



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del pentóxido de vanadio en la concentración
de las metaloproteasas (MMP-2 y 9) en estriado,
hipocampo y plexo coroideo en un modelo murino
de exposición por inhalación

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

Presenta:

Estephania Cortés Torres

Directora de Tesis: Dra. Laura Colín Barenque

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: | Cortés |
| Apellido materno: | Torres |
| Nombre(s): | Estephania |
| Teléfono: | 56301751 |
| Universidad: | Universidad Nacional Autónoma de México. |
| Facultad o escuela: | Facultad de Ciencias. |
| Carrera: | Biología |
| Numero de cuenta: | 301217125 |
| 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: | Dra. |
| Apellido paterno: | Montero |
| Apellido materno: | Montoya |
| Nombre(s): | Regina Dorinda |
| 5. Datos del sinodal 3 | |
| Grado: | M. en C. |
| Apellido paterno: | Ustaroz |
| Apellido materno: | Cano |
| Nombre(s): | Martha Luz |
| 6. Datos del sinodal 4 | |
| Grado: | M. en C. |
| Apellido paterno: | Bizarro |
| Apellido materno: | Nevarés |
| Nombre(s): | Patricia |
| 7. Datos del trabajo escrito | |
| Titulo: Efecto del pentóxido de vanadio en la concentración de las metaloproteasas (MMP-2 y 9) en estriado, hipocampo y plexo coroideo en un modelo murino de exposición por inhalación. | |
| Número de paginas: | 72 |
| Año: | 2009 |

🐾 Agradecimientos

Esta tesis se la dedico a mis padres y hermanos

A mi asesora y directora de tesis, Laura Colín Barenque por guiarme y apoyarme en la realización de este proyecto.

Dra. Teresa I. Fortoul, por permitirme trabajar y desarrollar este proyecto en su grupo de investigación.

A mi comité de titulación por concederme un espacio y tiempo para leer mi trabajo:

- Dra. Teresa Fortoul van der Goes
- Dra. Regina D. Montero Montoya
- Dra. Laura Colin Barenque
- M. en C. Martha Luz Ustarroz Cano
- M. en C. Patricia Bizarro Nevares

Al Dr. Paul Carrillo Mora y al Biol. Armando Zepeda Rodríguez que aunque no formaron parte de mi comité de titulación me orientaron en mi trabajo. Gracias por sus comentarios.

A la M. en C. Adriana E. González Villalva, te agradezco todos tus comentarios y apoyo durante toda la realización de mi tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio por su apoyo y comprensión. A Gaby Piñón por su ayuda y orientación desde mi ingreso al laboratorio.

A todos mis amigos a lo largo de toda mi carrera, en particular a mis compañeras de laboratorio y amigas Nallely y Paola.

Al laboratorio de Técnicas Histológicas: Téc. Acad. Verónica Rodríguez Mata,
Téc. Acad. Judith Reyes

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto del PAPIT IN218808

ABREVIATURAS

- A β** proteína β amiloide
- APP** proteína precursora amiloide
- BHE** barrera hematoencefálica
- CA1** cuerno de Amón 1
- CA2** cuerno de Amón 2
- CO** monóxido de carbono
- EP** enfermedad de Parkinson
- LCR** líquido cefalorraquídeo
- MEC** matriz extracelular
- MMPs** metaloproteasas
- MMP2** gelatinasa A
- MMP9** gelatinasa B
- MT-MMPs** metaloproteasa de membrana
- NFG** factor de crecimiento del nervio
- NO₃** radical nitrato
- OH** radical hidroxilo
- O₂** anión superóxido
- O₃** ozono
- PM₁₀** partículas gruesas
- PM_{2.5}** partículas finas
- PST** partículas suspendidas totales
- PTK** proteína tirosina cinasa
- ROS** especies reactivas de oxígeno
- SNC** sistema nervioso central
- SO₂** bióxido de azufre
- TIMPs** inhibidores tisulares de las metaloproteasas
- V₂O₅** pentóxido de vanadio

ÍNDICE

| | PÁG. |
|--|------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y CONTAMINATES | 7 |
| 1.2 PARTÍCULAS SUSPENDIDAS | 8 |
| 1.3 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA. EL CASO DE LA CIUDAD DE MÉXICO | 9 |
| 1.4 CONTAMINACIÓN POR METALES | 11 |
| 2. VANADIO | 11 |
| 2.1 ANTECEDENTES | 12 |
| 2.2 BIOQUÍMICA DEL VANADIO | 12 |
| 2.3 DISTRIBUCIÓN DEL VANADIO | 13 |
| 2.4 USOS DEL VANADIO | 14 |
| 2.5 VÍAS DE ABSORCIÓN DEL VANADIO | 14 |
| 2.5.1 EXCRECIÓN DEL VANADIO | 15 |
| 2.6 TOXICIDAD DEL VANADIO | 15 |
| 2.6.1 ESTRÉS OXIDANTE | 16 |
| 3. METALOPROTEASAS | 17 |
| 3.1 ESTRUCTURA DE LAS METALOPROTEASAS | 19 |
| 3.2 REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS | 20 |
| 3.3 GELATINASAS (MMP2 y MMP9) | 20 |
| 3.3.1 MMP2 (GELATINASA-A) | 21 |
| 3.3.2 MMP9 (GELATINASA-B) | 21 |
| 3.4 METALOPROTEASA EN EL SISTEMA NERVIOSO | 22 |
| 4. GANGLIOS BASALES (ESTRIADO) | 23 |
| 4.2 FUNCIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES | 24 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.3 | GANGLIOS BASALES, CORRELACIÓN CLÍNICA Y METALOPROTEASAS..... | 25 |
| 5. | HIPOCAMPO..... | 26 |
| 5.1 | FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO..... | 27 |
| 5.2 | HIPOCAMPO, CORRELACIÓN CLÍNICA Y METALOPROTEASAS..... | 27 |
| 6. | PLEXO COROIDEO..... | 28 |
| 6.1 | BARRERA HEMATOENCEFÁLICA..... | 30 |
| 6.1.1 | ESTRUCTURA DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA..... | 30 |
| 6.1.2 | BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y METALOPROTEASAS..... | 31 |
| 7. | JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| 8. | OBJETIVOS | |
| 8.1 | OBJETIVO GENERAL..... | 32 |
| 8.2 | OBJETIVOS PARTICULARES..... | 32 |
| 9. | HIPÓTESIS..... | 33 |
| 10. | MATERIAL Y MÉTODO | |
| 10.1 | ANIMALES..... | 34 |
| 10.2 | INMUNOHISTOQUÍMICA..... | 34 |
| 10.3 | DENSITOMETRÍA..... | 34 |
| 10.4 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 35 |
| 10.5 | ESQUEMA METODOLOGÍA..... | 36 |
| 11. | RESULTADOS | |
| 11.1 | INMUNOHISTOQUÍMICA ESTRIADO..... | 37 |
| 11.2 | GRÁFICA METALOPROTEASAS 2 y 9 EN ESTRIADO | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 11.3 INMUNOHISTOQUÍMICA HIPOCAMPO CA1..... | 41 |
|---|-----------|

PÁG.

| | |
|---|-----------|
| 11.4 INMUNOHISTOQUÍMICA HIPOCAMPO CA3..... | 43 |
| 11.5 INMUNOHISTOQUÍMICA HIPOCAMPO GIRO DENTADO..... | 46 |
| 11.6 GRÁFICA METALOPROTEASAS 2 EN HIPOCAMPO (CA1, CA3 y giro dentado).. | 49 |
| 11.7 GRÁFICA METALOPROTEASAS 9 EN HIPOCAMPO (CA1, CA3 y giro dentado).. | 50 |
| 11.8 INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2 PLEXO COROIDEO | 51 |
| 11.9 GRÁFICA METALOPROTEASAS 2 y 9 EN PLEXO COROIDEO..... | 53 |
| 12. DISCUSIONES..... | 54 |
| 12.1 PENTÓXIDO DE VANADIO Y METALOPROTEASAS..... | 54 |
| 12.2 ESTRIADO..... | 55 |
| 12.3 HIPOCAMPO..... | 57 |
| 12.4 PLEXO COROIDEO..... | 58 |
| 13. CONCLUSIONES..... | 59 |
| 13.1 RECAPITULACIÓN..... | 61 |
| 14. ANEXO (INMUNOHISTOQUÍMICA)..... | 62 |
| 15. REFERENCIAS..... | 64 |

RESUMEN

La calidad del aire es alterada por la emisión de contaminantes ya sea de tipo orgánico (alcanos, alquenos, alquinos) o inorgánico que incluye a los metales pesados y óxidos. Dentro de este rubro se incluye al vanadio que es un contaminante atmosférico capaz de formar especies reactivas de oxígeno (ROS), que alteran la quimiodinámica del medio ambiente. En estudios previos se ha comprobado que el pentóxido de vanadio genera alteraciones morfológicas en el estriado, hipocampo y en el epitelio endotelial. Lo anterior puede ser consecuencia de la activación de las metaloproteasas (MMPs), familia de enzimas encargadas del remodelado de la matriz extracelular que participan en procesos neurofisiológicos como la remodelación sináptica.

El objetivo del trabajo fue analizar el efecto del pentóxido de vanadio vía inhalada sobre la inmunolocalización y concentración de las metaloproteasas 2 y 9 en estriado, hipocampo y plexo coroideo.

Para dicho objetivo se utilizaron 20 ratones macho de la cepa CD 1 de 35 gr. que inhalaban pentóxido de vanadio (V_2O_5) al 0.02M, 2 veces a la semana durante una hora. El grupo control se sometió a las mismas condiciones con agua destilada. Posteriormente los ratones se perfundieron vía aorta con solución salina al 0.9% y paraformaldehído al 4%, se sacrificaron a la segunda, tercera y cuarta semana después de la inhalación. Se extrajeron los cerebros y se procesaron por la técnica histológica ordinaria, se realizó inmunohistoquímica para las MMPs 2 y 9 y finalmente se hizo análisis densitométrico con el programa Image-Pro Plus.

Los resultados revelaron un aumento significativo en la concentración de las metaloproteasas para todas las estructuras: estriado, hipocampo y plexo coroideo. Lo anterior se puede explicar ya que el pentóxido de vanadio puede generar especies reactivas de oxígeno que puede activar a la MMP2 y 9, lo que provocaría un daño a la barrera hematoencefálica (degradación de los componentes de la lámina basal)

Esta ruptura de la barrera podría generar alteraciones de estructuras como hipocampo, estriado y plexo coroideo, lo que podría deberse a la degradación de la matriz extracelular, lo que conllevaría a una pérdida en la comunicación celular y por lo tanto muerte neuronal, esto se puede vincular con enfermedades como Parkinson y Alzheimer.

INTRODUCCIÓN

La atmósfera está estructurada en una forma ordenada y adecuada que permite la respiración y la vida en diversa especies animales y vegetales, incluyendo el hombre (López C. *et al* 2001). Sin embargo, nuestra atmósfera se ve afectada por la incursión del hombre (actividades antropogénicas). La calidad del aire se ve afectada por contaminantes ya sea de tipo orgánico que incluye: reacciones con radicales hidroxilo (OH), reacciones con el ozono (O₃) y reacciones con radicales nitrato (NO₃) y contaminantes inorgánicos que incluyen a los metales pesados y óxidos.

Los metales pesados son emitidos a la atmósfera por dos fuentes: las naturales entre las que se encuentran los cuerpos de agua, los suelos, la vegetación, la actividad volcánica, los incendios forestales y gases producidos en pantanos (Betancourt R, 1992; López *et al*, 2001) y las que produce el hombre, (fuentes antropogénicas), tales como la industria, la refinería del petróleo y las calderas industriales, que destacan como principales fuentes de emisión de metales.

Dentro del rubro de metales pesados (con mayor peso atómico al sodio y gravedad específica superior a 5.0) se pueden incluir alrededor de 70 elementos de la tabla periódica, de los cuales, el plomo (Pb), el mercurio (Hg), el arsénico (As), el cromo (Cr), y cadmio (Cd) sobresalen como principales contaminantes atmosféricos y que a su vez han sido en su mayoría ampliamente estudiados. En esta categoría se incluye al vanadio.

El vanadio es un elemento de transición que se ubica en el grupo VB de la tabla periódica de color blanco plateado cuyo peso atómico es 50.9. Este elemento trabaja con las valencias -1 a +5, no obstante, los estados de oxidación +3, +4 y +5 son los más comunes y el estado de oxidación +4 es el más estable (Barceloux, 1999).

El vanadio es un elemento que se encuentra de manera natural en el agua y en la tierra. Las formas de vanadio (III) y el vanadio (V) existen en sistemas biológicos y

en el ambiente (Crans D, A. y Tracey, 1998). La forma pentavalente predomina extracelularmente en los fluidos del cuerpo, mientras que la forma cuadrivalente intracelularmente (Barceloux, 1999). Por su ubicación en la tabla periódica, el vanadio tiene características similares al fósforo, por lo que se comprende el efecto del vanadio en las reacciones de fosforilación en el cuerpo. El pentóxido de vanadio (V_2O_5) es la forma más tóxica y reactiva debido a su estado de oxidación, ya que conforme aumenta la valencia su toxicidad es mayor.

El vanadio es una especie química capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluye a los radicales libres: radical hidroxilo (OH), anión superóxido (O_2^-) etc. Los radicales libres son moléculas independientes que contienen uno o más electrones sin aparear (Lin D. 1993). Lo anterior los hace muy inestables y altamente reactivos, esto les permite combinarse inespecíficamente con moléculas integrantes de la estructura celular y producir moléculas orgánicas disfuncionales (Rangel A., 2001).

Un aumento en la concentración de radicales libres en los organismos puede causar alteraciones como el estrés oxidante, que desempeña un papel importante durante los eventos que desencadenan el daño y la muerte celular (peroxidación de lípidos y proteínas de la membrana, alterando canales iónicos, aumento en la liberación de calcio, producción de óxido nítrico, etc.) durante un proceso neurodegenerativo. (Rivas S. *et al.* 2001).

El tejido del sistema nervioso es uno de los más endebles y vulnerables al estrés oxidante, debido a su alto consumo de oxígeno, alta tasa metabólica, bajos niveles de superóxido-dismutasa y glutatión peroxidasa y casi ausencia de catalasa (Rivas S. *et al.* 2001). No obstante, es importante señalar que las diferentes estructuras cerebrales presentan diferencias en su respuesta al daño oxidante, el hipocampo (sitio aloentróico del sistema límbico en donde se almacena de manera temporal todos los tipos de información) y estriado (control neural del movimiento, memoria motora), presentan una mayor vulnerabilidad a los radicales libres que corteza

frontal. (Rivas S. *et al.* 2001). Se ha reportado que el incremento en la concentración de vanadio (vía inhalada) causa alteraciones en el tejido nervioso: en el estriado se reporta pérdida en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas (Ávila-Costa. *et al.* 2004). En el hipocampo, pérdida de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la región CA1, así como necrosis celular, lo que genera deficiencia en la memoria espacial (Ávila-Costa. *et al.* 2004). Asimismo el pentóxido de vanadio altera la estructura del epitelio ependimal, (ruptura de las uniones entre las células del epéndimo y pérdida de cilios) lo que provoca daño a la barrera hematoencefálica (Ávila-Costa. *et al.* 2005).

Dentro de los cambios que se asocian como derivación del estrés oxidante en el sistema nervioso es lo que nos atañe en dicha investigación, la presencia y activación de las metaloproteasas (MMP-2 y MMP-9).

Las metaloproteasas son proteasas que se encargan de degradar los componentes de la matriz extracelular con ayuda de otras metaloproteasas (matrilisinas, estromelisin, colagenasas). Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son secretadas por los astrocitos, la microglia, las neuronas y el endotelio. Participan en diversos procesos neurofisiológicos: remodelación sináptica, regulación del crecimiento axonal, angiogénesis, etc (Yong Wee *et al.* 2001).

