



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la exposición a pentóxido de vanadio
sobre la preferencia olfatoria y las gelatinasas en
bulbo olfatorio en un modelo murino por inhalación.**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

PRESENTA

NALLELY CERVANTES PIZA

TUTORA: DRA. LAURA COLIN 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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno	
Apellido paterno:	Cervantes
Apellido materno:	Piza
Nombre(s):	Nallely
Teléfono:	56304142
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad o escuela:	Facultad de Ciencias.
Carrera:	Biología
Numero de cuenta:	301192426
2. Datos del Tutor	
Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Colín
Apellido materno:	Barenque
Nombre(s):	Laura.
3. Datos de sinodal 1	
Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Fortoul
Apellido materno:	van der Goes.
Nombre(s):	Teresa Imelda
4. Datos del sinodal 2	
Grado:	Dr.
Apellido paterno:	Vidal Tamayo
Apellido materno:	Ramírez
Nombre(s):	Román
5. Datos del sinodal 3	
Grado:	Dr.
Apellido paterno:	Mora
Apellido materno:	Carrillo
Nombre(s):	Paul
6. Datos del sinodal 4	
Grado:	M. en C.
Apellido paterno:	González
Apellido materno:	Villalva
Nombre(s):	Adriana Elizabeth.
7. Datos del trabajo escrito	
Titulo: Efecto de la exposición a pentóxido de vanadio sobre la preferencia olfatoria y las gelatinasas en bulbo olfatorio en un modelo murino por inhalación.	
Número de paginas:	72
Año:	2009

Agradecimientos y dedicatorias

Al comité revisor de esta tesis:

Dra. Laura Colín Barenque

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dr. Román Vidal Tamayo Ramírez

M. en C. Adriana Elizabeth González Villalva

Dr. Paul Mora Carrillo.

Al laboratorio de Microscopia Electrónica y de Fotografía del Departamento de Biología celular y Tisular, Facultad de Medicina:

Biól. Armando Zepeda Rodríguez

Al laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología celular y Tisular, Facultad de Medicina:

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata.

Técnica Académica Judith Reyes Ruiz.

Gracias por su asesoría y apoyo.

Esta Tesis fue apoyada por PAPIIT- IN218808

A mis papas

Agradezco y dedico mi trabajo, los cuales me han apoyado en mis decisiones y ayudado a lograr mis metas.

A mis hermanas

Dos grandes pequeñas que le han dado un enfoque distinto a mi vida, al estar conmigo en todos los momentos importantes, además de ser mis mejores amigas y mis cómplices en todo.

A Christian

Por estar conmigo todo este tiempo, en el cual no solo he aprendido mucho de ti, sino también por ayudarme, consolarme, quererme y sobre todo por ser una persona maravillosa.

A Estephania

Por tu gran amistad y comprensión que me has brindado a lo largo de este tiempo, y sobre todo por estar conmigo a lo largo de este trabajo que emprendimos hace algunos años.

A Fabiola y a Rosario

Por su amistad, el apoyo incondicional, la confianza y el cariño.

A mis compañeros del laboratorio Paty Bizarro, Paola, Gaby, Carlos, Rubén y Nelly, Karla itzel.

Y a todos aquellos que también tuvieron una participación.

INDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	2
	II.I.Contaminación.....	2
	II.II Contaminación atmosférica.....	2
	II.III.Contaminación ambiental en la Ciudad de México.....	3
	II.IV .Partículas suspendidas.....	5
	II.V .Vanadio.....	6
	II.V.I Características generales.....	6
	II.V.II Fuentes de emisión y usos.....	8
	II.V.III Niveles de vanadio en el ambiente.....	9
	II.V.IV Vías de exposición.....	10
	II.V.V Toxicocinética.....	12
	II.VI. Radicales libres.	14
	II.VII .Metaloproteinasas.....	15
	II.VII.I Estructura de las MMPs.....	16
	II.VII.II Clasificación.....	18
	II.VIII .Gelatinasas.....	20
	II.IX. Enfermedades neurodegenerativas.....	22
	II.IX.I Parkinson.....	22
	II.IX.II Alzheimer.....	23
	II.IX.III Relación de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson con alteraciones olfatorias.....	23
II.X	Sistema Olfatorio.....	24

II.XI	Nervio olfatorio.....	26
II.XII	Epitelio Olfatorio.....	26
II.XIV	Bulbo olfatorio.....	27
III.	Justificación.....	30
IV.	Hipótesis.....	31
V.	Objetivo.....	32
VI.	Objetivos particulares.....	32
VII.	Materiales y métodos.....	33
VIII.	Resultados.....	38
IX.	Discusión.....	51
X.	Conclusiones.....	58
XI.	Bibliografía.....	64

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza
BO: Bulbo olfatorio
BSA: Albúmina Sérica Bovina
Ca: Calcio
Co: Cobalto
Cu: Cobre
DAB: Diaminobenzidina
Fe: Hierro
H₂O₂: Peroxido de hidrogeno
H₂VO₄: Ortovanadato
IL: Interleucina
LGEEPA: Ley general de equilibrio ecológico y protección al ambiente.
Mg: Magnesio
Mn: Manganeseo
MMPs: Metaloproteasas de matriz extracelular
NaVO₃ Metavanadato de sodio
Na₃VO₄ Ortovanadato de sodio
ng: Nanogramos
NH₄VO₃ Metavanadato de amonio
Ni: Niquel
NRO: Neurona receptora olfatoria
O₂: Anion súper oxido
O₃: Ozono
OH: Radical Hidroxilo
PBS: Buffer de fosfatos
ppm: Partículas por millón
PS: Partículas suspendidas
PST: Partículas suspendidas totales
ROS: Especies reactivas de oxigeno
V₂O₃ Trióxido de vanadio
V₂O₄ Tetróxido de vanadio
V₂O₅: Pentóxido de vanadio
VOCl₂ Oxidicloruro de vanadio
VCl₄ Tetracloruro de Vanadio
VOCl₃ Oxitricloruro de vanadio
VOSO₄ Sulfato de Vanadilo
µg: Microgramos
µM: Micrometros
Zn: Zinc

I. Resumen.

La contaminación ambiental es uno de los problemas que existen en las grandes ciudades, tales como la Ciudad de México, la cual presenta gran cantidad de agentes como las partículas suspendidas totales las que tienen metales adheridos en su superficie como el vanadio, metal que se ha incrementado en las últimas décadas. Se tienen algunos reportes acerca de los efectos adversos que este puede tener sobre el bulbo olfatorio. Se ha reportado un decremento en el número de espinas dendríticas y en el tamaño del soma, muerte por necrosis y apoptosis en las neuronas granulosas del bulbo olfatorio e incremento en las gelatinasas ocasionado por el V_2O_5 . Por lo que el objetivo de este trabajo es analizar el efecto del pentóxido de vanadio sobre la preferencia olfatoria innata y la presencia de las gelatinasas en la zona glomerular y la zona de la granulosa del bulbo olfatorio con relación al tiempo de inhalación en un modelo murino de exposición. Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1, con un peso de 30-35 gramos. Se establecieron dos grupos, un grupo control (el cual fue expuesto a agua desionizada), y un grupo expuesto a pentóxido de vanadio 0.02 M. Las exposiciones se llevaron a cabo en una caja de acrílico conectada a un ultranebulizador, que emite vapor de agua o de solución de V_2O_5 . Las exposiciones se realizaron en sesiones de una hora, dos veces por semana durante 4 semanas. Durante este tiempo los ratones fueron sometidos a una prueba de preferencia olfatoria. Sacrificándose después de la 2, 3 y 4 semanas, se obtuvo el bulbo olfatorio, se procesaron con la técnica histológica ordinaria y se les realizó la técnica de inmunohistoquímica para las gelatinasas A y B. Se le realizó un análisis por densitometría. Los resultados mostraron alteración de la función olfatoria, hubo cambio en la preferencia por odorantes, además de disminución en los tiempos de olfacción y por otro lado aumento significativo de la marca de cada una de las gelatinasas (A y B) conforme al tiempo de exposición a V_2O_5 , tanto en la zona de la glomerular y la granulosa del bulbo olfatorio. La gelatinasa A se incrementó desde la segunda semana de exposición en la zona glomerular y a partir de la tercera semana en la zona de la granulosa. Por otro lado la gelatinasa B tuvo un incremento desde la segunda semana en ambas zonas. De nuestros resultados podemos mencionar que el V_2O_5 está ocasionando una alteración de la función olfatoria además de un incremento de las gelatinasas en la zona glomerular y granulosa del bulbo olfatorio, lo cual lo podría estar relacionado con la pérdida de espinas dendríticas en las neuronas granulosas anteriormente reportado. Además el pentóxido de vanadio produce especies reactivas de oxígeno, las cuales activan la producción de las gelatinasas y su incremento se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson y el Alzheimer.

II. Introducción.

II.I. Contaminación

Contaminación es definida por la ley general del equilibrio ecológico y protección al ambiente (LGEEPA) como la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

II.II. Contaminación atmosférica

Contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire que en ciertas cantidades pueden ser perjudiciales para la vida, afectando estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. En este sentido, un contaminante atmosférico es aquel agente (químico o biológico) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales (Vallejo *et al* 2003). Entre estos agentes podemos mencionar a las partículas suspendidas, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, ozono, monóxido de carbono (Katsouyanni y Pershagen, 1997), gases ácidos, materia orgánica volátil, solventes, pesticidas bioaerosoles y metales (Curtís *et al*. 2006). A este rubro de contaminantes también se pueden añadir todos aquellos factores que inciden sobre la atmósfera, como el calor, el ruido y la radiación (Vallejo *et al* 2003). A los metales se les asocia directamente con un impacto negativo en la salud (Lacasaña-Navarro *et al* 1999) debido a que los contaminantes atmosféricos son gases que interaccionan fácilmente con otras moléculas por lo que, al entrar en contacto con el aparato respiratorio, inmediatamente reaccionan y activan mecanismos de defensa que no permiten que se transporten ni se absorban. Sin embargo, aunque el aparato respiratorio funcione como un eficiente filtro del aire inhalado, es un hecho que los contaminantes ingresan en los fluidos internos hasta llegar a invadir todo el cuerpo.

Los contaminantes se pueden dividir en: Contaminantes primarios: Son los que permanecen en la atmósfera tal y como fueron emitidos por la fuente. Para fines de evaluación de la calidad del aire se consideran: óxidos de azufre, monóxido de carbono, óxido de nitrógeno, hidrocarburos, metales y partículas. Contaminantes secundarios: Son los que han estado sujetos a cambios químicos, o bien, son el producto de la reacción de dos o más contaminantes primarios en la atmósfera. Entre ellos destacan oxidantes fotoquímicos y algunos radicales de corta existencia como el ozono (O₃).

Los contaminantes atmosféricos pueden ser emitidos por dos tipos de fuentes: naturales o antropogénicas. Las naturales: en general, solo una pequeña fracción de los contaminantes de la atmósfera es emitida por fuentes naturales, entre estas se encuentran las erupciones volcánicas y las geológicas. Antropogénicas: son las generadas por las actividades humanas. (Curtis *et al* 2006) Estas fuentes se han clasificado en fijas y móviles. Fijas: Entre las principales fuentes fijas se cuentan minas, refinerías, centrales hidroeléctricas, termoeléctricas, sitios en donde se desarrollan procesos industriales, lugares de almacenamiento y distribución de gasolina, etc. Móviles: las principales fuentes móviles de contaminación atmosférica son los vehículos de combustión interna. Los contaminantes generados por estos son diferentes de los que proceden de las fuentes fijas (Flores, 2004)

Desafortunadamente varias ciudades están produciendo gran cantidad de contaminantes y las causas de esto tiene que ver con deficiencias tecnológicas, con el incremento del consumo de combustibles generado por la falta de eficiencia, las elevadas concentraciones demográficas e industriales y el rápido aumento del número de vehículos automotores.

II.III. Contaminación ambiental en la Ciudad de México.

La Ciudad de México es una de las más grandes y contaminadas del mundo, esta situación se debe a distintos factores entre los que destacan, que la ciudad se encuentra en una cuenca hidrológica casi cerrada a 2, 240 m. sobre el nivel del mar, ocupando casi 5000 km², la cual esta rodeada por grandes

cadena montañosa que dificultan la circulación del viento, e impiden el desalojo de los contaminantes generados, ambas situaciones favorecen las inversiones térmicas. Otro factor se debe a la altura de la ciudad, la concentración de oxígeno es 23% menor que la existente al nivel del mar. Esto promueve que los procesos de combustión interna de los motores sean menos eficientes y más contaminantes (Leal *et al* 1997). Por otro lado la zona metropolitana cuenta con una población estimada de 20 millones de habitantes (aproximadamente el 25% de la población total del país) (Vega *et al* 2002; Molina y Molina, 2004), un acelerado incremento poblacional, (de 2.9 millones en 1950 a 18.2 millones en el año 2000) un área aproximada de 1300 km² (Vega *et al* 2002), con aproximadamente 2.7 millones de vehículos y cerca de 35, 000 industrias, la cual presenta altos índices de contaminación (Riveros *et al* 1997)

Esto se debe en gran parte al desarrollo industrial y a la generación de infraestructura en los últimos años que han generado la concentración de actividades industriales, comerciales y financieras en un área que apenas representa el 0.37% del territorio nacional. La industria y el transporte representan un gasto de energía muy importante y son dos de las principales fuentes de contaminación. (www.fimevic.df.gob.mx/problemas/problemasdemov.htm,2002).

El sector transporte aporta casi el 70 % de las emisiones por lo que es una de las principales causas de contaminación atmosférica (PNUMA, 2002) De esta manera, la suma de todos estos factores resulta en una situación ambiental crítica.

En la Ciudad de México y el área metropolitana se monitorean continuamente las cantidades de dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno, monóxido de carbono, hidrocarburos y ozono. Adicionalmente, las partículas suspendidas totales, solo son monitoreadas semanalmente (Semarnat, 2002).

II.IV. Partículas suspendidas.

Las partículas suspendidas son un contaminante constituido por material líquido y sólido de muy diversa composición y tamaño, que se encuentra en el aire. Estas forman una mezcla de muchas clases de contaminantes, producto de una gran cantidad de procesos naturales y antropogénicos. (<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/460/particulas.html>).

El origen de las partículas suspendidas incluye procesos de combustión en vehículos, principalmente aquellos que usan diesel, industrias de fundición, pinturas, cerámica y plantas productoras de energía. La erosión, las tolvaneras y los incendios forestales constituyen también una fuente natural de partículas en el aire (Mújica y Figueroa. 1996).

Por su origen, las partículas pueden definirse como primarias y secundarias. Las primarias son aquellas producidas directamente por alguna fuente contaminante. Y las secundarias son aquellas formadas en la atmósfera, como resultado de la transformación y/o mezcla de gases y/o partículas primarias.

Una clasificación para las partículas suspendidas se basa en su tamaño, que se mide en términos de su diámetro aerodinámico (Englert 2004):

- Partículas gruesas: poseen un diámetro aerodinámico menor a $10\mu\text{m}$ (PM₁₀) y mayores a $2.5\mu\text{m}$ (PM_{2.5}) (Vallejo *et al* 2003, Englert 2004). Están compuestas principalmente por sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro, cloruros (Vallejo *et al* 2003, Molina y Molina 2004).
- Partículas finas: con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5\mu\text{m}$ (PM_{2.5}) (Vallejo *et al*. 2003, Englert 2004). Están compuestas por productos derivados de la combustión (Fernández *et al* 2003) e incluyen carbono, plomo, vanadio, dióxido de azufre y nitrógeno (Vallejo *et al*. 2003)
- Partículas ultrafinas: con un diámetro aerodinámico menor a $0.1\mu\text{m}$ (PM_{0.1}) (Vallejo *et al* 2003, Englert 2004). Están compuestas por

productos de las quemas agrícolas y forestales, y por la combustión de gasolina y diesel. Estas por lo regular tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo *et al* 2003).

Estudios sobre PST realizados en la Ciudad de México, reportaron que los niveles de vanadio más elevados se presentaron en la época de frío seco, especialmente en la región suroeste de la ciudad. En la época de frío, la concentración de vanadio, asociado a partículas menores a 2.5 μm , fue de 15 a 93 ng/m^3 ; mientras que en partículas menores a 10 μm fue de 22 a 114 ng/m^3 . En la época de mayor temperatura los niveles disminuyeron a valores menor a 10 ng/m^3 en ambos tipos de partículas (Gutierrez-Castillo *et al* 2006).

Los principales componentes de las partículas son los metales (plomo, hierro, vanadio, níquel, cobre, platino) asociados a un núcleo de carbono elemental puro, compuestos orgánicos, material de origen biológico (virus, bacterias, restos de animales y plantas, tales como fragmentos de polen), iones (sulfatos, nitrato y acidez) y gases reactivos como el ozono, peróxidos y aldehídos (EPA 1999). También se han atribuido efectos en la salud a las partículas secundarias, compuestas por sulfatos de amonio, nitratos de amonio y compuestos orgánicos secundarios, y producidas en la atmósfera por reacción de los gases y las partículas primarias con compuestos orgánicos reactivos (HEI 2002).

II.V. Vanadio

El vanadio (V) y sus compuestos han despertado interés debido a que en los últimos años han incrementado gradualmente su concentración tanto en el ambiente como en los organismos, lo cual aumenta su elevado potencial toxicológico (Altamirano, 1993)

El V fue descubierto por el minerólogo del Río en 1813, el cual lo llamo “pancronium” porque ocurren varios cambios de color durante la transición de

varios estados oxidativos. Mas adelante, Nils Sefstrom lo nombro vanadio, en honor a la diosa Vanadis. (Morinville *et al* 1998)

II.V.I. Características generales

Por sus características químicas, se identifica por ser el primer elemento del quinto grupo de la tabla periódica de los elementos, ocupando el lugar 23. Siendo un metal de transición, con un número atómico de 23 y masa molecular de 50.9415 g/mol. Su posición esta cerca de los elementos esenciales. En su estado puro es un metal dúctil de color plateado brillante o ligeramente blanco y de textura suave. Posee una densidad de 6.11g/cm³ a 18.7^a, su punto de ebullición se da entre los 1880 y los 1900°C, es soluble en agua. En la naturaleza no es común el V elemental ya que es altamente reactivo y tiende a combinarse con el oxígeno, el carbono y el nitrógeno (Barceloux, 1999).

Su química es compleja debido a que presenta diferentes estados de oxidación que van desde el -1 al +5, pero se encuentra con mayor frecuencia en +3, +4 y +5. El estado de oxidación más estable es la forma cuadrivalente o vanadil. La forma en la cual se encuentre el metal depende del pH, en soluciones ácidas debajo de 3.5 de pH existe el vanadil, mientras en soluciones básicas se encuentra formas tales como el ortovanadato; pero el V se comporta de forma pentavalente si se encuentra en soluciones neutras. Este último es el compuesto más tóxico, ya que puede entrar con facilidad a la célula donde es reducido a vanadil. (Barceloux, 1999, Fortoul *et al* 2002; Ivancsits, 2002)

El pentóxido de vanadio (V₂O₅), es el compuesto más comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de 1750°C y punto de ebullición de 690°C, es un agente químico peligroso, su limite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m³ (Barceloux, 1999)

II.V.II. Fuentes de emisión y usos

En cuanto a su abundancia, el V es un elemento ampliamente distribuido en el planeta; representa de 100 a 200 partículas por millón (ppm) de la corteza terrestre siendo el vigésimo segundo elemento mas abundante de esta. (Leonard y Geber, 1994. Mukherjee *et al* 2004), mientras que en la corteza oceánica ocupa el trigésimo cuarto lugar en abundancia, teniendo 2 ppm.

A nivel mundial, se calcula que cerca de 280 toneladas de vanadio son emitidas al ambiente cada año; 70 de estas son originadas por fuentes naturales y el resto por fuentes antropogénicas. Los niveles de vanadio más altos se reportan en zonas urbanas (Leonard y Geber, 1994). Las concentraciones de este van a depender de las condiciones geográficas y estacionales (Barceloux, 1999).

