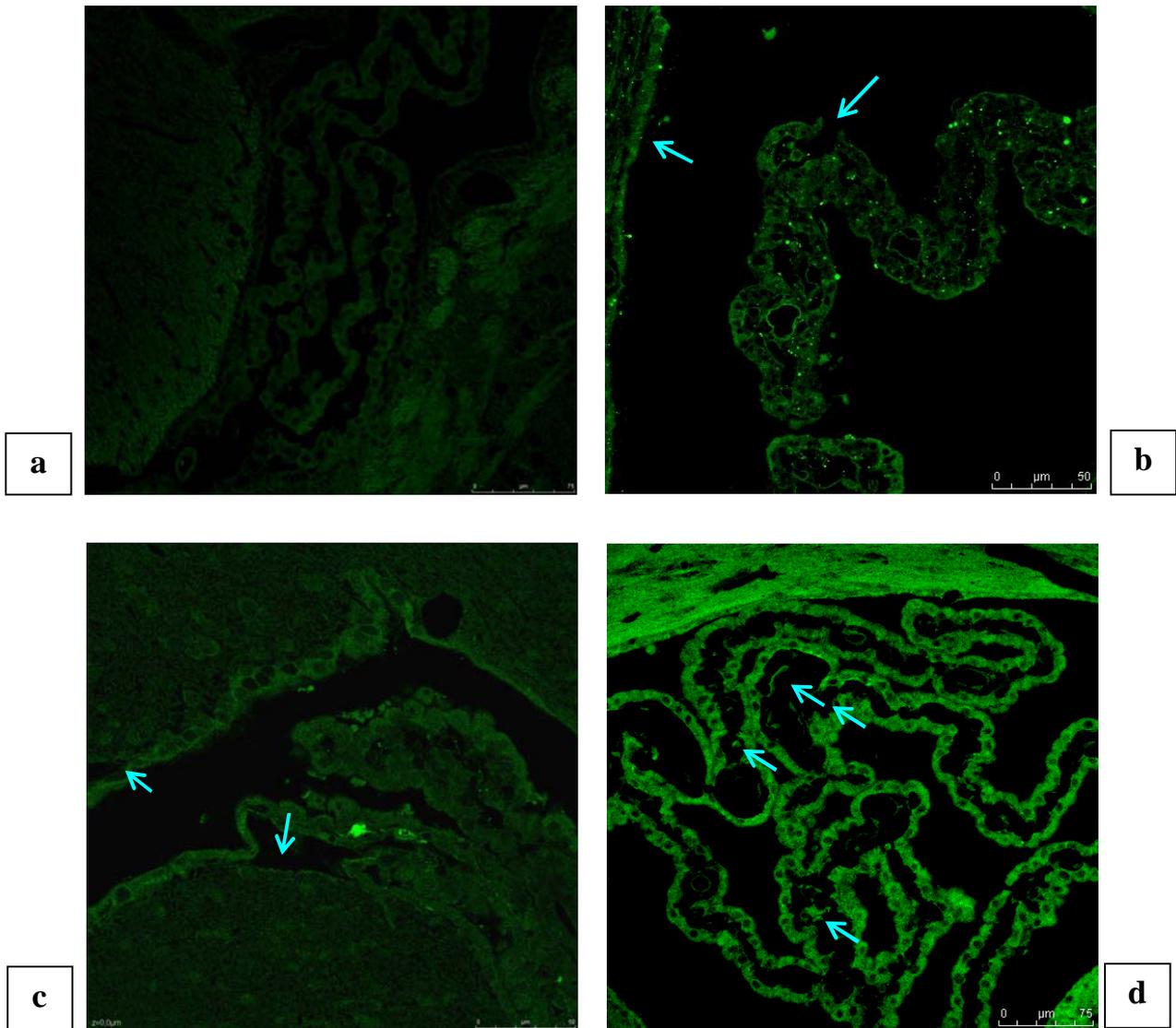


Figura 10- a) Plexo coroideo de ratón de grupo control. , b) a las 2 semanas de exposición a vanadio, se observa un aumento en la densidad de la marca en células del epéndimo y rompimiento de uniones de células endimarias del plexo (flechas), c) A las 3 semanas inhalación, se observa desprendimiento de la membrana basal de células del epéndimo y ruptura de algunas uniones de células endimarias (flechas), d) Se observa desprendimiento de endotelio, rompimiento de uniones de células endimarias y un aumento en la densidad de la marca por HNE en plexo coroideo con 4 semanas de inhalación en comparación con los otros grupos (flechas).

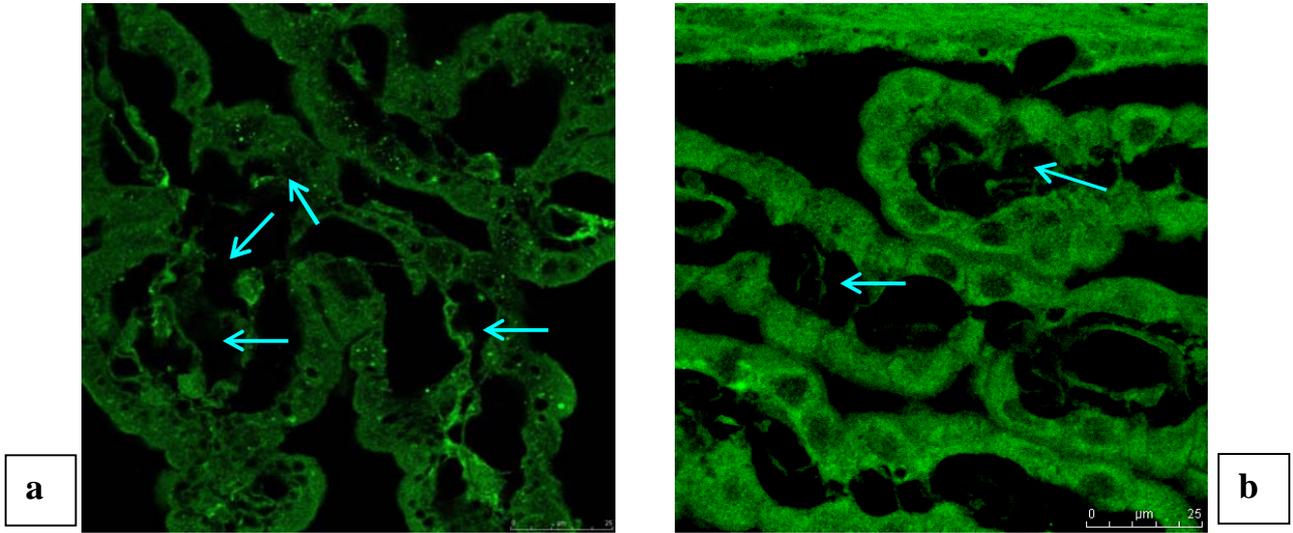
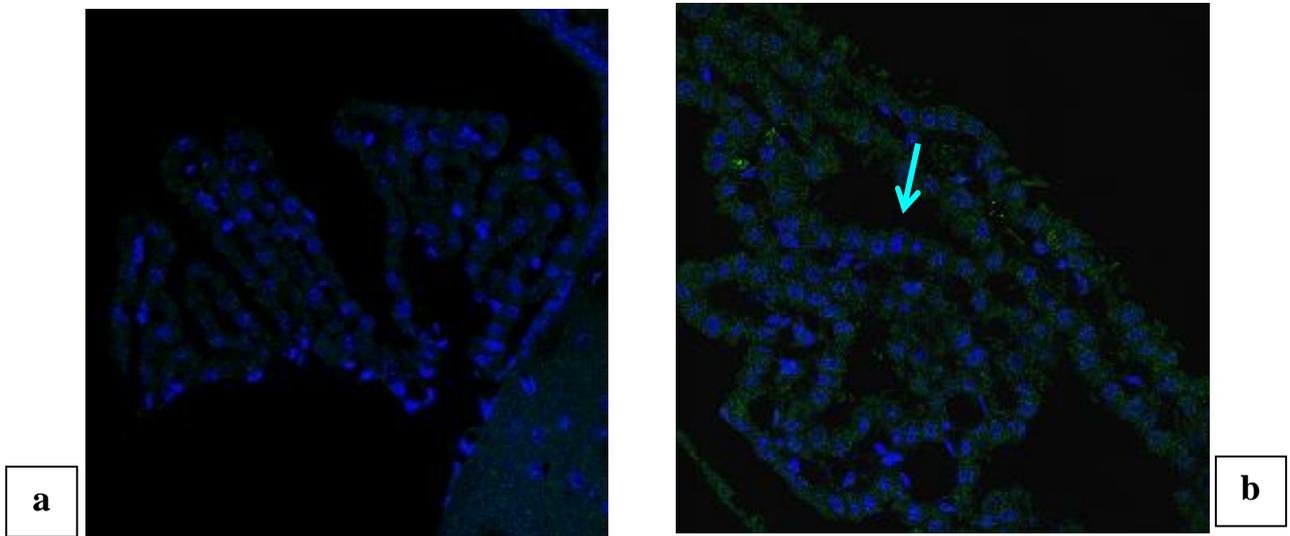


Figura 11- a) Plexos coroideos de ratones con 3 semanas de inhalación a pentóxido de vanadio vistos a mayor aumento, se observa desprendimiento de endotelio b) A las 4 semanas de inhalación a pentóxido de vanadio, se observa a mayor aumento en el plexo coroideo, desprendimiento de endotelio y rompimiento de uniones estrechas de las células ependimarias (flechas).