Una sobreexpresión de las metaloproteasas puede resultar en un daño neuronal. Lo anterior se asocia a la patogénesis de enfermedades en el sistema nervioso central: enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, etc. (Magoni *et al.* 2004; Lorenzi S. *et al.* 2002; Yong W. *et al.* 1998). Las MMPs también se vinculan con la ruptura de la barrera hematoencefálica, (Rosenberg G. *et al.* 2002), la cual juega un papel primordial en la eliminación de toxinas endógenas y exógenas

En un estudio previo Colín B. y colaboradores (2008) han reportado un aumento en la actividad de las metaloproteasas (MMP-9 y MMP2) como consecuencia a la

exposición a pentóxido de vanadio; en este trabajo se muestra un incremento en la actividad de la MMP-9 en el tejido cerebral, (hipocampo, estriado, bulbo olfatorio y corteza prefrontal) para el caso de la MMP-2 hay un aumento en las regiones del hipocampo y estriado (Colín B, *et al.* 2008).

Por lo que el presente trabajo analizará el efecto del pentóxido de vanadio vía inhalada en la concentración y distribución de las metaloproteasas (MMP-2 y 9) en hipocampo (CA1, CA2 y giro dentado) estriado y plexo coroideo en un modelo murino.

1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y CONTAMINATES

En los últimos años el índice de contaminación atmosférica se ha incrementado como consecuencia de las actividades antropogénicas. (siderúrgica, refinería del petróleo, calderas industriales, termoeléctricas, etc.). Las zonas urbanas como la Ciudad de México, en donde se han establecido grandes asentamientos humanos, presentan un mayor grado de contaminación ambiental, lo que constituye un desequilibrio en la condición natural de nuestro ambiente (López C. *et al* 2001).

Las sustancias químicas producidas por la actividad del hombre y de la naturaleza, son incorporadas al ambiente alterando su composición. (López C. *et al.* 2001). La contaminación ambiental por lo tanto se puede definir como los cambios producidos por la actividad del ser humano sobre el ambiente con la subsecuente afectación de agua, suelo y atmósfera (Serrano-Sierra *et al.* 1996). Vallejo la define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, ocasionando cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. Mientras que un contaminante atmosférico se define como cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales, algunos ejemplos son: el ozono (O₃), el monóxido de carbono (CO), el bióxido de azufre (SO₂), el bióxido de nitrógeno, y las partículas suspendidas. Dichas sustancias se pueden categorizar en contaminantes orgánicos e inorgánicos.

- **Contaminantes orgánicos:** Compuestos que contienen carbono, hidrógeno, oxígeno, pero también pueden contener nitrógeno y azufre (clorofluorocarbonos, acetaldehído, benceno). Este tipo de contaminante puede efectuar reacciones con radicales hidroxilo (OH), reacciones con el ozono (O₃) y radicales nitrato (NO₃).
- **Contaminates inorgánicos:** Comprende todas las sustancias que no contienen carbono. Dentro de esta categorización, se hace una subdivisión para su estudio: metales pesados, óxidos, asbesto y partículas suspendidas.

1.2 PARTÍCULAS SUSPENDIDAS

Las partículas suspendidas están constituidas por una variedad de sustancias, que pueden ser de origen natural o formarse por reacciones fotoquímicas que se llevan a cabo en la atmósfera. (Gómez-Gómez *et al.* 1998). Estas partículas se componen de partículas sólidas y líquidas que se encuentran en el aire. Diversas fuentes son las responsables de la emisión de las partículas suspendidas: maquinaria, incendios, quema de basura, sustancias químicas precursoras emitidas por los vehículos (quema incompleta de gasolina y diesel), las centrales eléctricas y las plantas industriales. (CEC. org.)

Las partículas suspendidas se clasifican de acuerdo a su tamaño (diámetro aerodinámico), por lo que se engloban en tres grupos: (CEC. org; Bravo A. 1998)

- **Partículas suspendidas totales (PST):** Comprende todos los tamaños de partículas que se encuentran en el aire.
- **Partículas gruesas (PM₁₀):** El diámetro de estas partículas va de 2.5 a 10µm. Se forman a partir de partículas primarias que se emiten directamente a la atmósfera (fuentes naturales como antropogénicas).
- **Partículas finas (PM_{2.5}):** Son partículas con diámetros menores a 2.5 µm. A diferencia de las partículas gruesas, se componen de partículas secundarias, es decir, de partículas que se forman a partir de reacciones químicas. Por ende se forman a partir de aerosoles, polvos y metales pesados como el plomo y el vanadio.

La importancia del tamaño de estas partículas radica en su comportamiento en la atmósfera. Las partículas más grandes no se mantienen por mucho tiempo en el aire, depositándose cerca de su lugar de origen, mientras que las partículas más pequeñas pueden viajar grandes distancias, siendo éstas últimas las más perjudiciales para la salud humana. Lo anterior se debe a que pueden penetrar con mayor facilidad hasta los pulmones, mientras que las gruesas quedan atrapadas en los filtros nasales.

Se ha demostrado que las partículas suspendidas en la atmósfera pueden causar efectos adversos en el ambiente (alterando ciclos químicos y de nutrientes en el suelo y en el agua) y en la salud humana. La exposición a este contaminante se relaciona con cardiopatías y enfermedades respiratorias (asma, bronquitis, efisema) (CEC. org.).

La contaminación atmosférica se ha convertido en un problema de relevancia ambiental, sobre todo en las zonas urbanas como la Ciudad de México.

1.3 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA. EL CASO DE LA CIUDAD DE MÉXICO

La Ciudad de México tiene características y condiciones geológicas propias que contribuyen y favorecen la contaminación del ambiente. Gómez-Gómez *et al.* 1996 y Vallejo M. *et al.* 2002 destacan las siguientes:

La zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) es una cuenca hidrológica situada a 2240 m de altura sobre el nivel del mar, su extensión territorial es de 1,200 km², se encuentra rodeada por montañas que tienen una altura promedio de 1000m: Ajusco, Chichinautzin, Nevada, Las Cruces, Guadalupe y Santa Catarina, siendo la más alta la Sierra del Ajusco; estas montañas actúan como barreras naturales que evitan la circulación libre del aire, por lo tanto los contaminantes quedan estancados en esta cuenca cerrada. La zona metropolitana de México al estar rodeada por montañas, genera una disminución en la concentración de oxígeno (menor al 23%), dando como resultado una disminución en la eficacia de los procesos de combustión interna.

Existe otro fenómeno conocido como inversión térmica (desplazamiento de aire frío del noroeste del país hacia el centro por la presencia de sistemas de alta presión) que favorece el depósito de contaminantes en la superficie (Muñoz C. *et al.* 1998).

Otra condición que favorece la contaminación en el Valle de México (VM) es su localización geográfica, a una latitud de 19°N, dicha ubicación hace que el VM

absorba una mayor cantidad de radiación solar, haciendo a la atmósfera más fotorreactiva; en otras palabras afecta su quimiodinámica, ya que en ella hay una amplia variedad de especies químicas, las cuales se exponen durante el día a la luz solar, siendo capaces de formar radicales libres o especies por reacciones térmicas. (López *et al.* 2001). Por ejemplo los hidrocarburos y los óxidos de nitrógeno reaccionan en presencia de la luz solar y forman contaminantes como el ozono, el monóxido de carbono, el bióxido de azufre entre otros.

Aunado a sus particularidades geográficas, la zona metropolitana del Valle de México concentra la mayor población y actividad económica del país (Muñoz C. *et al.* 1998). Existen alrededor de 40000 industrias, de la cuales 5000 están consideradas como altamente contaminantes y 400 son críticas en la producción de contaminantes (Gómez-Gómez. *et al.* 1998).

El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reporta que México ocupa el lugar número 11 en el mundo y el tercero en América en monto de población. Hasta el año del 2005, las cinco zonas metropolitanas mayores (Edo. de México, Distrito Federal, Veracruz, Jalisco y Puebla) concentraban 30.2% de los habitantes del país, ascendiendo la población del Valle de México a 19.2 millones. (El Universal, 2008). Este aumento poblacional genera un mayor consumo y demanda de energía y de combustible fósil, en el Valle de México se consumen diariamente 20 millones de litros de gasolina, siendo el parque vehicular el responsable del 80% de la contaminación, emitiendo diariamente 400 toneladas de hidrocarburos (HC), 4600 de monóxido de carbono (CO), 700 de óxidos de nitrógeno (NO), 80 de dióxido de azufre (SO₂) y dos de plomo. (Serrano S. *et al.* 1996). Otro contaminante producto de la quema de combustibles fósiles es el vanadio, componente natural de la gasolina mexicana. (Mussali G. *et al.* 2005). En el año de 2002 se reporta un incremento en la concentración de este metal en autopsias de residentes de la Ciudad de México (Fortoul *et al.* 2002). Se hizo un estudio comparativo entre niños y perros que viven en la Ciudad de México y un grupo control que vive en una ciudad con bajos niveles de contaminación y se observó que los niños y perros que residen en la Ciudad de México exhiben evidencia de ruptura

de la barrera del epitelio nasal y de la barrera hematoencefálica, así como inflamación crónica en el cerebro (Calderón G. *et al.* 2008).

1.4 CONTAMINACIÓN POR METALES

Los metales como ya se había mencionado son contaminantes de tipo inorgánico. Existen dos tipos de emisión de metales al ambiente: las fuentes naturales (cuerpos de agua, suelos, actividad volcánica, incendios forestales) y la antropogénica (combustión de petróleo y sus derivados, industria). (Betancourt R. 1992)

La toxicidad de un metal está sujeta al tipo de compuesto (orgánico o inorgánico) y sus características de hidro o liposolubilidad que determina su toxicocinética. Las biomoléculas más afectadas por los metales son las proteínas con actividad enzimática, por lo que su efecto es multisistémico (Ferrer A. 2003)

El efecto de los metales en el sistema nervioso ha sido ampliamente reportado, existe evidencia sustancial de que la acumulación de elementos traza tales como el aluminio, el plomo, el cadmio y el mercurio se asocian a enfermedades como el Alzheimer. (Bharathi *et al.* 2006). Nuestro grupo de laboratorio ha reportado los efectos del vanadio en el sistema nervioso. En el estriado la pérdida de espinas de las neuronas espinosas medianas (Ávila-Costa. *et al.* 2004). En el hipocampo, pérdida de espinas dendríticas de la neuronas piramidales de la región CA1 y deterioro de la memoria espacial, (Ávila-Costa. *et al.* 2004) así como la ruptura de las uniones entre las células endimarias (Ávila-Costa. *et al.* 2005).

2. VANADIO

El vanadio es un contaminante inorgánico. Es una especie química que forma especies reactivas de oxígeno (ROS), que alteran la quimiodinámica del medio ambiente. La toxicidad del vanadio aumenta conforme a su valencia, por ende el pentóxido de vanadio es la forma más reactiva. Cabe mencionar que dichas especies incluyen a los radicales libres, los cuales se asocian con daño y muerte

celular. (Rivas S. *et al.* 2001). Por tanto al ser un compuesto que se encuentra en estrecha relación con los seres vivos, representa un riesgo en la integridad y salud de los mismos.

2.1 ANTECEDENTES

El vanadio es un elemento que fue descubierto en el año de 1813. Sin embargo, Andrés Manuel del Río fue el primer químico en proponer al vanadio como un nuevo elemento (Mukherjee B. *et al.* 2004). En 1830 el químico Nils Sefstrom purifica vanadio en la forma de óxido. Se acuña posteriormente el nombre de vanadio por la diosa Vanadis (diosa de la belleza y de la fertilidad), debido a la belleza de dicho metal. (Tsiani E. *et al.* 1997)

Para el año de 1911 se reportaban los primeros efectos nocivos del vanadio. Dutton indicaba que la exposición ocupacional al polvo y humo del óxido de vanadio causaba tos e irritación en los ojos (Barceloux. 1999).

El vanadio es un elemento ultra-traza en los mamífero, estudios han sugerido a este metal como esencial en otras especies animales como las gallinas y las ratas (Tsiani E. *et al.* 1997). En el tejido animal se acumula predominantemente en hueso, hígado, riñón y pulmón (Capella M. *et al.* 2007).

2.2 BIOQUÍMICA DEL VANADIO

El vanadio es un elemento de transición de color blanco grisáceo que se encuentra en el grupo VB de la tabla periódica, su símbolo químico es V, su número atómico es 23 y su peso atómico es de 50.942. El vanadio se combina con otros elementos como el azufre, el oxígeno y el sodio.

Es un metal que trabaja con las valencias de -1 a +5, pero las valencias más comunes son de +3, +4 y +5. La forma pentavalente predomina extracelularmente en los fluidos del cuerpo, mientras que la forma cuadrivalente intracelularmente. Lo

anterior ayuda ha explicar que el vanadio tiene características similares al fósforo, por lo que se entiende el efecto del vanadio en las reacciones de fosforilación en el cuerpo (Tsiani E. *et al* 1997; Barceloux. 1999). Interfiere en los sistemas enzimáticos: ATPasa, cinasas, ribonucleasas y fosfatasas. (Mukherjee B, *et al*. 2004)

2.3 DISTRIBUCIÓN DEL VANADIO

El vanadio es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre (alrededor de 0.05 g/kg), ocupa el lugar 22 en abundancia. Las concentraciones de vanadio varían de acuerdo a la fuente de emisión: en la tierra su rango oscila de 10 a 360 mg/kg, en el agua de 1 a 30 µg/l, en el aire su rango oscila de 6 a 1320 ng/m³ y en tejido humano y animal de 5-20 nM (Goc. A. 2006). Se estima que los humanos reciben alrededor de 10-70 mg de vanadio por día (Parsadonian H.K. *et al*. 1998), mientras que la emisión de vanadio anual en la atmósfera es de aproximadamente 66000 toneladas (Byczkowski J *et al*. 1998). A continuación se detallará cada fuente de origen:

- **Aire:** La exposición general de la población al vanadio resulta de la combustión del petróleo, carbón y aceites pesados durante la generación de electricidad y calor (Mussali P. *et al*. 2005). Las concentraciones de vanadio en el petróleo varía de acuerdo a su sitio de origen, por ejemplo, el rango de vanadio en el petróleo crudo del occidente de Venezuela y de la zona Maya de México es de 3 a 273 µg (Fortoul T. *et al*. 2007). Asimismo la industria de la metalurgia, las emisiones volcánicas, contribuyen a la presencia de vanadio en la atmósfera (Barceloux. 1999).
- **Tierra:** El vanadio está ampliamente distribuido como un metal traza, que ocupa el lugar 22 en abundancia. En la corteza terrestre existe naturalmente en un número de minerales en estados de oxidación III, IV y V (Crans D. A. Tracey. 1998)

- **Agua:** El agua no es una fuente importante de exposición, ya que contiene cantidades muy bajas de los límites detectables. En los ríos, lagos y océanos el vanadio existe en forma monomérica (oxoanion), este produce el pH natural en el agua (Crans D. A. Tracey. 1998). En varias especies marinas este metal es un elemento esencial (Mukherjee *et al.* 2004).

- **Alimento:** Los alimentos contienen bajas cantidades de vanadio (<1 ng/g), como los cereales, los hongos, los mariscos, el eneldo y los pimientos, estos últimos contienen mayor cantidad de vanadio que los cereales. (Mukherjee *et al.* 2004; Barceloux. 1999)

- **Ocupacional:** Producida por la industria de la metalurgia, el vanadio se encuentra en un porcentaje de 1 V/M³. Los altos niveles de vanadio son producto de la limpia de calderas (resultado de las altas concentraciones de oxido de vanadio en el polvo) (Barceloux. 1999).