Un tercio del V atmosférico proviene de polvos continentales, aerosoles marinos y emisiones volcánicas que aportan bajas concentraciones de este metal desde 0.001 a 0.002 ng/m³ en el polo norte (Altamirano, 1993) El resto es generado por fuentes antropogénicas pues se trata de un metal frecuentemente utilizado en la industria moderna para la producción de aleaciones de acero y no ferrosas, catálisis para la producción de ácido sulfúrico, manufactura de semiconductores, colorantes (e.g. pigmentos amarillos) y cerámica (Barceloux, 1999). Los principales países productores de vanadio son Sudáfrica, Rusia, Estados Unidos, Finlandia y China (Leonard y Geber, 1994).

Aunque el V es un metal ampliamente distribuido en la naturaleza, raramente se encuentra en su estado nativo, generalmente se extrae de minerales como la vanadinita, la patronita y la carnosita (Leonard y Geber, 1994). Se estima que hay una correlación entre el contenido de los elementos metálicos en la corteza terrestre y su contenido en el petróleo; el V es muy abundante en este, especialmente en el que proviene de regiones como Kuwait, Irán, Irak, Venezuela y el golfo de México, así como en los productos de su refinación (Vouk y Piver, 1983 Fortoul *et al* 2002).

El V, junto con el níquel y el zinc, se encuentran en muy altas concentraciones en la fracción residual más pesada del petróleo, la cual se utiliza en plantas generadoras de energía y calentadores comerciales. El V es emitido a la atmósfera en las formas químicas de Pentóxido de vanadio (V_2O_5), Metavanadato de amonio (NH_4VO_3), Metavanadato de sodio ($NaVO_3$), Tetróxido de vanadio (V_2O_4), Ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), Oxitricloruro de vanadio ($VOCl_3$), Sulfato de Vanadilo ($VOSO_4$), Tetracloruro de Vanadio (VCl_4), Oxidicloruro de vanadio ($VOCl_2$), y Trióxido de vanadio (V_2O_3) (Vouk y Piver, 1983).

Además de las fuentes inorgánicas de V, de manera habitual lo podemos encontrar en algunos alimentos tales como cereales, pescado, fruta seca, y vegetales (Mukherjee *et al* 2004). Se calcula que la ingesta diaria de V es aproximadamente de 10 a 60 g/día (Altamirano, 1993). Se estima que los productos marinos, tales como los mariscos, presentan mayor contenido de dicho metal que los de animales terrestres (Barceloux, 1999). En algunos estudios se examinó la cantidad de V en los alimentos que se ingieren en la dieta cotidiana y el riesgo toxicológico que representa (EFSA, 2004). En los alimentos que se encuentran en un estado de oxidación III y IV, las concentraciones de peso fresco de grasas, aceites, frutas y vegetales van de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en granos, alimentos de mar y carnes de 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en eneldo o pimienta negra las cantidades detectadas se encuentran en 431 y 987 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente y en tabaco para fumar de 1 a 8 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se ha estimado que la ingesta de V en la dieta en promedio es de 13 a 1510 $\mu\text{g}/\text{día}$ (French y Jones 1993).

Debido a la dureza y a su capacidad para formar aleaciones, el V es frecuentemente utilizado como constituyente del acero que se emplea para fabricar herramientas, implantes ortopédicos (Ivancsits *et al* 2002) y maquinaria (Barceloux 1999). También su uso común en la manufactura de semiconductores, reveladores fotográficos y agentes colorantes; para la producción de pigmentos amarillos y cerámicas.

El vanadato, las sales y los óxidos de V se emplean como catalizadores para la producción de ácido sulfúrico, en la purificación de gases y en la oxidación de etanol (Barceloux 1999)

El V_2O_5 es el compuesto mas empleado (Ivancsits *et al* 2002) y comercial, es también el material principal para la producción de otros compuestos de vanadio (Dill *et al* 2004). Por otro lado, es la forma mas común en situaciones de exposición industrial (Dill *et al* 2004). Es usado como un catalizador para una variedad de gases en la fase de oxidación, particularmente en la conversión de dióxido de sulfuro a trióxido de sulfuro durante la manufactura de ácido sulfúrico. También es usado en algunos pigmentos en la industria cerámica impartiendo un color de café a verde (Fortoul *et al* 2007)

II.V.III. Niveles de vanadio en el ambiente

Para el personal ocupacionalmente expuesto, el limite de exposición permisible determinado por la Administración para la Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) es 0.5mg/m³ en el aire (Dill *et al* 2004). En el caso de las áreas urbanas, el nivel medio de vanadio es las ciudades con un alto consumo de combustibles fósiles es 0.62 µg/m³ comparado con 0.011 µg/m³ en las zonas rurales (Fortoul *et al* 2002).

II.V.IV. Vías de Exposición

Nos encontramos expuestos a este metal de diversas formas (Figura 1), una de las principales vías de exposición a vanadio es la inhalada, la cual es muy importante dado que el vanadio se ha convertido en uno de los principales contaminantes del aire en las grandes ciudades, emitiéndose en grandes cantidades anualmente en la atmósfera (Barceloux, 1999) La exposición por inhalación al metal es muy importante ya que es la ruta por la cual produce mas efectos tóxicos. Se considera que por medio de esta vía se absorbe hasta el 90% (Leonard y Geber, 1994) Las concentraciones en el ambiente varían dependiendo de la cercanía con las fuentes emisoras (Ding *et al.* 1999).

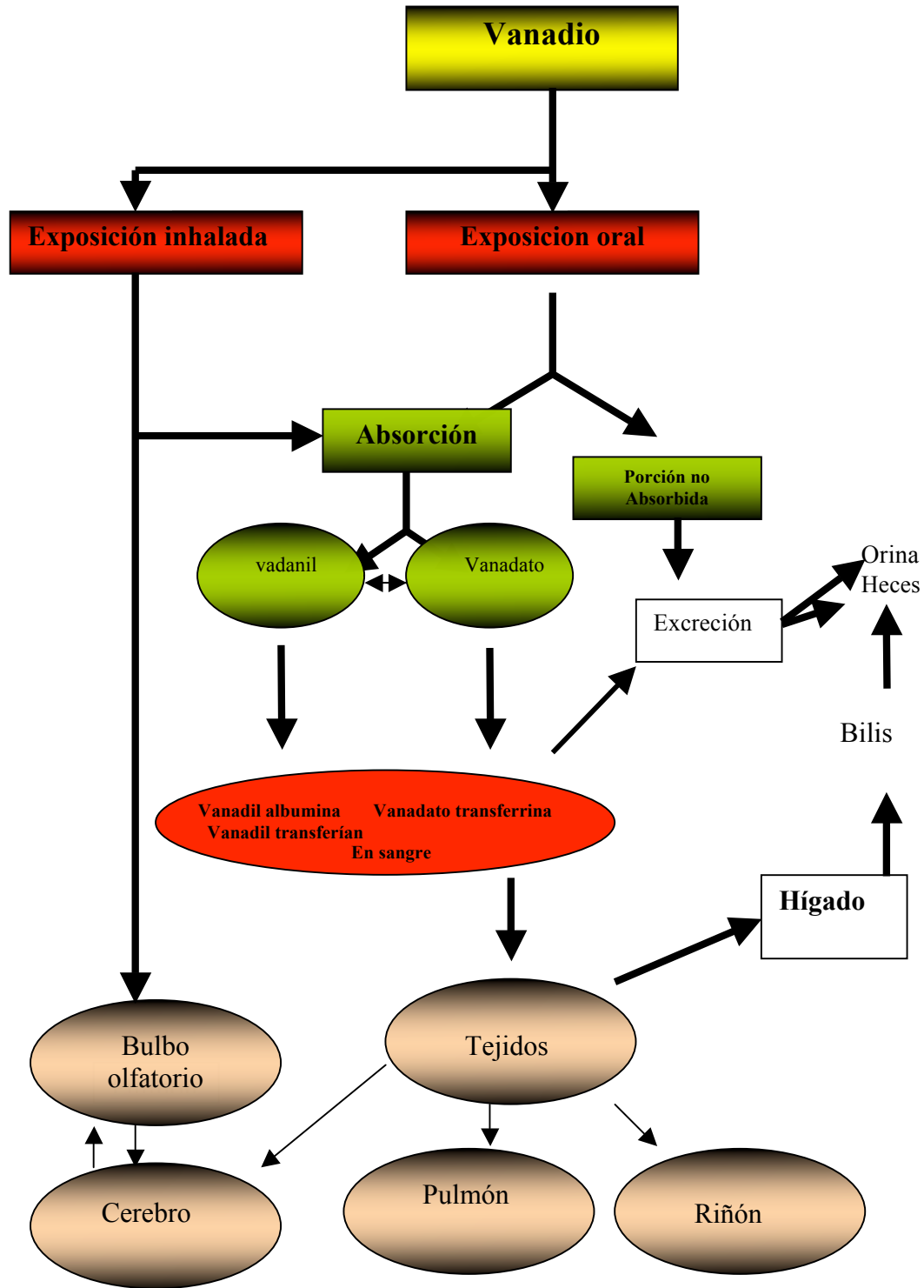


Figura 1. Vías de absorción, distribución y excreción del Vanadio

La exposición crónica a este contaminante se refleja en la acumulación de V en la población y en los niveles en los distintos órganos. Se observó incremento significativo en la concentración de V, 0.3 µg/g de tejido seco en tejido pulmonar de autopsias de habitantes de la Ciudad de México durante los años noventa respecto a los de los años 60s. Esto puede ser consecuencia del incremento en el consumo de derivados del petróleo como la gasolina (Fortoul *et al.* 2002)

Otra vía de exposición a V es la enteral, debido a que éste se encuentra en el agua y en algunos alimentos. La absorción de este va a depender de la dieta, puesto que algunos de los alimentos son ricos en vanadio; sin embargo, la absorción de vanadio por vía gastrointestinal es considerablemente baja (Murherjee *et al.* 2004), siendo entre el 1- 2% del metal que es ingerido (Barceloux, 1999)

Por otro lado también esta la absorción dérmica de vanadio, en la cual algunos estudios han demostrado que el vanadio no penetra la piel humana, esto es debido a que es un compuesto metálico poco hidrosoluble, por lo que es la ruta de exposición con menos absorción(Barceloux, 1999)

Se tienen reportes que algunos de los tejidos donde mayormente se concentra este elemento son el tejido hematopoyético, adiposo, óseo, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, los pulmones (WHO, 2001; Rodríguez y Altamirano, 2006) y el cerebro (Avila-Costa *et al.* 2005).

II.V.V. Toxicocinética

La toxicidad del V depende de una variedad de factores que incluyen: la vía de exposición, la dosis, la sensibilidad del órgano. Además de que la toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta dependiendo de la valencia, siendo la forma pentavalente la mas tóxica (Barceloux, 1999).

El V puede ser altamente tóxico para los humanos y algunos animales debido a que puede afectar importantes funciones celulares (Altamirano-Lozano *et al.* 2002) como ciclo celular, vías de señalización y supervivencia celular tanto *in vitro* como *in vivo* (SCF 2004). Este puede interferir con sistemas enzimáticos que contienen fosfatos como: ATPasas, fosfatasa, cinasas (Zhong *et al.* 1994, Murherjee *et al.* 2004), ribonucleasas (Murkherjee *et al.* 2004), ADN-polimerasas, peroxidasas (Zhong *et al.* 1994) y proteínas propias de la síntesis de ADN (Altamirano-Lozano *et al.* 2002)

La exposición a V por vía inhalada se absorbe con más facilidad en los pulmones (Choi *et al.* 2004) y es capaz de acumularse en las fosas nasales, laringe, traquea, bronquios, bronquiolos y sacos alveolares y de ahí rápidamente entra en la circulación sanguínea.

En el torrente sanguíneo el vanadio se auto-oxida en presencia de oxígeno a vanadato con ello aumentan los niveles de esta molécula en el plasma: posteriormente el vanadato se puede convertir en vanadil. Estos compuestos se transportan por medio de proteínas séricas acarreadoras como la albúmina y glicoproteínas transportadoras de metales como la transferrina, la cual tiene alta afinidad por el Fe⁺, pero puede transportar otros metales (Rodríguez y Altamirano, 2006). Esta proteína puede transportar vanadato y gracias a ello llegar a todos los órganos y tejidos del cuerpo. El estado de oxidación del vanadio en la sangre oscila entre +4 y +5 (Opresko, 1991). Es la forma pentavalente la que predomina en los fluidos extracelulares y tetravalente dentro de las células (Barceloux, 1999).

Por otro lado, el vanadio que no es absorbido por el organismo se excreta por medio de la orina y las heces fecales. La dinámica de eliminación del vanadio en los riñones es bifásica: presenta una fase de eliminación rápida que comprende un tiempo de 15 a 40 horas y una fase lenta de aproximadamente 40- 50 días (Mukherjee *et al.* 2004)

La entrada de V a las células está mediada por el sistema de transporte de fosfatos (Baran, 2003), por transportadores de cationes divalentes (Rodríguez y

Altamirano, 2006) o por medio de canales iónicos inespecíficos (Ster *et al.* 1993) Una vez en el interior de la célula, el vanadio es reducido por los sistemas antioxidantes como el glutatión, NADPH, NADH, así como por ascorbato en presencia de oxígeno (Rodríguez- Mercado *et al.* 2003; García-Guevara, 1996). Y este puede inhibir la cadena respiratoria y generar especies reactivas de oxígeno en el interior celular.

Se ha demostrado que el V promueve la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en sistemas biológicos, principalmente por medio de tres mecanismos (Gandara *et al.* 2005)

- 1) Reacción tipo Fenton o ciclo de Haber-Wiss.
- 2) Bio-reducción del vanadato, mediado por enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa o flaveoenzimas como NADPH oxidasa, procesos por los cuales se generan ROS como subproductos.
- 3) Interacción con la mitocondria (cadena respiratoria)

Uno de los principales procesos sugeridos como mecanismo inductor de toxicidad por vanadio y metales (M) de transición en general, es la generación de radicales libres (RL).

II.VI. Radicales libres

Un radical libre (RL), representa cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos. Esta configuración, electroquímica es muy inestable, le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida (Chihuilaf *et al.* 2002, Valko *et al.* 2006) La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, tienen un periodo de vida muy corto (fracciones de microsegundo). Cuando un radical reacciona con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, generándose así reacciones en cadena que dan lugar a

efectos biológicos alejados del sistema que origino el primer radical (Martínez-Cayuela, 1998)

Existen dos mecanismos de producción de ROS y radicales libres: 1) los generados como subproducto de algunos procesos celulares fisiológicos entre los que podemos citar al transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial, el transporte de electrones en el retículo endoplásmico, actividad de xantinas, hipoxantinas, ciclogenasas, lipooxigenasas, detoxificación celular por citocromo, β -oxidación en los peroxisomas y complejos NADPH-oxidasa (Fariss *et al.* 2005) y 2) los generados a partir de fuentes exógenas a la célula como la radiación ultravioleta, radiación ionizante, exposición a metales, humo de tabaco, sales de hierro, etc. (Kamata y Hitara, 1999)

En condiciones normales, existe un balance entre la generación de ROS y los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos; este equilibrio se denomina estado redox intracelular y se ha propuesto que participa en la regulación de la transducción de señales y la supervivencia celular en conjunto con los estímulos extracelulares (Kamata y Hirata, 1999); cuando las ROS se producen en exceso provocan un estado de estrés oxidante, es decir, un desequilibrio en el estado redox de las células, que induce diversos efectos tóxicos como oxidación y fragmentación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana, daño mitocondrial y disrupción de la homeostasis iónica en la estructura del citoesqueleto (Boonstra y Post, 2004) modificaciones al ADN (Valko *et al.* 2005) activación de las metaloproteinasas (Haorah *et al.* 2007) e inducción de muerte celular (Cai y Jones, 1999).

II.VII. Metaloproteinasas

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas (Zn-dependientes) que se encargan del remodelado de la matriz extracelular (MEC) y que en conjunto pueden degradar todos los constituyentes de la misma. Son importantes en la mayoría de los procesos fisiológicos que

requieren el recambio de la MEC y tienen un papel bien definido en diversos procesos celulares como la proliferación, la apoptosis, la morfogénesis tisular. Además de estar implicadas en procesos reparadores y remodeladores, también están implicadas en una gran variedad de procesos patológicos, tales como la inflamación, el crecimiento tumoral (Zhao *et al.* 2006; Saenz, 2007) la invasión de los tejidos, degradación de la MEC por las MMP, alteración de las uniones célula-MEC y célula-célula, mediar la liberación, activación o desactivación de moléculas señalizadoras autocrinas o paracrinas (activadores de angiogénesis, por ejemplo) y activar o inactivar los receptores de la superficie celular (Sternlicht y Werb 2001).

II.VII.I. Estructura de las MMPs.

Todas las MMPs contienen tres dominios diferentes (Figura 2, 2b): el propéptido, el dominio catalítico y el extremo C-terminal, cada uno de los cuales desarrolla una función específica. La estructura en dominios de la MMP-9 o gelatinasa B, también conocida como colagenasa tipo IV de 94 kDa, es el prototipo de la familia de MMPs. Su propéptido, de aproximadamente 100 residuos, contiene un segmento de 8 aminoácidos estables, PRCGVDPV, la escisión de los cuales activará las MMPs latentes. El dominio catalítico, formado por 162 a 173 residuos, contiene el lugar activo que se unirá a Zn^{2+} y Ca^{2+} para llevar a término su acción. El resto de dominios tienen secuencias similares a la de otras proteínas estructurales de la MEC (Murphy *et al.* 1992).

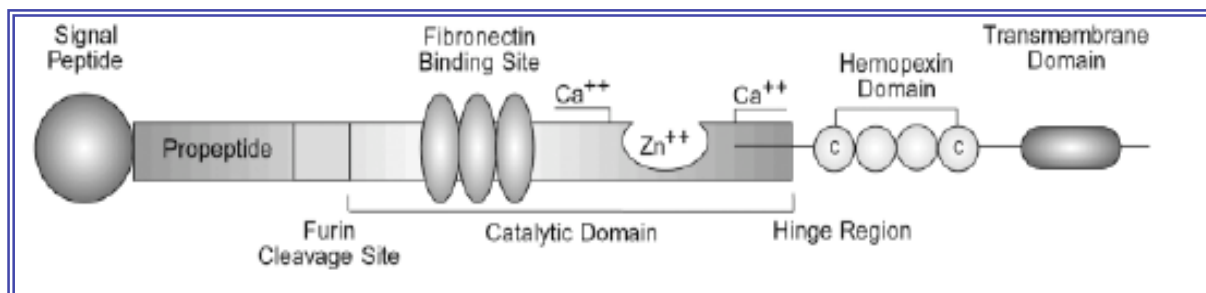


Figura 2. Estructuras de las metaloproteinas. Cys. Cisterna; Zn²⁺; ion zinc (Rosenberg 2002)

MMP	DOMAIN STRUCTURE	MAJOR SUBSTRATES
Matrilysin (MMP-7, pump-1) (EC 3.4.24.23)	PRE PRO CAT	Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins, elastin
Interstitial Collagenase (MMP-1, EC 3.4.24.7)	PRE PRO CAT H HEM	Fibrillar Collagens
Neutrophil Collagenase (MMP-8, EC 3.4.24.14)	PRE PRO CAT H HEM	Fibrillar Collagens
Collagenase-3 (MMP-13)	PRE PRO CAT H HEM	Fibrillar Collagen
Stromelysin-1 (MMP-3, transin, EC 3.4.24.17)	PRE PRO H CAT H HEM	Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins
Stromelysin-2 (MMP-10, transin 2, EC 3.4.24.22)	PRE PRO H CAT H HEM	Proteoglycans, ECM glycoproteins, IV collagen, gelatins
Metalloelastase (MMP-12, EC 3.1.24.65)	PRE PRO H CAT H HEM	Elastin
MMP-18		N.D.
MMP-19		N.D.
Stromelysin 3 (MMP-11)	PRE PRO H CAT H HEM	Laminin and fibronectin (weakly)
MT1 MMP (MMP-14)	PRE PRO H CAT H HEM	Gelatinase A, fibrillar collagens, proteoglycans, ECM glycoproteins
M12-MMP (MMP-15)	PRE PRO H CAT H HEM TM	N.D.
MT3 MMP (MMP-16)	PRE PRO H CAT H HEM	Gelatinase A
MT4-MMP (MMP-17)	PRE PRO H CAT H HEM	N.D.
Gelatinase A (MMP-2, 72kD gelatinase, IV collagenase, EC 3.4.24.34)	PRE PRO CAT FN CAT H HEM	Gelatins, collagen IV, collagen I
Gelatinase B (MMP-9, 92kD gelatinase, IV collagenase, EC 3.4.24.35)	PRE PRO CAT FN CAT C H HEM	Gelatins, collagen IV, collagen V

Figura. 2b Estructuras de las distintas familias de metaloproteinasas.