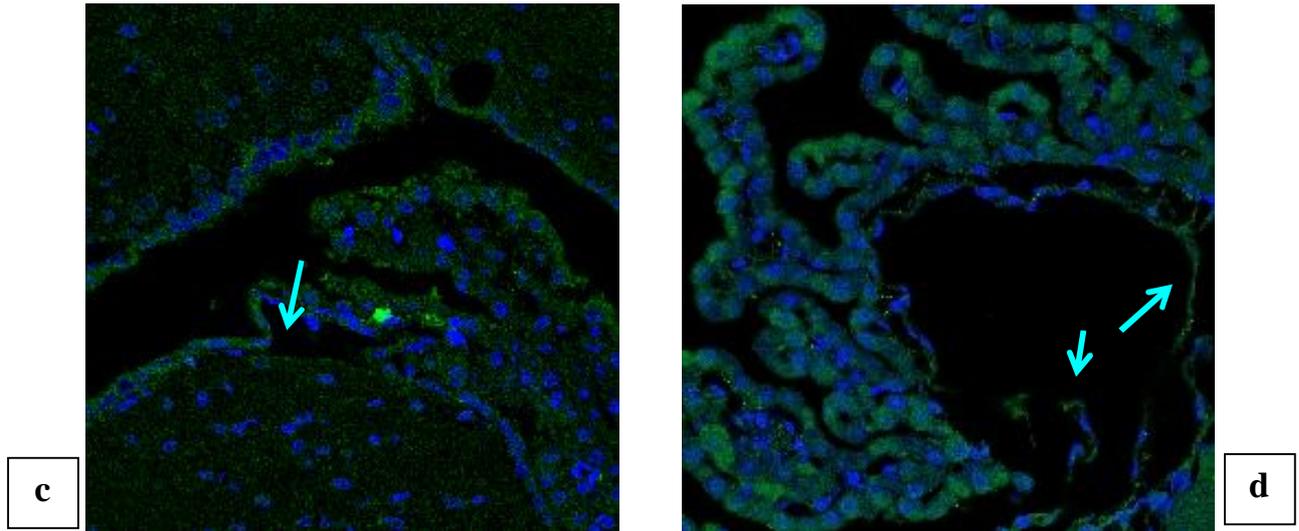
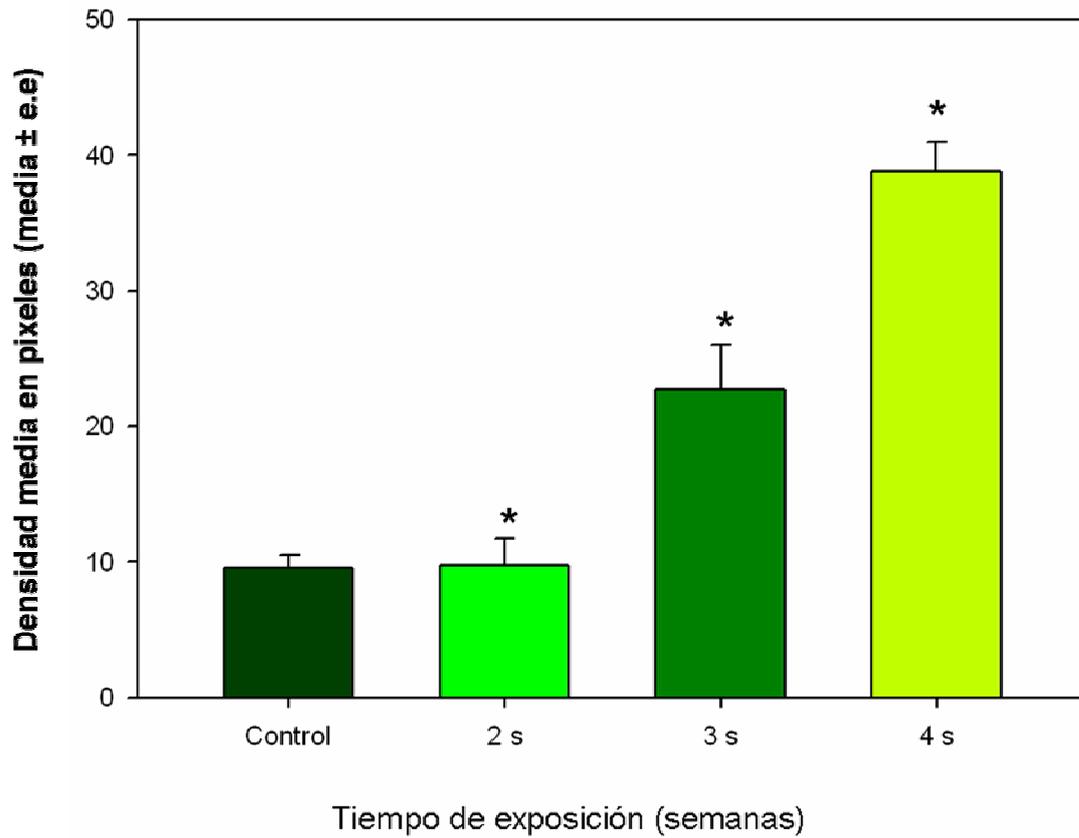


Figura 12- Imágenes con marcas sobreexpuestas de HNE y DAPI. a) Plexo coroideo de ratón del grupo control, no se observa marca producida por HNE, b) a las 2 semanas de inhalación a V_2O_5 , comienza a observarse un aumento en la densidad de la marca de HNE (flecha), c) El aumento en la densidad de la marca de HNE es mayor respecto al control y las 2 semanas, además se observa desprendimiento de la membrana basal del epéndimo (flecha), d) la densidad de la marca de HNE a las 4 semanas de inhalación es mayor que los otros grupos y se observa desprendimiento del endotelio (flechas).

Densitometría de células positivas HNE en plexo coroido de ratones expuestos a V₂O₅



Gráfica 2- Comparación de grupos expuestos con el grupo control, mediante una prueba de ANOVA, p* < 0.05.

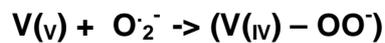
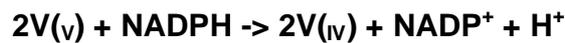
7. DISCUSIÓN

La exposición al V_2O_5 produjo aumento en la marca de daño oxidante y presencia de muerte celular por apoptosis en somas neuronales de neuronas piramidales de corteza motora, y en cuanto al plexo coroideo también aumento la marca de 4-HNE, se observó rompimiento de las uniones entre las células endimarias y desprendimiento del endotelio en los plexos coroideos de ratones con cuatro semanas de exposición a vanadio, siendo mayor la marca de daño oxidante del grupo con mayor número de inhalaciones. La exposición a V_2O_5 induce aumento en la generación de ERO (Evangelou, 2002) e induce el proceso de peroxidación de lípidos (Valko et al., 2005), por lo que al generarse el mayor producto de esta peroxidación, el 4-HNE, juega un papel fundamental en el daño oxidante y la muerte celular observada.

7.1 Efectos del vanadio en la generación de estrés oxidante

Los resultados obtenidos en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a inhalaciones de V_2O_5 , y que presentaron células positivas a 4-HNE, indican la presencia de daño oxidante en éstas estructuras, reflejando de esta forma el efecto que ejerce el vanadio como generador de estrés oxidante. El vanadio, al ser un metal de transición, posee varios estados de oxidación y puede participar en reacciones que generan ERO. En el plasma, el vanadio es rápidamente reducido a vanadil (IV) y transportado uniéndose a proteínas del plasma como transferrina y albúmina, o bien, puede entrar en las células por medio de canales inespecíficos. Este metal puede reaccionar con enzimas como oxidasas de NADPH, causando la reducción de oxígeno molecular para generar radicales hidroxilo, los cuales aumentan su concentración en presencia del H_2O_2 , por medio de la reacción tipo Fenton. Con esto, se genera estrés oxidante (Evangelou, 2002).

El V_2O_5 es el compuesto de vanadio más tóxico y, por tal motivo, se esperaba que al aumentar el número de inhalaciones, los efectos tóxicos producidos por este compuesto aumentarían su magnitud y ejercerían mayor daño al tejido. Los óxidos de vanadio son lábiles, es decir, pueden presentar rápido intercambio de donadores de electrones. Dichos compuestos, en presencia de peróxidos, llegan a formar peróxidos de vanadio y ligandos polidentados, formando a su vez complejos peroxo-heteroligandos cristalinos, los cuales pueden cambiar el potencial óxido-reductor del vanadio IV y V , resultando en un debilitamiento entre los enlaces $V-O$, y formar ligandos dioxigenados coordinados y O_2^- . El anión superóxido puede formar peroxivanadil y vanadil hidropéroxido ($V(IV)-OH$), todo esto en presencia de oxidasas de NADPH en la mitocondria. Las reacciones de los peróxidos de vanadio son:



Además, el vanadil hidropéroxido, en presencia de iones de hidrógeno (H^+) puede descomponerse produciendo H_2O_2 y vanadio de esta forma:



La capacidad de éstos óxidos de formar compuestos con alto potencial óxido reductor y generar ERO, en especial el V_2O_5 , les permite producir daño sobre proteínas, ADN y lípidos (Evangelou, 2002).