2.4 USOS DEL VANADIO

Los usos del vanadio son diversos, en la industria se ocupa como catalizador, específicamente el pentóxido de vanadio se utiliza en la producción de ácido sulfúrico, también es empleado en la fabricación de la cerámica y las tintas (contienen alrededor de 15% de pentóxido de vanadio), de igual forma es aprovechado como agente colorante. El óxido de vanadio se usa en la fabricación de partes de automóviles y en la manufactura de herramientas de acero, etc. (Fortoul T *et al.* 2007; Rodríguez-Mercados y Altamirano-Lozano. 2006). El VOSO₄ fue utilizado por algún tiempo como complemento alimenticio (Crans D. A. Tracey. 1998).

2.5 VÍAS DE ABSORCIÓN DEL VANADIO

El vanadio es absorbido por el organismo por medio de las siguientes vías (Fortoul T *et al.* 2007; Mukherjee *et al.* 2004; Barceloux. 1999)

- **Vía oral:** El vanadio es pobremente absorbido por el tracto gastrointestinal, sólo se absorbe <1-2% (Barceloux. 1999). El vanadio ingerido es transformado en la forma de catión vanadil antes de ser absorbido por el duodeno, esto es posible gracias a la acción de una reductasa dependiente de NADH.
- **Vía inhalada:** Es la principal ruta de entrada del vanadio, principalmente en personal ocupacional. Se estima que por esta vía se absorbe alrededor del 90% del vanadio (Leonard A. *et al.* 1994)
- **Vía dérmica:** Esta vía de absorción es la menos importante debido a la baja solubilidad del vanadio (Barceloux. 1999).

2.5.1 EXCRECIÓN DEL VANADIO

El vanadio es excretado principalmente por la vía urinaria (Fortoul T. *et al.* 2007). A través de la administración parenteral de vanadio, se muestra que alrededor del 10% de vanadio es hallado en las heces de humanos y ratas (Barceloux. 1999). Se ha reportado que el vanadio es excretado a través de la bilis y la orina (Mukherjee B. *et al.* 2004).

2.6 TOXICIDAD DEL VANADIO

Se ha reportado la citotoxicidad del vanadio ampliamente. Como ya se mencionó, los componentes del vanadio interfieren con la actividad de diferentes ATPasas: cinasas, ribonucleasas, fosfatasas (Na⁺/k⁺), ADN polimerasas, peroxidasas, etc. (Goc. A. 2006; Mukherjee B. *et al.* 2004; Byczkowski J. *et al.* 1998; Tsiani E. *et al.* 1997). Asimismo inhibe o estimula la actividad de diversas enzimas de DNA y RNA induciendo efectos mutagénicos y teratogénicos (Mukherjee B. *et al.* 2004). Se ha demostrado que el pentóxido de vanadio es capaz de inducir daño al DNA (Mussali P. *et al.* 2007).

El vanadio puede participar en las reacciones de fosforilación debido a la similitud química que tiene con el fósforo (situados en el mismo grupo de la tabla periódica,

trabajan como la valencia +5). En el sistema nervioso se ha comprobado que el vanadio genera alteraciones en el metabolismo del fósforo (inhibe enzimas que participan en la fosforilación) (Parsadanian *et al.* 1998).

Se ha comprobado que en animales expuestos a este metal, provoca parálisis de piernas, fallo respiratorio, convulsiones, etc. En un modelo con ratas adultas expuestas a metavanadato vía intraperitoneal (1.25 V/Kg) se ha comprobado que el vanadio inducen peroxidación lipídica, ya que la alta concentración de ácidos grasos polisaturados en el SNC (mielina) incrementa la susceptibilidad a daño peroxidativo. En este mismo modelo se demuestran cambios en la actividad locomotora de las ratas, así como un decremento de la mielina en el cuerpo calloso y cerebelo (García G. *et al.* 2004).

Se sabe que el vanadio puede generar estrés oxidante (Byczkowski J. *et al.* 1998), como consecuencia de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

2.6.1 ESTRÉS OXIDANTE:

El estrés oxidante es un proceso patofisiológico en el se presenta un exceso de pro-oxidantes o un déficit en las defensas antioxidantes, que se caracteriza por altos niveles de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (Rivas S. *et al.* 2001)

El vanadio es capaz de formar ROS, este proceso involucra la reducción de una molécula de oxígeno (cadena de transporte de electrones mitocondrial) a través de la reacción tipo Fenton (Goc. A. 2006; Zhuo Z. *et al.* 2001):



Las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer se han asociado a estrés oxidante. Se piensa que una consecuencia del incremento del estrés oxidante puede ser la activación de las metaloproteasas (Martín-Aragón *et al.* 2009; Wright J. *et al.* 2004; Lorenzi S. *et al.* 2002).

3. METALOPROTEASAS

La matriz extracelular (MEC) es todo aquel material que se encuentra fuera de la célula. Esta matriz extracelular está compuesta por 3 clases de biomoléculas: las proteínas estructurales (colágeno y elastina), las proteínas especializadas (fibronectina y laminina) y proteoglicanos (proteínas de gran tamaño a las que se les unen cadenas de azúcares como glicosaminoglicanos). Algunas de sus funciones son separar tejidos y órganos, a pesar de que en los años 60's sólo se creía que la MEC era una simple estructura para atrapar desechos y material residual, actualmente se sabe que es un sistema dinámico que está involucrado en diversas funciones: moduladora de crecimiento, migración celular, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, reparación de tejidos, almacenamiento para factores de crecimiento, etc. Por lo tanto la MEC desempeña una función fundamental en la arquitectura tisular y en la regulación de la homeostasis celular. (Castillo J. *et al.* 2004)

La remodelación de la MEC requiere de dos procesos antagonistas: síntesis y deposición de nuevos componentes de la MEC y la destrucción proteolítica de otros. (Castillo J. *et al.* 2004). En dichos procesos participa una familia de proteasas conocidas como metaloproteasas de matriz (MMP).

Las metaloproteasas reciben dicho nombre precisamente por su capacidad de adherirse a la superficie celular y a otras proteínas y remodelar la MEC (Ethell I. *et al.* 2007), se pueden definir entonces como proteasas o enzimas proteolíticas que se encargan de degradar y remodelar la MEC, es decir, regulan el microambiente celular (Ozlem B *et al.* 2007; Mannello F. *et al.* 2005; Soria A. *et al.* 2005; Castillo J. *et al.* 2004; Szklarcyk A *et al.* 2002; Fujimura M. *et al.* 1999).

La base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>) las clasifica dentro de la familia M10 de la clase metaloproteasas, que cuenta con alrededor de 24 miembros de MMP en mamíferos (MMP1-28), cada una es producto de un diferente gen (Fig.1). La división se hace de acuerdo a su estructura dominio. Dentro

de esta gran familia existen 6 miembros conocidos como tipo membrana, o metaloproteasas de membrana (MT-MMPs). Algunos de los miembros más representativos son las colagenasas, estromelinas, gelatinasas, matrilasas y MMP tipo membrana. (Yong Wee. 2005; Yong Wee *et al.* 2001). Se han encontrado otros miembros en el interior de la célula y se ha sugerido que actúan sobre sustratos intracelulares. (Pardo A. 2008)

Table 1 | **Matrix metalloproteinase family members**

| Member | Name | M latent/ active (kDa) | Furin activation site | Collagen substrates | Pro-MMP substrates | Other matrix substrates* |
|--------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| MMP1 | Collagenase 1 | 55/45 | | I, II, III, VII, VIII, X | 2, 9 | Agg, Gel, PG |
| MMP2 | Gelatinase A | 72/66 | | I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV | 1, 9, 13 | Agg, EL, FN, Gel, LN, PG, VN |
| MMP3 | Stromelysin 1 | 57/45 | | III, IV, IX, X, XI | 1, 7, 8, 9, 13 | Agg, EL, FN, Gel, LN, PG, VN |
| MMP7 | Matrilysin | 28/19 | | IV, X | 1, 2, 9 | Agg, Casein, EL, FN, Gel, LN, PG, VN |
| MMP8 | Collagenase 2 | 75/58 | | I, II, III, V, VI, VIII, X | | Agg, EL, FN, Gel, LN, |
| MMP9 | Gelatinase B | 92/86 | | IV, V, VII, X, XIV | | Agg, EL, FN, Gel, PG, VN |
| MMP10 | Stromelysin 2 | 57/44 | | III, IV, V, IX, X | 1, 8 | Agg, EL, FN, Gel, LN, PG |
| MMP11 | Stromelysin 3 | 51/44 | Yes | | | |
| MMP12 | Metalloelastase | 54/45/22 ¹ | | IV | | Casein, EL, FN, Gel, LN, PG, VN |
| MMP13 | Collagenase 3 | 60/48 | | I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV | 9 | Agg, FN, Gel |
| MMP14 | MT1-MMP | 66/56 | Yes | I, II, III | 2, 13 | Agg, EL, FN, Gel, LN, |
| MMP15 | MT2-MMP | 72/60 | Yes | | 2 | Agg, FN, Gel, LN |
| MMP16 | MT3-MMP | 64/52 | Yes | III | 2 | Gel, FN |
| MMP17 | MT4-MMP | 57/53 | Yes | | | Fibrinogen/fibrin |
| MMP18 | Collagenase 4 | 70/53 | | I | | |
| MMP19 | RAS11 | 54/45 | | IV | | Gel, FN, LN |
| MMP20 | Enamelysin | 54/22 | | | | Amelogenin |
| MMP21 | Xenopus MMP | 70/53 | Yes | | | |
| MMP22 | Chick embryo MMP | 51/42 | | | | Casein, Gel |
| MMP23 | | | Yes | | | |
| MMP24 | MT5-MMP | | Yes | | 2 | Gel |
| MMP25 | MT6-MMP | | Yes | IV | | Gel, FN |
| MMP26 | Matrilysin 2/endometase | 28/19 | | | | Gel |
| MMP27 | Human MMP22 ² | | | | | |
| MMP28 | Epilysin | 56/45 | Yes | | | Casein |

Fig. 1 Miembros de la familia de metaloproteasa. Miembro abreviado, nombre que recibe de acuerdo al sustrato que degradan, peso kDa del sitio activo, sustrato que degradan, sustrato de la Pro-MMP (en algunos casos es necesaria para la activación de ellas mismas), y otros sustratos de matriz (Yong Wee *et al.* 2001).

3.1 ESTRUCTURA DE LAS METALOPROTEASAS

La estructura de todos los miembros en general es muy similar, es una secuencia de aminoácidos, que se encuentra conformada de la siguiente manera (Fig. 2 Estructura General de las metaloproteasas): (Pardo A. 2008; Castillo J. *et al.* 2004 Yong Wee *et al.* 2001)

- **Prodominio:** Conformado por un péptido señal y un propéptido
- **Dominio catalítico o sitio catalítico:** Constituido por átomos de zinc y calcio, que activan una molécula de agua en la hidrólisis del enlace peptídico del sustrato. Todas las metaloproteasas están unidas a un ión zinc. Su sitio activo usa 3 residuos de histidinas en la secuencia HExxHxxGxxH (x es cualquier aminoácido, dependiendo del miembro).
- **Dominios adicionales:** En su gran mayoría las metaloproteasas tiene dominios adicionales, su importancia radica en el reconocimiento del sustrato y su unión con los TIMPs (Inhibidores tisulares de las metaloproteasas). Algunos de ellos son las llamadas regiones hemopexina y fibronectina.
- **Región bisagra o hendidura para furina:** Sitio específico para la ruptura o modificación estructural de la proteasa.

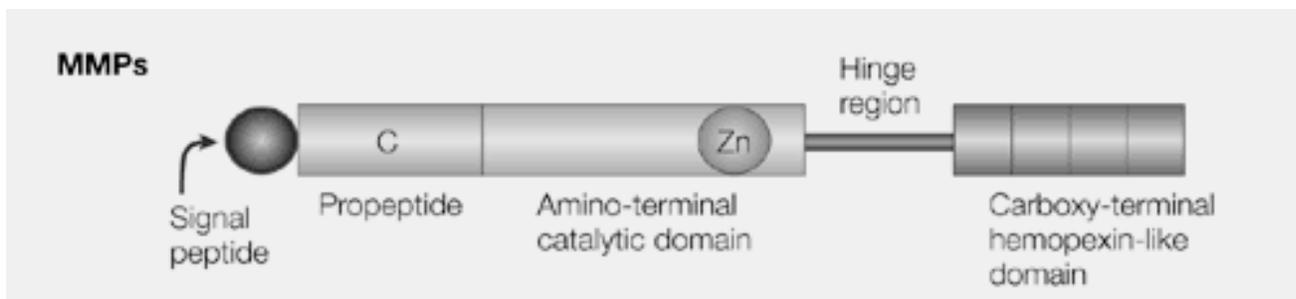


Fig. 2 Estructura General de las Metaloproteasas. Prodominio (compuesto por el péptido señal y el propéptido), el sitio catalítico (región de zinc y calcio), Región bisagra (ruptura y modificación estructural, para su activación) y dominios adicionales (hemopexina, fibronectina) (Yong Wee *et al.* 2001)

3.2 REGULACIÓN DE LAS METALOPROTEASAS

En un tejido normal la expresión de las metaloproteasas es muy baja, sus niveles son casi indetectables, por lo que su regulación está altamente controlada y se da en tres niveles: (Pardo A. 2008; Ethell I *et al.* 2007; Dzwonek J. *et al.* 2004; Yong Wee *et al.* 2001)

- **Nivel transcripcional:** Pueden ser activadas en respuesta a oncogenes, factores de crecimiento, citocinas y hormonas.
- **Activación de proenzimas:** Las metaloproteasas son secretadas como zimógenos, para su activación es necesaria la liberación o exposición del sitio catalítico, es decir, el propéptido se tiene que separar del resto de la cadena de la MMP. Por ende la activación se logra por la acción de proenzimas, que pueden ser otros MMPs u otras proteasas (serina).
- **Inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs):** Es el último nivel de regulación de las MMPs. Su actividad está controlada por la interacción de ellas con el TIMP. Existen 4 miembros reconocidos que provocan su inhibición, TIMP1 al TIMP4. El TIMP se une al sitio catalítico evitando su activación. Actualmente se reconoce que estos inhibidores participan en otros procesos: proliferación, muerte celular.

3.3 GELATINASAS (MMP2 y MMP9)

Las gelatinasas son un miembro de la familia de las metaloproteasas designadas como MMP2 (gelatinasa A) y MMP9 (Gelatinasa B). Ambas gelatinasas se encuentran en el sistema nervioso, y son secretadas por los astrocitos, la microglia y las neuronas. (Lorenzi S. *et al.* 2002).

Como se mencionó, las gelatinasas tienen una estructura similar a la de todas las metaloproteasas, la diferencia radica en que tiene insertado en el sitio catalítico un dominio de fibronectina tipo II, que tiene alta afinidad para unirse a gelatina y elastina (Fig. 3). (Yong Wee *et al.* 2001)

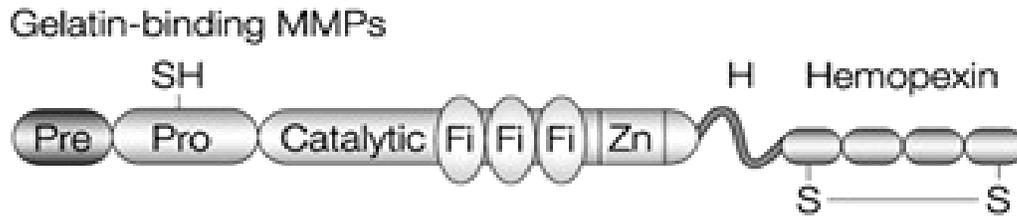


Fig. 3 Estructura de las Gelatinasas (MMP's 2 y 9). Prodominio, sitio catalítico en el que tiene insertado un dominio de fibronectina tipo II y un dominio adicional.