(Bohórquez-Sierra 2006)

Respecto al mecanismo de acción, se sabe que las MMPs son secretadas como proenzimas que requieren ser activadas. Además, en los tejidos existen inhibidores de la acción de estas, son los inhibidores titulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Existen dos inhibidores fisiológicos de las MMPs: la

α 2-macroglobulina, con una actividad restringida dado su gran volumen (780 kDa), y una familia de inhibidores específicos de las MMPs: los TIMPs. Hay dos hechos característicos de la interacción entre TIMPs y MMPs: 1) una afinidad muy elevada y 2) diferencias entre su especificidad de los diversos TIMPs, a pesar del alto grado de semejanza entre sus secuencias (Nagase y Woessner 1999)

Las MMPs pueden ser activadas por proteínas o in-vitro por agentes químicos, como agentes tales como: tiol (4-aminofenilmercurioacetato, HgCL₂ y N-etilmaleimida); glutatión oxidado, agentes caotrópicos, especies reactivas de oxígeno, pH alcalino y el aumento de temperatura; estos agentes trabajan principalmente alrededor de la interacción del switch de cisterna interrumpiéndolo, es decir, interrumpen la interacción entre un residuo de Cys y un átomo de Zn.

La activación de MMPs es escalonada en la mayoría de los casos. El ataque proteolítico inicial ocurre en la región que contiene los lazos de unión entre la primera y la segunda hélice del propéptido. La especificidad en la región anzuelo es dictaminada por la secuencia de cada MMP. Por otra parte, el propéptido es removido y esto probablemente desestabiliza al resto de la proteína, incluyendo la interacción del “switch de cisterna”, lo que permite un proceso intermolecular que activa parcialmente los intermediarios de MMP u otras MMPs. Así, el paso final de la activación esta conducido por una MMP. La activación más importante de proMMP-2 ocurre en la superficie celular y es mediada por MT_MMP's (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP y MT6-MMP)

II.VII. II. Clasificación

La clasificación de esta familia de enzimas se ha modificando y aunque se tiende a agruparlas según la estructura en dominios de la proteína, el criterio empleado todavía es el que tiene en cuenta el sustrato sobre el que las MMPs actúan específicamente (Tabla 1). Actualmente se conocen seis subfamilias de MMPs: 1) las colagenasas, que degradan el colágeno tipo I, II, III, VII, VIII, VIII

y X 2) las gelatinasas, que actúan sobre los colágenos tipo IV, V, VII y X, la elastina y los colágenos desnaturalizados; 3) las estromelinas degradan el colágeno tipo III, IV, IX y X además de la gelatina, la caseínas y algunas mmps; 4) las matrilisina, que degradan el núcleo proteoglicanos de las proteínas, la laminina, la fibronectina, la elastina y la gelatina; 5) las MMPs de membrana, que degradan la fibronectina, la laminina y otras MMPs y, finalmente 6) las metaloelastasas, que actúa sobre la elastina insoluble, el colágeno IV, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Hasta ahora se han identificado 20 miembros de la familia de las MMPs (Montaner 2001).

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las metaloproteinasas expresadas en tejidos vasculares.

Subtipo de MMP	Nombre	Sustratos principales
Colagenasas		
MMP-1	Colagenasa intersticial	Colágenos I, II, III, VII, VIII y X, proteoglicanos, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Colagenasa de neutrófilos	Colágenos I, II, III, V, VII, VIII y X, gelatina, proteoglicanos
MMP-13	Colagenasa-3	Colágenos I, II, III, y IV, gelatina, proteoglicanos, PAI-2 (inhibidor del activador del plasminógeno)
Gelatinasas		
MMP-2	Gelatinasa-A	Gelatina, colágenos I, IV, V, VII, X, XI y XIV, elastina
MMP-9	Gelatinasa-B	Gelatina, colágenos IV, V, VII y X, elastina
Estromelinas		
MMP-3	Estromelina-1	Colágenos III, IV, IX y X, gelatina, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9
MMP-10	Estromelina-2	Colágenos III, IV y V, gelatina, caseína, MMP-1 y MMP-8
MMP-11	Estromelina-3	Desconocido
MMP de membrana		
MMP-14	MT-MMP-1	Colágenos I, II y III, gelatina, MMP-2 y MMP-13
MMP-15	MT-MMP-2	MMP-2, gelatina
MMP-16	MT-MMP-3	MMP-2
MMP-17	MT-MMP-4	Desconocido
Matrilisinas		
MMP-7	Matrilisina-1	Colágenos IV y X, gelatina, fibronectina, laminina
MMP-26	Matrilisina-2	Colágeno IV, fibronectina, fibrinógeno, gelatina
Metaloelastasas		
MMP-12	Metaloelastasa de los macrófagos	Elastina, colágeno IV, gelatina, fibronectina

II.VIII. Gelatinasas

Son una de las familias de las MMPs, la cual esta integrada por dos miembros que son: gelatinasa A (metaloproteinasa 2) y gelatinasa B (metaloproteinsas 9).

La actividad proteolítica de las gelatinasas A y B está dirigida contra el colágeno intersticial desnaturalizado o gelatina, colágeno tipo IV y V de la membrana basal (Turpeenniemi-Hujanen 2005; Mook *et al.* 2004; Bjorklund 2005 ; Sabeh *et al.* 2004).

Una característica estructural de las gelatinasas es la presencia en el seno de su dominio catalítico de tres secuencias peptídicas repetitivas análogos a los motivos de la fibronectina de tipo II (DeClerck YA 2000).

La gelatinasa-A es fisiológicamente expresada por las células de los fibroblastos del estroma de la mayoría de los tejidos, pero la expresión de la gelatinasa-B es débil o ausente en los tejidos normales, y se encuentra limitada a monocitos y macrófagos. Sin embargo, su expresión puede ser inducida en caso de remodelación tisular como el desarrollo embrionario, cicatrización o invasión tumoral (Patel *et al.* 2005; Pellikainen *et al.* 2004). La gelatinasa A degrada un extenso rango de sustratos de matriz y otro tipo de moléculas; es efectiva contra colágena tipo IV y otros componentes de la membrana basal, aunque también posee una débil habilidad de degradar colágenas fibrilares (Patterson *et al.* 2001). Se ha propuesto que la gelatinasa A posee principalmente funciones anti-inflamatorias y funciones homeostáticas, al inactivar quimiocinas inflamatorias y regular el recambio de tejido conectivo (McQuibban *et al.* 2000; Monaco *et al.* 2006). Así como la gelatinasa B se ha asociado con la destrucción de membranas basales (García-Alvarez *et al.* 2006; Pérez-Ramos *et al.* 1999)

Además del remodelado, recambio, numerosas evidencias indican que las gelatinasas participan en enfermedades humanas tales como: la fibrosis pulmonar, donde la gelatinasa A se ha encontrado fuertemente sobrerregulada en pulmones con fibrosis idiopática y la actividad de la enzima aparece generalmente incrementada en el lavado bronquioalveolar (Pardo, 2008); la gelatinasa B también se ha reportado elevada en fibrosis humana y experimental (Pardo 2008). También se han visto involucradas en patologías tales como en la invasión tumoral, la cual ha sido bien estudiada, habiéndose demostrado que las presentes a nivel del frente invasivo no son producidas por las células tumorales mismas, sino por las células estromales tales como fibroblastos, células endoteliales, macrófagos estimuladas por las células tumorales (Pellikainen *et al.* 2004; Lafleur *et al.* 2005).

También se ha reportado la participación que tienen las gelatinasas A y B después de la exposición a pentóxido de Vanadio en el sistema nervioso central (CNS) (Colín-Barenque *et al.* 2008) en estos experimentos se reportó que V_2O_5 incrementa la actividad de las gelatinasas en bulbo olfatorio, corteza prefrontal, estriado e hipocampo. Por otro lado el incremento de las gelatinasas también se han asociado a la pérdida de espinas dendríticas y muerte neuronal (Colin-Barenque *et al.* 2008). Además de que se ha reportado que la actividad de la gelatinasa B ha sido relacionada con la disrupción de la barrera hematoencefálica (Abilleira 2002)

Otras enfermedades en las cuales tienen una participación muy importante son las enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer (Kim *et al.* 2006) en la cual se reportó un incremento de la actividad y la distribución de las gelatinasas en la corteza cerebral (Baig s *et al.* 2008) y la enfermedad de Parkinson en la cual se muestra incremento de la actividad de las gelatinasas en las neuronas de la sustancia nigra (Lorenzl *et al.* 2002).

II.IX. Enfermedades Neurodegenerativas

Una enfermedad neurodegenerativa es una alteración en la estructura y función del SNC de inicio insidioso y curso lento y progresivo, estas son muy heterogéneas en cuanto a sus síntomas y hallazgos anatomopatológicos. Se desconocen las causas que provocan la pérdida de neuronas en las enfermedades neurodegenerativas. (Peinado M.A. *et al.* 2000)

II.IX.I. Enfermedad de Parkinson

Fue descubierta por el inglés James Parkinson en 1817. Es una afección cerebral degenerativa (Kim *et al.* 2006) que afecta del 1- 2% (aproximadamente 1.5 millones de personas) de la población en Estados Unidos. (Thomas B and Flint B.M 2007) La prevalencia de enfermedad de Parkinson (EP) aumenta con la edad, (Rajput *et al.* 1984; Morgante *et al.* 1991).

Esta enfermedad está caracterizada por progresiva y profunda pérdida de neuronas en la sustancia nigra pars compacta (Thomas B y Flint B.M 2007) y la consecuente pérdida de sus fibras proyectadas en el estriado (Kim, 2006) gliosis, y presencia de cuerpos de Lewy (Forno, 1990).

Los síntomas de la enfermedad de Parkinson pueden incluir:

- Temblor en las manos, los brazos, las piernas, la mandíbula y la cara
- Rigidez en los brazos, las piernas y el tronco
- Lentitud de los movimientos
- Problemas de equilibrio y coordinación

Además otro de los síntomas más prevalentes y tempranos en esta enfermedad es la hiposomía, lo cual se debe en parte a un cambio de dopamina en el bulbo olfatorio además de la reducción significativa del número de células positivas a tirosina hidroxilasa. (Huisman E. *et al.* 2008)

II.IX.II. Enfermedad de Alzheimer

Fue descubierta en 1906 por el neurólogo alemán Alois Alzheimer; está caracterizada por un trastorno cognitivo progresivo inicialmente leve, con problemas de la memoria y que conduce al deterioro global de la persona con gran incapacidad. Las alteraciones anatomopatológicas características de este proceso, consisten en ovillos fibrilares y placas seniles (Goedert *et al.*, 1991; Kim *et al.* 2006). Los ovillos neurofibrilares son agregación es de la proteína microtubular TAU, que se encuentra hiperfosforilada, que se dispersan por todo el cerebro, pero particularmente las que afectan bilateralmente a las neuronas del sistema colinérgico del cerebro anterior, a las del hipocampo y a las de la amígdala. Tal daño acumulado por años, va deteriorando la capacidad amnésica y ello determina los cuadros cognitivos iniciales y la demencia e incapacidad física final, que culmina en la muerte del individuo.. A medida que las lesiones progresan se pierden las neuronas piramidales en el hipocampo, el la corteza entorrinal y en las áreas asociadas de la neocorteza. (Segovia *et al.* 2002)

II.IX.III. Relación de enfermedad de Alzheimer y Parkinson con alteración en el olfato.

Es ahora bien establecido que pacientes con enfermedades de Alzheimer y Parkinson presentan disfunción olfatoria. Estas fuentes clínicas corresponde a los descubrimientos neuropatológicos de los cuerpos de Lewi en el interior del núcleo olfatorio, además en el sistema olfatorio se presenta un proceso neurodegenerativo (Katzensclager *et al.* 2004).

La disfunción olfatoria es un frecuente síntoma en la enfermedad de Parkinson y es considerado una manifestación temprana. (Westermann *et al.* 2007) ocurriendo del un 70-90% de todos los casos, se han observado alteraciones de discriminación e identificación de olores y de igual manera alteraciones como hiposomía (Qualiatio *et al.* 2007)

De igual manera en la enfermedad de Alzheimer es un síntoma temprano, lo cual ayuda a para detección temprana de la enfermedad que es muy importante para acceder a un tratamiento oportuno y mejorar así la calidad de vida en caso de ser confirmada la enfermedad. Y para esto se realiza una prueba de *screening* diagnóstico está basada en la identificación de los olores que se perciben (Foster *et al.* 2008)

II.X. Sistema Olfatorio

En el sistema olfatorio, los odorantes interaccionan con las neuronas sensoriales (NSO) que se encuentran en el epitelio olfatorio. Los axones de estas células proyectan directamente hacia neuronas del BO (Figura 3), las que a su vez, mandan sus proyecciones a la corteza prefrontal y a otras estructuras del cerebro anterior. Aunque la localización superficial del epitelio olfatorio en la cavidad nasal permite que las NSO interaccionen con mayor facilidad con los odorantes, dicha localización tiene como consecuencia que estas neuronas estén expuestas a contaminantes, alérgenos, microorganismos y otras sustancias (Purves *et al.*, 2001)

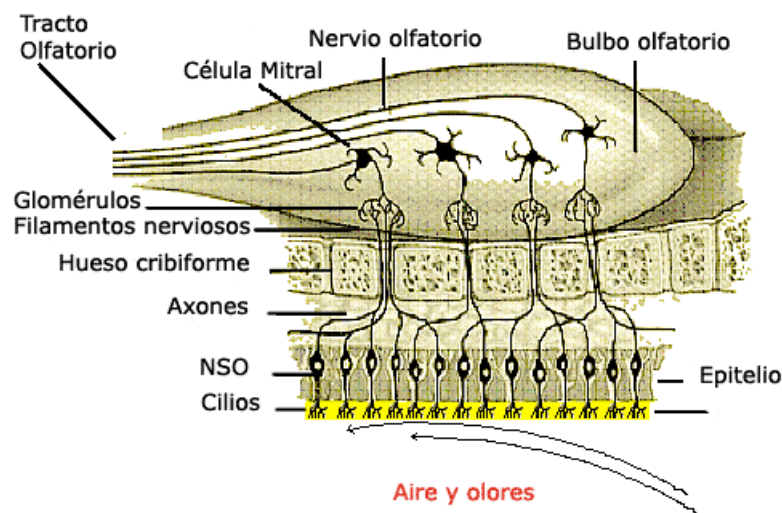


Figura 3. Ampliación de la región olfatoria mostrando las proyecciones axonales desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio principal.

Se han distinguido tres sistemas para el procesamiento de los olores: un sistema para percibir los reflejos olfativos básicos, también llamado área

olfativa medial que consiste en un grupo de núcleos situándose en las porciones mediobasales del cerebro delante del hipotálamo: los septales forman parte de una serie de núcleos de la línea media que terminan en el hipotálamo y en otras estructuras primitivas del sistema límbico, este último se ocupa del comportamiento reflejo. Le sigue un sistema antiguo, o área olfativa lateral, que está compuesto principalmente por la corteza piriforme junto con la porción cortical de los núcleos amigdalinos; una característica importante del área olfativa lateral es que muchas vías parten de esta se proyectan directamente en otra zona más antigua de la corteza cerebral en la porción antero medial del lóbulo temporal; finalmente un sistema más reciente para la percepción consciente de la olfacción comparable a la mayoría de los demás sistemas sensoriales y corticales que pasa por el tálamo, en concreto por los núcleos dorsomediales y después llega al cuadrante posterolateral de la corteza orbitofrontal (Guyton, 2001).

El sistema olfatorio de los mamíferos es quizás el detector químico más complejo que existe. Este es el discriminador entre una inmensa y diversa variedad de olores. Existen más de 10, 000 moléculas odorantes agrupadas en muchas clases y estructuras químicas, desde cadenas simples de moléculas orgánicas alifáticas hasta largas y complejas moléculas aromáticas con múltiples grupos funcionales. En muchos casos el cambio de un solo átomo de carbono hace la diferencia entre un olor y otro, en otros, las interacciones químicas producen percepciones olfativas similares entre moléculas muy diferentes (Purves, 2001).

Las neuronas receptoras olfatorias son las primeras células sensoriales que detectan y discriminan entre una diversa gama de ligandos químicos odorífero. Desde mediados de los años 80 mediante la aplicación de modernas técnicas en fisiología, imagenología, biología molecular y genética se ha llegado a un modelo de señalización olfativa relativamente fidedigno (Buck y Axel, 1991)

Y es que gracias a la función olfatoria podemos obtener información del ambiente, mediante el procesamiento de los olores, los cuales nos brindan

señales de peligro, placer, comida, la presencia de algo que evadir o buscar, así como el reconocimiento de una pareja sexual potencial, en cuyo caso los olores corporales volátiles contribuyen a su reconocimiento (Shipley, 2004).

II.XI. Nervio olfatorio.

El sistema olfatorio forma una interfase directa entre el sistema nervioso y el ambiente externo. Algunos xenobióticos pueden sobrepasar la circulación sistémica y tener acceso directo al cerebro o al fluido cerebroespinal seguido de la administración intranasal. (Purves, 2001). Tres vías principales pueden facilitar el movimiento de xenobióticos de la nariz al cerebro incluyendo: a) al nervio olfatorio, b) vía el epitelio olfatorio (independiente a los receptores de las neuronas olfatorias, resultando en un transporte al cerebro a través del espacio perineuronal alrededor del nervio olfatorio) y c) una vía sistémica, secundaria al movimiento del epitelio nasal a la sangre en el espacio submucosal (Mathison *et al.*, 1998)

Las funciones olfatorias se pueden situar básicamente en dos contextos distintos: el sociosexual y reproductivo por un lado, y el alimenticio, por el otro. En el primer caso, la percepción de los olores de conespecíficos les permite a los organismos determinar el sexo, la jerarquía social y el periodo reproductivo de una pareja potencial e incluso el estado de salud y consanguinidad de sus congéneres. El aprendizaje olfatorio es determinante para establecer vínculos de pareja (Brennan *et al.* 1995) y de tipo de madre cría (Kendrick *et al.* 1997) en diversas especies. Para la mayoría de los mamíferos los olores constituyen el principal estímulo sexual. En cuanto al contexto alimenticio, la detección de olores es fundamental para la formación de los hábitos de consumo; el olfato incluso más que el gusto, confiere a la comida cualidades afectivas de agrado o desagrado sobresalientes.

II.XII. Epitelio olfatorio.

El epitelio olfatorio incluye distintos tipos celulares. El más importante desde el punto funcional es la neurona receptora olfatoria (NRO), una neurona bipolar

que da origen en su superficie basal a un axón amielínico de pequeño diámetro que transmite la información olfatoria hasta el BO. En su superficie apical, la neurona receptora da origen a una prolongación única que se expande en una profusión similar a un botón desde la cual se extienden microvellosidades llamadas cilios olfatorios, en la capa gruesa de moco reviste la cavidad nasal y controla el medio iónico de los cilios olfatorios. El moco es producido por glándulas de Bowman que están distribuidas en todo el epitelio. Se presentan otras dos clases de células, las basales y las sustentaculares. Todo este aparato, constituido por la capa de moco y el epitelio con los receptores y de sostén, se denomina mucosa nasal olfatoria. (Purves *et al.*, 2001)

II.XIII. Bulbo Olfatorio.

El bulbo olfatorio es la estructura central del sistema olfatorio, cuya morfología y conexiones han sido objeto de numerosas investigaciones desde los tiempos de Cajal. (Valverde, 2003) El cual tiene una organización laminar la cual esta constituida por las siguientes capas: 1) nerviosa superficial, 2) glomerular, 3) plexiforme externa, 4) capa de células mitrales, 5) plexiforme interna y 6) granular (Colín, 2002).

Capa nerviosa superficial

Es la capa mas superficial del bulbo olfatorio contiene axones amielínicos extremadamente delgados (0.1-0.3 μm de diámetro) de las neuronas olfatorias primarias, que establecen sinapsis con las terminales en cepillo de las dendritas de las células mitrales que descienden verticalmente para formar los glomérulos olfatorios.