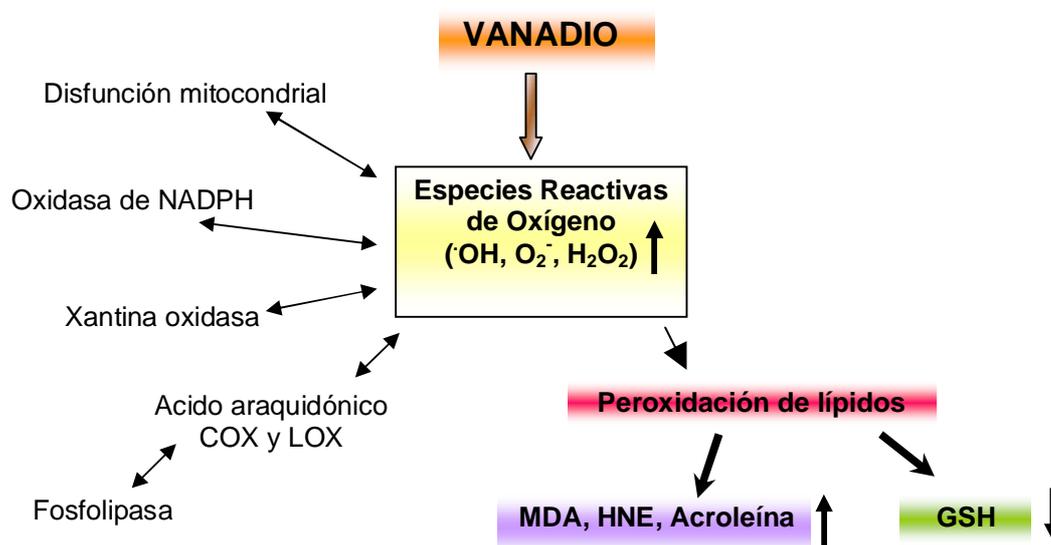
7.2 Peroxidación de lípidos y 4-HNE en el Sistema Nervioso

Se sabe que las reacciones mediadas por los radicales libres pueden contribuir a la acumulación progresiva de productos de estrés oxidante tóxicos y a los cambios funcionales y estructurales que pueden sufrir los tejidos. Todos los componentes celulares son sensibles al daño oxidante producido por RL, en especial los lípidos (Adibhatla y Hatcher, 2007). Este daño es consecuencia de procesos desencadenados por estrés oxidante, y en este caso, bajo la inducción de un metal de transición, el vanadio. La exposición a este metal genera un aumento en la producción de RL, los cuales tienen preferencia por los ácidos grasos poliinsaturados, generando reacciones autocatalíticas que oxidan y degradan lípidos de membrana, por peroxidación de lípidos. Estas reacciones inducen un daño preferencial si se trata de ácido araquidónico, que al oxidarse, puede provocar una sobreproducción de enzimas que intervienen en su metabolismo y la generación de productos tóxicos para la célula (Adibhatla y Hatcher, 2007).

El metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) es controlado por la FLA2 y acetiltransferasas, en un proceso conocido como “ciclo de deacetilación-reacetilación”. En condiciones normales, los ácidos grasos libres (FFAs) liberados por FLA2 se unen rápidamente a los lípidos de membrana a través de procesos dependientes de energía en el cual están implicados CoA y ATP. Las fosfolipasas son enzimas que catalizan el anclaje de ácidos grasos en la membrana, y son de particular importancia debido a que intervienen en la función sináptica y regulan la liberación del AcAr), un precursor de la síntesis de los eicosanoides, incluyendo prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Kunz et al., 2002). Diferentes FLA2 participan en eventos fisiológicos como daño celular, inflamación, y apoptosis. Estudios recientes se han enfocado a los grupos más numerosos de las FLA2; los cuales son el grupo de FLA2 citosólicas dependientes de Ca (cFLA2), el grupo de las FLA2 secretorias (sFLA2), y el grupo IV de FLA2 dependientes de Ca (iFLA2). Las cFLA2 presentan 3 isoformas, varios sitios de fosforilación, y un sitio para calmodulina de Ca. Una de las isoformas que presenta este grupo de enzimas tiene preferencia para la hidrólisis de AcAr. Se considera a éstas enzimas como

las más importantes en la liberación de este ácido graso, que sirve para modular procesos intracelulares (Sun et al., 2004).

El AcAr se metaboliza por las ciclooxigenasas (COX) y lipoxigenasas (LOX). Un aumento en la producción de ERO y radicales libres, en particular el H_2O_2 y $OH\cdot$, son generados por procesos como el metabolismo oxidante de AcAr a través de éstas enzimas, o por la inducción de metales de transición que generan óxidos tóxicos como el V_2O_5 . Otro tipo de ERO, $OH\cdot$, es formado a partir de H_2O_2 también en presencia de iones metálicos, como el vanadio, por medio de la reacción tipo Fenton. Una vez formado, este radical reacciona casi instantáneamente con varios componentes celulares, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados de membranas lipídicas. El radical superóxido no induce la peroxidación directamente, pero puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO\cdot$), el cual sí puede iniciar la peroxidación. Como consecuencia, el aumento en los niveles de ERO produce una sobreproducción de FLA2, que induce la oxidación de lípidos de membrana, formándose peróxidos de lípidos, o lípidos hidroperóxidos (Adibhatla y Hatcher, 2008) (Esquema 3).



Esquema 3 – Diversas formas en que pueden incrementar los niveles de ROS, una de ellas es la exposición a vanadio. Estos niveles incrementados generan peroxidación de lípidos, produciendo productos aldehídicos tóxicos y una disminución en las concentraciones de GSH (Modificado de Adibhatla y Hatcher, 2008).

Los lípidos hidroperóxidos formados por peroxidación, fácilmente se descomponen en múltiples productos como son epóxidos, alcoholes y aldehídos (Uchida, 2003). Los aldehídos en particular, pueden afectar y modular, a concentraciones muy bajas, funciones celulares, incluyendo transducción de señales, expresión de genes, proliferación celular, etc. Estos grupos de aldehídos juegan un papel importante al agregarse y cambiar la estructura de las proteínas, y pueden ser clasificados dentro de tres familias: los 2-alquenalos, 4-hidroxicarbanos y los cetoaldehídos (Chiarotto et al., 1995).

Los 4-hidroxicarbanos representan el grupo más prominente de estos aldehídos, y dentro de este grupo, el más representativo es el 4-HNE. Se ha sugerido que al presentarse daño oxidante en las membranas, 4-HNE puede acumularse en ellas a concentraciones de 10 μ M hasta 5mM. Estos fenómenos pueden darse con mayor frecuencia en SNC, el cual presenta mayores concentraciones de lípidos, lo que lo convierte en un sistema muy susceptible a la peroxidación (Uchida, 2003).

El 4-HNE y los 4-hidroxicarbanos son fuertes agentes alquiladores que reaccionan rápidamente con los grupos sulfhidrilo de proteínas, enzimas, y aminoácidos como cisteína, histidina y lisina. Comparado con los radicales libres, el 4-HNE junto con otros aldehídos como MDA y acroleína, son moléculas muy estables y pueden difundirse en la célula y atacar blancos específicos, siendo además mediadores de otras rutas tóxicas, como puede ser la ruta de muerte celular por apoptosis. Dentro de los efectos generales producidos a concentraciones intracelulares bajas, el 4-HNE estimula la fosfolipasa C, reduce la comunicación de uniones Gap, y estimula la migración de neutrófilos. También estimula la expresión de varios genes, como c-myc y genes globo, procolágena tipo 1, y aldosa reductasa, genes c-myc, y el gen transformador de crecimiento factor β 1 (Uchida et al., 1999).

7.3 Toxicidad de 4-HNE y vanadio en corteza cerebral

En los resultados obtenidos en corteza cerebral se observó que hay presencia de marca de 4-HNE específicamente en neuronas piramidales, la cual incrementa conforme la exposición a V_2O_5 es mayor. Dichas neuronas son glutamatérgicas de proyección y mandan su información de manera conjunta, por lo que la interconexión entre estas neuronas es vital (Tan et al., 1998). El glutamato es un neurotransmisor excitador, el cual es utilizado por las neuronas para realizar el tipo de sinapsis más distribuido en los mamíferos. Los astrocitos están íntimamente asociados a las sinapsis glutamatérgicas y juegan un papel clave previniendo la acumulación excesiva de glutamato extracelular en regiones sinápticas. Esta asociación entre glía y neuronas se da a nivel de contactos sinápticos entre las neuronas, donde se requieren grandes cantidades de energía para soportar una transmisión sináptica prolongada.

El glutamato liberado en exceso en el sitio sináptico es tomado por los astrocitos y es convertido a glutamina, un aminoácido no excitatorio. La glutamina es liberada en el espacio extracelular, tomada por las neuronas y convertida nuevamente a glutamato en las terminales presinápticas. Este glutamato disponible entra de nuevo en las vesículas sinápticas para que vuelva a ejercer su función excitatoria durante la neurotransmisión. Ambas células, neuronas y astrocitos, expresan transportadores de glutamato, pero se sabe que los astrocitos presentan mayor capacidad para eliminar glutamato del espacio extracelular. Los transportadores de glutamato más conocidos son GLAST y GLT-1 en el caso del astrocito y para neuronas el EAAC1 y EAAT4. Los transportadores de glutamato neuronales, ejercen su actividad en la toma de glutamato durante su liberación después de haberse llevado a cabo una estimulación presináptica, mientras que los transportadores del astrocito eliminan excesos de glutamato en el sitio sináptico (Hatton, 2002).

La liberación excesiva de este neurotransmisor daña a componentes neuronales como receptores y dendritas y provoca muerte neuronal. Uno de los mecanismos que intervienen en estos procesos excitotóxicos es el daño en la retención de glutamato en el astrocito, producido por los radicales libres de oxígeno. En este estudio, el papel que representa la exposición a un metal como el vanadio podría inducir mecanismos oxidantes por medio de la peroxidación, que generen productos como el 4-HNE, el cual reacciona directamente con componentes que participan en la sinapsis, como los transportadores de glutamato del astrocito, ATPasa de Na^+/K^+ y transportadores de glucosa neuronales.

La toxicidad del 4-HNE formado por peroxidación en el SNC se relaciona principalmente con su habilidad de alquilar grupos nucleofílicos y de reducir considerablemente los niveles de antioxidantes como glutatión. El 4-HNE es capaz de reaccionar con proteínas que son clave para mantener la función sináptica y la comunicación de las neuronas con los astrocitos (Kubatova et al., 2007).