3.3.1 MMP2 (GELATINASA-A)

Metaloproteasa que se encuentra presente en el sistema nervioso y en el líquido cefalorraquídeo. Su peso molecular es de 72 kDa (Castillo J. *et al.* 2004). Se ha documentado que los activadores fisiológicos de la proMMP-2 son las metaloproteasas tipo membrana. La MMP-2 degrada un amplio rango de sustratos como colágena tipo IV, gelatina, elastina, fibronectina y en menor cantidad colágenas fibrilares (Pardo A. 2008; Wright J. *et al.* 2004). Se plantea que esta gelatinasa participa en funciones anti-inflamatorias y homeostáticas al inactivar quimiocinas inflamatorias y regular el recambio de tejido conectivo (Pardo A. 2008).

3.3.2 MMP9 (GELATINASA-B)

Esta gelatinasa se encuentra presente en el sistema nervioso y en el líquido cefalorraquídeo, pero su concentración es menor que la MMP2, no obstante, tiene una respuesta muy alta en procesos inflamatorios. Su peso molecular es de 92 kDa (Castillo J. *et al.* 2004). El sustrato más importante con el que trabaja esta gelatinasa es el colágeno tipo IV (Opdenakker *et al.* 2001). La expresión de la MMP-9 está regulada por la expresión de algunos genes como AP-1 y NF- κ B (Dzwonek J. *et al.* 2004).

3.4 METALOPROTEASA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Las metaloproteasas juegan un papel importante en el sistema nervioso central (SNC). Un desbalance en la activación de las metaloproteasas y sus inhibidores tisulares (TIMPs) puede ocasionar alteraciones celulares y lesiones del tejido nervioso (Campbell I. *et al.* 1999).

Las metaloproteasas pueden trabajar en beneficio o en detrimento del SNC. De manera benéfica participan en la regulación de procesos tales como: (Ethell I. *et al.* 2001; Yong Wee. 2005)

- **neurogénesis:** No se ha definido el papel que tienen las metaloproteasas en la neurogénesis, una propuesta es que modulan la matriz extracelular para guiar células precursoras, por ejemplo, la migración de oligodendrocitos progenitores. Las MMPs 2 y 9 están involucradas en la morfogénesis del cerebelo.
- **crecimiento axonal:** La actividad de las metaloproteasas se localiza en el cono axonal (sitio del crecimiento del axón). El factor de crecimiento del nervio (NFG) incrementa la expresión de las metaloproteasas que ayudan a la orientación axonal permitiendo las conexiones sinápticas.
- **sinaptogénesis:** Las MMPs pueden influenciar el desarrollo de las espinas dendríticas, la estabilidad sináptica y el remodelado. La expresión de la MMP9 induce aumento en la actividad sináptica en el sistema límbico, se propone que las metaloproteasas podrían regular la actividad sináptica, por lo tanto la memoria y el aprendizaje (Bozdagi O. *et al.* 2007; Szklarczyk A. *et al.* 2002).

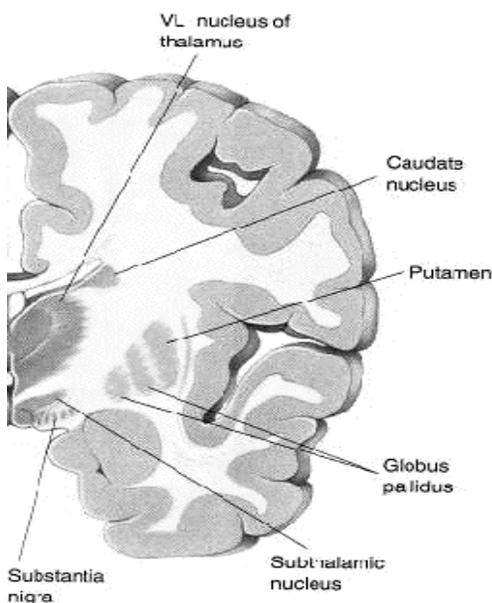
En condiciones patológicas del SNC como diversas clases de tumores (incluyendo astrocitomas, neuroblastomas y meningiomas) hay una sobreexpresión de MMPs y un decremento en los TIMPs 1 y 4 (Groft *et al.* 2001). Existe evidencia de que las metaloproteasas son esenciales para la metastasis (Wright J. *et al.* 2004; Kaczmarek *et al.* 2002). Se ha documentado que la actividad anormal de las MMPs 2 y 9 juega un papel importante en la patofisiología de la isquemia cerebral, lo anterior se ha corroborado en modelos con ratas, primates y humanos. En el cerebro de roedores

existe un aumento de las metaloproteasas paralela a la ruptura de la barrera hematoencefálica y a la respuesta inflamatoria posterior a la isquemia focal (Magnoni S. *et al.* 2004). Asimismo se han vinculado con procesos neurodegenerativos como la esclerosis múltiple, se ha demostrado que estas proteasas (capaces de catalizar la degradación de la mielina) están presentes en el fluido cerebroespinal de pacientes con dicha enfermedad (Yong Wee *et al.* 1998). Otras dos patologías en las que se encuentran implicadas son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, en las que se describe un incremento en la expresión de las MMPs 2 y 9 en las estructuras de hipocampo y estriado (Martín-Aragón *et al.* 2009; Wright J. *et al.* 2004; Lorenzi S. *et al.* 2002).

4. GANGLIOS BASALES (ESTRIADO)

El control neural del movimiento es el resultado de la interacción de estructuras neuronales corticales y subcorticales. Dentro de estas estructuras subcorticales, destacan tres: los ganglios basales, el cerebelo y el sistema mesencefálico dopaminérgico.

Los ganglios basales son un grupo de núcleos interconectados que participan en funciones motoras, haciendo referencia a los núcleos caudado, putamen, globo pálido, *nucleus accumbens septi* y tubérculo olfatorio. (Adelk A, *et al.* 2006).



El putamen se ubica lateralmente respecto del globo pálido y medial en relación con la cápsula externa. Se encuentra separado del núcleo caudado por la cápsula interna. El estriado posee una compartimentalización conocida como organización parche/matriz (o estriosomas/matriz), formada por la segregación de neuronas espinosas medianas. La división parche/matriz del estriado está relacionada con sus conexiones aferentes y eferentes y con la organización laminar de la corteza (Mena S. *et al.* 2001).

El estriado está compuesto por una vasta población neuronal de aproximadamente 2.79 millones de neuronas por hemisferio. La población celular del estriado la conforman las neuronas espinosas y las neuronas sin espinas. Las neuronas espinosas representan el 95% de la población, son llamadas propiamente “neuronas espinosas medianas de proyección”, estas neuronas contienen GABA como neurotransmisor y diversos neuropéptidos: sustancia P, encefalina, neurotensina, dinorfina y colecistocina. (Mena S. *et al.* 2001).

Las neuronas sin espinas, son neuronas intrínsecas (interneuronas) que conforman el 5% de la población. Se dividen en cuatro tipos: colinérgico grande, GABAérgico pequeño y contenedoras de parvalbúmina (la población más grande). Estudios inmunocitoquímicos demostraron la presencia de interneuronas dopaminérgicas intrínsecas en el estriado. Este tipo de neuronas de forma normal no están presentes en el estriado; pero hay un aumento cuando se interrumpe la aferencia dopaminérgica al estriado, como sucede en la patología de Parkinson. (Adelk A. *et al.* 2006).

4.2 FUNCIÓN DE LOS GANGLIOS BASALES

En un inicio se pensaba que los ganglios basales sólo intervenían en funciones de movimiento voluntario, actualmente se acepta que los ganglios basales, gracias a su interacción con la corteza cerebral contribuye a la realización de funciones esquelomotoras, oculomotoras, cognitivas e incluso emocionales (Kandel *et al.* 2001).

Los ganglios basales establecen conexiones amplias y bien organizadas con toda la corteza cerebral, así como con el hipocampo y el núcleo amigdalino.

En lo que respecta al movimiento, la información que fluye de la corteza a los ganglios basales se inicia con una instrucción de la corteza al estriado que comienza la acción en las neuronas estriatales. La aferencia al tálamo sirve para actualizar al estriado sobre la actividad en otros sistemas relacionados con el movimiento. Finalmente el estriado integra y alimenta información en el globo pálido y la parte

reticular de la sustancia nigra que influye en la actividad del tálamo y otros blancos (Adelk A. *et al.* 2006).

4.3 GANGLIOS BASALES, CORRELACIÓN CLÍNICA Y METALOPROTEASAS

Uno de los principales trastornos motores de los ganglios basales es la enfermedad de Parkinson (EP) un desorden neurodegenerativo de etiología desconocida que se produce por la muerte celular acelerada de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (Lorenzl S *et al.* 2002), que manda proyecciones al cuerpo estriado dando como consecuencia una pérdida dramática en el contenido de dopamina en ésta región cerebral. Dicha pérdida resulta de capital importancia debido a que cerca del 80% de la dopamina cerebral se encuentra concentrada en el cuerpo estriado. Se requiere que mueran entre un 80 y 90% de las neuronas dopaminérgicas nigrales para que los síntomas y signos de la enfermedad de Parkinson se hagan evidentes. Actualmente se cree que los signos que constituyen el parkinson aparecen cuando la pérdida de las neuronas dopaminérgicas excede un umbral crítico, que se cree corresponde al 70-80% de las terminales nerviosas y un 50-60% de los cuerpos celulares en el SNC (Escobar A. 2003). Después de la primera aparición de los signos clínicos, la muerte neuronal continúa y las alteraciones motoras se incrementan, aunque esta evolución es lenta (; Kandel *et al.* 2001).

Se ha documentado que las metaloproteasas podrían estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Se han medido los niveles de las metaloproteasas 2 y 9 en el tejido cerebral (postmortem) de enfermos de Parkinson encontrando niveles elevados de la metaloproteasa 9 en las neuronas, lo que se podría vincular con la pérdida neuronal en dicha enfermedad. En la enfermedad de Parkinson ya se habían descrito cambios en la matriz extracelular, por lo que se postula que probablemente el sistema MMP/TIMP juegue un papel importante en dicha enfermedad, ya que las MMPs pueden ejercer un efecto neurotóxico directo o indirecto causando la muerte celular de la neuronas debido a la degradación de

proteínas de la matriz extracelular, lo que podría ser importante para la regeneración del circuito neuronal después de la lesión (Lorenzl S *et al.* 2002).

5. HIPOCAMPO

El hipocampo topológicamente se encuentra situado en la parte medial del lóbulo temporal (Kim J *et al.* 2002), es la región más grande que constituye la formación hipocámpica (Adelk A. *et al.* 2006), es el sitio alocéntrico del sistema límbico en donde se almacena de manera temporal todos los tipos de información. En el humano se asocia a la habilidad intelectual, constituyendo una estructura cerebral que juega un papel crucial en la memoria, como en la regulación neuroendócrina de las hormonas del estrés (Díaz-Cintra. *et al.* 2001; Kim J *et al.* 2002).

En un inicio Ramón y Cajal describió las laminaciones y divisiones de dicha estructura de la siguiente forma, siete láminas que actualmente se agrupan en tres capas mayores: molecular, de células piramidales y *stratum oriens* (capa polimorfa). De forma adicional el hipocampo se subdivide en campos, que se designan como cuernos de Amón, que va del 1 al 4 (CA1-CA4) (Adelk A. *et al.* 2006). Por lo tanto se pueden englobar las regiones del hipocampo en 3 regiones subcorticales: CA1, CA3 y giro dentado (Fig. 4).

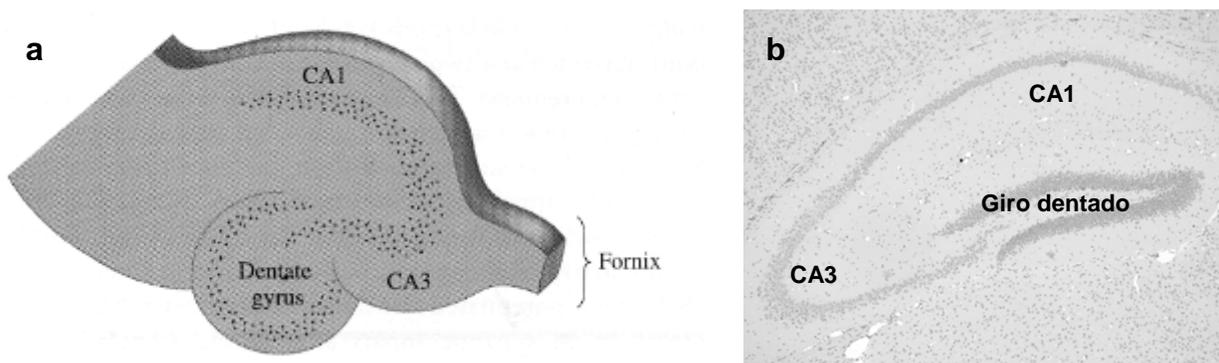


Fig. 4 Regiones del hipocampo. a) esquema del hipocampo. b) corte histológico de hipocampo: se muestra en ambos el giro dentado, CA1 y CA3.

Su población neuronal se compone de tres grandes poblaciones celulares: granulares, piramidales e interneuronas (Díaz-Cintra. *et al.* 2001). Otros autores las engloban en dos tipos: células piramidales o principales y las intrínsecas que son las células polimorfas y las células en canasta. (Adelk A. *et al.* 2006).

Las neuronas piramidales son las principales neuronas del hipocampo, son las únicas neuronas con axones que contribuyen al tracto de salida, su densidad y tamaño varían en las diferentes regiones del hipocampo. Las neuronas más grandes son conocidas como “células piramidales gigantes”. (Noback C. *et al.* 1993).

5.1 FUNCIÓN DEL HIPOCAMPO

El hipocampo está formado por 3 regiones subcorticales que realizan funciones particulares (Amaral *et al.* 1989):

- **Giro Dentado:** Conformado por células granulares. Función indispensable en la formación de la memoria espacial. Interviene en la distinción de patrones espaciales (discriminación y reconocimiento de lo familiar).
- **CA3:** Está formado por células piramidales. Esta área se involucra en la asociación, separación y complemento de patrones, (discriminación y generalización) detección de novedades y memoria a corto plazo.
- **CA1:** Región que proyecta vías eferentes a la corteza. Participa en la asociación temporal y memoria a mediano plazo.

5.2 HIPOCAMPO, CORRELACIÓN CLÍNICA Y METALOPROTEASAS

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa irreversible relacionada con el envejecimiento que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro (Parquet A, *et al.* 2007). Esta enfermedad se caracteriza por pérdida de la memoria, deterioro intelectual y trastorno de personalidad y del comportamiento. Estructuralmente se relaciona con dos alteraciones (Revista Panamericana de Salud Pública. 2001):

- **Placas amiloides:** Aparecen en las regiones cerebrales implicadas en la memoria (principalmente en la región CA1), por medio de formaciones amiloides que son producto de la proteína precursora llamada amiloide (APP) en el neuropilo. Se cree que la formación de estas placas puede ser un proceso fundamental.
- **Redes neurofibrilares:** Los microtúbulos adoptan una disposición diferente por la proteína *tau* (las moléculas se enrollan helicoidalmente, una alrededor de la otra. La agregación de estos filamentos provoca la formación de las redes neurofibrilares y la separación de microtúbulos, lo que altera el mecanismo de transporte intracelular.

En investigaciones previas se ha observado que en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a A β (proteína β amiloide) hay incremento de diversas metaloproteasas (MMP2, 9 y 7), sugiriendo que estas podrían estar incrementadas en tejido de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Yong Wee *et al.* 1998). La MMP9 es capaz de degradar el β -amiloide por lo que se propone que la acumulación de esta proteína en pacientes con Alzheimer puede deberse a una deficiencia de la actividad de la MMP9, esta deficiencia puede interferir con procesos de consolidación de la memoria, que puede ser una consecuencia del deterioro en la capacidad de reconfigurar la matriz extracelular (Wright J. *et al.* 2004).