Capa Glomerular

Esta constituida por los glomérulos, estructuras generalmente ovoides de 80-160 μm de diámetro, la parte interna de los glomérulos esta compuesta de neuropilo formado por axones olfatorios, dendritas de las células mitrales y

neuritas de las neuronas yuxtglomerulares, rodeados por una delgada lamina glial. Las neuronas yuxtglomerulares se han clasificado en células periglomerulares, células en penacho y células de axón corto. (Colín 2002) En cada glomérulo convergen los axones de neuronas que reconocen una molécula volátil particular, es decir que expresan un receptor a odorantes específico. En los glomérulos se lleva a cabo el relevo de la información olfatoria, porque es ahí donde las terminales nerviosas de las NSO hacen contacto con las prolongaciones dendríticas de las neuronas de relevo de segundo orden. (Buck 2004)

Las células periglomerulares son pequeñas (5-8 μm) se localizan en la periferia de los glomérulos y proyectan sus dendritas espinosas y su axón hacia el interior de los glomérulos. Los somas de las células de axón miden 10-15 μm ; proyectan una dendrita apical que se ramifica a un glomérulo y dos o tres dendritas apicales se ramifican hacia varios glomérulos.

Los glomérulos del bulbo olfatorio representan entidades anatómicas y funcionales en donde las terminaciones de las células receptoras del epitelio olfatorio establecen interacciones sinápticas con las dendritas de células mitrales, en penacho y periglomerulares (Valverde, 2003).

Capa plexiforme externa

Esta capa presenta poca densidad celular y neuropilo denso, las neuronas principales son las de penacho externas, medias y profundas las cuales presentan incremento de tamaño a mayor profundidad, y presentan dos o tres dendritas apicales que proyectan a diferentes glomérulos.

Capa de células mitrales.

Por debajo de la capa plexiforme externa se encuentra la monocapa de células mitrales de 25- 35 μm de diámetro, son las principales neuronas eferentes del bulbo olfatorio, presentan una dendrita apical que proyecta a un glomérulo donde se ramifica y realiza contacto sináptico con los axones del

nervio olfatorio, las dendritas secundarias son paralelas a la superficie del bulbo olfatorio y realizan sinapsis dendrodendríticas con dendritas de las células granulares (Colín , 2002). Estas células se conectan con centros en la corteza cerebral donde se lleva a cabo propiamente el proceso de integración e interpretación de la información olfatoria. (Buck 2004)

Capa plexiforme Interna

Como la capa plexiforme externa se caracteriza por presentar poca densidad celular y gran cantidad de axones y dendritas. En estudios realizados con la técnica de Golgi indican que esta capa presenta axones de células mitrales, en penacho y dendritas granulares, algunos axones se originan en el núcleo de rafe y del locus coeruleus (Colín, 2002).

Capa de células granulosas

Esta es la capa mas profunda del bulbo olfatorio, las células granulares se encuentran en todo el bulbo olfatorio, pero adquieren una mayor densidad en la parte central, donde forman la capa granular. Estas son pequeñas (8-10 μm de diámetro) las cuales pueden formar agregados celulares acoplados por uniones estrechas. No tienen axón y sus dendritas poseen espinas que establecen sinapsis dendrodendríticas con las células mitrales. Las dendritas basales se ramifican en la capa granulosa y las dendritas apicales se ramifican y se proyectan a la capa plexiforme externa.

De tal manera que los tres elementos principales de la vía olfatoria son: la entrada de las fibras olfatorias, que hacen contacto con las dendritas de las células mitrales y en penacho del bulbo olfatorio, en formaciones especiales denominadas glomérulos olfatorios; los axones de las células mitrales y en penacho forman el tracto olfatorio lateral, que se extiende por la parte superficial del núcleo olfatorio lateral, que es la región más anterior de la corteza olfativa propiamente dicha y, por ultimo, los axones de células piramidales del núcleo olfatorio lateral que entran a formar parte de la comisura anterior.

III. Justificación

En los últimos años el índice de contaminación atmosférica se ha incrementando como consecuencia de las actividades antropogénicas. Dentro de los contaminantes emitidos al ambiente encontramos al pentóxido de Vanadio, al cual se le atribuye diversos efectos adversos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC).

Se ha reportado decremento en el número de espinas dendríticas y en el tamaño del soma, muerte por necrosis y apoptosis en las neuronas granulosas del bulbo olfatorio e incremento en la actividad de las gelatinasas.

Por otra parte el V_2O_5 genera ROS, las cuales se han asociado a enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, Parkinson, donde se presentan alteraciones olfatorias.

Por lo que el presente trabajo se analizará el efecto de vanadio sobre la función olfatoria y la distribución de las gelatinasas A y B en las zonas glomerular y granulosa del bulbo olfatorio.

IV. Hipótesis

Se ha reportado que el V_2O_5 provoca daño y muerte neuronal en el bulbo olfatorio, por lo que suponemos que la exposición a este puede afectar la función olfatoria con relación al tiempo de exposición.

Además de incrementar la presencia de las gelatinasas en las capas glomerular y granulosas del bulbo olfatorio. Con forme aumenta el tiempo de exposición por inhalación.

V. Objetivo General

- Analizar el efecto del pentóxido de vanadio inhalado sobre la función olfatoria y las gelatinasas en el bulbo olfatorio

VI. Objetivos particulares

- Evaluar la función olfatoria, por medio de una prueba de preferencia olfatoria, en los distintos tiempos de inhalación subaguda de pentóxido de vanadio.
- Cuantificar la presencia de las gelatinasas A y B en la zona glomerular y granulosa del bulbo olfatorio, por medio de la técnica de inmunohistoquímica, con relación al tiempo de inhalación.

VII. Materiales y métodos.

Animales

Se utilizaron 30 ratones machos de la cepa CD-1, con peso de 30-35 gramos. Estos fueron alimentados con rat chow y agua.

Exposición a Pentóxido de vanadio.

Se establecieron dos grupos (ver esquema 1), un grupo control (el cual fue expuesto a agua desionizada), y un grupo expuesto a pentóxido de vanadio 0.02 M. Las exposiciones se llevaron a cabo en una caja de acrílico conectada a un ultranebulizador, que emite vapor de agua o de solución de V_2O_5 0.02 M. con un flujo continuo de 10 L/minuto. Las exposiciones se realizaron en sesiones de una hora, dos veces por semana durante 4 semanas. En la caja de acrílico se alcanza una concentración de vanadio de 1436 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, dicha concentración puede presentarse en algunas condiciones laborales (Avila-Costa *et al.*, 2005, Leonard y Geber, 1994).

Prueba de preferencia olfatoria.

Se utilizaron 10 ratones macho de la cepa CD-1. Antes de la exposición a V_2O_5 a los animales se les realizó una prueba preferencia olfatoria innata (anexo 1) (Kobayakawa *et al.* 2007) Posteriormente los 10 ratones fueron expuestos a V_2O_5 0.02 M., por vía inhalada en una caja de acrílico 1 hora 2 veces por semana. Cada semana se evaluó la preferencia olfatoria (Obsérvese el Cronograma de actividades Figura 4)

Cronograma de actividades para la prueba de olfato					
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
Semana 0				Prueba control	
Semana 1	Primera exposición de los ratones a V_2O_5		Segunda exposición de los ratones a V_2O_5 . Se les dejaba a los ratones toda la noche sin agua ni alimento.	Prueba de olfato	
Semana 2	Tercera exposición de los ratones a V_2O_5		Cuarta exposición de los ratones a V_2O_5 . Se les dejaba a los ratones toda la noche sin agua ni alimento.	Prueba de olfato	
Semana 3	Quinta exposición de los ratones a V_2O_5		Sexta exposición de los ratones a V_2O_5 . Se les dejaba a los ratones toda la noche sin agua ni alimento	Prueba de olfato	
Semana 4	Séptima exposición de los ratones a V_2O_5		Octava exposición de los ratones a V_2O_5 . Se les dejaba a los ratones toda la noche sin agua ni alimento	Prueba de olfato	

Figura 4. Cronograma de actividades de la prueba de olfato y las inhalaciones de los ratones

Cada noche antes de aplicar la prueba olfatoria se dejó a los ratones sin alimento ni agua.

Al día siguiente los ratones se colocaron en las cajas, durante 15- 30 minutos para que se adaptaran. Una vez adaptados se comienza la prueba

(figura 5) usando tres odorantes: heptaldehído 0.1 M, ácido acético al 5% y etanol al 100%.

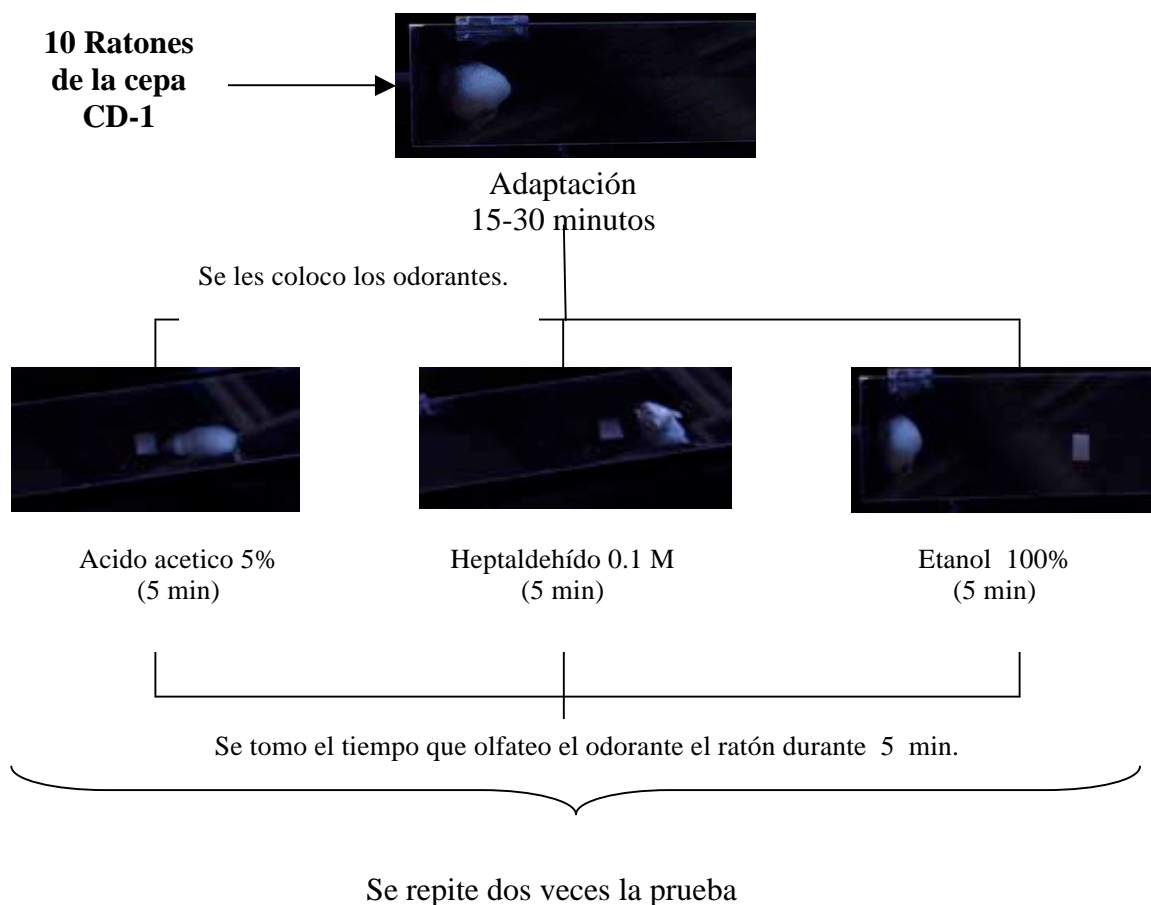


Figura 5. Representación de la prueba de preferencia olfatoria.

Sacrificio de los ratones.

Una vez realizada la prueba de olfato y la exposición a pentóxido de vanadio se fueron sacrificando 10 ratones después de la 2 semana, otros 10 después de la 3 semana y los últimos 10 después de la 4 semana de exposición.

Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (35mg/kg), posteriormente se procedió a realizar la perfusión vía intra-cardiaca (ver figura 6), donde se paso solución salina al 0.9% para drenar la sangre, después se

perfundio el paraformaldehído al 4% y se extrajo el cerebro y se mantuvo en el mismo fijador durante 2 hrs. Y se proceso con la técnica histológica ordinaria.

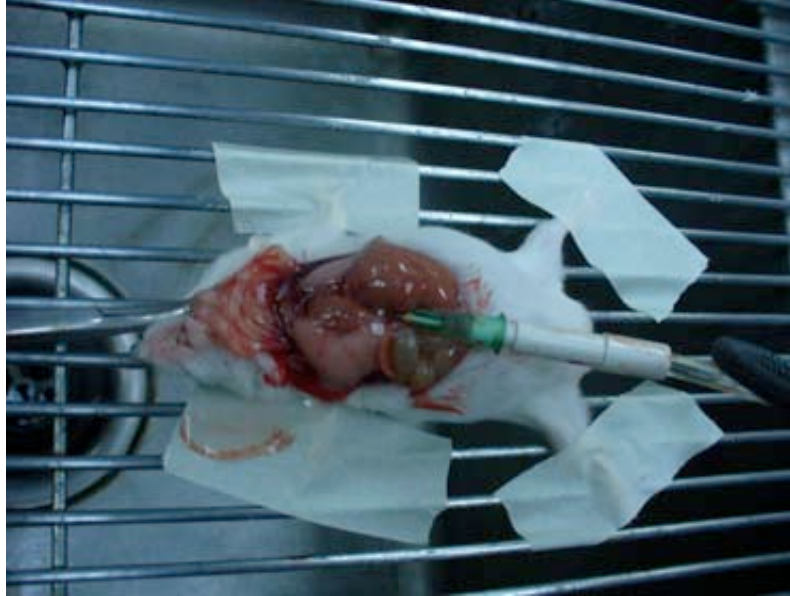


Figura 6. Fotografía que muestra a un ratón en el proceso de perfusión intracardiaca

Inmunohistoquímica.

Ver la metodología en el anexo 1

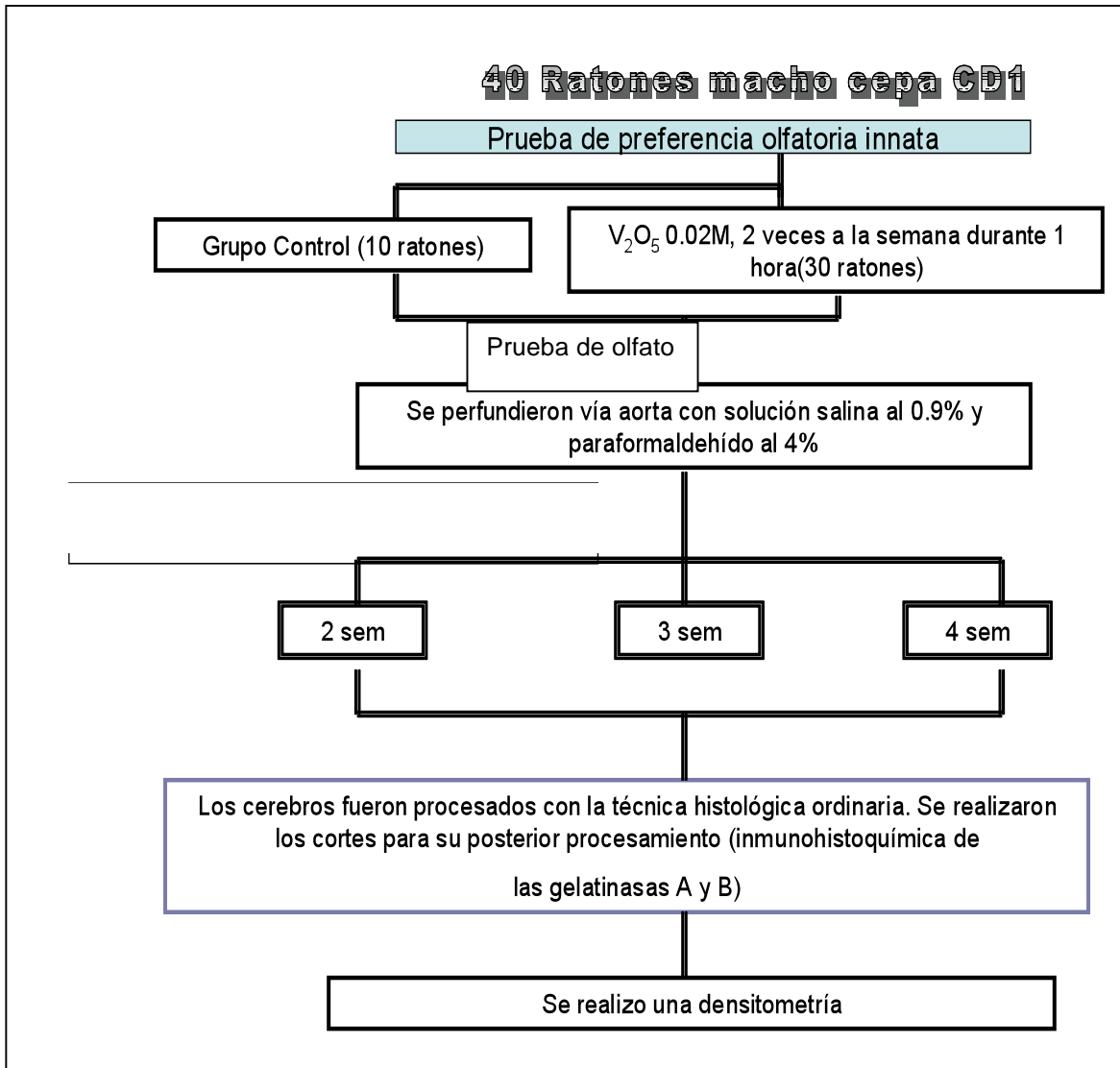
Densitometría

Se tomaron fotos de la zona glomerular y de la granulosa a 400 x en los diferentes tiempos de exposición a pentóxido de vanadio. (Cuatro fotos por zona y tiempo de cada ratón de cada grupo).

Análisis Estadístico

Se realizo análisis de varianza (ANOVA) con el paquete estadístico Sigma Stat versión 2.0, para evaluar las diferencias entre cada uno de los grupos expuestos a pentóxido de vanadio y el grupo testigo de la capa glomerular y granulosa del bulbo olfatorio.

Esquema 1. Representación esquemática del método.



VIII. Resultados.

Se observó alteración de la función olfatoria, disminuyeron los tiempos de olfatear y cambiaron las preferencias que tenían por ciertos odorantes conforme a los distintos tiempos de exposición a pentóxido de vanadio,

Por otra parte se observó aumento en la marca de las gelatinas A y B comparados con el grupo control en la zonas glomerular y granulosa en los diferentes tiempos de inhalación a pentóxido de vanadio.