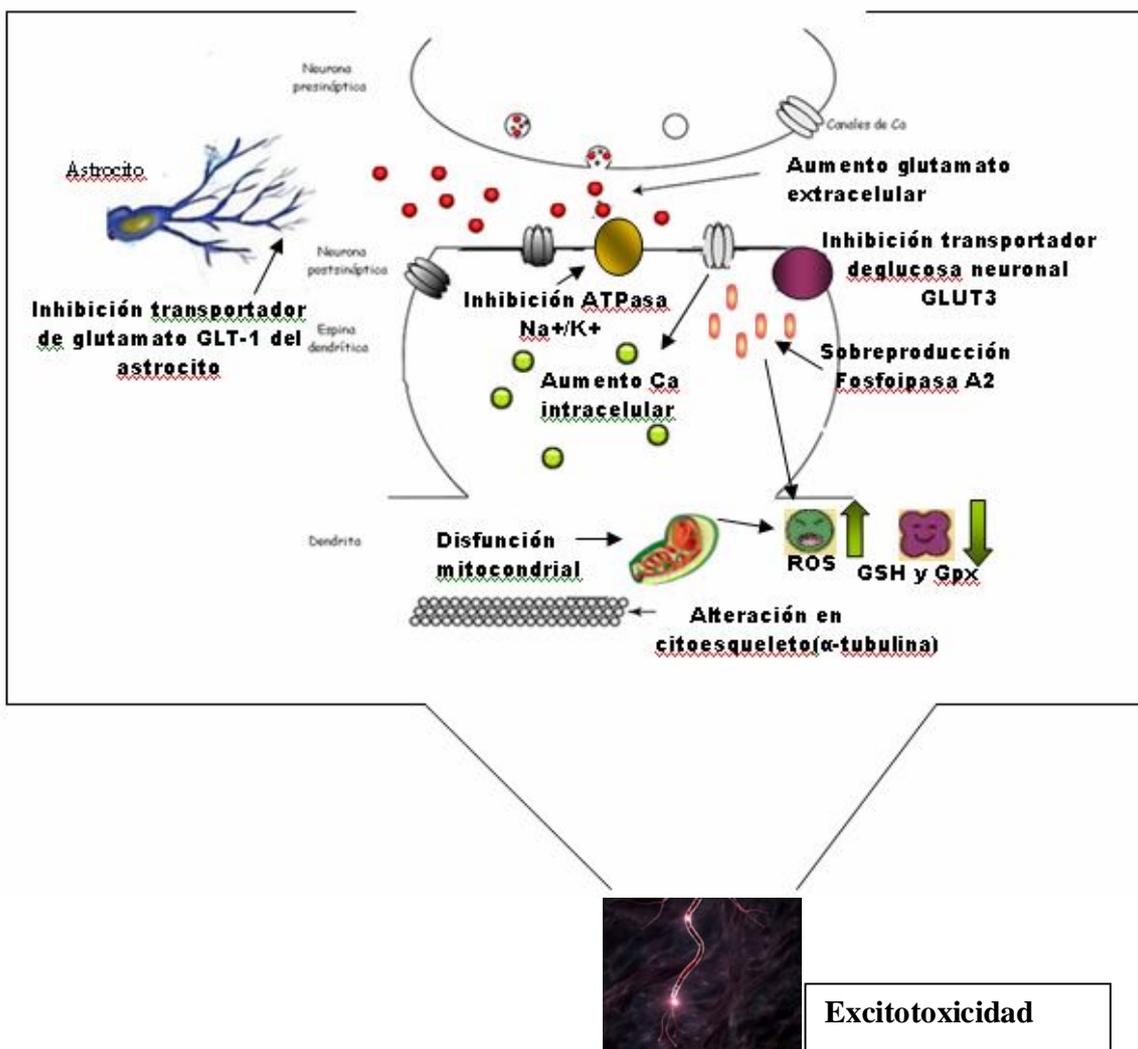
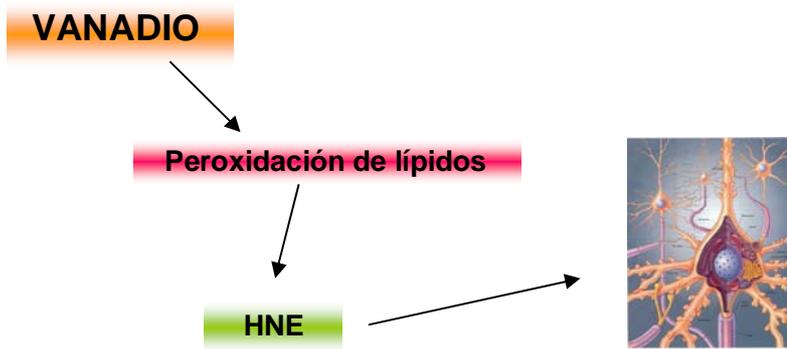
Este aldehído altera el transporte del glutamato y la función mitocondrial en sinaptosomas corticales (LoPachin et al., 2009), reaccionando con el transportador GLT-1 del astrocito, Otra de las enzimas más susceptibles a sufrir daño por EL 4-HNE es la ATPasa de Na^+/K^+ , cuya función principal es el mantenimiento de las concentraciones de K^+ y Na^+ intracelular y extracelulares, para mantener el balance eléctrico de la membrana. El 4-HNE reacciona rápidamente a esta enzima en sus grupos sulfhidrilos y provoca la pérdida de actividad enzimática, además de reaccionar con otros aminoácidos como la lisina para formar aductos que interfieren con la función de la proteína (Siems et al., 2003). Además, el vanadio también puede reaccionar directamente con esta proteína integral de membrana e inhibirla (Morinville et al., 1998).

Aunado a esto se ha reportado que el 4-HNE es capaz de unirse e inhibir componentes esenciales para la función sináptica y para la sobrevivencia neuronal, como es la inhibición de la ATPasa de Na^+/K^+ , generando la pérdida del potencial de membrana de la neurona y una acumulación de glutamato extracelular, debido a que el 4-HNE también inhibe a uno de los transportadores de glutamato del astrocito, el GLT-1, y al transportador de glucosa neuronal, GLUT3, alterando la producción de energía de la neurona. Dichos efectos se suman a otros efectos tóxicos de componentes asociados a la sobreactivación de enzimas como fosfolipasas y adenilatociclasa, por alteración de la proteína $\text{G}\alpha_{q/11}$ por parte del 4-HNE. La suma de dichas alteraciones puede provocar una sobreexcitación de las neuronas, generando como consecuencia muerte celular (Uchida, 2003) (Esquema 3).

Por otra parte la exposición a vanadio induce estrés oxidante, que podría alterar enzimas que participan en procesos metabólicos básicos para la neurona. La mitocondria de las neuronas es uno de los sitios que son susceptibles a sufrir alguna disfunción por la acción del 4-HNE. Se ha observado que el 4-HNE altera la función en los complejos mitocondriales 1 y 2. En el cerebro, la enzima primaria que cataliza la oxidación del 4-HNE en la mitocondria pertenece a la clase de las 5 aldehído deshidrogenasa (ALDH5A). Debido a que las ALDHs son enzimas dependientes de NAD^+ , el 4-HNE se difunde fácilmente por la matriz mitocondrial y provoca la inhibición del complejo 1 y bloquea la oxidación de NADH a NAD^+ , generando disfunción mitocondrial, elevando los niveles de ERO y estimulando una sobreproducción de FLA2. Como se había mencionado previamente en los antecedentes, existe un sistema antioxidante que reacciona e inhibe a los aldehídos producto de la peroxidación. La ruta metabólica preferencial para 4-HNE es la conjugación con GSH, especialmente con glutatión s-transferasas, la mayor ruta de eliminación de 4-HNE, aunque también puede ser metabolizado por aldehído deshidrogenasa y aldosa reductasa. Sin embargo, en presencia de vanadio, que genera estrés oxidante por incremento en la producción de ROS,

NO, y ONOO⁻, el daño oxidante en las membranas puede incrementar a tal grado durante el proceso de peroxidación, que el 4-HNE puede ser producido a concentraciones de hasta 5mM, siendo la reducción de GSH uno de los primeros efectos de este aumento, por lo que este sistema antioxidante no está apto para compensar tales concentraciones (Raza y John, 2006; Chen et al., 2002; Kubatova et al., 2007).

Uno de los componentes del citoesqueleto susceptible a 4-HNE y a vanadio, son los microtúbulos, conformados estructuralmente por heterodímeros de tubulina (α y β tubulina). La exposición a V₂O₅ induce un decremento en los niveles de la gamma-tubulina en células germinales y somáticas de testículo de ratón (Mussali-Galante et al. 2005), y la exposición de los microtúbulos al aldehído rompe con su estructura en cultivos de células de neuroblastoma, siendo la tubulina un blanco preferencial, la cual sufre alteraciones y provoca que los microtúbulos no se polimericen. Además, pueden provocar muerte celular de otros tipos celulares como fibroblastos, miocitos y neuronas y una disminución significativa en los niveles de GSH en estas mismas células. (Sastry, 1985; Neely et al., 2005).



Esquema 4- En este esquema se ilustra la peroxidación inducida por de lípidos inducida por el vanadio, produciendo mayores concentraciones de 4-HNE, el cual reacciona con enzimas que participan en las sinapsis glutamatérgicas de corteza cerebral y esto puede provocar que la célula muera por excitotoxicidad.