6. PLEXO COROIDEO

Los plexos coroideos son estructuras en forma de ovillo que se encuentran adheridos a la pared de los ventrículos (ventrículos laterales, tercero y cuarto). Los plexos coroideos están constituidos de la siguiente manera (Fig. 5):

- **capilares fenestrados:** Los plexos coroideos se caracterizan por tener capilares fenestrados, es decir, las células endoteliales que lo forman tienen aberturas que permiten el transporte de líquidos, estos se localizan dentro de una capa de tejido conjuntivo que forma un estroma, su interfase con el espacio subaracnoideo se

forma de una capa de células aplanadas de tejido conjuntivo que se interconectan por uniones hendidas.

- **epitelio cúbico:** es una sola capa de epitelio, cada célula está unida a la adyacente mediante un complejo de unión que actúa para restringir el movimiento intercelular de materiales.

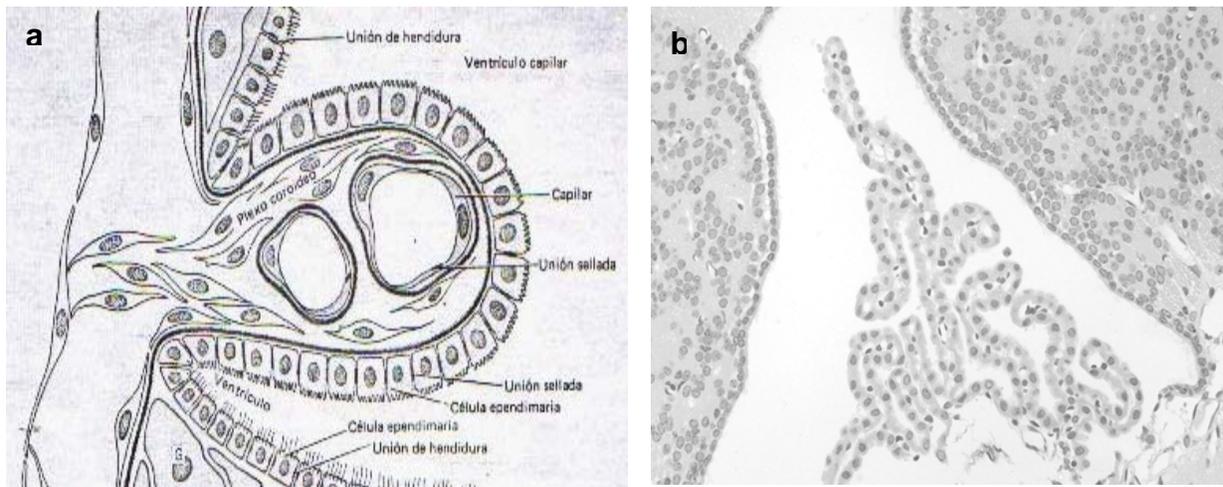


Fig. 5 Estructura del Plexo coroideo. a) Esquema que muestra las capas del plexo coroideo: capilares fenestrados, con unión ocluyente y las células endodimarias que recubren al ventrículo (Noback C. *et al.* 1993). B) Corte Histológico del plexo. Muestra la estructura en ovillo formada por un epitelio simple cúbico (células endodimarias).

Esta estructura se encarga de formar el líquido cefalorraquídeo en conjunto con los capilares, permitiendo el intercambio y la eliminación de nutrientes, metabolitos y productos de desecho del SNC (Noback C. *et al.* 1993). El plexo coroideo utiliza la filtración capilar y los mecanismos secretores del epitelio para mantener la estabilidad química del líquido cefalorraquídeo (Kandel *et al.* 2001).

6.1 BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica es una barrera física y metabólica que aísla al SNC del resto del organismo; esta barrera mantiene un medio estable para las neuronas, evitando que entren sustancias tóxicas y protegiéndolas de neurotransmisores circulantes como la noradrenalina y el glutamato (que pueden aumentar en respuesta al estrés) (Kandel *et al.* 2001). En condiciones normales tiene 4 funciones (Bernhardi R. 2004):

- Separar y proteger al cerebro
- Transportar de forma selectiva compuestos necesarios para el cerebro
- Detectar cambios en la sangre y comunicar estos cambios al cerebro
- Metabolizar sustancias presentes en el cerebro y en la sangre

6.1.1 ESTRUCTURA DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

La barrera hematoencefálica (BHE) tiene propiedades anatómicas especializadas, las células endoteliales del encéfalo limitan la difusión pasiva de sustancias hidrosolubles a través de las paredes vasculares, como resultado muchos metabolitos necesarios para el buen funcionamiento cerebral deben ser transportados selectivamente a través de las paredes vasculares (Kandel *et al.* 2001). El endotelio está formado por tres tipos de unión célula- célula: uniones hendidas (GAP junctions), uniones adherentes y uniones estrechas. Las GAP junctions están formadas por proteínas trans-membrana (conexinas) que conectan el citoplasma entre células endoteliales. El segundo tipo de unión se forma por proteínas de la familia de las cadherinas y las uniones estrechas se componen de proteínas integrales y periféricas de membrana de la familia de la zonula ocludens (Bernhardi R. 2004).

La microcirculación cerebral está constituida por células endoteliales, pericitos y procesos astrogiales (Fig. 6).

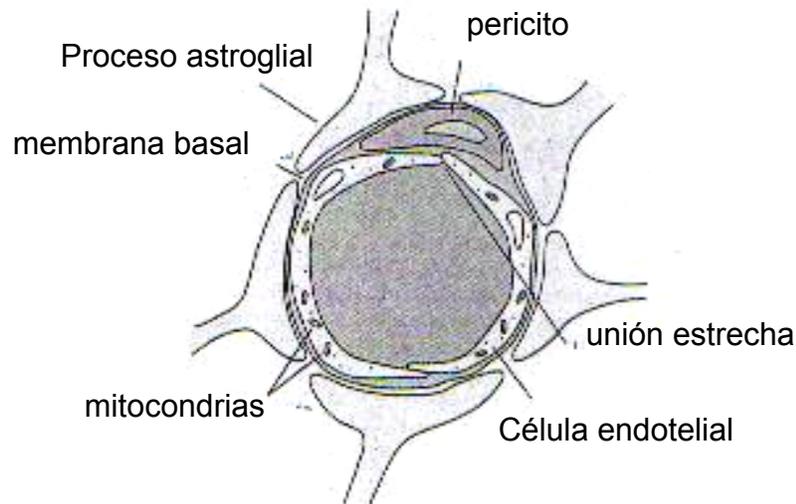


Fig. 6. Capilar encefálico. Partes de la microcirculación cerebral: pericito, célula endotelial y procesos astrogliales. (Kandel *et al.* 2001)

6.1.2 BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y METALOPROTEASAS

El aumento en la permeabilidad de la BHE está asociado con la presencia de metaloproteasas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) o en la sangre. (Haorah J. *et al.* 2007; Bernhardt R. 2004; Fujimura M. *et al.* 1999)

Las metaloproteasas MMPs 2 y 9 son capaces de digerir la lámina basal endotelial, que juega un papel importante en el mantenimiento de la impermeabilidad de la barrera hematoencefálica (Fujimura M. *et al.* 1999).

7. JUSTIFICACIÓN

El vanadio es un contaminante inorgánico capaz de formar especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas se asocian con daño y muerte celular así como en la activación de las metaloproteasas.

La exposición a este contaminante induce alteraciones citológicas en hipocampo, estriado y daño al epitelio endotelial que forma parte de la barrera hematoencefálica. Asimismo el pentóxido de vanadio provoca un aumento en la actividad de las metaloproteasas 2 y 9, que se vinculan con la ruptura de la barrera hematoencefálica. La sobreexpresión de estas metaloproteasas se asocia con enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer.

Por lo que el presente trabajo analizará el efecto del pentóxido de vanadio sobre la distribución (inmunolocalización de las mmp's (neuronas, glia o epitelio endotelial) y concentración de las MMPs 2 y 9 en hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado), estriado y plexo coroideo.

8. OBJETIVOS

8.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Analizar el efecto del pentóxido de vanadio vía inhalada sobre la distribución y concentración de las metaloproteasas 2 y 9 en estriado, hipocampo y plexo coroideo.

8.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Identificar cambios en la concentración y distribución de la MMPs 2 y 9 en hipocampo, estriado y plexo coroideo por inmunohistoquímica.
- ✓ Correlacionar cambios entre el tiempo de exposición y la concentración de las MMPs 2 y 9 en estriado, hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) y plexo coroideo por densitometría.

9. HIPÓTESIS

El vanadio es un elemento que provoca estrés oxidante por un aumento en la producción de radicales afectado la expresión tisular de las metaloproteasas de la matriz extracelular por lo que:

- El efecto del pentóxido de vanadio promoverá un aumento en la concentración de las metaloproteasas 2 y 9 en hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado), estriado y plexo coroideo.

10. MATERIAL Y MÉTODO

10.1 ANIMALES

Se trabajó con 20 ratones macho de la cepa CD1 con un peso de 35 ± 2 , con libre acceso a alimento y agua. De estos 20 ratones, 15 fueron expuestos a pentóxido de vanadio y los 5 ratones restantes formaron el grupo control.

Los ratones se colocaron en una cámara de acrílico con dimensiones de 56 cm de ancho x 60 cm de largo y 35 cm de alto, herméticamente cerrada, inhalando 0.02 M de pentóxido de vanadio (V_2O_5), dos veces a la semana durante 2 horas de exposición. El grupo control sólo inhaló agua destilada durante el mismo periodo.

Los ratones (grupo experimental) fueron sacrificados a la segunda, tercera y cuarta semana después de su exposición (vía inhalada) al pentóxido de vanadio. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y se perfundieron vía aorta con solución salina al 0.9% y con paraformaldehído al 4%.

10.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cerebros fueron procesados con la técnica histológica ordinaria. (Ver apéndice 1) para la MMP2 y la MMP9.

10.3 DENSITOMETRÍA

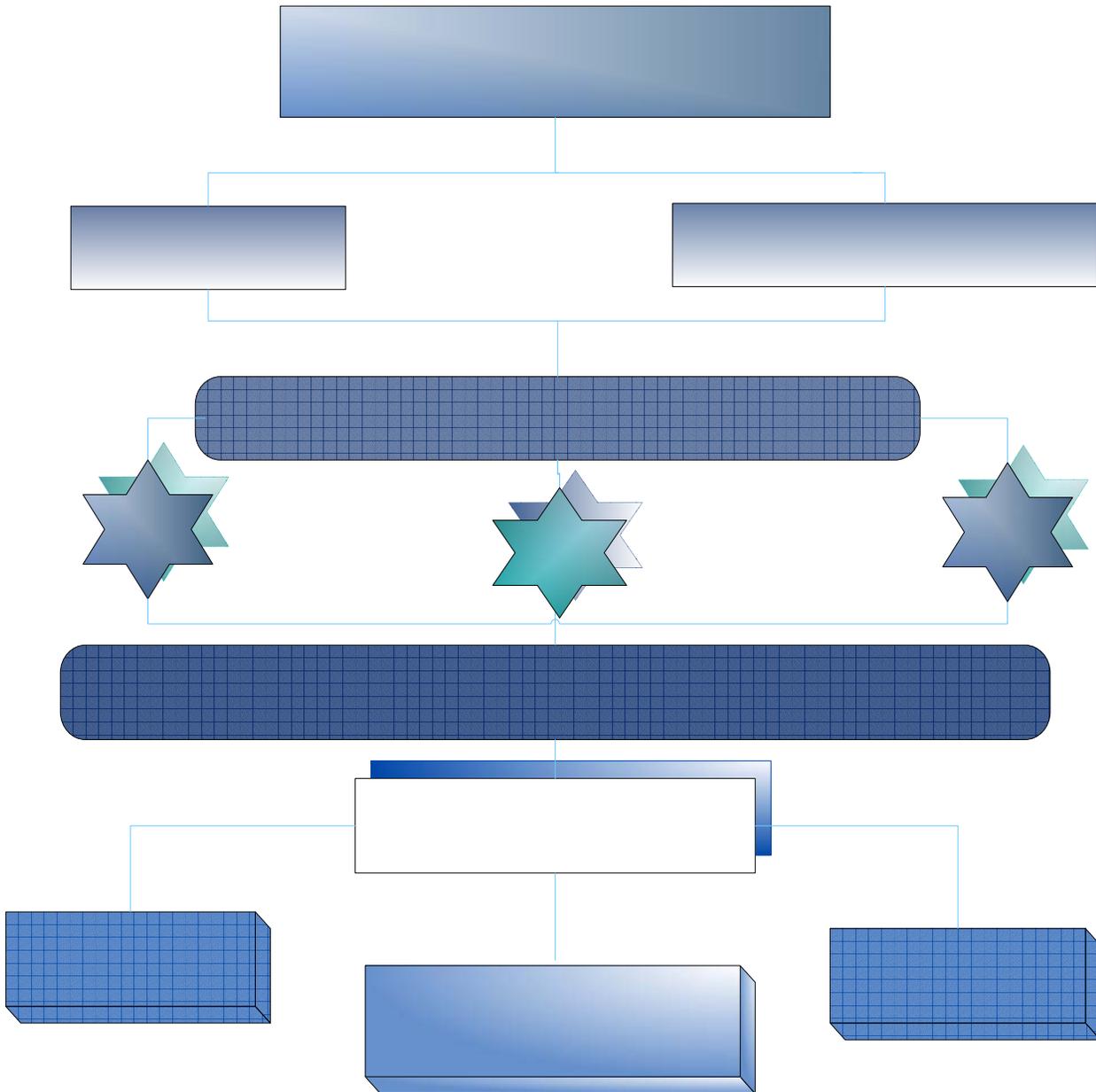
Se capturaron las imágenes de los cortes, eligiendo 4 campos por animal de cada estructura (estriado hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) y plexo coroideo) por cada uno de los tiempos, incluyendo el control. Todos los campos fueron capturados con el objetivo 40X.

Para el análisis densitométrico se ocupó el programa Image-Pro Plus. El análisis tomó un área de $5 \times 10^6 \mu^2$

10.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos arrojados del análisis densitométrico de cada una de las áreas: Estriado, Hipocampo (CA1 CA3 y Giro Dentado) y plexo coroideo, fueron utilizados para hacer una prueba de ANOVA y hacer las gráficas correspondientes.

10.5 METODOLOGÍA (ESQUEMA)

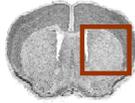


20

11. RESULTADOS

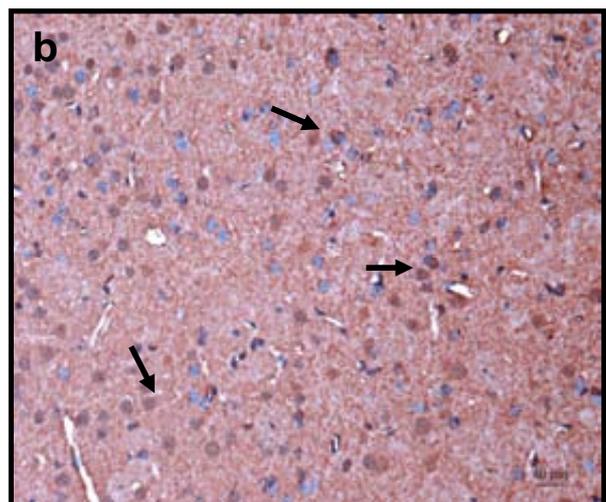
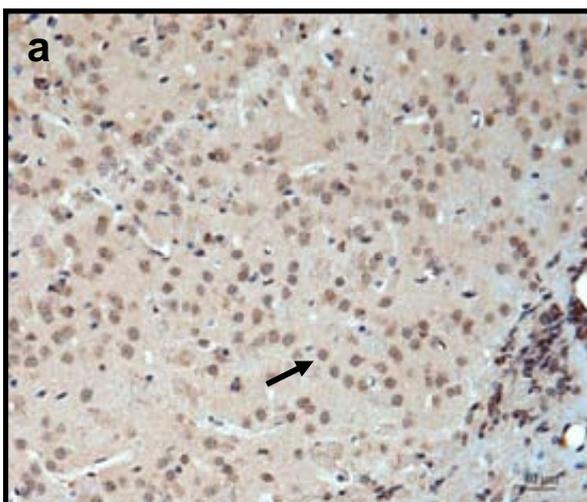
Como resultado del análisis densitométrico se observó un aumento significativo de las metaloproteasas 2 y 9 en todas las estructuras: estriado, hipocampo (CA1, CA3, giro dentado) y plexo coroideo.