Función olfatoria

En la prueba de preferencia olfativa se observó que los ratones control, tenían mayor preferencia al ácido acético, menor hacia el heptaldehído 0.1 M. y un desagrado hacia el etanol 100%. (Figura 7)

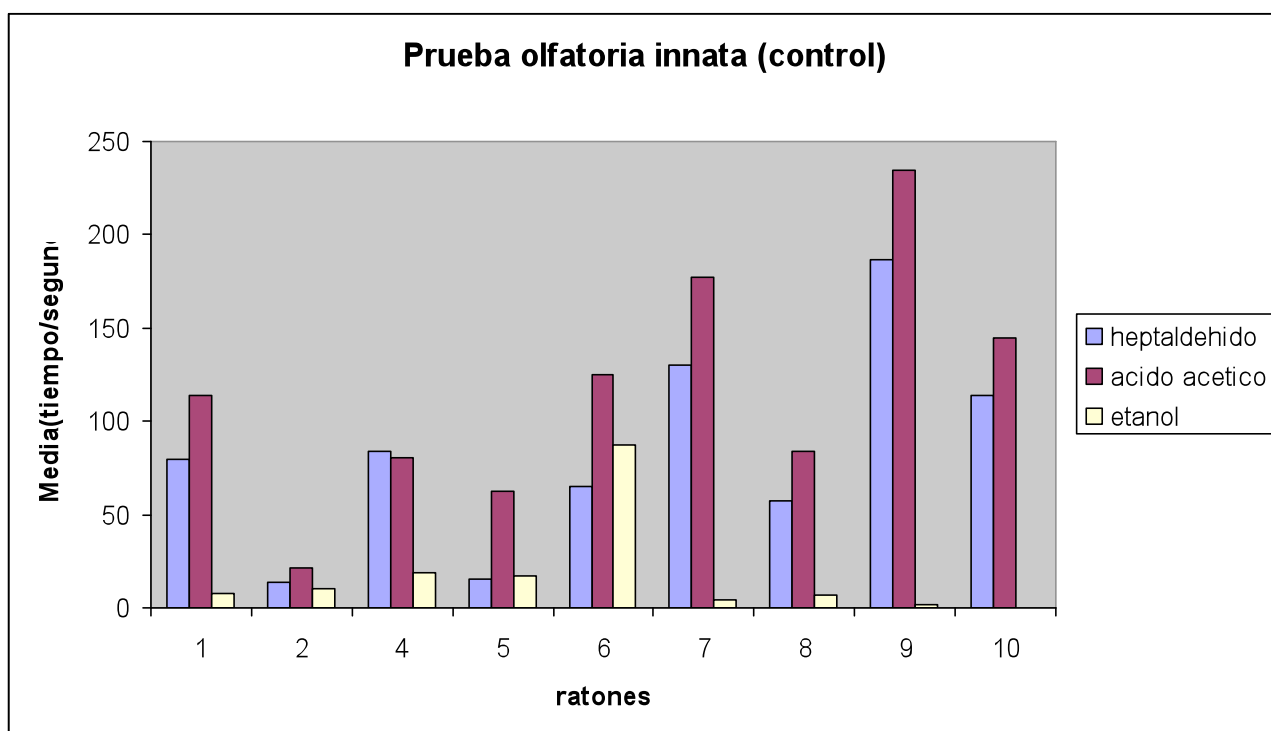


Figura 7. Prueba control, donde se muestra a cada odorante y la media de tiempo en segundos que hizo cada ratón.

A la segunda semana de inhalación, el comportamiento de los ratones cambio, después de haber preferido el olor a ácido acético cambiaron esta preferencia por el heptaldehído, los tiempos de inhalación disminuyeron conforme a la prueba control. (Figura 8).

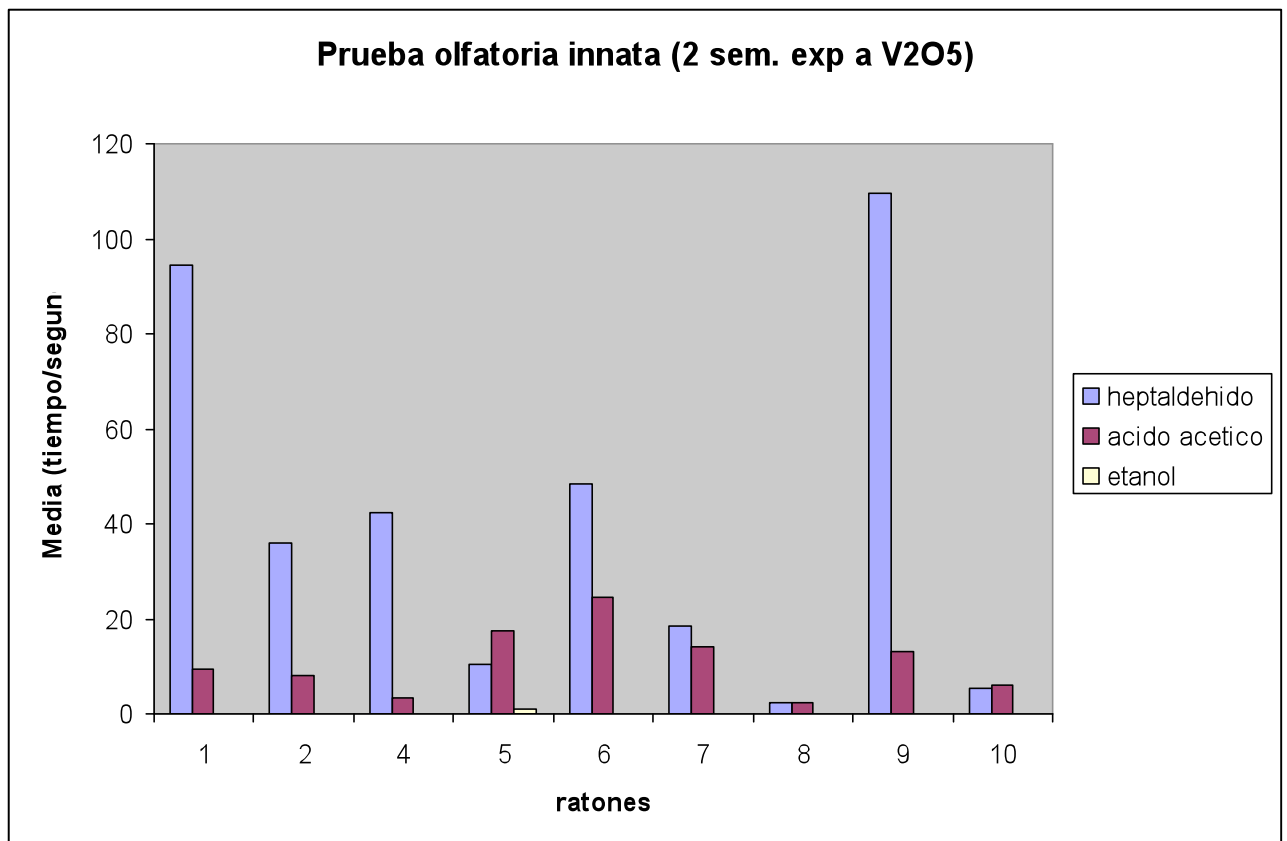


Figura 8 Grafica de la Prueba olfatoria a la segunda semana de inhalación, se muestra a cada odorante y el tiempo en segundos que hizo cada ratón.

A la tercera semana de inhalación, la prueba decae la prueba no decae mucho con respecto al tiempo que olfatearon, siguen teniendo la preferencia por el heptaldehído, pero el tiempo que estos olfatearon bajo con respecto al tiempo que realizaron en la prueba control. (Figura 9)

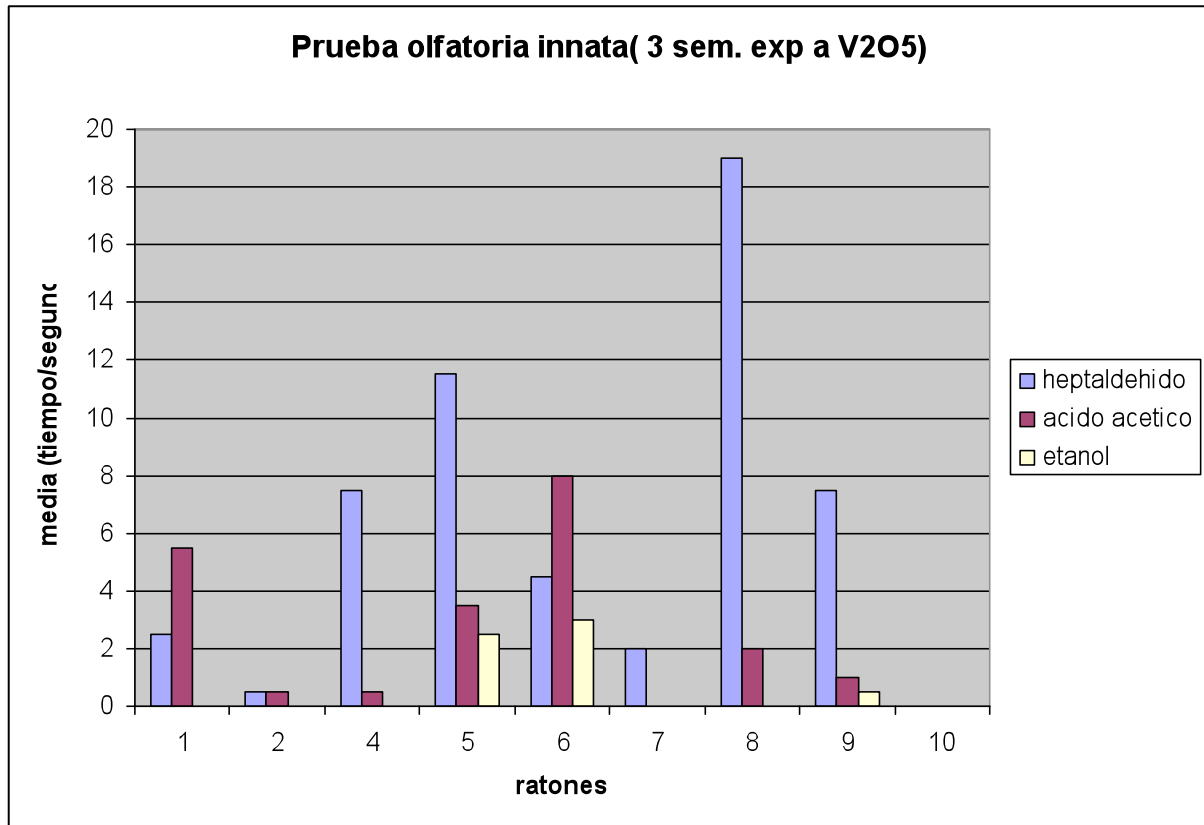


Figura 9 Grafica de la prueba olfatoria de la tercera semana donde se muestra a cada odorante y el tiempo en segundos que hizo cada ratón.

Para la 4 semana de inhalación, los ratones dejaron prácticamente de olfatear con los tres odorantes, su tiempo disminuyó considerablemente (a excepción de uno o dos ratones que en toda la prueba mostraron un comportamiento distinto (Figura 10)

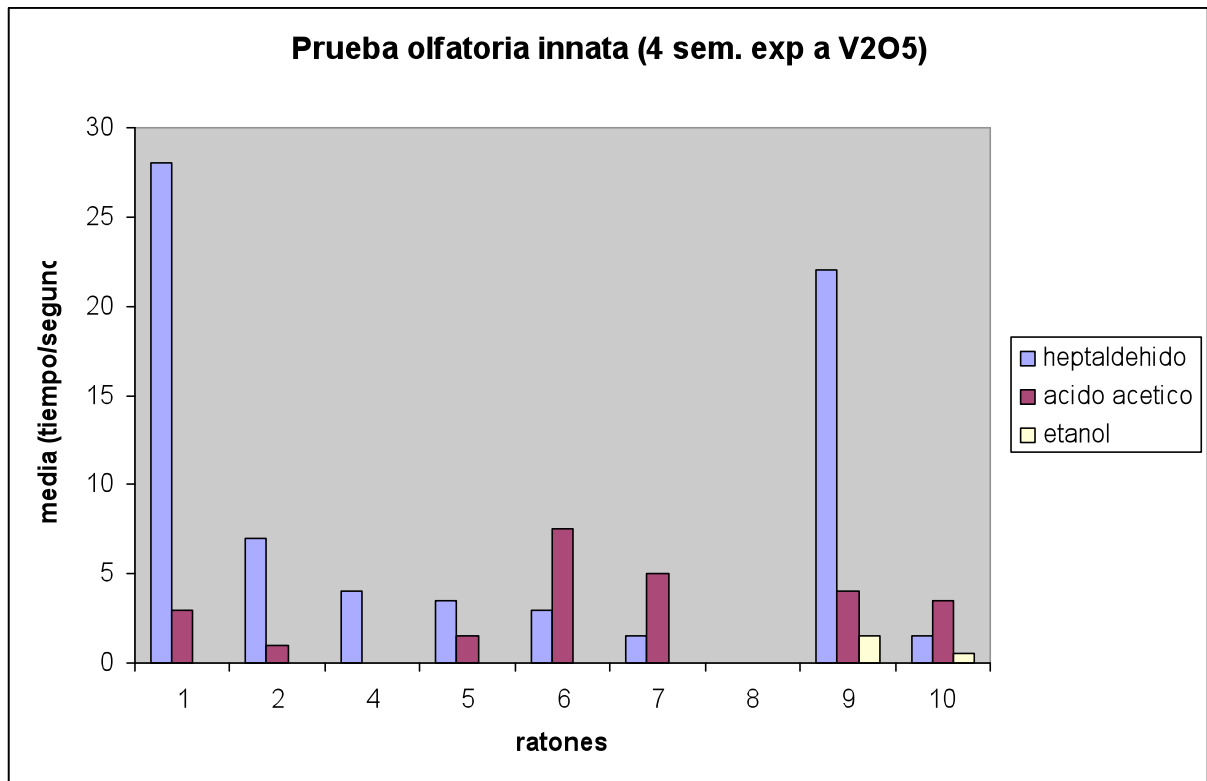
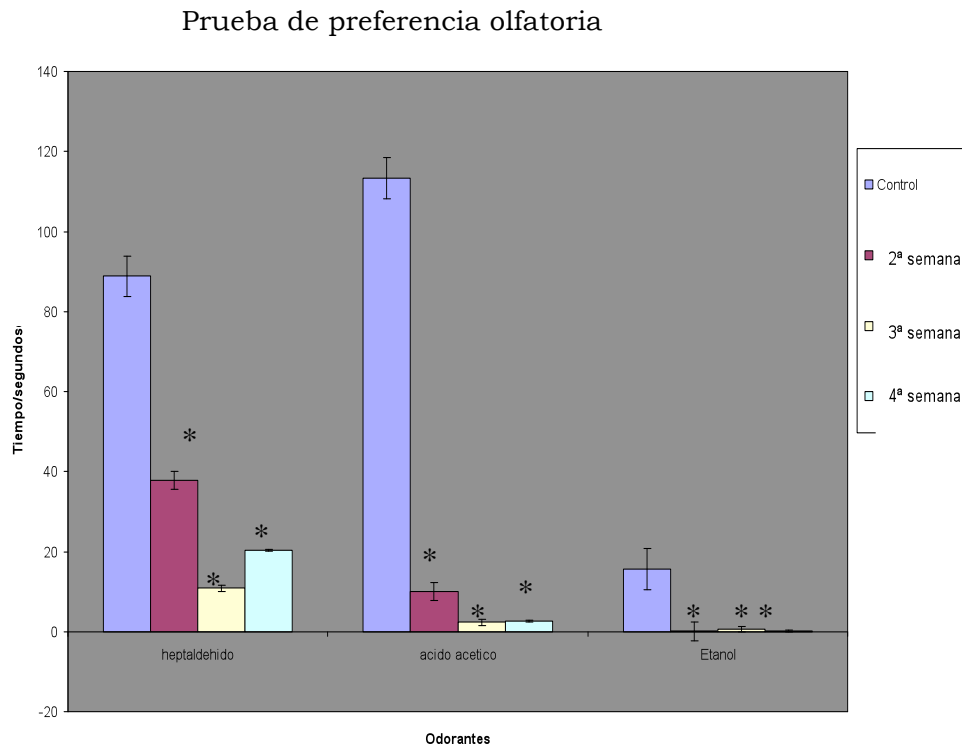


Figura 10. Grafica de la Prueba olfatoria de la cuarta semana donde se muestra a cada odorante y el tiempo en segundos que hizo cada ratón.

De tal manera que se puede observar que los ratones conforme aumento la exposición a pentóxido de vanadio, el tiempo que olfateaban fue disminuyendo, y la preferencia por ciertos odorantes cambio y se perdió a las 4 semanas, existiendo diferencia significativa entre los controles y los expuestos a vanadio (ver grafica 11)



(ANOVA, Turkey) $p < 0.001$

H = 86.968 with 11 degrees of freedom.

Figura 11. Grafica de la prueba olfatoria, media de los ratones conforme a cada odorante y el tiempo que olfatearon estos en los distintos tiempos de inhalación.

Inmunohistoquímica

Con la técnica de inmunohistoquímica observamos aumento significativo, con respecto a los controles, de la marca de las gelatinasas A y B, tanto en la zona de la glomerular y la granulosa del bulbo olfatorio conforme aumenta el tiempo de exposición a V_2O_5 . (Figuras 12, 13, 14 y 15)

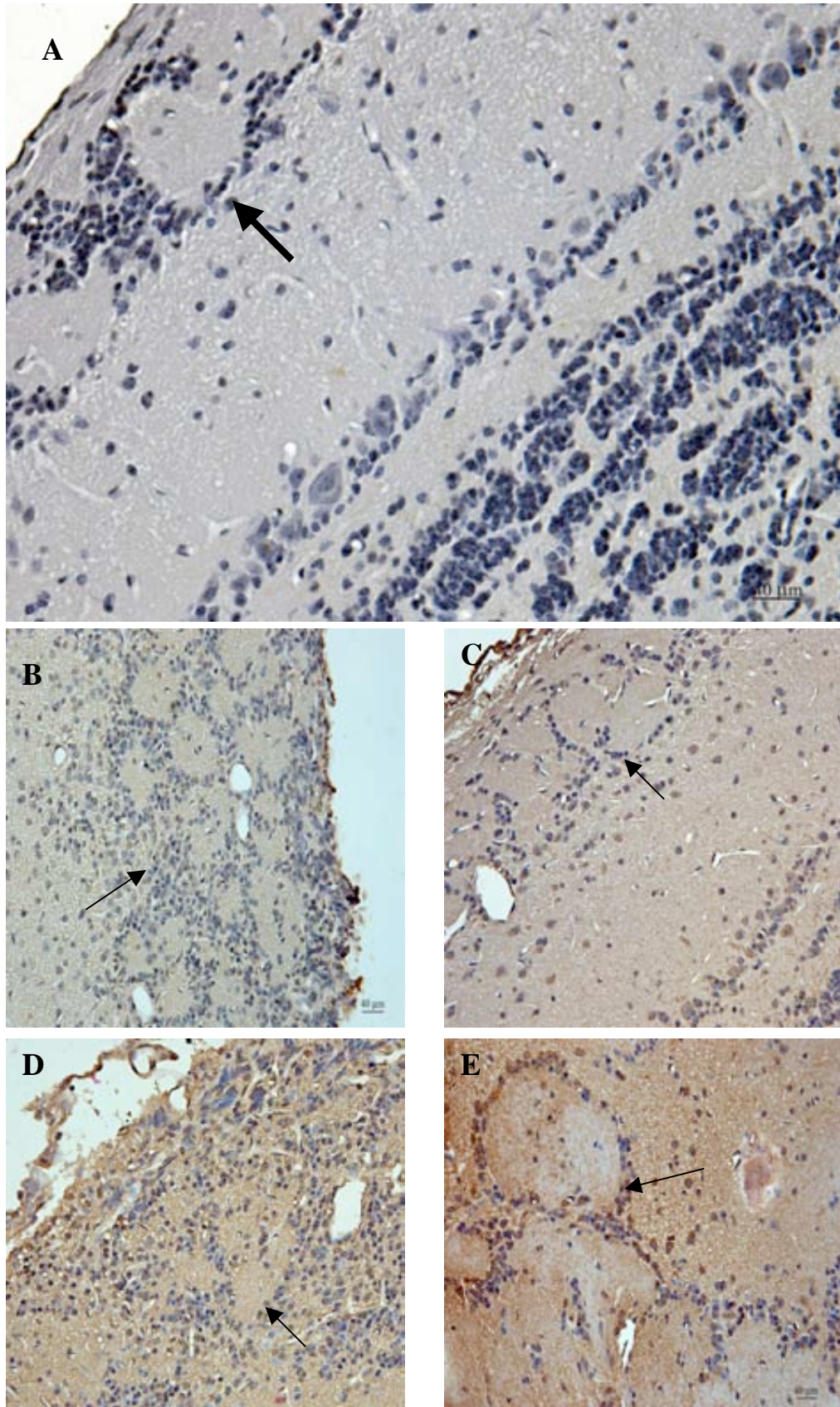


Figura 12. Fotografías de la inmunohistoquímica para la gelatinasa A, en la zona glomerular. A) Control negativo, B) control, C) segunda semana de exposición a vanadio, D) tercera semana de exposición, E) cuarta semana de exposición. ↙ Indica a los glomérulos