En cuanto a los resultados obtenidos con DAPI, en los cuales observamos presencia de núcleos apoptóticos en las neuronas piramidales de corteza cerebral. Se sabe que la exposición a vanadio puede afectar los niveles de fosforilación intracelular por inhibición de proteínas fosfatasas y rutas de señalización, donde pueden intervenir JNK, SAPK y p38. El 4-HNE induce muerte celular por apoptosis mediante procesos que implican acumulación de Ca intracelular, activación de quinasas c-Jun, deleción de glutatión, y activación de caspasas dependientes de Fas (Bruckner y Estus, 2002; Lim et al., 2006). Otros estudios muestran que el 4-HNE induce la liberación de citocromo-c, el cual inicia apoptosis induciendo la formación de una proteasa apoptótica que activa caspasa 9 en presencia de ATP. La caspasa 9 se ancla y activa a la caspasa 3, provocando la fragmentación de ADN y la muerte celular. La liberación de citocromo c dentro del citosol puede ser considerado como un blanco potencial para la regulación de apoptosis inducida por 4-HNE (Ji et al., 2001).

La localización en la marca sobreexpuesta de 4-HNE y DAPI muestra en varias neuronas piramidales positivas que esta marca del aldehído se distribuye en todo el soma y además con el DAPI se observa el núcleo apoptótico en el mismo soma. Una vez que el vanadio indujo estrés oxidante y se generó la peroxidación, el 4-HNE producido en altas concentraciones genera efectos genotóxicos diversos, presentando un papel importante en la función y actividad de varios factores de transcripción, que son regulados a su vez por MAP quinasas. El aldehído modula los genes TGF β 1 y colágena tipo 1 en concentraciones de 1-10 μ M, los cuales requieren un sitio activo de un factor de transcripción para la proteína activadora (AP-1). El 4-HNE activa también AP-1 y desregula significativamente NF-kB. Es activador de JNKs, promoviendo su translocación en el núcleo (Esterbauer et al. 1991). En otros estudios realizados en cultivos celulares, 4-HNE activa las quinasas de los oncogenes c-jun, p46 y p54 por unión directa, y utiliza más de una ruta para llevar información al núcleo. Se ha sugerido que el 4-HNE no reconoce un solo receptor en específico, sino que interactúa no específicamente con diferentes receptores de superficie o intracelulares. La activación de proteínas tirosina quinasas es uno de los pasos clave en la expresión de c-Jun inducida por 4-HNE en

las células. Dicho gen, una vez activado, puede activar otros genes. Primero, la fosforilación de c-jun activa su propia transcripción, incrementando su disponibilidad para la formación del complejo AP-1. Segundo, la fosforilación de c-jun también incrementa la actividad de nuevos factores de AP-1 formados, permitiendo la actividad transcripcional de AP-1 para ser activada. También hay inducción de 4-HNE hacia p38 pero no para ERK. La activación de JNK ha estado implicada en inducir apoptosis en respuesta a la falta de factores de crecimiento y otros estímulos del ambiente (Esterbauer, 1991; Ji et al., 2001; Leonarduzzi et al., 2000; Eckl, 2003).

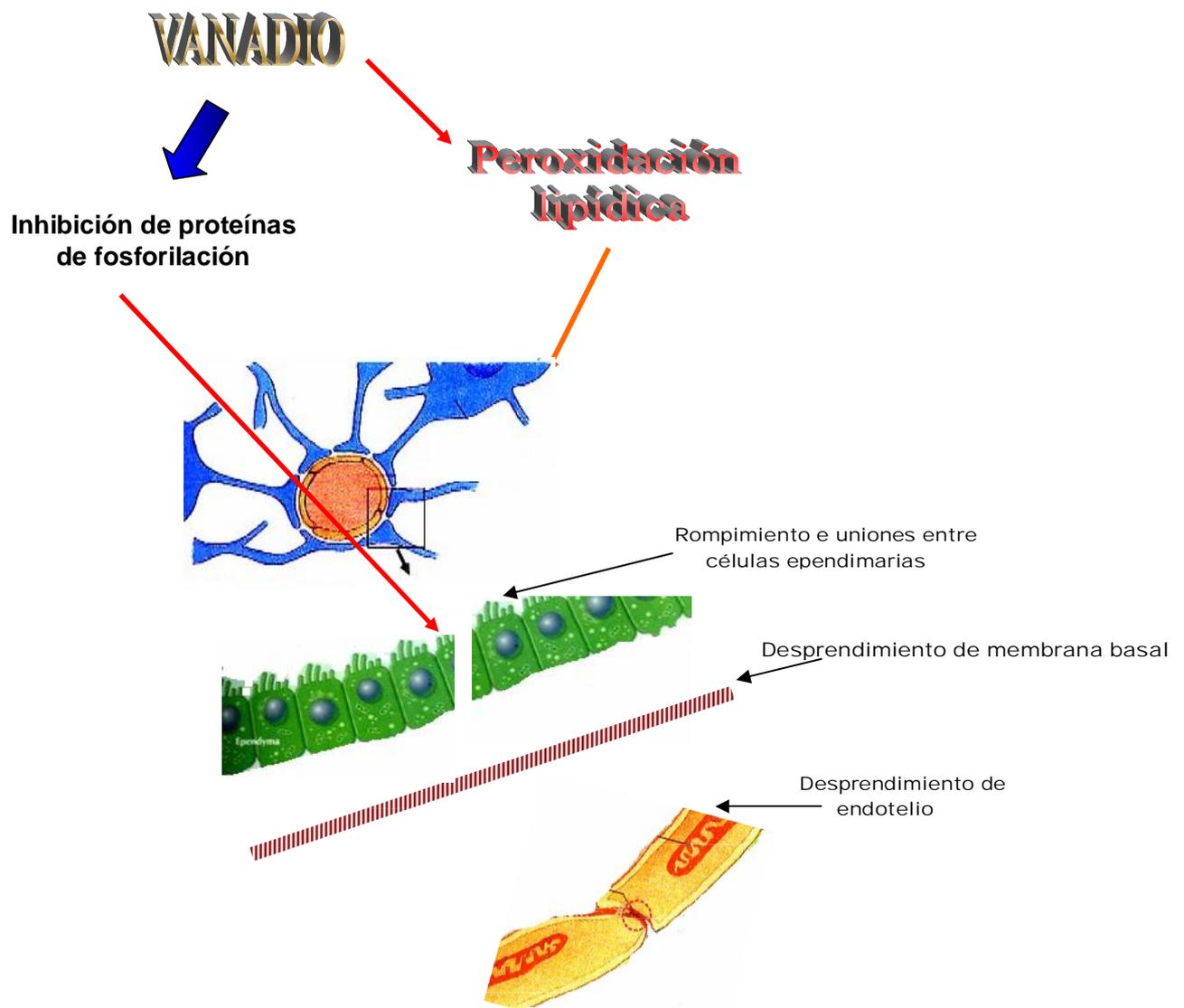
7.4 Toxicidad de vanadio y 4-HNE en plexo coroideo

Una vez que el vanadio entra al organismo, se une a proteínas como transferrina y albúmina, para ser transportado en el plasma y puede llegar al SNC sobrepasando la barrera hematoencefálica o a través de los plexos coroideos directamente (Barceloux. 1999; Yokel, 2006; Radisky y Kaplan, 1999).

Una vez dentro del SNC, el vanadio induce un aumento en los RL que tienen preferencia sobre los lípidos. El daño generado como consecuencia de la peroxidación puede observarse mediante la marca de 4-HNE en la estructura del plexo coroideo, la cual se presentó en células endoteliales y en el endotelio. Se sabe que el 4-HNE es fácilmente metabolizado por células endoteliales de la BHE. Sin embargo, estas células endoteliales de la barrera, presentes en forma de monocapas epiteliales, y actúan como barrera entre la sangre y el tejido, se vieron expuestas a un fuerte compuesto tóxico como el V_2O_5 , y por lo tanto pudo ser el punto de partida para dañar al tejido. La sensibilidad del endotelio al 4-HNE fue probada mediante un estudio realizado en células endoteliales de porcino clonadas. El 4-HNE indujo en éstas células aberraciones cromosómicas a concentraciones de ≥ 1 μ M y micronúcleos a concentraciones de ≥ 10 μ M. (Eckl, 2003).

Como se mencionó previamente, otro elemento de la barrera que es blanco preferencial, son los astrocitos. El 4-HNE altera el transporte de glutamato en éstas células, impidiéndole cumplir con una de sus funciones básicas como es la retención de glutamato. (Blanc et al., 1998).

Se sabe que el vanadio inhibe enzimas que realizan reacciones de fosforilación. Los compuestos de vanadio modulan la fosforilación de varias proteínas, como son AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI-3K, y NF- κ B, todas son proteínas efectoras de rutas de señalización que son susceptibles al daño causado por el aumento en producción de ERO. La activación de estas rutas de señalización está mediada por la fosforilación de tirosinas, dependientes en la actividad de proteínas fosfatasas y fosfocinasas. En presencia de peróxidos de vanadio, se promueve la inhibición de fosfotirosinas, resultando en la acumulación de proteínas tirosina fosforiladas (TPPs). La acumulación excesiva de estas TPPs inicia una cadena oxidante con abundante producción de anión superóxido el cual cataliza la formación de peróxidos de vanadio adicionales, estableciendo un círculo vicioso. Los daños en estas enzimas generan una separación en las uniones intercelulares de las células ependimarias que forman parte del plexo coroideo (Huyer et al., 1997; Radisky y Kaplan, 1999) (Esquema 4). Además, se sabe por resultados previos observados en nuestro grupo de laboratorio que la inhalación a V_2O_5 induce una pérdida de cilios en células ependimarias de cuarto ventrículo de ratones, desprendimiento de su membrana basal y rompimiento de uniones intercelulares (Avila-Costa et al., 2005).



¡¡¡Rompimiento de barrera hematoencefálica !!!