11. 1 ESTRIADO



INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2:

En el caso del estriado la inmunolocalización de la metaloproteasa 2 se identificó en las neuronas espinosas medianas (marcadas con la flecha) (Fig. 7 a-d). La MMP2 al igual que la metaloproteasa 9 se expresa de manera endógena, por lo que la marca también se observa en las neuronas espinosas medianas de los grupos controles (Fig. 7a y Fig. 8a). A la segunda semana de exposición se aprecian algunos núcleos marcados por esta MMP (Fig. 7b). En lo que respecta a la tercera y cuarta semana todos los núcleos de la neuronas espinosas medianas se encuentran marcados, no obstante, a la cuarta semana la marca no sólo es nuclear sino también citoplasmática (Fig. 7d).



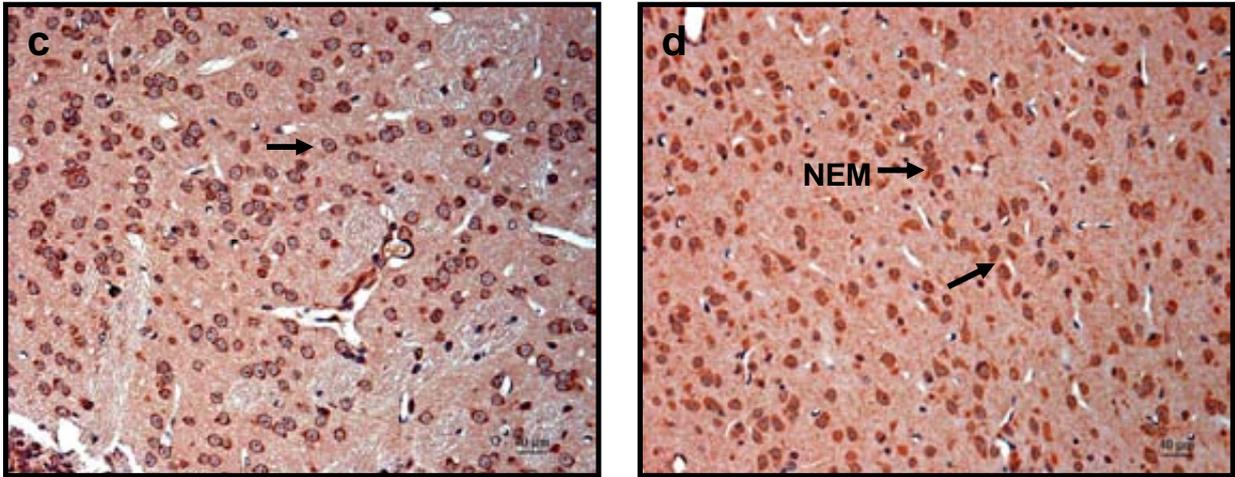
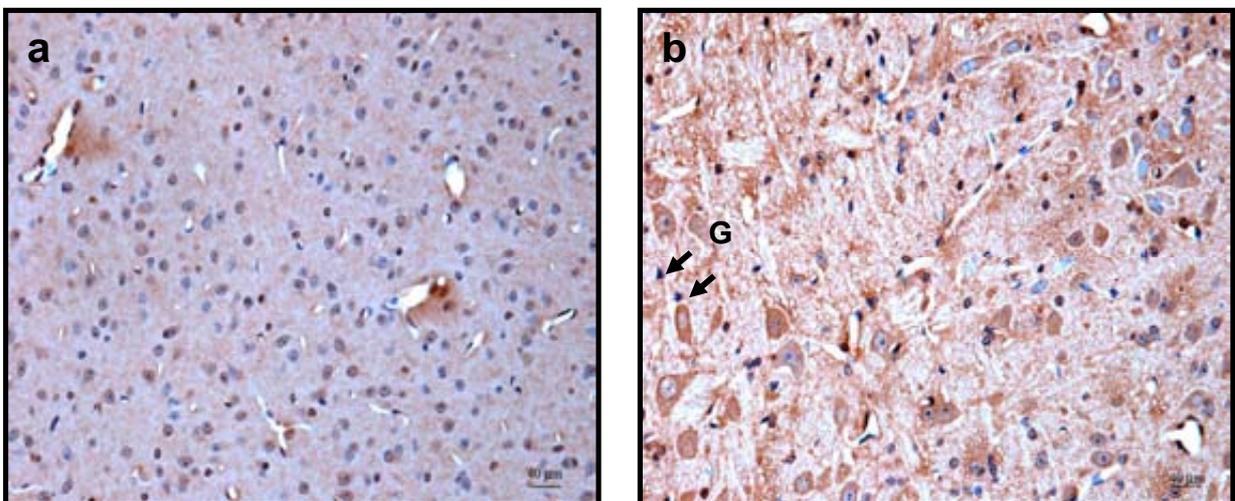


Fig. 7 Inmunohistoquímica MMP2 estriado. a) Control b) 2 semanas V_2O_5 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . NEM= neuronas espinosas medianas

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP9:

Al igual que la metaloproteasa 2 la inmunolocalización se hizo en las neuronas espinosas medianas y no en la glia (marcadas con una G). Conforme aumenta el tiempo de exposición se aprecia lo mismo que sucede con la MMP2, a la segunda semana los núcleos de la neuronas comienzan a marcarse (Fig. 8b), ya para la tercera y cuarta semana todas las neuronas están marca y en esta última semana la marca no es tan sólo nuclear sino también citoplasmática.



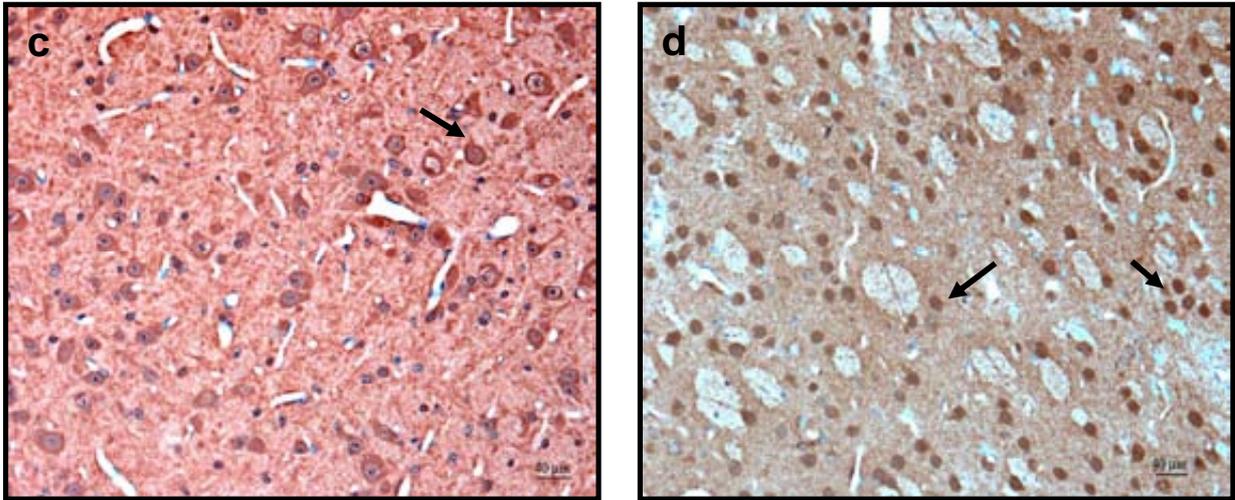


Fig. 8 Inmunohistoquímica MMP9 estriado. a) Control b) 2 semanas V_2O_5
c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . G= glia

De los resultados arrojados de la densitometría de la inmunohistoquímica para la MMP2 y 9 para estriado se obtuvo la siguiente gráfica (Fig. 9), en la que se aprecia un aumento significativo en la concentración de la MMP2 y 9 a partir de la 2 semana de inhalación respecto al control. El aumento se mantiene muy similar en la 3 y 4 semana. Sin embargo no hay diferencia significativa entre ninguno de los grupos (2 3 y 4 semana).

11.2 GRÁFICA METALOPROTEASAS 2 y 9 EN ESTRIADO

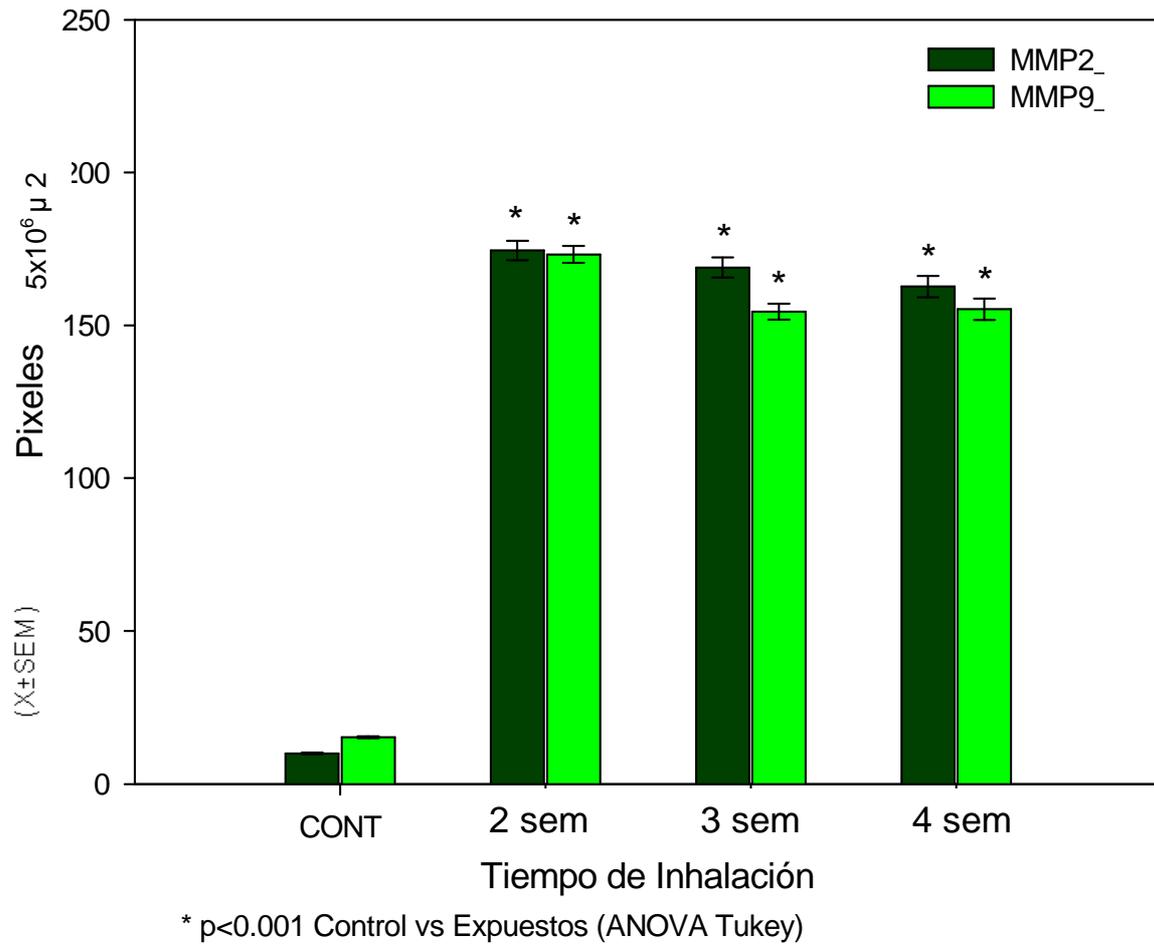


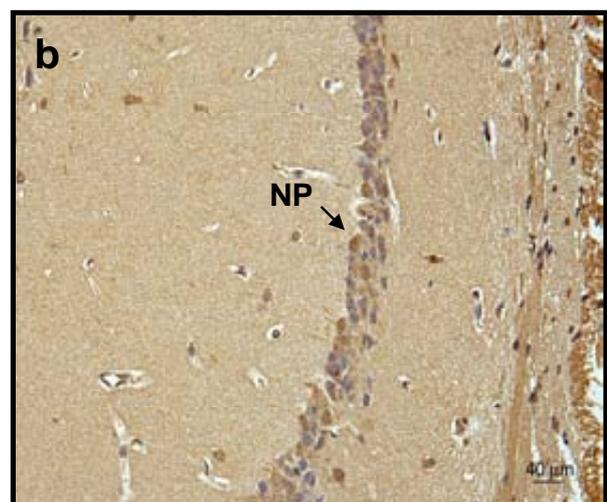
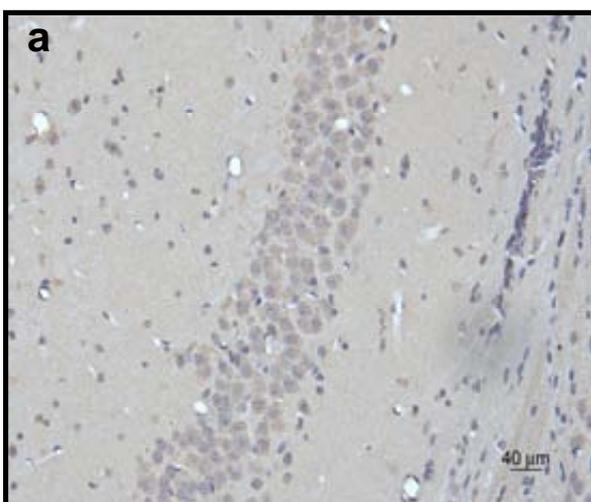
Fig. 9. Gráfica MMP2 y 9 en estriado.

11.3 HIPOCAMPO (CA1)



La inmunolocalización de la MMP2 y 9 en el hipocampo en la región CA1 se identificó en las neuronas piramidales (Fig. 10 y 11). En los controles hay marca de ambas MMPs ya que al igual que en el estriado, estas metaloproteasas se expresan de manera endógena (Fig. 10a y 11a). Para la segunda semana, hay núcleos marcados por la presencia de la MMP2 y 9 (Fig. 10b y 11b). En la tercer semana hay un incremento de neuronas piramidales marcadas para la MMP2 (Fig. 10c), la marca de la MMP9 para esta misma semana está en todas las neuronas piramidales. En la cuarta semana todos los núcleos están marcados para la MMP2 (Fig. 10d). A diferencia de esta metaloproteasa, la marca de la MMP9 no está en todas las neuronas, sin embargo podemos apreciar neuronas retraídas, es decir, muerte neuronal (Fig. 11d).