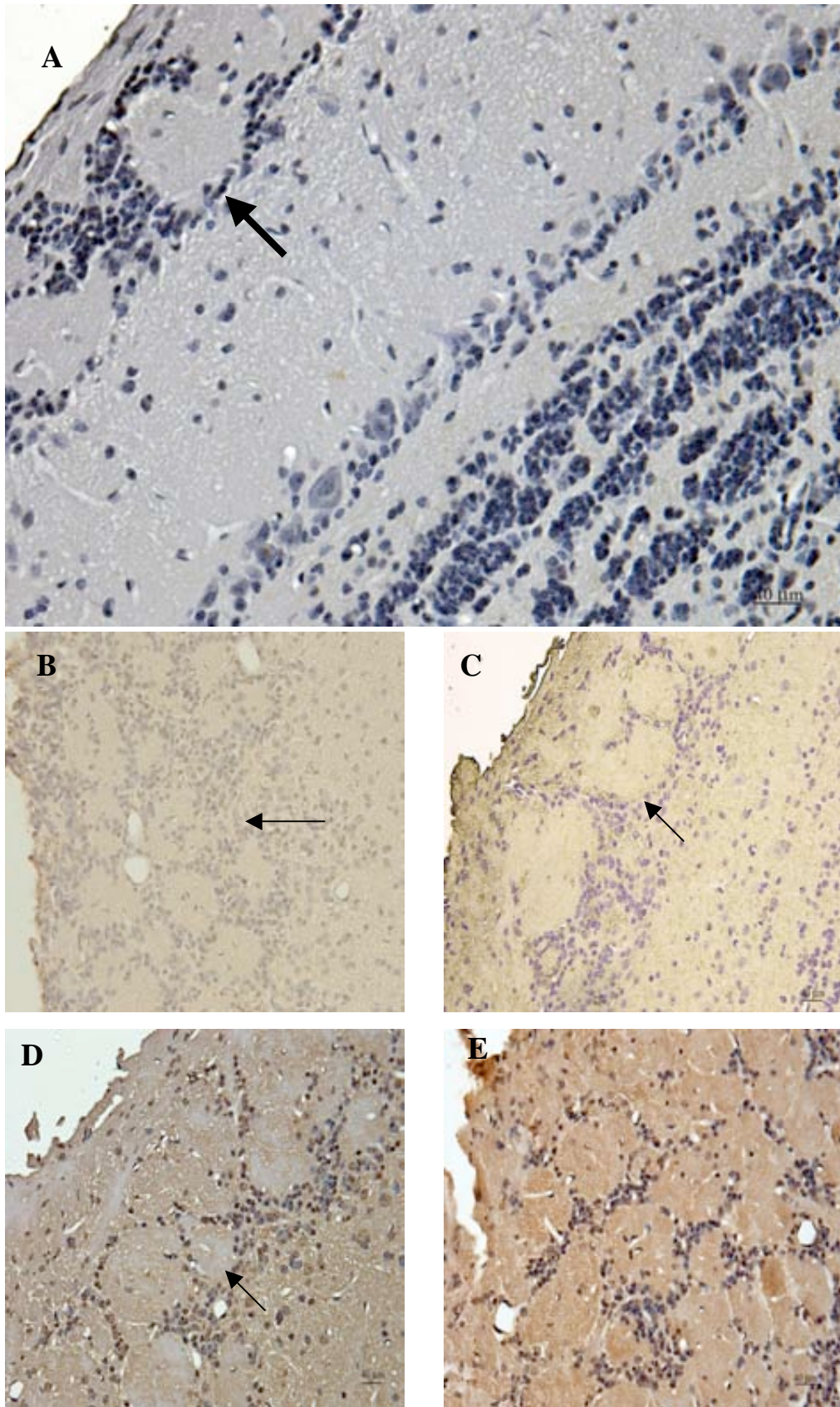


Figura 13. Fotografías de la inmunohistoquímica para la gelatinasa B, en la zona glomerular. A) Control negativo, B) control, C) segunda semana, D) tercera semana, E) cuarta semana. ← Indica los glomérulos

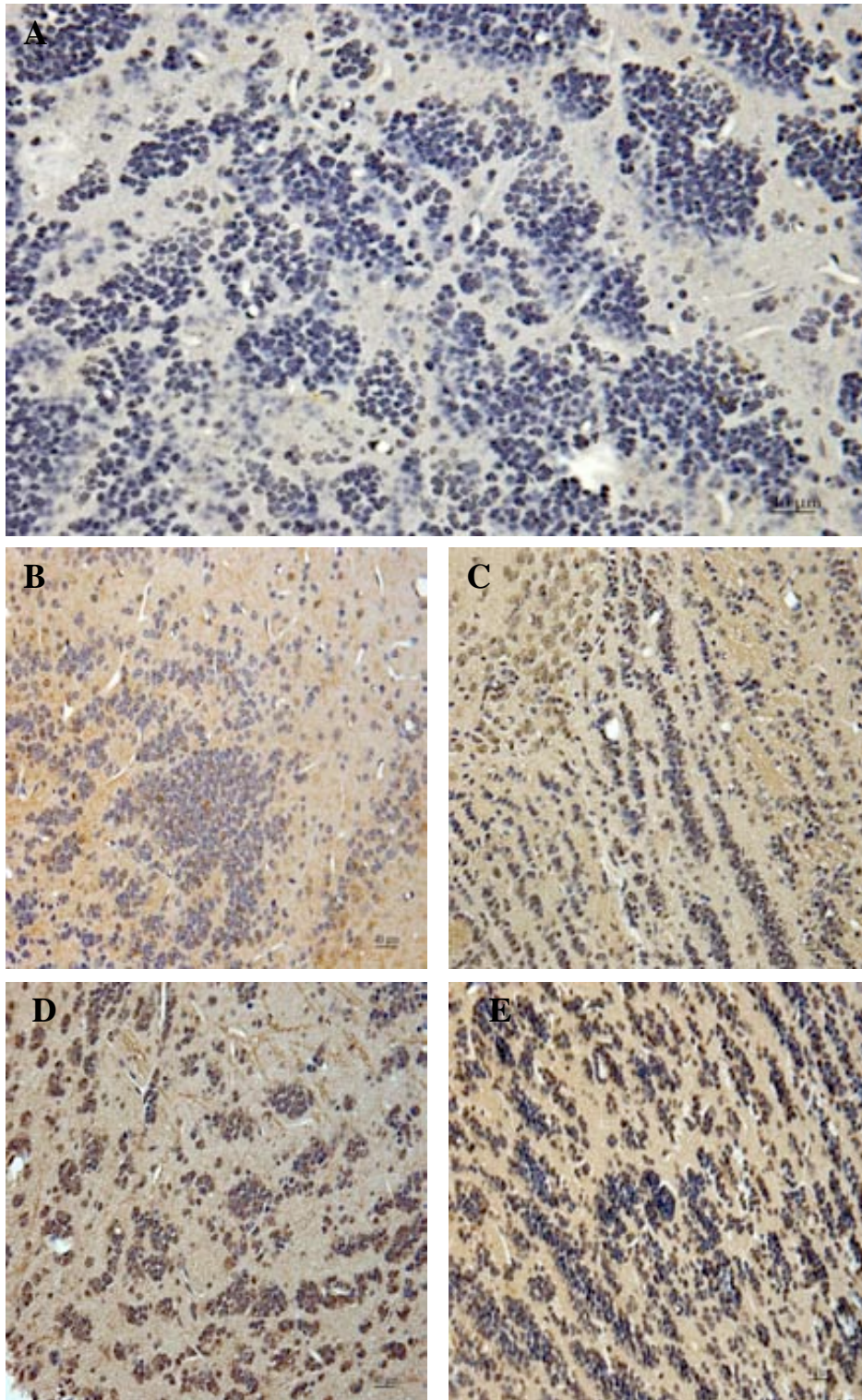


Figura 14. Fotografías (400x) de inmunohistoquímica para la gelatinasa A, en la zona granulosa. A) Control negativo, B) control, C) segunda semana, D) tercera semana, E) cuarta semana.

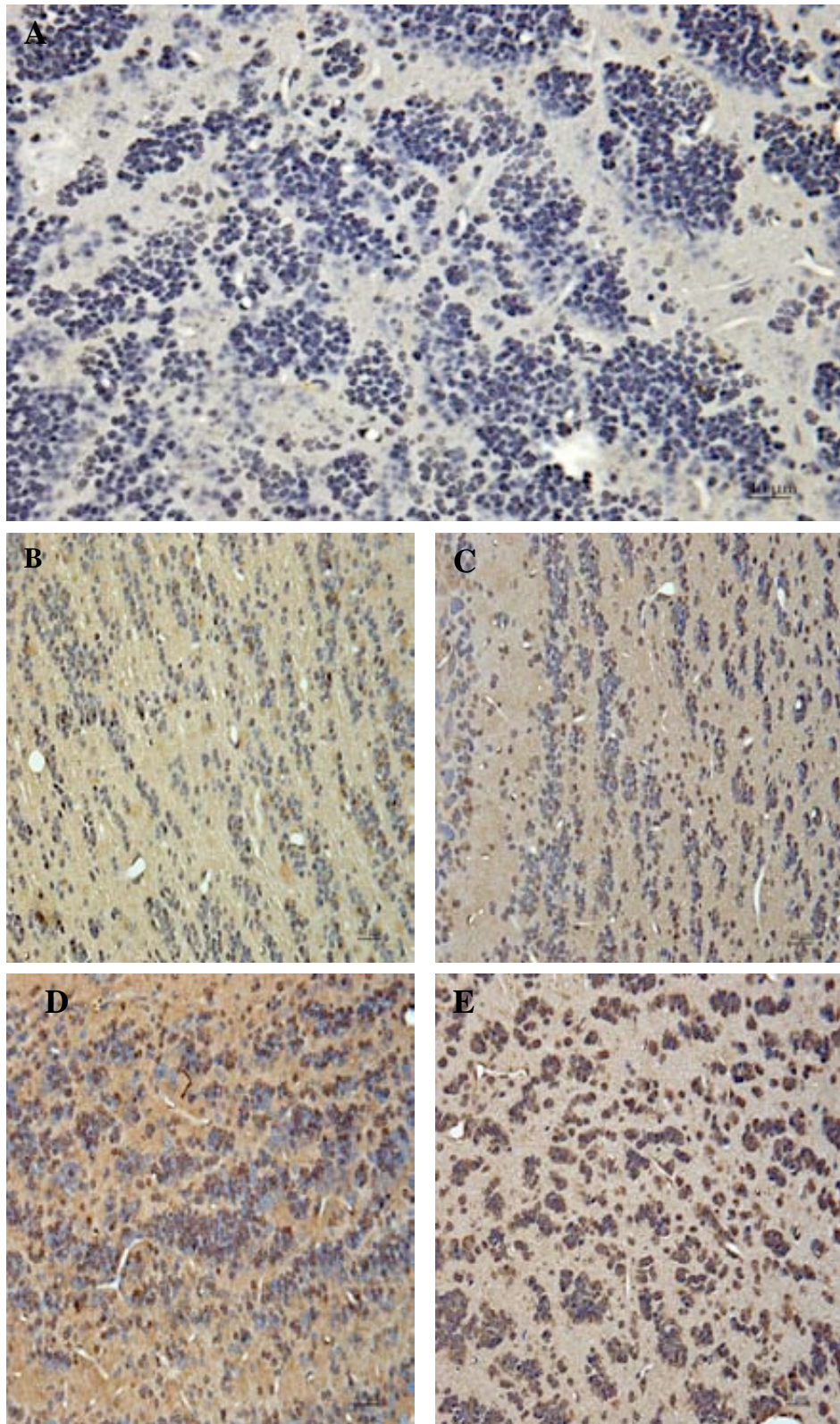


Figura 15. Fotografías (400x) de inmunohistoquímica para la gelatinasa B, en la zona granulosa. A) Control negativo, B) control, C) segunda semana, D) tercera semana, E) cuarta semana.

Análisis de densitometría

Se realizó el análisis densitométrico de las inmunohistoquímicas realizadas, tomando las áreas de la granulosa y la glomerular con un aumento de 400x de los animales control y expuestos a pentóxido de vanadio, y se observó aumento significativo de la gelatinasa A en la zona granulosa desde la segunda semana de exposición a V_2O_5 , y aumento significativo de la zona glomerular desde la tercera semana de exposición a V_2O_5 comparados con los controles. (Figura 16)

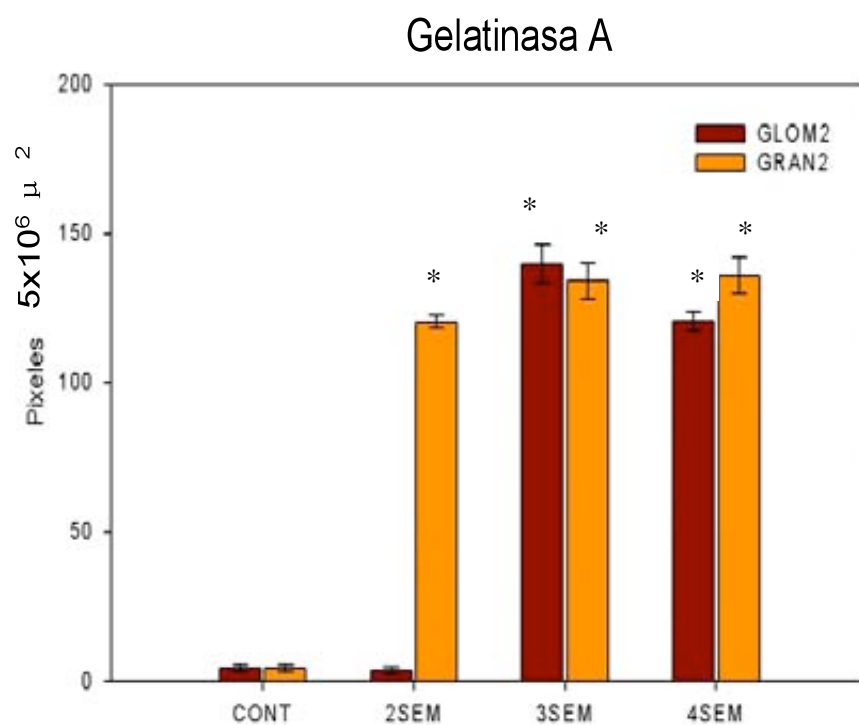


Figura 16. *Grafica del promedio del número de píxeles $5 \times 10^6 \mu^2$ De la inmunoreactividad a la gelatinasa A prueba de ANOVA Turkey*

Con respecto a la gelatinasa B, lo que obtuvimos fue tanto la zona de la granulosa, como la zona glomerular tuvo aumento significativo desde la segunda semana de exposición a V_2O_5 . (Figura 17)

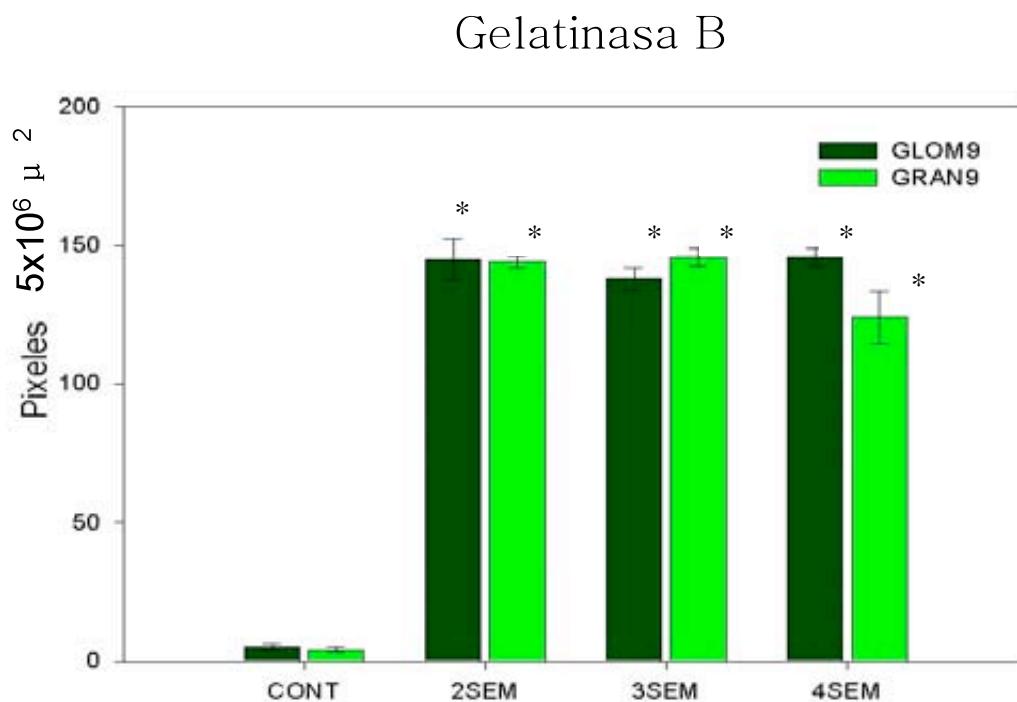


Figura 17. *Grafica del promedio del número de píxeles $5 \times 10^6 \mu^2$ De la inmunoreactividad a la gelatinasa B prueba de ANOVA Turkey*

IX. Discusión

Se ha reportado que la contaminación ambiental aumenta día con día, principalmente por actividades antropogénicas, como es la quema de combustibles derivados del petróleo, debido a que uno de los principales problemas con estos combustibles son los residuos que deja su combustión, los cuales se dispersan en el aire, siendo de varios tamaños y formas (Rosales-Castillo et al 2001). Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre el tiempo de exposición al contaminante y el incremento de la mortalidad. (Fortoul T.I y Avila-Costa 2007). Aunque se ha estudiado mucho acerca de algunos contaminantes y metales que se encuentran en el ambiente, poco se sabe sobre la exposición a V_2O_5 y las consecuencias que este produce en el sistema nervioso central.

Conducta

Nuestros resultados mostraron que la exposición a pentóxido de vanadio provocó alteraciones a nivel conductual en la prueba de preferencia olfatoria innata, a partir de la segunda de semana de inhalación. Conforme aumentaba el número de inhalaciones a V_2O_5 , progresivamente los ratones disminuyeron significativamente su tiempo de olfacción, con respecto al grupo control.

Además de la disminución en el tiempo de olfacción, los ratones cambiaron su preferencia, ya que en el grupo control elegían notablemente al ácido acético sobre el heptaldehído y el etanol, creemos que a este odorante lo relacionan con alimento. Por otro lado, con el etanol sucedió lo contrario al ácido acético, ya que desde que lo olfateaban, los ratones se alejaban de este. A diferencia del grupo control, después de exponer a los ratones a V_2O_5 hubo cambios significativos, el ácido acético no les atraía y tenían mayor preferencia por el heptaldehído. Al final de las cuatro semanas de exposición, tanto las preferencias como el tiempo que tardaban en olfatear cambio, el

tiempo de olfacción disminuyó notablemente con relación al grupo control, y ya no había preferencia por ninguno de los odorantes mencionados.

El modelo utilizado para este trabajo fue un modelo de inhalación, por el cual el vanadio tiene dos formas de entrar en contacto con el bulbo olfatorio, la primera es la forma directa, donde al ser inhalado entra en contacto inmediato, interaccionando con las neuronas sensoriales (NSO) que se encuentran en el epitelio olfatorio.