Esquema 5- Ilustración en la cual se observa que la exposición a vanadio puede interactuar directamente con proteínas que realizan reacciones de fosforilación e inhibirlas, provocando la separación entre las células endimarias de la BHE, o bien, induce peroxidación de lípidos, cuyos efectos se verán reflejados en el desprendimiento de la membrana basal, de las células endimarias, separación entre éstas células y desprendimiento del endotelio.

7.5 Enfermedades neurodegenerativas y su relación con la exposición a vanadio y a 4-HNE

La neurodegeneración es una serie de procesos complejos y multifacéticos que se asocian a diversas enfermedades crónicas. Estos procesos afectan a una población de células nerviosas e implican muerte celular progresiva (Gaeta y Hider, 2005).

Las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer son multifactoriales. Dentro de los factores exógenos están los ambientales, en los que está implicada la exposición a metales, los cuales desencadenan factores metabólicos tóxicos por estrés oxidante.

Uno de los blancos preferenciales del estrés oxidante son los lípidos, por lo que se ha identificado alteraciones en proteínas que participan en el metabolismo de los lípidos, así como efectos tóxicos generados por productos de la peroxidación, como el 4-HNE.

En la enfermedad de Alzheimer, se presenta una desregulación de FLA2 en personas que la padecen. Estudios realizados en cultivos de neuronas corticales se ha observado fosforilación de cFLA2, y sobreliberación de AcAr por activación de la vía de oxidasa de NADPH, que provoca un aumento en la generación de ERO, y activación de ERK. Además, se ha observado disfunción mitocondrial inducida por el péptido A β a través de cFLA2 y iFLA2 en cultivos de astrocitos corticales (Adibhatla y Hatcher, 2008).

El incremento de 4-HNE observado en corteza cerebral de ratones expuestos a vanadio podría relacionarse con procesos que se presentan en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. El transporte de glutamato es inhibido en cerebros de pacientes con Alzheimer, además de que el 4-HNE se encuentra en altas concentraciones en cerebros de pacientes con la enfermedad (McGrath et al., 2001). La oxidación de proteínas resulta de la acción por una sobreproducción del

péptido A β , formando placas neurofibrilares extracelulares. Además, este péptido se oxida, aumentando los niveles de ERO, generando 4-HNE, el cual reacciona nuevamente con el péptido, para incrementar su concentración en corteza cerebral y su toxicidad. Dichas postulaciones se hicieron en base a estudios que evaluaban la adición de de A β y 4-HNE en cultivos de sinaptosomas corticales, lo que resulta en la inhibición del transporte del glutamato, por la acción del 4-HNE al transportador GLT-1, resultando en una disminución en el transporte de glutamato en esta enfermedad. (Lauderback et al., 2001; Subramaniam et al., 1997; Mark et al., 1997).

Otro componente que forma parte del metabolismo de lípidos y que está relacionado con enfermedades neurodegenerativas son las COX. Su contribución a estas patologías está asociada a su modificación sináptica. Estas enzimas participan en vías de síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y ecosanoides al liberarse AcAr. La inhibición de estas enzimas suprime la neurotransmisión glutamatérgica excitatoria y su potenciación a largo plazo. La COX-2 está asociada a membranas y está expresada constitutivamente en SNC (neuronas, astrocitos, microglia y endotelio), en especial en estructuras como hipocampo y corteza cerebral. La inducción de estrés oxidante generada por los metales, produce un aumento en los niveles de ERO, los cuales actúan directamente sobre las ciclooxigenasas, oxidándolas y generando mayor aumento en ERO (Adibhatla y Hatcher, 2007).

La relación que presenta el 4-HNE en la enfermedad de Parkinson se relaciona con la oxidación de proteínas que se encuentran en las neuronas dopaminérgicas y la acumulación de proteínas ubiquitinizadas degradadas por el proteosoma.

Algunas de las modificaciones que sufren estas proteínas que serán degradadas provocan un incremento en la susceptibilidad de ser oxidadas por productos de la peroxidación lipídica, debido probablemente a un incremento en la superficie hidrofóbica de la proteína. La oxidación de estas proteínas causa una exposición

de sitios hidrofóbicos que son marcados con ubiquitina para ser reconocidos por el proteosoma. Las proteínas modificadas por conjugación con 4-HNE se convierten en sustratos pobres para su degradación en el proteosoma y en consecuencia, se acumulan agregados de proteínas en la célula debido a que no pudieron ser reconocidas por el proteosoma (Hyun et al., 2002).

El daño observado en neuronas piramidales de la corteza motora podría relacionarse con una disminución en la actividad locomotora de ratones expuestos a vanadio reportada previamente (García et al., 2004; Cortés et al., 2008). Por otra parte, las alteraciones observadas en el plexo coroideo se correlacionan con la ruptura de la BHE en epitelio endotelial, reportada por Avila-Costa y cols. en 2004. Las alteraciones en la barrera y el plexo pueden involucrar un deterioro en la producción del LCR, generando muerte neuronal.

8. CONCLUSIONES

- La inhalación de V_2O_5 produce daño oxidante y muerte celular por apoptosis en neuronas piramidales de la corteza cerebral, pérdida de uniones intercelulares de las células ependimarias y desprendimiento del endotelio y de su membrana basal en el epéndimo. El daño a estas estructuras se incrementó conforme el tiempo de la exposición a este compuesto se incrementó.
- Los resultados obtenidos se relacionan con uno de los efectos tóxicos que presenta el vanadio, el cual induce la formación de ERO, generando estrés oxidante, el cual actúa principalmente sobre lípidos membranales, produciendo peroxidación lipídica y su producto más tóxico, 4-HNE.
- La relevancia de este estudio se relaciona con el papel que representa el estrés oxidante como uno de los posibles factores causantes de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson que se presentan con mayor frecuencia en ciudades con altos índices de contaminación, generada por la acumulación de múltiples compuestos entre los que destacan los metales por inducir estrés oxidante.

9. ANEXO

Técnica de inmunofluorescencia

Desparafinar tejidos (toda la noche en xilol)

Pasar muestras por el tren de xilones

Enjuagar muestras con agua normal

Colocar en un koppling con PBS

Colocar 500 ml de H₂O₂ en la olla de presión y dentro de ella colocar el koppling con las laminillas en Declere

- Dilución 1:20 (2 ml Declere, 38 ml agua desionizada)

Enfriar muestras a 4°C

Tratar tejidos con etanol absoluto por 10 minutos a 4°C

Se permeabiliza l tejido con solución de tritón X-100 al 0.2% a temperatura ambiente por 5 min.

Se hacen dos lavados (de 5-10 min. c/lavado) para eliminar el tritón con PBS

Tratamiento con azul de Evans (1:100) PBS 10 min. a temperatura ambiente

Bloqueo de de unión inespecífica con PBS-Albúmina al 0.5% de albúmina libre durante 30 minutos a temperatura ambiente

Se incuban los cortes con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C

Se hacen 3 lavados (10 min c/u) con PBS, con la intención de eliminar los excesos del anticuerpo primario

Se incuban nuevamente los cortes de tejido, con el anticuerpo secundario diluidos 1:200, durante 2 hrs a temperatura ambiente

Se lavan nuevamente 3 veces y se procede a montar las preparaciones, una gota de Vectashield y se coloca el cubreobjetos

Se conservan en refrigeración hasta el análisis en el microscopio

Se analizan las preparaciones en microscopio confocal

10. BIBLIOGRAFÍA

Abuja P y Albertini R. 2001. **Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins** Clin Chim Acta 306 :1-17.

Adibhatla R y Hatcher J. 2007. **Role of Lipids in Brain Injury and Diseases.** Future Lipidol 2:403-422.

Adibhatla R y Hatcher JF. 2008. **Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies.** BMB Rep :560-567.

Adibhatla R y Hatcher J. 2008. **Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders.** Subcell Biochem 48:1-24.

Acevedo-Nava S. 2005. **La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio.** Tesis de maestría en Ciencias Biológicas.

Al-Bayati M, Mohammad A, Culbertson R, Scheider JP, Rosenblatt LS y Raabe OG. 1992. **The lymphotoxic action of vanadate.** J Environ Pathol Toxicol Oncol 2:19-27.

Aley P, Colín-Barenque L, Montiel Flores E, Ordoñez J, Flores Martinez EA, Gutiérrez Valdez A, Rico Zambrano JP, Espinosa J, Avila-Costa MR y Fortoul TI. 2004. **Análisis citológico de la corteza motora del ratón despues de la inhalación a vanadio.** XLVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Veracruz Ver.

Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Zepeda-Rodriguez A, Antuna S, Saldivar OL, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Avila-Casado MC, Reyes-Olivera A, Anaya V y Fortoul TI. 2005. **Ependymal epithelium disruption alter vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model.** Neurosci Lett 381:21-25.

Avila-Costa MA, Fortoul-TI, Niño-Cabrera G, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Gutierrez-Valdés A, Ordoñez-Librado JL, Gutiérrez-Lara V, Mussali-Galante P, Díaz-Bech P y Anaya-Martínez V. 2006. **Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V₂O₅) promote memory deterioration.** Neurotoxicol 27:1007-1012.

Avila-Costa MR, Montiel-Flores E, Colín-Barenque L, Ordoñez JL, Gutiérrez AL, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P y Fortoul TI. 2004. **Nigrostriatal Modifications Alter Vanadium Inhalation: An Immunocytochemical and Cytological Approach.** Neurochem Res 29:1365-1369.

Bacci A, Verderio C, Pravettoni E y Matteoli M. 1999. **The role of glial cells in synaptic function.** Phil Trans R Soc Lond B 354:403-409.

Ballester F. 2005. **Contaminación atmosférica, cambio climático y salud.** Rev Esp Salud Publica 79:159-175.