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2:



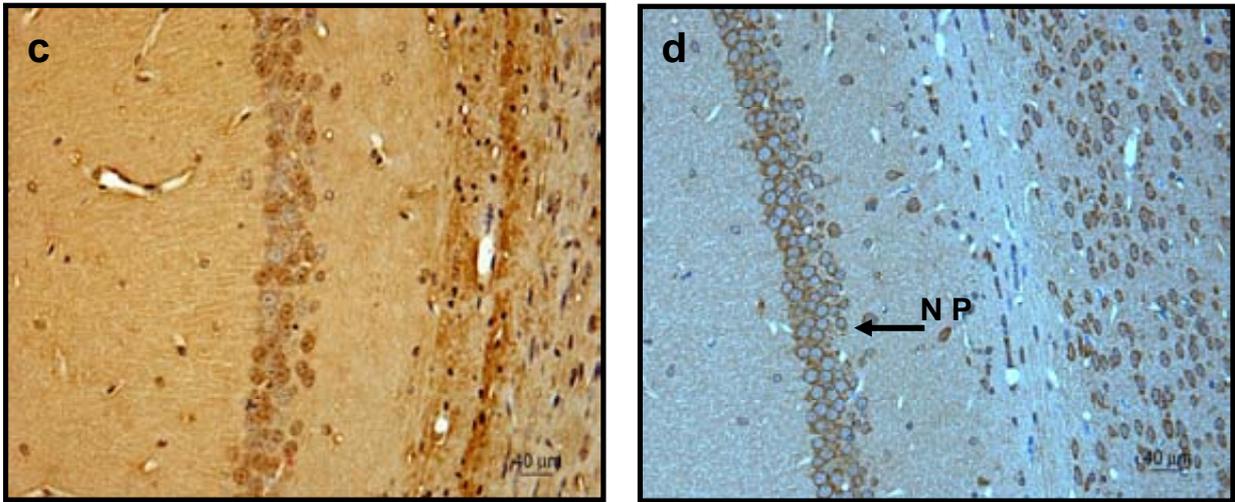
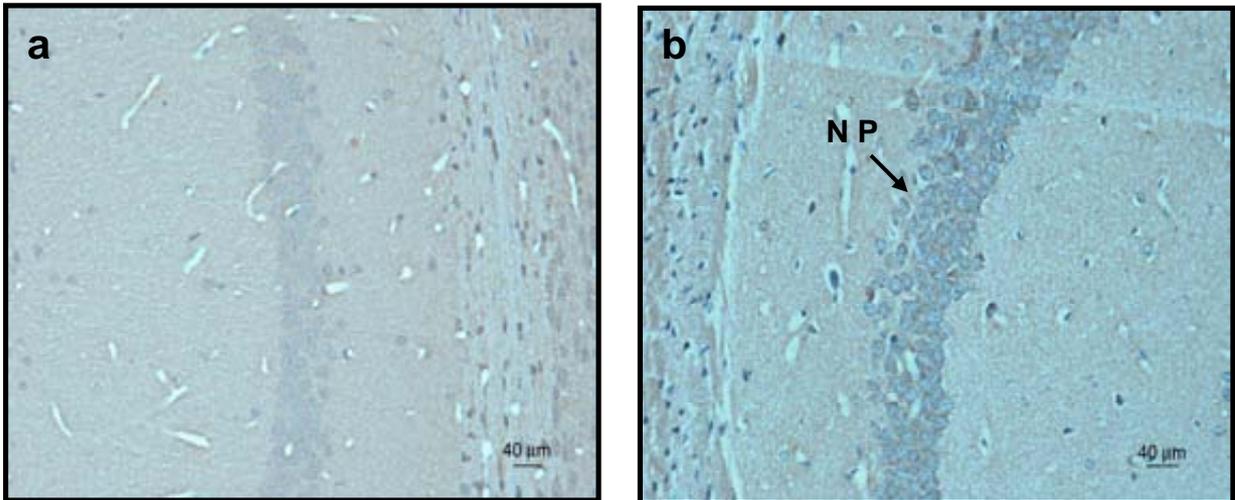


Fig. 10 Inmunohistoquímica MMP2 región CA1. a) Control b) 2 semanas V_2O_5
 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . NP=neuronas piramidales

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP9:



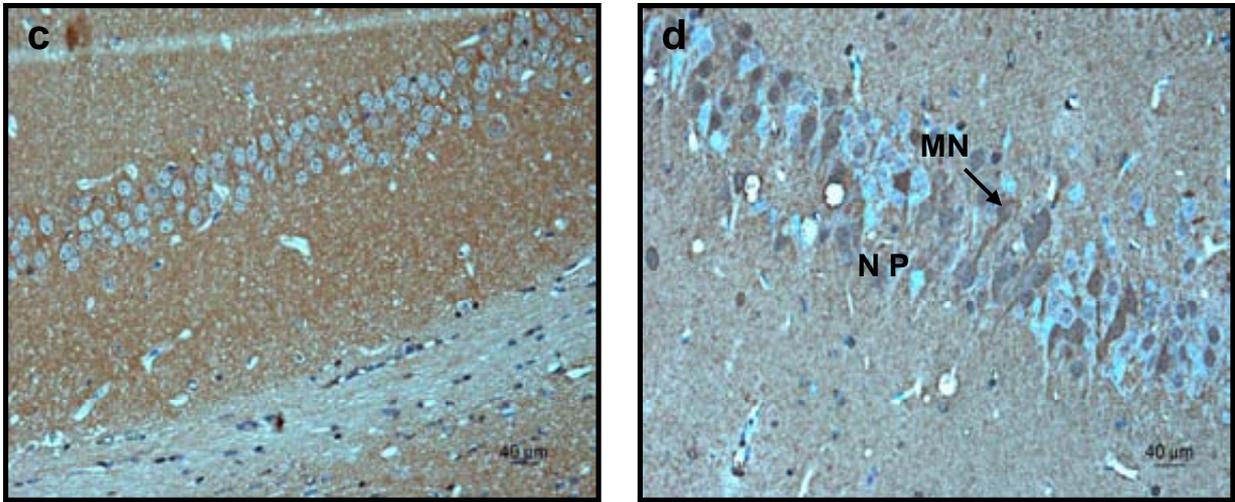


Fig. 11 Inmunohistoquímica MMP9 región CA1. a) Control b) 2 semanas V_2O_5 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . NP=neuronas piramidales, MN= muerte neuronal

11.4 HIPOCAMPO (CA3)



Al igual que en la región CA1 la marca de la MMP2 y 9 se localiza en las neuronas piramidales. Con ambas metaloproteasas sucede lo mismo que en la región CA1. En los controles hay poca marca (Fig. 12a y 13a), a la segunda semana la marca se va intensificado. A la tercer semana todas las neuronas piramidales están marcadas (Fig. 12c y 13c). En lo que respecta a la última semana de exposición todos los núcleos de las neuronas piramidales están marcados por la presencia de la MMP2 (Fig. 12d), a diferencia de la MMP9 que no está presente en todas las neuronas, sin embargo, la marca no sólo es nuclear sino también citoplasmática (Fig. 13d).

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2:

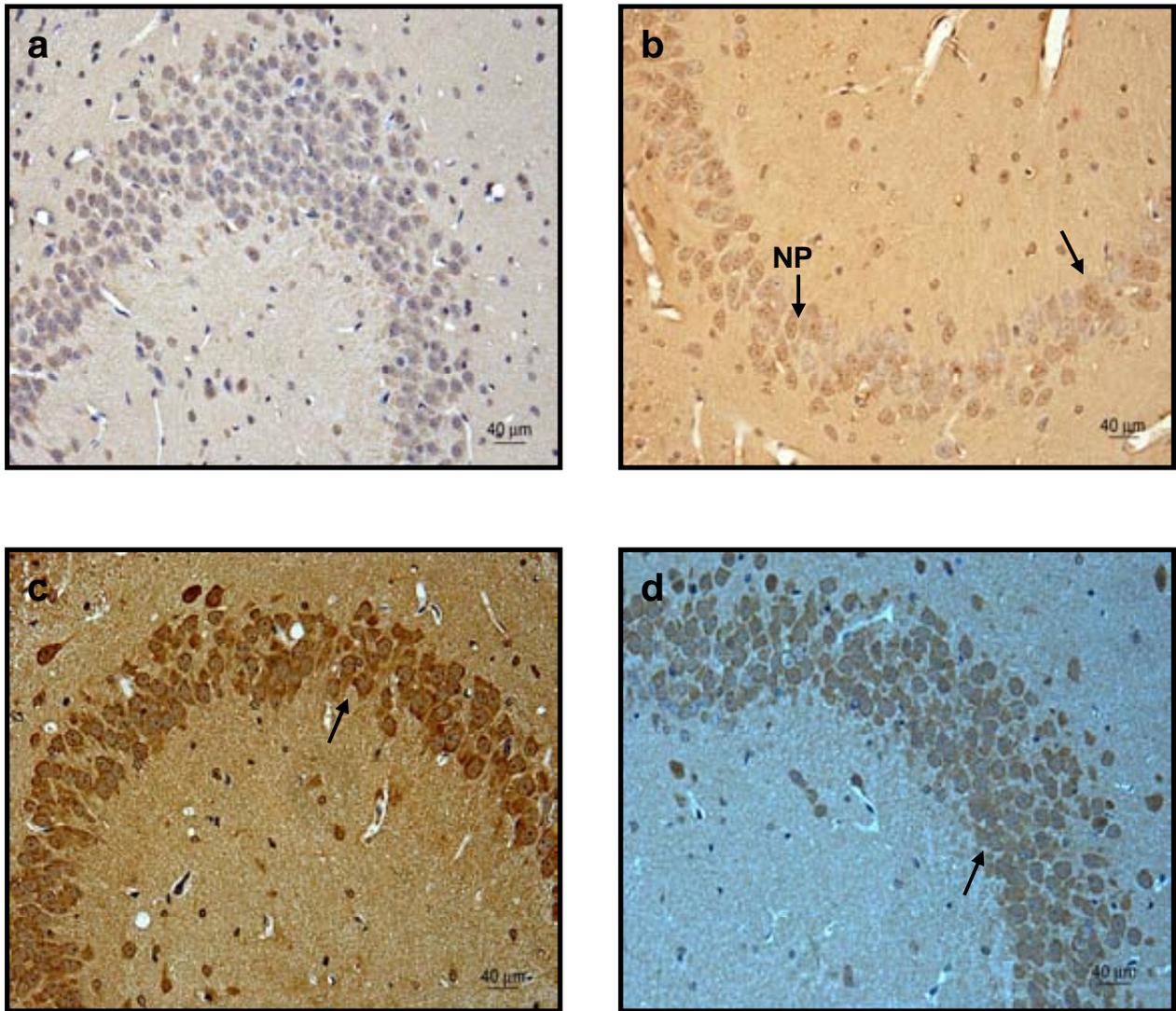


Fig. 12 Inmunohistoquímica MMP2 región CA3. a) Control b) 2 semanas V₂O₅
c) 3 semanas V₂O₅ d) 4 semanas V₂O₅. NP= neuronas piramidales

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP9:

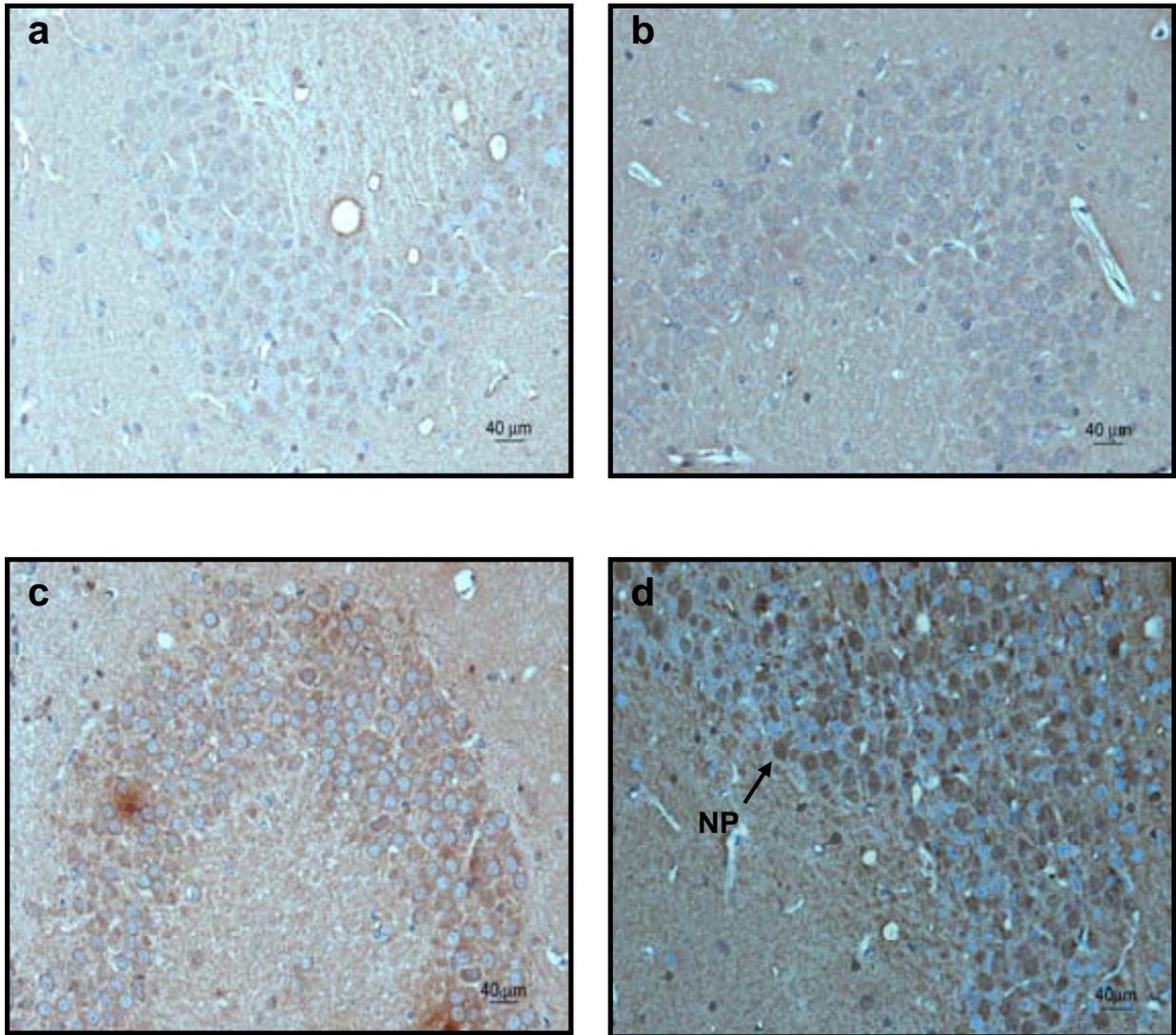


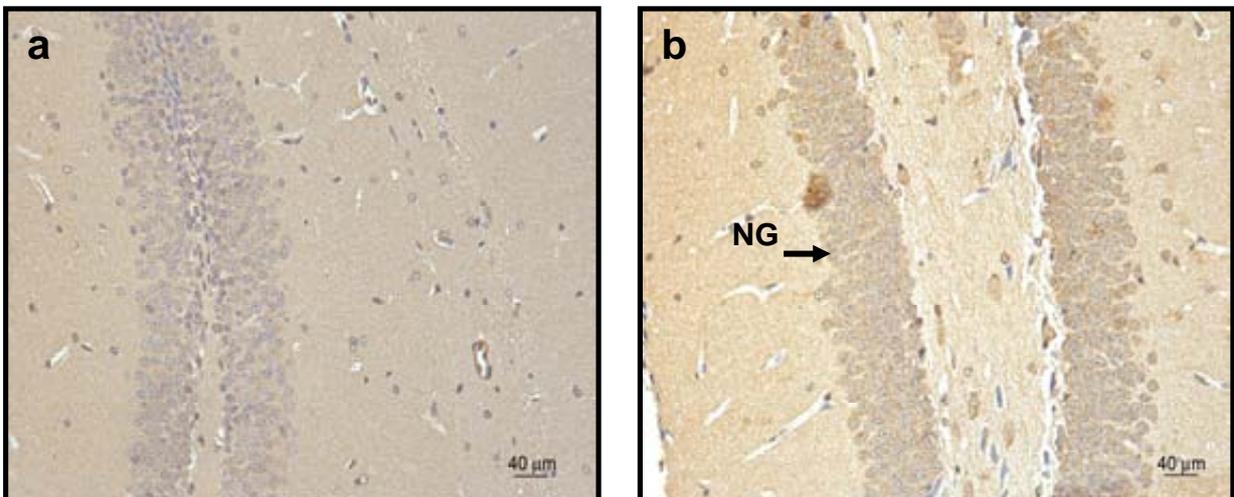
Fig. 13 Inmunohistoquímica MMP9 región CA3. a) Control b) 2 semanas V₂O₅
c) 3 semanas V₂O₅ d) 4 semanas V₂O₅. NP= neuronas piramidales

11.5 HIPOCAMPO (giro dentado)



En el giro dentado se observan las neuronas granulares, en ellas se localiza la marca de la MMP2 y 9. Conforme aumenta el tiempo de la exposición a pentóxido de vanadio la marca va en aumento para ambas metaloproteasas. Para la MMP2, va aumentando la marca, llegando a la última semana con todas las neuronas marcadas, sin embargo, la marca sólo es nuclear (Fig. 14d). Para la MMP9, también la marca se intensifica en las neuronas granulares, a la segunda semana comienza a haber neuronas marcadas (Fig. 15b), a la tercer semana la marca se ve más definida en las neuronas granulares (Fig. 15c) y a la cuarta semana todas las neuronas tienen marca tanto nuclear como en el citoplasmática (Fig. 15d).