Una vez que el Vanadio interacciona con las neuronas sensoriales, estas van a ser activadas y enviar una señal eléctrica hacia los glomérulos. En cada glomérulo convergen los axones de neuronas que reconocen una molécula volátil particular, en este caso el vanadio. En los glomérulos se lleva a cabo el relevo de la información olfatoria (Buck 2004), posteriormente estos establecen interacciones sinápticas con las dendritas de células mitrales, en penacho, periglomerulares y granulosas (Valverde, 2003). (ver figura 18)

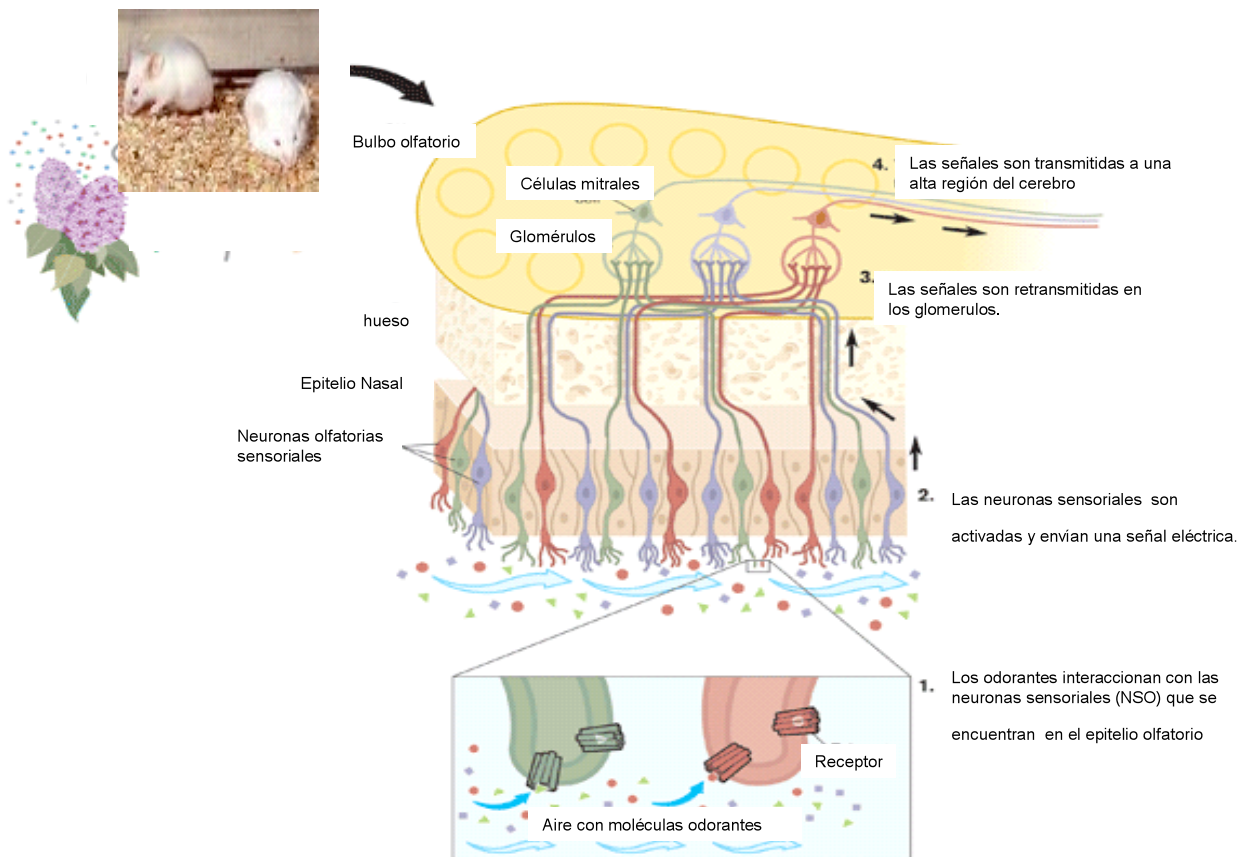


Figura 18. Ampliación de la región olfatoria mostrando las proyecciones axonales desde el epitelio olfatorio hasta el bulbo olfatorio principal.

La otra vía es la indirecta, la cual es por medio del torrente sanguíneo, el vanadio al inhalarse ingresa profundamente en las vías respiratorias bajas, llega a los sacos alveolares, alvéolos y alcanza el torrente sanguíneo (Rosales-Castillo *et al.* 2001). El vanadio tetravalente es transportado por albúmina y transferrina, mientras que el vanadio pentavalente sólo por transferrina (Murhejee *et al.* 2004, Gandara *et al.* 2005); unido a estas proteínas, el vanadio puede alcanzar los órganos y tejidos (Rosales- castillo *et al.* 2001, Murherjee *et al.* 2004, Gandara *et al.* 2005)

El vanadio entra a las células por canales iónicos inespecíficos, una vez dentro de la célula, el vanadio pentavalente es reducido nuevamente por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Valko *et al.* 2006). Se considera que los efectos adversos que el vanadio ejerce sobre los sistemas biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, son debidos en gran medida a la inducción de estrés oxidante: generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de radicales libres (Evangelou 2002).

- 1) $V^{4+} + O_2 \rightarrow V^{5+} + O_2^-$ (radical superóxido)
- 2) $V^{5+} + O_2 \cdot \rightarrow [V^{4+} + \cdot OO]$ (radical peroxovanadilo)
- 3) $V^{4+} + H_2O_2 \rightarrow V^{5+} + OH^- + \cdot OH$ (Radical hidroxilo) (Valko *et al.* 2006).

El aumento de radicales libres y ROS provoca estrés oxidante, el cual se ha relacionado con la muerte celular y la disfunción neuronal (Haorah J *et al.* 2007). (Ver esquema 2). En un estudio previo, en un grupo de ratones después de haber sido sometidos a una exposición a V_2O_5 , vía inhalada, tenían pérdida significativa de espinas dendríticas de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio, así como muerte por apoptosis y necrosis de estas neuronas (Colin-Barenque *et al.* 2004). El tejido neuronal es muy vulnerable al daño ocasionado por ROS por el alto consumo de oxígeno, la moderada capacidad antioxidante y sus membranas ricas en lípidos poliinsaturados. Por lo que al ROS se le ha implicado en enfermedades neurodegenerativas como

son la Enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y Enfermedad de Alzheimer (Fortoul T., Avila-Costa, 2007).

Por otra parte, la pérdida progresiva de una población neuronal específica es una característica de desordenes neurológicos (Bharathi *et al* 2006; Haorah J *et al* 2007) Así como la pérdida de la discriminación olfatoria se ha visto relacionada con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Thomman *et al* 2007; Herting *et al* 2008).

La pérdida de olfato se ha considerado como un criterio importante junto con biomarcadores de sangre para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (Foster J. *et al* 2008); de igual manera la alteración en la discriminación olfatoria, la depresión, disfunción motora, así como el trastorno de sueño, son criterios que se usan para el diagnóstico temprano de la enfermedad de Parkinson (Berg D. 2008)

Gelatinasas

Nuestros resultados mostraron aumento en la inmunoreactividad a las gelatinasas después de la exposición a V_2O_5 , en la capa glomerular y granulosa del bulbo olfatorio.

El aumento significativo en la inmunoreactividad de la gelatinasa B se observó desde la segunda semana de exposición a V_2O_5 en la capa glomerular y granulosa, con respecto al grupo control, a partir de la segunda semana este aumento se mantuvo constante sin diferencia significativa para la tercera y cuarta semana con respecto a la segunda semana de inhalación, pero si una diferencia con respecto al grupo control.

Por otra parte, en la gelatinasa A también se observó aumento significativo desde la segunda semana pero solo de la capa de la granulosa, mientras que la capa glomerular presentó un aumento significativo desde la tercera semana de inhalación.

En un trabajo previo, en el modelo por inhalación a V_2O_5 durante 4 semanas se determinó la actividad de las gelatinasas A y B en el bulbo olfatorio, se observó un aumento de la actividad de la gelatinasa B desde la primera semana de exposición, mientras que la gelatinasa A mantuvo constante su actividad y sin diferencia significativa a lo largo de toda la exposición (Colin-Barenque *et al.* 2008). Esta diferencia, de la actividad de la gelatinasa A y la gelatinasa B se podría explicar debido a que las gelatinasas son sintetizadas como zimógenos y son secretadas en el espacio extracelular como zimógenos inactivos. Su activación e inhibición se consigue a través del bloqueo de la actividad enzimática mediado por inhibidores específicos tales como las TIMPs (Castillo *et al.* 2004) o por las mismas MMPs, en este caso se ha reportado que la gelatinasa B inhibe a la gelatinasa A (Opdenakker *et al.* 2001). De tal manera que la gelatinasa B podría estar inhibiendo a la gelatinasa A, y por lo tanto la actividad de esta se vea constante y no en aumento a diferencia de la gelatinasa B.

Por otro lado como ya se mencionó el V_2O_5 genera ROS, pero también se ha reportado que también aumenta las Citocinas (IL-1 β , IL-6 TNF α)(Evangelou 2002; Fortoul T.I y Avila-Costa 2007), los cuales inducen la activación de las gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9)(Haorah *et al.* 2007).

Así, la regulación de la expresión y la activación de las MMPs es muy compleja y altamente controlada. Las MMPs son sintetizadas como zimógenos y secretadas en el espacio extracelular como zimógenos inactivos. ProMMPs son activados por la disrupción del zinc-tiol interacción entre el sitio catalítico y el pro-dominio (Candelario-Jalil *et al.* 2008). De tal forma que su actividad está regulada a múltiples niveles. La síntesis de las MMP está controlada a nivel transcripcional en respuesta a la acción de oncogenes, factores de crecimiento (TGF- β), citocinas(IL-1 β , IL-6, TNF- α), las cuales como ya mencione también son activadas por V_2O_5 (Fortoul y Ávila-Costa, 2007), y hormonas sobre las regiones promotoras del gen (c-fos,c-jun)(Castillo *et al.* 2004). Las MMP son secretadas como zimógenos inactivos que requieren un proceso proteolítico para liberar la zona catalítica. La activación se consigue al separar el propéptido del resto de la cadena de las MMP. Este proceso puede

conseguirse a través de la acción de otras MMP o proteasas (Castillo *et al.* 2004).

Otra alternativa de activación, es por medio de un mecanismo no-proteolítico de MMP que podría existir en sistemas biológicos. Siendo las especies reactivas de oxígeno (ROS) un activador de las gelatinasas; por ejemplo *in vitro* ROS ha mostrado activar las formas latentes de pro-MMP-2 y pro-MMP-9 y también *in vivo* ROS se ha visto implicado en la activación de MMP (Gasche Y. *et al* 2001).

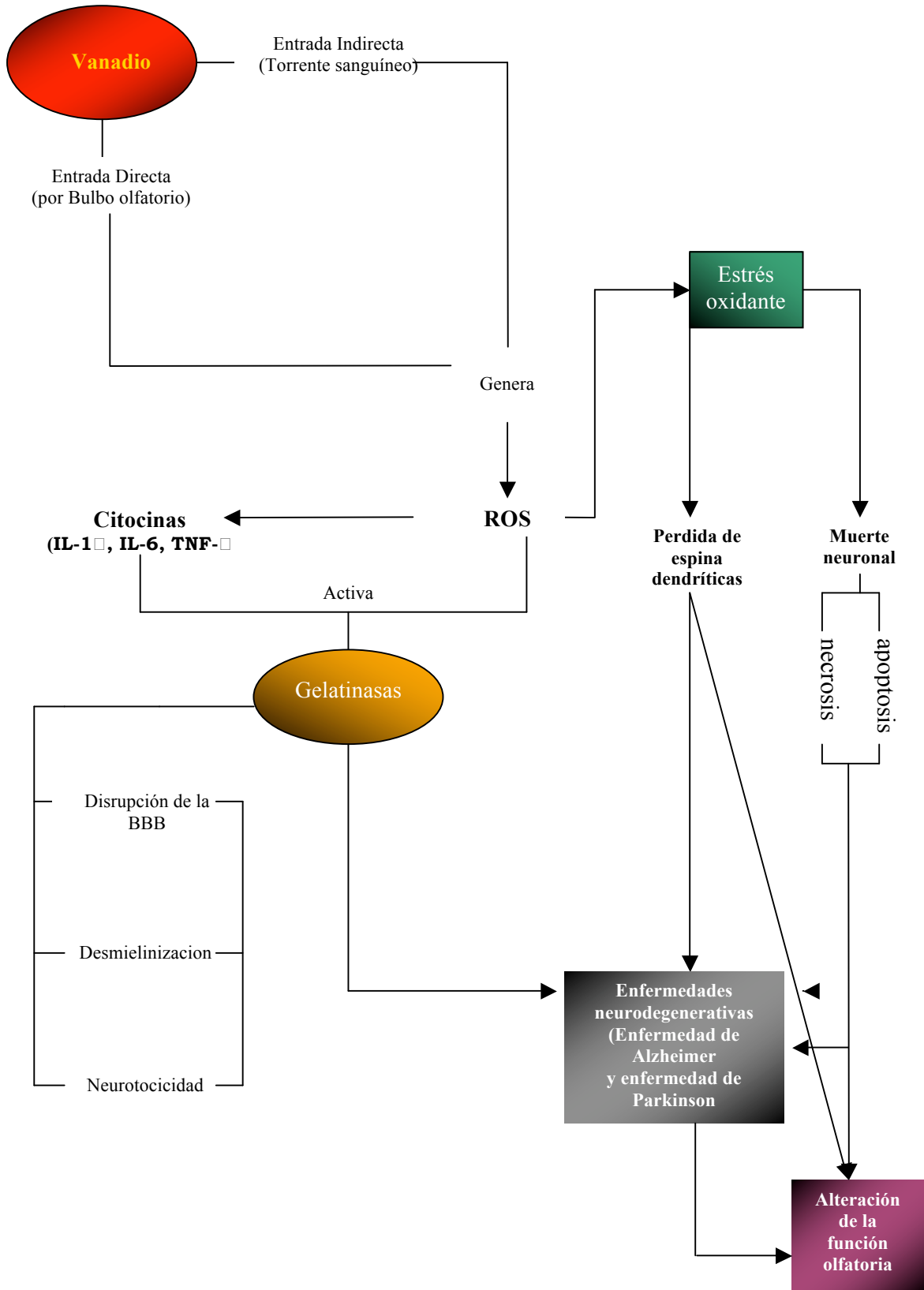
De tal manera que el V₂O₅ genera ROS, los cuales no solo causan estrés oxidante sino también activa las gelatinasas, las cuales se han asociado con enfermedades neurodegenerativas (Yong *et al* 2001). (ver esquema 2)

Las gelatinasas están asociadas con la enfermedad de Alzheimer (Kim *et al.* 2006), esta enfermedad se caracteriza por la formación de placas amiloides, las cuales están formadas por el depósito del péptido β-amiloide (Aβ) derivadas de las proteínas precursoras amiloides (APP). Tres proteasas-α-, β y γ secretasa son envueltas en APP en distintos sitios para generar péptidos Aβ de varios tamaños y se ha sugerido que la MMP-2 tiene como actividad la β secretasa. Además, la presencia de TIMP en placas amiloides de Alzheimer señala que las MMPs son excesivamente producidas o activadas en las placas (Yong *et al* 2001) además se reportó incremento de la actividad y la distribución de las gelatinasas en la corteza cerebral (Baigs *et al.* 2008) en un estudio postmortem de humano.

Por otro lado, las gelatinasas también se han asociado a la enfermedad de Parkinson, la cual está caracterizada por progresiva y profunda pérdida de neuronas en la sustancia nigra pars compacta (Thomas B y Flint B.M 2007) y la consecuente pérdida de las aferencias dopaminérgicas estriatales. En un estudio postmortem, se reportó incremento de la actividad de las gelatinasas en las neuronas de la sustancia nigra (Lorenzi *et al.* 2002).

De tal manera que el estrés oxidante ocasionado por el V_2O_5 puede estar incrementando las gelatinasas, las cuales también se han visto involucradas en las enfermedades neurodegenerativas (Kim *et al* 2006) porque la presencia de niveles altos de gelatinasas se han asociado a destrucción tisular, en este caso degradando la matriz extracelular de las neuronas, lo cual puede ocasionar que haya una pérdida de espinas dendríticas, seguido de muerte celular por anoikis.(Candelario-Jalil *et al* 2008)

En resumen, el pentóxido de vanadio está alterando el sistema olfatorio, reflejado en la función y en el incremento de las gelatinasas que podría asociarse con la muerte neuronal y pérdida de espinas de las neuronas granulosas previamente reportada



Esquema 2. Mecanismo por el cual el V_2O_5 puede estar actuado

X. Conclusiones

1. El pentóxido de vanadio con relación al tiempo de exposición por inhalación ocasiona alteración de la función olfatoria.
2. Con base a nuestros resultados podemos decir que el V_2O_5 esta ocasionando un incremento con relación al tiempo de exposición en la distribución de las gelatinasas en la zona glomerular y granulosa del bulbo olfatorio, lo cual lo podría relacionarse con la perdida de espinas dendríticas en las neuronas granulosas previamente reportada.
3. Por otra parte el vanadio produce especies reactivas de oxígeno, las cuales activan la producción de las gelatinasas y su incremento se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson y el Alzheimer.

Por lo que es importante considerar los efectos y daños que el V_2O_5 esta provocando y no solo este metal sino el aumento de contaminación que día a día aumenta por las actividades antropogénicas, ya que si bien es cierto, es que el V_2O_5 es uno de los tantos metales y contaminantes que respiramos y de los que estamos expuestos, y por lo que quizá las enfermedades neurodegenerativas se han asociado a la contaminación.

Anexo 1

Prueba olfatoria

Material:

- Heptaldehido 0.1M
- Ácido acético 5%
- Etanol 100% o de 96%
- Filtros
- Cajas de acrílico con su respectiva tapa (la cual debe de dejar al menos un orificio para que pueda entrar aire, se puede cubrir con un acrílico o una misma caja de acrílico)
- Cronómetros
- Micropipetas de 200 μ L
- Puntas para micropipetas para 200 μ L

Método

1. Una noche previa a la prueba dejar a los ratones sin agua, ni alimento.
2. El día de la prueba colocar a los ratones en las cajas con sus respectivas tapas (colocar solo un ratón por caja) durante 15 minutos, para que estos se acoplen.
3. Una vez transcurrido el tiempo colocar un cuadrado de papel filtro a la mitad de la caja a este papel filtro colocarle 200 μ L de heptaldehido 0.1M. Durante 5 minutos. (la caja también debe de permanecer cerrada, para que el olor no se volatilice)
4. Durante este tiempo se debe tomar el tiempo que el ratón se acerque a olfatear el papel filtro (con un cronometro aparte).

5. Una vez transcurridos los 5 minutos se destapa la caja y se quita el odorante y se deja destapada un rato hasta que el olor del odorante se haya volatilizado (para no meter ruido con el siguiente odorante)
6. Después se continúa con el siguiente odorante, ácido acético 5%, lo cual se realiza exactamente lo mismo que con el heptaldehido.
7. Terminando con el ácido acético continuamos con el etanol 100% y se realiza lo mismo que los anteriores.
8. Esto se hace con cada uno de los ratones, una vez que todos los ratones hicieron la prueba, se repite nuevamente la prueba.

Anexo 2

Técnica de inmunohistoquímica

Los cerebros de los animales control y tratados fueron procesados mediante la técnica histológica convencional. Después de la perfusión intra-cardíaca con fijador a base de paraformaldehído (4%), el tejido se suspendió en paraformaldehído. Posteriormente se deshidrató e incluyó en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes de 30 micrómetros de espesor para posterior procesamiento inmunohistoquímico.

Para esto se desparafinaron los tejidos en xilol y se deshidrataron en alcoholes graduales (alcohol absoluto, alcohol de 96° hasta 50%). Finalmente de haber pasado por los alcoholes se lavaron con agua corriente.

La recuperación antigénica se llevó a cabo mediante temperatura. Los cortes se suspendieron en Declere y se colocaron dentro de una olla de presión a 15 lb. y 120° C, por 3 minutos.

Se dejaron enfriar.

Se colocaron en una cámara húmeda en agitación.

Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno consecutivamente a cada corte con buffer de fosfatos (PBS). La peroxidasa endógena se inhibió con peróxido de hidrógeno al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente.

Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno y además se agregó un lavado de PBS-albumina(BSA) al 1% y Tween 20 al 0.1% , pero este último fue de 10 minutos a temperatura ambiente.

El tejido se incubo a 37° C con una alícuota del anticuerpo gelatinasa A o gelatinasa B según sea el caso, en una dilución de 1:199, durante toda una noche a 4° C.

Posteriormente se realizaron tres lavados de PBS de 5 minutos cada uno consecutivamente y otro de PBS- albumina durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se colocó una alícuota de anticuerpo secundario anti-IgG de conejo 1:155 y se incubó el tejido por 30 minutos a 37 ° C.

Posterior a eso se realizaron 3 lavados de PBS de 5 minutos cada uno consecutivamente a temperatura ambiente.

Se incubaron los tejidos para la detección del antígeno con el complejo Horse Radish Peroxidase (HRP)-Estreptavidina durante 30 minutos a 37°.

Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno consecutivamente a temperatura ambiente. Para revelar se utilizó, 3 Diaminobenzidina (DAB), esta reacción da un color café sobre los tejidos positivos que tienen expresadas a las MMPs. La reacción fue inhibida después de 1 minuto y 24 segundos con PBS.

Los tejidos se contratiñeron con Hematoxilina, se deshidrataron con alcoholes graduales y se montaron en resina sintética.