Barceloux DG. 1999. **Vanadium.** Clin Toxicol 37(2):265-278.

Barth A, Schaffer W, Konnaris C, Blauensteiner R, Winker R, Osterode W y Rudiger HW. 2002. **Neurobehavioral effects of vanadium.** J Toxicol Environ Health Part A 65:677-683.

Blanc E, Keller J, Fernández S y Mattson M. 1998. **4-Hydroxynonenal, a Lipid Peroxidation Product, Impairs Glutamate Transport in Cortical Astrocytes.** Glia 22:149-160.

Briggs D. 2003. **Environmental pollution and the global burden of disease.** Br Med Bull 68:1-24.

Bruckner S y Estus S. 2002. **JNK3 Contributes to *c jun* Induction and Apoptosis in 4-Hydroxynonenal-Treated Sympathetic Neurons.** J Neurosci Res 70:665–670.

Brunekreef B y Holgate S. 2002. **Air pollution and health.** Lancet 360:1233-42.

Brunekreef B y Forsberg B. 2005. **Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health.** Eur Respir J 26:309–318.

Byezkowski J y Kulkarni A. 1998. **Oxidative Stress and Pro-Oxidant Biological Effects of Vanadium.** Vanadium in the Environment. Part 2:Health Effects :235-257.

Ca C, Torri C, Bertorelli L, Tartar F, Tancioni F, Gaetani P, Rodriguez y Baena R y Marzatico F. 1995. **Oxidative events in neuronal and glial cell-enriched fractions of rat cerebral cortex.** Free Radic Biol Med 19:853-857.

Calderón-Garcidueñas L, Biagio A, Acuna H, García R, Gambling T, Osnaya N, Monroy S, Tizapantzi MR, Carson J, Villareal-Calderon N y Rewcastle B. 2002. **Air Pollution and Brain Damage.** Toxicol Pathol 30:373 – 389.

Carter JD, Ghio AJ, Samet JM y Devlin RV. 1997. **Cytokine production by human airway epithelial cells alter exposure to an Air Pollution Particle is Metal-Dependent.** Toxicol Appl Pharmacol 146:180-188.

Catalán RK, Martínez AM, Aragonés MD, Robles A y Miguel BG. 1987. **Alterations in brain lipid composition caused by vanadate.** Life Sci 40:799-806.

Cenini G, Sultana R, Memo M, Butterfield D. 2008. **Elevated levels of pro-apoptotic p53 and its oxidative modification by the lipid peroxidation product, HNE, in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.** J Cell Mol Med 12:987-994.

Chang R. 1999. **Química.** Sexta edición. Ed. Mcgraw Hill. 993 pp.

Chen J, Schenker S y Henerson G. 2002. **4-Hydroxynonenal Detoxification by Mitochondrial Glutathione S-Transferase Is Compromised by Short-Term Ethanol Consumption in Rats.** Alcohol Clin Exp Res 26:1252-8.

Chen F, Vallyathan V, Castranova V y Shi X. 2001. **Cell apoptosis induced by carcinogenic metals.** Mol Cell Biochem 222:183-188.

Chiarotto E, Biasi F, Scavazza A, Camandola S, Dianzani MU y Poli G. 1995. **Metabolismo of 4-Hydroxy-2-nonenal and aging.** Biochem Biophys Res Común 207:477-484.

Colín Barenque L, Martínez-Hernández MG, Baiza-Gutman LA, Avila-Costa MR, Ordoñez Librado JL, Bizarro Nevares P, Rodríguez Lara V, Piñón Zarate G, Rojas-Lemus M, Mussali-Galante P, and Fortoul TI. 2007. **Matriz metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification alter vanadium inhalation.** J. Appl Toxicol 27:1-6.

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

Cortés-Torres E, Colín-Barenque L, Cervantes-Piza N, Jiménez-Martínez R, Avila-Costa MR, Bizarro-Nevarés P, Martínez-Pedraza M, Mussali-Galante P y Fortoul TI. **Alteración de la coordinación motora y de la concentración de las proteasas 2 y 9 en estriado en un modelo murino de exposición por inhalación a pentóxido de vanadio.** IX Congreso Nacional de Microscopía. 9-13 de noviembre 2008. Guanajuato.Gto.

Cortizo AM, Bruzzzone L, Molinuevo S y Etcheverry SB. 2000. **A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** Toxicol 147:89-99.

DeFelipe J y Fariñas I.1992. **The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs.** Prog Neurobiol 39:563-607.

Dotan Y, Lichtenberg D, y Pinchuk I 2004 **Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress.** Progress in Lipid Research 43:220-227.

Eckl PM. 2003. **Genotoxicity of HNE.** Mol Aspects Med 24:161-165.

Eckl PM, Ortner A y Esterbauer H. 1993. **Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes.** Mutat Res 290:183-192.

Elston GN, Benavides-Piccione R, DeFelipe J. 2001. **The pyramidal cell in cognition: a comparative study in man and monkey.** J Neurosci 21:1-5.

Emerit J, Edeas M, Ricairdre R. 2004. **Neurodegenerative disease and oxidative stress.** Biomed Pharmacother 58:39-46.

Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H. 1991. **Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal. Malonaldehyde and related aldehydes.** Free Radic Biol Med 11:81-128.

Evangelou. 2002. **Vanadium in cancer treatment.** Crit Rev Oncol Hematol 3:249-265.

Fawcett D. 1995. **Tratado de Histología.** 12a Edición. Editorial Interamericana. Madrid: 403-404.

Felleman DJ y Van Essen DC. 1991. **Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex.** Cereb Cortex 1:1-47.

Fernández A. 2008. **Air Quality Management in Mexico.** J Toxicol Environ Health A 71:56 – 62.

Fortoul TI, Osorio LS, Tovar AT, Salazar D, Castilla ME, Olaiz-Fernández G. 1996. **Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: comparison of cases from the 1960s and the 1990s.** Environ Health Perspect 104:630-2.

Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldivar-Osorio L, Espejel-Maya G, Avila-Casado MC, Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Navarro-Villanueva D y Olaiz-Fernández G. 2002. **Vanadium in Ambient Air: Concentrations in Lung Tissue from Autopsies of Mexico City residents in 1960s and 1990s.** Arch Environ Health 57:446-449.

Freeman B. 1998. **Environmental Ecology. The ecological effects of Pollution, Disturbance and other Stresses.** Academic Press. New York. 606pp.

Gaeta A y Hider R. 2005. **The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for promising therapeutic strategy.** Br J Pharmacol 146:1041-1059.

García BG, Quiroga AD, Sturtz N, Martínez AI y Blanzardi ME. 2004. **Morphological alterations of Central Nervous System (CNS) Myelin in Vanadium (V)-Exposed adult rats.** Drug Chem Toxicol 27:1-13.

Gutierrez JR. 2002. **Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes.** Rev Cubana Med Militar 31:126-33.

Gutiérrez-Castillo M, Roubicek D, Cebrián-García M, De Vizcaya-Ruiz D, Sordo-Cedeña M, Ostrosky P. 2006. **Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA. Damage by Urban Airborne Particulate Matter.** Environ Mol Mutagen 47: 199-211.

Ghio AJ y Samet JM, 1999. **Air pollution and health.** Academic Press, New York, 648 pp.

Grune T y Davies K. 2003. **The proteosomal system and HNE-modified proteins.** Mol Aspects Med 24:195-204.

Hatton G. 2002. **Glial-Neuronal interactions in the mammalian brain.** Adv Physiol Educ 26:225-237.

Ho L, Purohit D, Haroutunian V, Luterman J, Willis F, Naslund J, Burbaum J, Mohs R, Aisen P y Passinetti J. 2001. **Neuronal Cyclooxygenase 2 Expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer Disease.** Arch Neurobiol 58:487-492.

Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsapraitis G, Gresser M, Ramachandran C. 1997. **Mechanism of Inhibition of Protein-tyrosine Phosphatases by Vanadate and Pervanadate.** J Biol Chem 272:843-851.

Hyun D, Lee M, Halliwell B y Jenner P. 2002. **Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2,3-trans -nonenal, an end-product of lipid peroxidation:a mechanism contributing to neurodegeneration?.** J Neurochem 83:360-370.

Jarup L. 2003. **Hazards of heavy metals contamination.** Br Med Bull 68:167-182.

Jenner P. 2003. **Oxidative stress in Parkinson's disease.** Ann Neurol 53:526 - 538.

Ji C, Amarnath V, Pietenpol J, Marnett L. 2001. **4-Hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrome c release.** Chem Res Toxicol 14:1090-1096.

Kandel E., Schwartz J., Jessell T. 2001. **Principios de Neurociencia.** Cuarta Edición. McGraw Hill. Madrid. 1321 pp.

Keller JN, Mark RJ, Bruce AJ, Blanc E, Rothstein JD, Uchida K, Waeg G y Mattson M.P. 1997. **4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes.** Neuroscience 80:685-696.

Koistinaho J y Chan P. 2000. Spreading **Depression-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in the Cortex.** Neurochem Res 25:645-651.

Kokubo J, Nagatani N, Hiroki K, Kuroiwa K, Watanabe N y Arati T. 2008. **Mechanism of Destruction of Microtubule Structures by 4-Hydroxy-2-nonenal.** Cell Struct Funct 33:51-59.

Kruman I, Bruce-Keller A, Bredesen D, Waeg G, Mattson M. 1997. **Evidence that 4-hydroxynonenal Mediates Oxidative Stress-Induced Neuronal Apoptosis.** J Neurosci 17:5089-5100.

Kubatova A, Honzatko A, Brichac J, Long E, y Picklo M. 2007. **Analysis of HNE metabolism in CNS models.** Redox Rep 12:16-19.

Kunz T, Marklund N, Hillered L y Oliw E. 2002. **Cyclooxygenase-2, Prostaglandin Synthases, and Prostaglandin H₂ Metabolism in Traumatic Brain Injury in the Rat.** J Neurotrauma 19:1051-1063.

Leonarduzzi G, Arkan M, Bas HV, Chiarpotto E, Sevanian A y Poli G. 2000. **Lipid oxidation products in cell signalling.** Free Radic Biol Med 28:1370–1378.

Lauderback C, Hackett J, Huang F, Keller J, Szweda L, Markesbery W y Butterfield D. 2001. **The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of A β 1-42.** J Neurochem 78:413-416.

Lim J., Lee J., Hyun Lee Y., Choi I., Kyoung Oh Y., Kim H., Sun Park J. y Kim W. 2006. **Simvastatin prevents oxygen and glucose deprivation/ reoxygenation-induced death of cortical neurons by reducing the production and toxicity of 4-hydroxy-2 E –nonenal.** J Neurochem 97:140-150.

LoPachin R, Geohagen B y Gavin T. 2009. **Synaptosomal Toxicity and Nucleophilic Targets of 4-Hydroxy-2- Nonenal.** Toxicol Sci 107:171-181.

Mark R, Lovell M, Markesbery W, Uchida K y Mattson M. 1997. **A Role for 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by Amyloid /3-Peptide.** J Neurochem 68: 255-264.

Molina MJ, Molina LT. 2004. **Megacities and atmospheric pollution**. J Air Waste Manag. Assoc 54:644-80.

Montgomery J y Madison D. 2002. **State-Dependent heterogeneity in synaptic depression between pyramidal cell pairs**. Neuron 33:765–777.

Morinville A, Maysinger D y Shaver A. 1998. **From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling**. TIPS 19: 452-460.

Moriyama Y y Omote H. 2008. **Vesicular Glutamate Transporter acts as a metabolic regulator**. Biological Pharmacological Bulletin. 31: 1844-1846.

Mujica V, Maubert M, Torres M, Muñoz J, Rico E. 2001. **Temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in México city during 1996-1998**. Aerosol Sci 33:91-102.

Mussali-Galante P, Rodríguez-Lara V, Hernández B, Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Piñón-Zárte G, Saldivar-Osorio L, Díaz-Beck P, Herrera-Enriquez MA, Tovar-Sánchez E y Fortoul TI. 2005. **Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times**. Toxicol Ind Health 21:215-222.

Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. 2004. **Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry**. Sci Total Environ 321:59-69.

Neely MD, Boutte A, Milatovic D, Montine TJ. 2005. **Mechanisms of 4-Hydroxynonenal neuronal microtubule dysfunction**. Brain Res 1037:90-98.

Neely MD, Sidell KR, Graham DG, and Montine TJ. 1999. **The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal Inhibits Neurite Outgrowth, Disrupts Neuronal Microtubules, and Modifies Cellular Tubulin.** J. Neurochem 72:2323-2333.

Newman CM y McIntosh AW. 1991. **Advances in Trace Substances Reseach Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications.** Lewis Publishers. Orlando. 456 pp.

Nriagu J.1998. **Emission of vanadium to the atmosphere.** En: Nriagu. J. Ed. Vanadium in the Environment. Part1: Chemistry and Biochemistry. New York , NY. John Wiley and sons. 505 pp.

Parsadonian HK, Marchenko SN, Parsadonian KH y Barilyak IR. 1998. **Vanadium as a factor that disturbs Phosphorus Metabolism in Nervous Tissue.** Neurotoxicol 19:561-564.

Peng J, Song Y, Peng Y, Xiao Y y Qiu. 2008. **The remediation of heavy metals contaminated sediment.** J Hazard Mater 161: 633-640

Purves D, Augustine G, Katz LC, Lamantia AS y Macnamara JO. 2006. **Invitación a la neurociencia.** Ed Panamericana. Argentina. 611pp.

Qin Z, Hu D, Han S, Reaney S, Di Monte D y Fink A. 2007. **Effect of 4-Hydroxy-2-nonenal Modification on α -Synuclein Aggregation.** J Biol Chem 282: 5862–5870.

Radisky DC and Kaplan J. 1999.**Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane.** J Biol Chem 274: 4481–4484.

Raza H y John A. 2006. **4-Hydroxynonenal induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells.** Toxicol Appl Pharmacol 216:309-318.

Ross. 2007. **Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Tisular.** 5ª Edición. Ed. Panamericana. 980 pp.

Roubicek D., Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebri M, Ostrosky-Wegman P. 2007. **Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City.** Mut Res 631:9–15.

Sastry SP. 1985. **Lipids of nervous tissue: composition and metabolism.** Prog Lipid Res 24:69-176.

Sayre L, Perry G y Smith M. 2008. **Oxidative Stress and Neurotoxicity.** Chem Res Toxicol 2:172–188.

Sharma RP, Culombe RA y Srisuchart B. 1986. **Effects of dietary vanadium exposure on levels of regional brain neurotransmitters and their metabolites.** Biochem. Pharmacol 35:461-465.

Siegel S. 2007. **The Oxidative Stress Metabolite 4-Hydroxynonenal Promotes Alzheimer Protofibril Formation.** 2007 Biochem 46:1503-1510.

Siems W y Grune T. 2003. **Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal.** Mol Asp Med 24:167-175.

Soares S. 2007. **Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration.** J Inorg Biochem 101:80 -88.

Soazo M, Garcia GB. 2007 .**Vanadium exposure through lactation produces behavioral alterations and CNS myelin deficit in neonatal rats.** Neurotoxicol Teratol 29:503-510.

Stankiewicz PJ, Tracey AS, Crans DS, Sigel H, Sigel A. 1995. **Metal Ions in Biological Systems:Vanadium and Its Role in Life.** Marcel Dekker, New York. 287pp.

Stewart B, Doorn J y Petersen D. 2007. **Residue-specific adduction of tubulin by 4-Hydroxynonenal and 4-Oxononenal causes cross-linking and inhibits polymerization.** Chem Res Toxicol 20:1111–1119.

Subramaniam R, Roediger F, Jordan B, Mattson M, Keller J, Waeg G y Butterfield D. 1997.**The Lipid Peroxidation Product, 4-Hydroxy-2-trans-Nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins.** J Neurochem 69:1161-1169.

Sun G, Xu J, Jensen M y Simonyi A. 2004. **Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases.** J Lipid Res 45:205-213.

Svoboda P, Tesinger J, Pilar J y Vyskocil F. 1984. **Vanadyl (VO²⁺) and vanadate ions inhibit the brain microsomal Na, K-ATPase with similar affinities. Protection by transferrin and noradrenaline.** Biochem Pharmacol 33:2485-2491.

Tan S, Wood M y Maher P. 1998. **Oxidative Stress Induces a Form of Programmed Cell Death with Characteristics of Both Apoptosis and Necrosis in Neuronal Cells.** J Neurochem 71:95-105.

Todd K, Serrano A, Lacaille JC y Robitaille R. 2006. **Glial cells in synaptic plasticity.** J Physiol 99:75-83.

Torres-Dosal A, Pérez-Maldonado I, Jasso-Pineda Y, Martínez Salinas RI, Alegría-Torres JA, Díaz-Barriga F. 2008. **Indoor air pollution in a Mexican indigenous community: Evaluation of risk reduction program using biomarkers of exposure and effect.** Sci Total Environ 390:362– 368.

Uchida K. 2003. **4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress.** Prog Lipid Res 569:26pp.

Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii, Nakamura Y y Osawa T. 1999. **Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation.** J Biol Chem 274:2234–2242.

Valko M, Morris H y Cronin M.T. 2005. **Metals, Toxicity and Oxidative Stress.** Curr Med Chem 12:1161-1208.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.** Chem Biol Interact 160:1–40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin TD, Mazur M y Telser J. 2007. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol 39:44–84.

Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo A, Márquez M y Cárdenas M. 2003. **Efectos en la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México.** Gac Med Mex 139:57-64.

Valverde M, López M, López I, Sánchez I, Fortoul T, Ostrosky W y Rojas M. 1997. **DNA Damage in Leukocytes and Buccal and Nasal Epithelial Cells of Individuals Exposed to Air Pollution in Mexico City.** Environ Mol Mutagen 30:147-152.

Vargas MF. 2005. **La contaminación ambiental como factor determinante de la salud.** Rev Esp Salud Pública 79:117-127.

Vouk V y Piver WT. 1983. **Metallic Elements in Fossil Fuel Combustion Products: Amounts and Form of Emissions and Evaluation of Carcinogenicity and Mutagenicity.** Environ Mol Mutagen 47:201-225.

World Health Organization. 2000. **International Program of Chemical Safety. Consise International chemical assessment document.** Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds 22:1-54.

Yanardag R y Tunali S. 2006. **Vanadyl sulfate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats.** Mol Cel Biochem 286: 153–159.

Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awashti S y Awashti Y. 2003. **Lipid peroxidation and cell cycle signalling 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signalling.** Acta Biochim Pol 50: 319-336.

Yokel RA. 2006. **Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration.** J Alz Dis 10: 223–253.

Zarkovic N. 2003. **4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathological processes.** Mol Asp Med 24:281-291.

Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard S, Lanciotti R, Butterworth L y Shi X. 2001. **Vanadate-Induced Cell Growth Regulation and the Role of Reactive Oxygen Species** . Arch Biochem Biophys 392:311-320.

Fuentes de consulta

www.semarnat.gob.mx – 17 de enero de 2009-03-03

www.javeriana.edu.co – 18 de febrero de 2009-03-03

www.vet.uga.edu- 19 de marzo de 2009

www.daviddarling.info- 19 de marzo de 2009

www.kcl.ac.uk- 19 de marzo de 2009