XI. Referencias bibliográficas

Abilleira Castells, Sonia. (2002) **Papel de la gelatinasa B (MMP-9) en el desarrollo del edema en la fase aguda de la hemorragia intracerebral espontánea.** Tesis Doctoral. UAB.

Altamirano-Lozano M, Alvarez BL, Roldán RE. (1993) **Cytogenic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice.** Medical Science Research. 21:711-713.

Altamirano-Lozano M, Alvarez-Barrera L, Roldán RE. (2002). **Cytogenic and teratogenic effects of vanadium pentoxide on mice.** Medical Science Research. 21: 711-713.

Angarita F. L.A., Builes A. C. M. y Machado M. E. L. (1997) **Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Alzheimer.** CES. 1-13.

Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Zepeda-Rodriguez A, Antuna SB, Saldivar OL, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, del Carmen Avila-Casado M, Reyes-Olivera A, Anaya-Martinez V, Fortoul TI.(2005) **Ependymal epithelium disruption alter vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model.** NeurosciLett. 381:21-5.

Baig S, Kehoe PG, Love S. (2008) **MMP-2, -3 and -9 levels and activity are not related to Abeta load in the frontal cortex in Alzheimer's disease** Neuropathol Appl Neurobiol. 2008 Apr;34(2):205-15. Epub 2007 Oct 29.

Baran, E.J. (2003). **Model studies related to vanadium biochemistry:Recent advances and perspectives.** Journal of Brazillian Chemistr Society. 14:878-888.

Barceloux DG. **Vanadium.** J Toxicol Clin Toxicol. 1999; 37:265-78.

Berg D. (2008)**Biomarkers for the early detection of Parkinson`s and Alzheimer`s disease.** Neurodegeneration Dis. 5(3-4):133-6.

Björklund A (2005) **Cell therapy for Parkinson's disease: problems and prospects.** Novartis Found Symp. 265:174-86; 187, 204-211.

Bharathi, Ravid R., and Jagannathan Rao K.S. (2006) **Role of Metals in Neuronal Apoptosis: Challenges Associated with Neurodegeneration.** Current Alzheimer Research. 3, 311-326.

Brennan PF.Cantor M. (1995) **Characterizing the use of health care services delivered via computer networks.** J Am Med Inform Assoc 1995, 2(3): 160-8.

Buck L, Axel R.(1991) **A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition.** Cell. Apr 5;65(1):175-87.

Buck, L. B. (2004)**The search for odorant receptors.** Cell 116, S117-9, 1 p following S119

Cai, J. y Jones, D. (1999) **Mitochondrial redox signaling during apoptosis**. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 31(4): 327-334.

Candelario-Jalil, Y. Yang and G.A. Rosenberg (2008) **Diverse Roles of matriz metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia**. Review. Neurosciencie.10:1-10.

Castillo J., Leira R., Blanco M. (2004) **Metaloproteasas y lesion neurovascular**. Neurologia; 19(6):312-320.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. (2002) **Patogénesis del estrés oxidativo. Consecuencias y evaluacion en salud animal**. Vet. Mex.33:265-283.

Choi , S.M., Yoo, S.D. y Lee, B.M. (2004) **Toxicological characteristic of endocrine disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenity and mutagenecity**. Journal of Toxicology and Enviromental Health. Part B. 7:1-23.

Colín Barenque, Laura. (2002) **Efecto de la exposición aguda a ozono sobre la morfología de la mucosa y del bulbo olfatorios de rata**. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias (Biología)-UNAM, Facultad de Ciencias.

Colin Barenque L, Avila-Costa MR, Delgado V, Lopez Sanchez I, Pasos F, Fortoul TI. (2004) **Mice olfactory bulb neuronal death alter V2O5 inhalation**. 43 rd Annual Meeting of the Society of Toxicology. Blatimore, Maryland. 2004.

Colín-Barenque, L; M. G. Martinez-Hernandez, L.A Baiza-Gutman, M.R. Avia-Costa, J. L. Ordoñez-Librado, P. Bizarro-Nevaras, V. Rodríguez-Lara, G. Piñon-Zarate, M. Rojas-Lemus, P. Mussali-Galante and T. I. Fortoul. (2008) **Matrix metalloproteinases 2 and 9 in crental nervous system and their modification alter vanadium inhalation**. Journal of Applied Toxicology. 28(6):718-723.

Curtis, L., Rea, W., Smith-Willis, P., Fenyves. E. y Pan. Y. (2006) **Adverse health effects of outdoor air pollutants**. Enviroment International 32:825-830.

DeClerck YA.(2000) **Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinase in cancer**. Eur J Cancer 2000; 36:1258-1268.

Dill, A.J. ; Lee, M. K., Mellinger, H. K, Bates DJ, Burke LT, Roycroft JH. (2004) **Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice**. Toxicological Scienes. 77:6-18.

Ding M, Li JJ, Leonard SS, Ye JP, Shi X, Colburn NH, Castranova V, Vallyathan V. (1999) **Vanadate-induced activation of activador protein-1:role of reactive oxygen species**. Carcinogenesis. 20:663-8.

EFSA Journal (2004) 101,1-36.Available at

URL:http://www.efsa.eu.int/science/contam/contam_opinions/645/opinion_contam09ej101_ochratoxina_en1.pdf

Englert N. (2004) **Fine particles and human health- a review of epidemiological studies**
Toxicology Setter. 149: 235-242.

EPA, Center for Environmental Research Information (1999). **Compendium of Methods for the Determination of Inorganic Compounds in Ambient Air. Continuous Measurement of PM-10 suspended particulate matter (SPM) in ambient air.** EPA/625/R-96/010a.

Evangelou AM. (2002)**Vanadium in cancer treatment.** Critical Reviews in Oncology/Hematology. 42:249-265

Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S.(2005) **Role of mitochondria in toxic oxidative stress.** Mol Interv. 2005 Apr;5(2):94-111.

Fernández, A., Wendt, J., Wolsky, N., Hein, K., Wang, S y Witten, M. (2003) Inhalation **health effects of fine particles from de co- combustion of coal and refuse derived fuel.** Chemosphere.51:1129-1137.

Flores RJ. (2004).**Contaminación Atmosférica. En: Toxicología ambiental.** Lilis A. Albert (ed). México: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.

Forno LS. (1990) **Pathology of Parkinson´s disease: The importance of the substantia nigra and lewy bodies.** In: Stern GM(ed), Parkinson's disease. Baltimore: Johns Hopkins Press,1990:1985-238.

Fortoul TI, Quan-Torres A, Sanchez I, Lopez IE, Bizarro P, Mendoza ML, Osorio LS, ESpejel-Maya G, Avila-Casado Mdel C, Avila-Costa MR, Colin Barenque L, Villanueva DN, Olaiz-Fernandez G.(2002) **Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s.** Arch Environ Health. 57:446-9.

Fortoul TI, Bizarro-Nevaras P, Acevedo-Nava S, Piñón-Zárate G, Rodríguez-Lara V, Colín-Barenque L, Mussali-Galante P, Avila-Casado Mdel C, Avila-Costa MR, Saldivar-Osorio (2007) **Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation.** Reprod Toxicol. 2007 Jun;23(4):588-92. Epub 2007 Mar 27.

Fortoul Teresa I y Avila-Costa Maria Rosa(2007) **Vanadium:its Impact on Health.** Nova Sciencie Publishers, Inc. New Cork pag. 1.

Foster J, Sohrabi H, Verdile G, Martins R (2008). **Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: genetic risk factors, blood biomarkers and olfactory dysfunction.**Int Psychogeriatr. 2008 Aug;20(4):853-5. Epub 2008 Apr 17.

French, R.J & Jones, P. J. H. (1993). Minireview. **Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations.** Life Science. 52: 339-246.

Gándara RMC, Soares SS, Martins H, Gutierrez MC, Aureliano M.(2005) **Vanadate oligomers : In vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers.** Journal of Inorganic Biochemistry. 99: 1238-1244.

García-Alvarez, J., Ramirez, R., Sampieri, C.L, Nuttall, R.K., Edwards, D. R., Selman, M. y Pardo A. (2006)**Sarcoidosis Vasc.** Diffuse Lung Dis. 23, 13-21.

García-Guevara, J. A. (1996) **Una semblanza de la química bioinorgánica del vanadio.** Profesores al día. Puebla, Mexico. 185-189.

Gasche Y, Jean-Christophe Copin, Taku Sugawara, Miki Fujimura and Pak H. Chan (2001) **Matrix Metalloproteinase Inhibition Prevents Oxidative Stress-Associated Blood-Brain Barrier Disruption After Transient Focal Cerebral Ischemia.** Journal of cerebral Blood Flow & Metabolism. 21:1393-1400.

Goedert M, Sisodia SS, Price DL.(1991) **Neurofibrillary tangles and beta deposits in Alzheimer's diseases.** Curr Opin Neurobiol. 1: 441-7.

Gutierrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrian-Gracia ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeno M, Ostrosky-Wegman P. (2006) **Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter.** Environ Mol Mutagen. 47: 199-211.

Guyton A., Hall J., 2001. **Tratado de fisiología médica.** Editorial McGraw-Hill Interamericana, Décima Edición, México.

Haorah J, Ramirez SH, Schall K, Smith D, Pandya R, Persidsky Y.(2007) **Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction.** J Neurochem. 2007 Apr;101(2):566-76. Epub 2007 Jan 23.

HEI Perspectives 2002. Understanding the Health Effects of the Components of the Particulate Matter Mix: Progress and Next Steps. Health Effects Institute.

Herting B, Schulze S, Reichmann H, Haehner A, Hummel T. (2008) **A longitudinal study of olfactory function in patients with idiopathic Parkinson's disease.** J Neurol. 2008 Mar;255(3):367-70

Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV. (2008) **Gender-related changes in increase of dopaminergic neurons in the olfactory bulb of Parkinson's disease patients.** Mov Disord. 2008 Jul 30;23(10):1407-13

Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger W.(2002). **Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblast at doses relevant to occupational exposure.** Mutation Research. 519: 25-35.

Kamata, H. y Hirata, H.(1999) **Redox regulation of cellular signalling.** Cellular signalling 11(1): 1-14.

Katsouyanni, K. and Pershagen (1997) **Ambient air pollution exposure and cancer.** Cancer Causes and Control 8 :284-291

Katzenschlager R, Zijlmans J, Evans A, Watt H, Lees AJ.(2004) **Olfactory function distinguishes vascular parkinsonism from Parkinson's disease.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004 Dec;75(12):1749-52.

Kendrick KM. Da Costa AP, Broad KD, (1997) **Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain.** Brain Res Mol Brain Res. 1997 Jun;46(1-2):63-76.

Kim Yoon, S. and Joh Tong H. (2006) **Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease**. Experimental and Molecular Medicine. 38: 333-347.

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H.(2007) **Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb**. Nature. 2007 Nov 22;450(7169):503-8. Epub 2007 Nov 7.

K, Matsumoto M, Oda T, et al.(1990) **Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death**. Neuroscience 35:551-558.

Lacasaña-Navarro, M, Aguilar-Garduño, C, y Romieu, I. (1999) **Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de América latina**. Salud Publica de México 41:203-215.

Lafleur MA, Drew AF, De Sousa EL, Blick T, Billis M, Walker EC, Williams ED, Waltham M, Thompson EW. (2005). **Upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer xenografts: a major induction of stromal MMP-13**. Int J Cancer 2005; 114:544-554.

Leal, J. (1997). **Guías para la Evaluación de Impacto Ambiental de Proyectos de Desarrollo Local**. ILPES. Santiago, Chile.

Leonard A, Gerber GB. (1994) **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds**. Mutat REs. 317:81-8.

Lorenzl S., Sabine Narr, Barbara Angele, Hans Willi Krell, Jason Gregorio, Mahmoud Kiaei, Hans-Walter Pfister and M. Flint Beal.(2002) **MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease**. Exp Neurol.166-171

Martinez-Cayuela M.(1998) **Toxicidad de Xenobioticos mediada por radicales libres de oxígeno**. Ars Pharmaceutica. 1998. 39:5-18.

Mathison S, Nagilla R, Kompella UB(1998) **Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: fact or fiction?** J Drug Target. 5(6):415-41.

McQuiabban, G.A., Gong. J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I y Overall, C.M.(2000) .Science289, 1202-1206.

Molina, M., J y Molina, L, T. (2004) **Megacities and atmospheric pollution**. Air and Waste Manage Association 54: 644-680.

Monaco, S., Sparano, V., Gioia, M., Sbardella, D., Di Pierro, D., Marini, S. y Coletta, M (2006) **Protein** Sci. 15, 2805-2815.

Montaner Villalonga Joan (2001) **El papel de las metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico**. Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma de Barcelona.

Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ.(2004) **The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis**. Biochim Biophys Acta. 2004 Dec 17;1705(2):69-89. Review

- Morgante L, Rocca WA, Di Rosa AE. et al. (1992) **Prevalence of Parkinson's disease and other types of parkinsonism: A door-to-door survey in three sicilian municipalities**. Neurology 1992; 42:1901-1907.
- Morinville A, Maysinger D, Shaver A. (1998) **From Vanadis to Atropos: Vanadium compounds as pharmacological tools in cells death signaling**. TIPS. 19: 452-460.
- Mujica-Álvarez, V. y Figueroa-Lara, J. (1996) **Contaminación Ambiental causas y control**. UAM-Azcapotzalco, México.
- Murherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwaru A, Chatterjee M. (2004) **Vanadium- an element of atypical biological significance**. Toxicology Letters. 150: 135-143.
- Nagase, H y Woessner, J.F (1999) Matrix **Metalloproteinases**. Minireview. The Journal of Biological Chemistry. 274: 21491-21494.
- Opendakker G. (2001) **New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock**. Verh K Acad Geneesk Belg. 2001;63(6):531-8; discussion 538-41. Review
- Opresko, DM, (1991) **Toxicity summary for vanadium and vanadium compounds**. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, Tennessee.
- Pardo Annie (2008) **Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar**. XXXII Mensaje Bioquímico. Facultad de Medicina UNAM. 39-47.
- Patel BP, Shah PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PS. (2005) **Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma**. J Surg Oncol 2005; 90:81-88.
- Patterson, M. L., Atkinsn , S. J., Knäuper, V., y Murphy, G. (2001) **Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain**. FEBS Lett. 503, 158-162.
- Peinado M.A, M:L: del Moral, F.J. Esteban, E.Martinez-Lara, E.Siles, A. Jiménez, R. Hernandez-Cobo, S. Blanco, J. Rodrigo, J.A.Pedrosa. (2000) **Envejecimiento y neurodegeneración: bases moleculares y celulares**. Rev Neurol 2000; 31(11):1054-1065
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM.(2004) **Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with special reference to activator protein-2, HER-2 and prognosis**. Clin Cancer Res 2004; 10:7621-7628.
- Pérez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A.(1999) **Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis**. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Oct;160(4):1274-82.
- PNUMA.(2002). **Perspectivas del medio ambiente mundial**. GEO-3. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 446 p

Purves, D, Augustine, GL, Fitzpatrick, D, Katz, LC, LaMantia, AS, McNamara, JO, Williams, SM. **The Chemical Senses**. En Neuroscience. Sinauer Associates, INc. Sunderland (MA). 2001 pp 337-367.

Quagliato LB, Viana MA, Quagliato EM, Simis S.(2007) **Olfactory dysfunction** in Parkinson's disease Arq Neuropsiquiatr. 65(3A):647-52.

Rajput AH, Offord KP, BeardCM, Kurland LT. **Epidemiology of parkinsonism: Incidence, clasification and mortality**. And Neurol 1984; 16:278-282.

Riveros –Rosas H, Pfeifer GD, Lynam DR, Pedroza JL, Sanchez AJ, Canales O, Garfias J. (1997) **Personal exposure to elements in Mexico City air**. The Science of the Total Enviroment. 198: 79-96.

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

Rodríguez- Mercado, J.J.Roldan-Reyes, E y Altamirano-Lozano, M, (2003) **Genotoxic effects of vanadium (IV) in human perpheral blood cells**. Toxicology Letters 144:359-369.

Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. **Effect of steroids onCFS matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury**. Neurology 1996-1632

Rosenberg Gary A. (2002) **Matrix Metalloproteinases in Neuroinflamation**. GLIA 39:279-291.

Rosales-Castillo JA, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH(2001) **[Acute effects of air pollution on health: evidence from epidemiological studies]** Salud Publica Mex. 2001 Nov-Dec;43(6):544-55

Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ. (2004) **Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP**. J Cell Biol. 2004 Nov 22;167(4):769-81.

Sáenz Iglesias D. (2007)**Asociación de las metaloproteinasas y sus inhibidores tisulares con el sistema de la fibrinólisis y los marcadores de activación neutrofilica en los derrames pleurales paraneumónicos**. Tesis de Doctorado. En la Universidad Autonoma de barcelona. España.

SCF (2004) Survey of Consumer Finances. <http://www.federalreserve.gov/PUBS/oss/oss2/method.html>.

Segovia De Arana J.M., Mora Teruel F. (2002) ***Enfermedades Neurodegenerativas***. Farma Industria. Serie científica. 53-54

Semarnat, Gobierno del Estado de México, Gobierno del Distrito Federal, SSA, 2002. ***Programa para Mejorar la Calidad del Aire de la Zona Metropolitana del Valle de México 2002-2010***. México.

Shiple J, Waxman DJ.(2004)**Simultaneous, bidirectional inhibitory crosstalk between PPAR and STAT5b**.Toxicol Appl Pharmacol. 199(3):275-84.

Stemlich MD; Werb Z. (2001)**How matrix metalloproteinases regulate cell behavior**.Annu Rev Cell Dev Biol. 17:463-516.

Ster, A., Yin X., Tsang, S.S. Davidson, A y Moon, J. (1993) **Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression**. Biochemistry and Cell Biology 71:103-112.

Thomann Philipp A., Santos Dos Vasco, Toro Pablo, Schönknecht Meter, Essig Marco and Schröder Johannes(2007)**Reduced olfactory bulb and tract volume in early Alzheimer's disease-A MRI study**. Neurobiology of aging. 6: 1-4.

Tolosa E, Gaig C, Santamaría J, Compta Y. (2009) **Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease**.Neurology. 2009 Feb 17;72(7 Suppl):S12-20.

Turpeenniemi-Hujanen T.(2005) **Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers**. Biochimie. 2005 Mar-Apr;87(3-4):287-97. Review.

Valko M, Morris H, Cronin MT. (2005)**Metals, toxicity and oxidative stress**. Curr Med Chem. 2005;12(10):1161-208. Review

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.(2006) **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**. Chemico-Biological Interactions; 160: 1-40

Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermsillo AG, Márquez MF, Cárdenas M. (2003). **Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México**. Gaceta Médica Mexicana. 139: 56-63.

Valverde F.(2003) **The olfactory bulb as a model for experimental studies** Neurologia. 2003 May;18(4):177-86. Spanish

Vega, E., Reyes, E., Sánchez, G., Ortiz, E., Ruiz, M., Chow, J., Watson, J. y Edgerton, S. (2002) **Basic statistics of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere of Mexico City**. The Science of Total Environment 287: 167-176.

Vouk, V. B.; Piver, W.T. (1983) **Metallic elements in fossil fuel combustion products: amount and form of emission and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity**. Environmental health Perspective, 47: 201-205.

Westermann B, Wattendorf E, Scherdtfeger U, HUsner A, Fuhr P, Gratzl O, Hummel T, Bileen D, Welge-Lüssen(2007)**Functional imaging of the cerebral olfactory system in patients with Parkinson's disease**. J Neurol Neurosurg Psychiatry.(1):19-24. Epub 2007 May 22.

WHO, World Health Organization (2001) **Vanadium Pentoxide and other inorganic Vanadium Compounds. International Program on Chemical Safety**. Concise International Chemical Assessment Document 29: 1-52.

Yong Wee V. (2005) **Metalloproteinases: Mediators of Pathology and Regeneration in the CNS**. Nature. Neurociencia. 6:931-944 Review.

Zhao Bing Qiao; Wang, S., Kim H.Y., Storrie, H., Rosen, B.R., Mooney, D.J., Wang, X y Lo, E.L.(2006) ***Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke***. Nature medicine. 32: 441-446.

Zhong BZ, Gu ZW, Wallace WE, Whong WZ, Ong T. (1994) ***Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells***. Mutat Res. 1994 Apr;321(1-2):35-42

www.fimevic.df.gob.mx/problemas/problemasdemov.htm,2002).

<http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/460/particulas.html>.