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2:



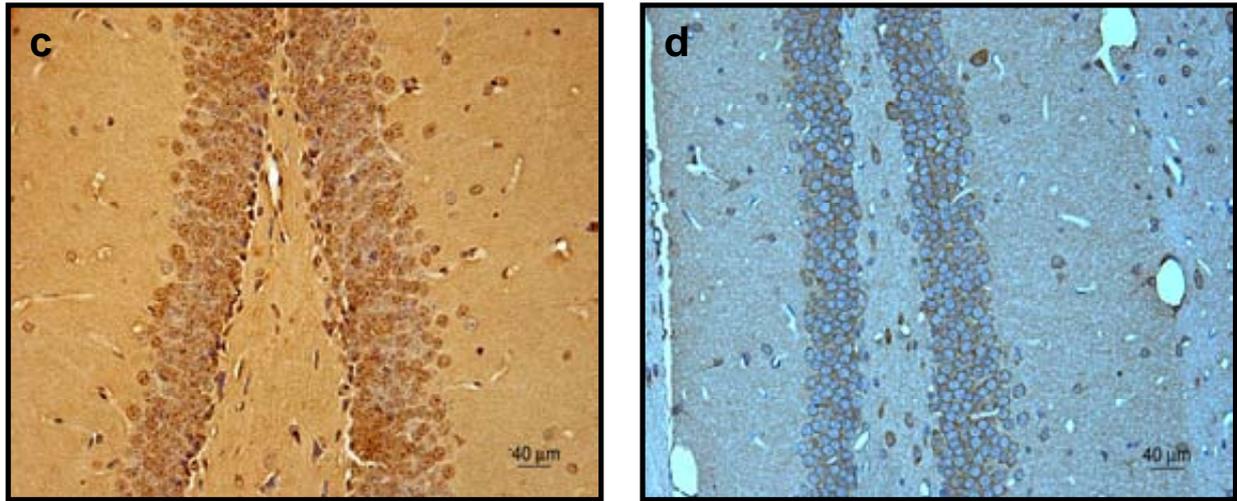
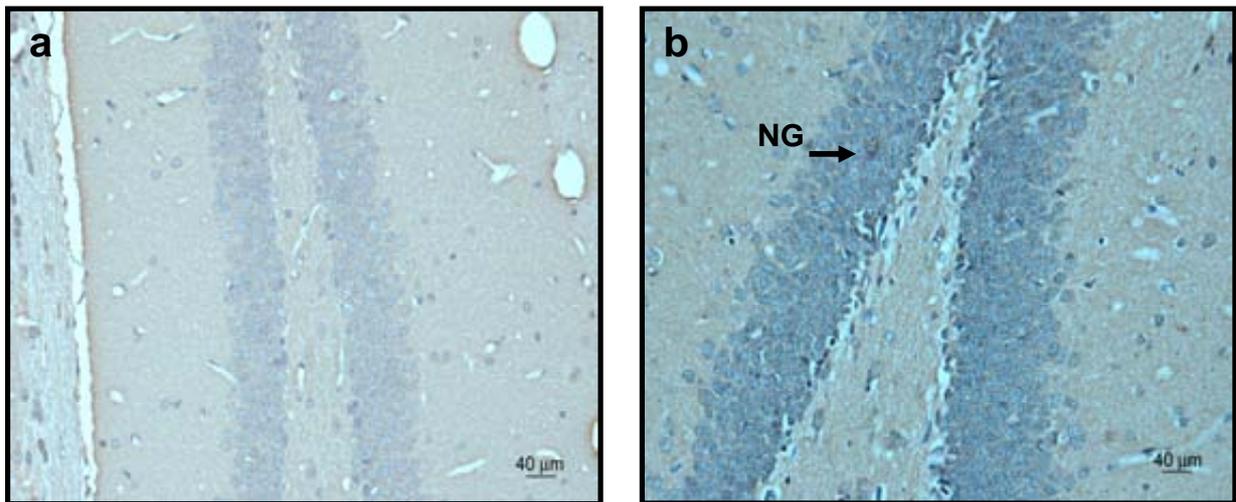


Fig. 14 Inmunohistoquímica MMP2 giro dentado. a) Control b) 2 semanas V_2O_5
 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . NG= neuronas granulares

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP9:



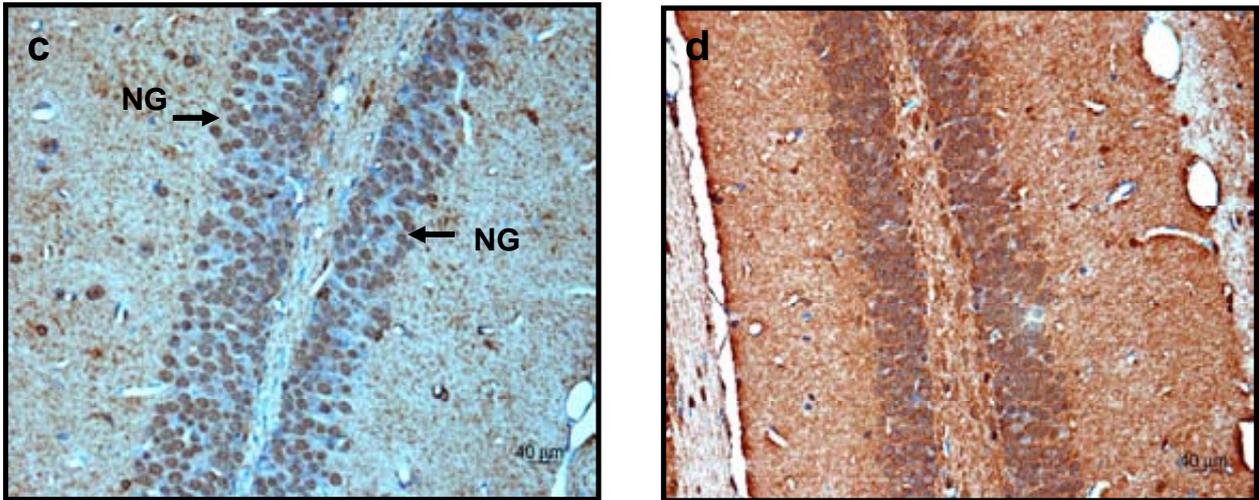


Fig. 15 Inmunohistoquímica MMP9 giro dentado. a) Control b) 2 semanas V_2O_5
c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . NG= neuronas granulares

En el hipocampo para las regiones de CA1, CA3 y giro dentado se obtuvieron dos gráficas para cada una de las metaloproteasas (fig. 16 y 17). Ambas gráficas presentan un comportamiento similar. Se observa un aumento significativo en la concentración de la MMP2 y 9 a partir de la 2 semana de inhalación respecto al control, este aumento se mantiene muy similar en la 3 y 4 semana. El grupo control para la gráfica de la MMP9 es mayor que para la gráfica de la MMP2. Al igual que para la región de estriado solo hay diferencia entre control y grupos y no entre los mismo grupos (2, 3 y 4 semana).

11.6 GRÁFICA METALOPROTEASA 2 EN HIPOCAMPO (CA1, CA3 y GIRO DENTADO)

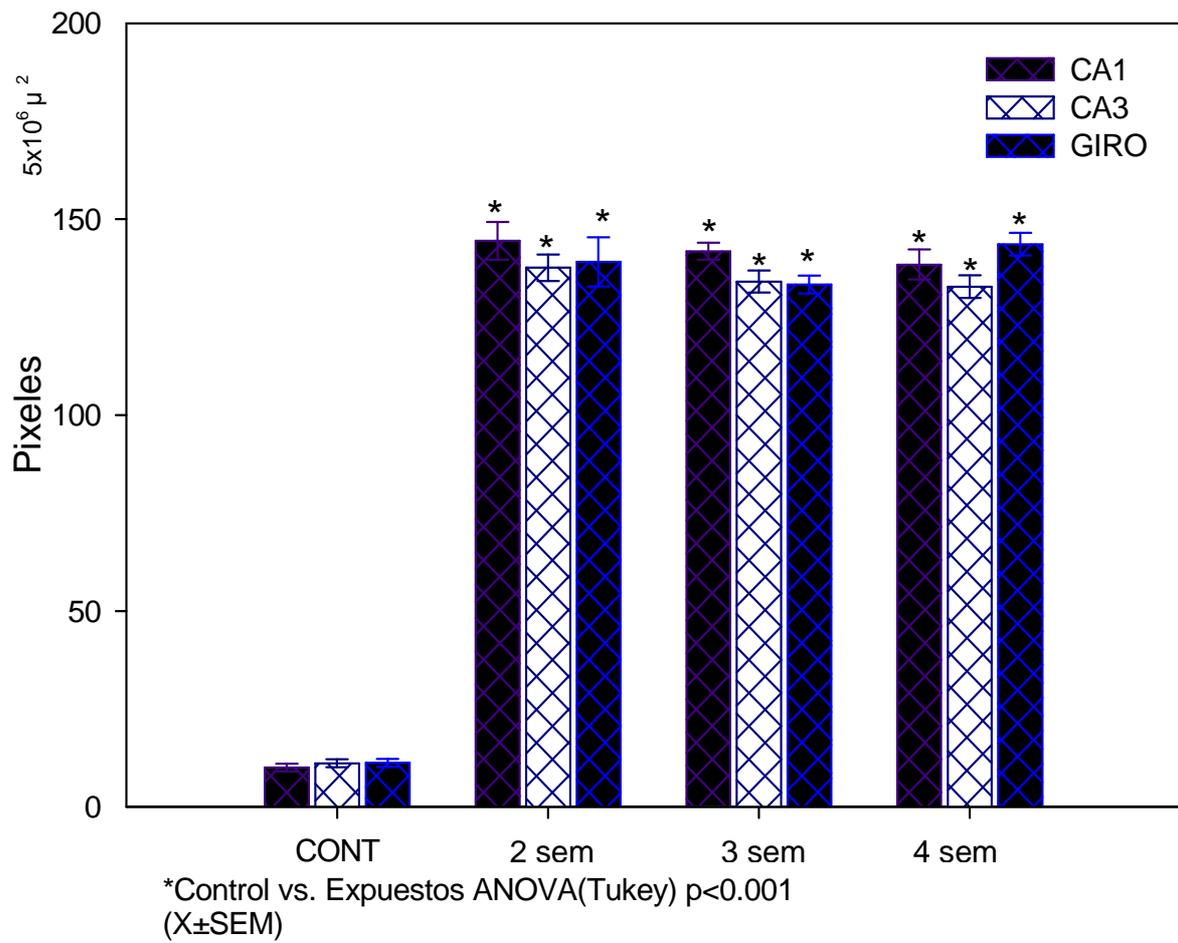


Fig. 16 Gráfica MMP2 en hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado).

11.7 GRÁFICA METALOPROTEASA 9 EN HIPOCAMPO (CA1, CA3 y GIRO DENTADO)

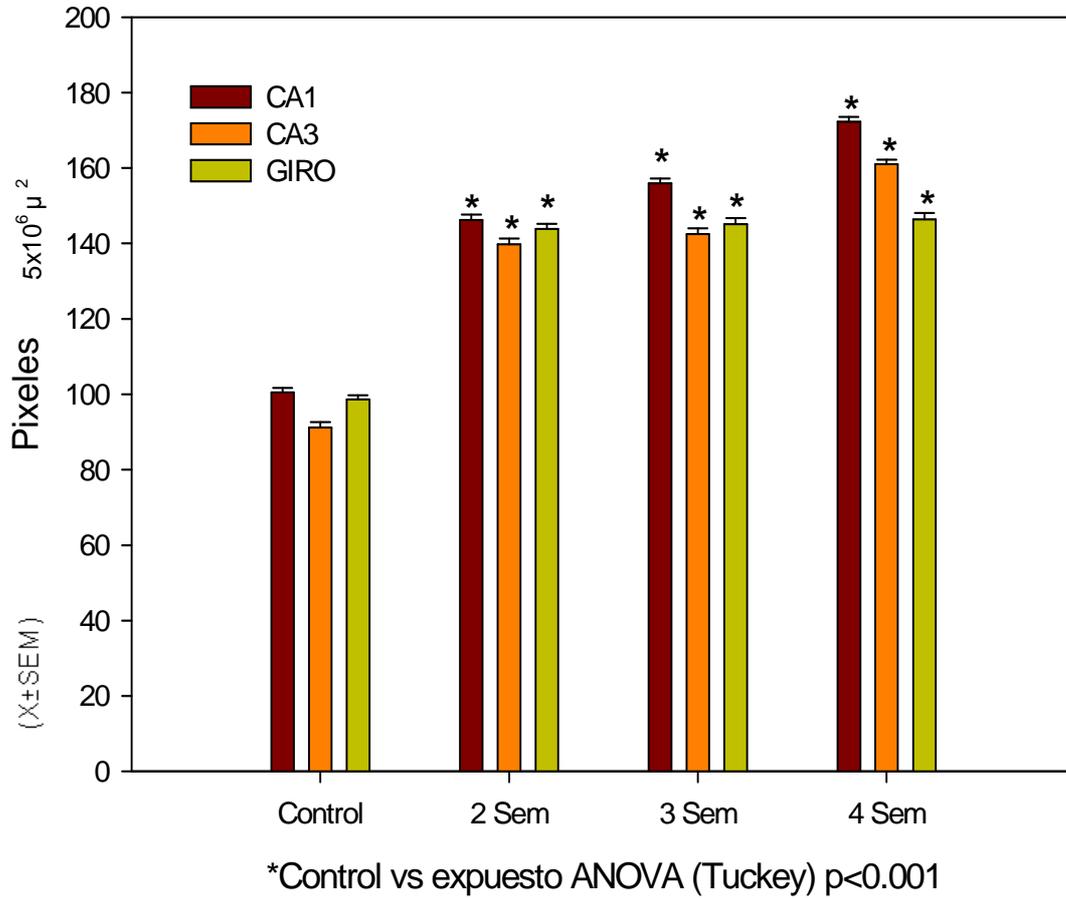


Fig. 17 Gráfica MMP9 en hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado).

11.8 PLEXO COROIDEO

En lo que respecta al plexo coroideo se puede apreciar en los controles la estructura en forma de ovillo del plexo, cuyo epitelio es simple cúbico. A diferencia de las otras estructuras con las que hemos trabajado, la marca para ambas metaloproteasas es muy evidente desde los grupos controles (Fig. 18a y 19a). En la segunda semana de inhalación todo el plexo tiene marca (Fig. 18b y 19b). Ya para la tercer semana comienza a perderse la estructura en ovillo, y se observan vasos sanguíneos dilatados, aunque para la MMP9 es más evidente (Fig. 19c). En la última semana hay mayor cantidad de vasos sanguíneo dilatados y se hace más evidente la pérdida de la estructura del plexo (Fig. 18d y 19d).

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP2:

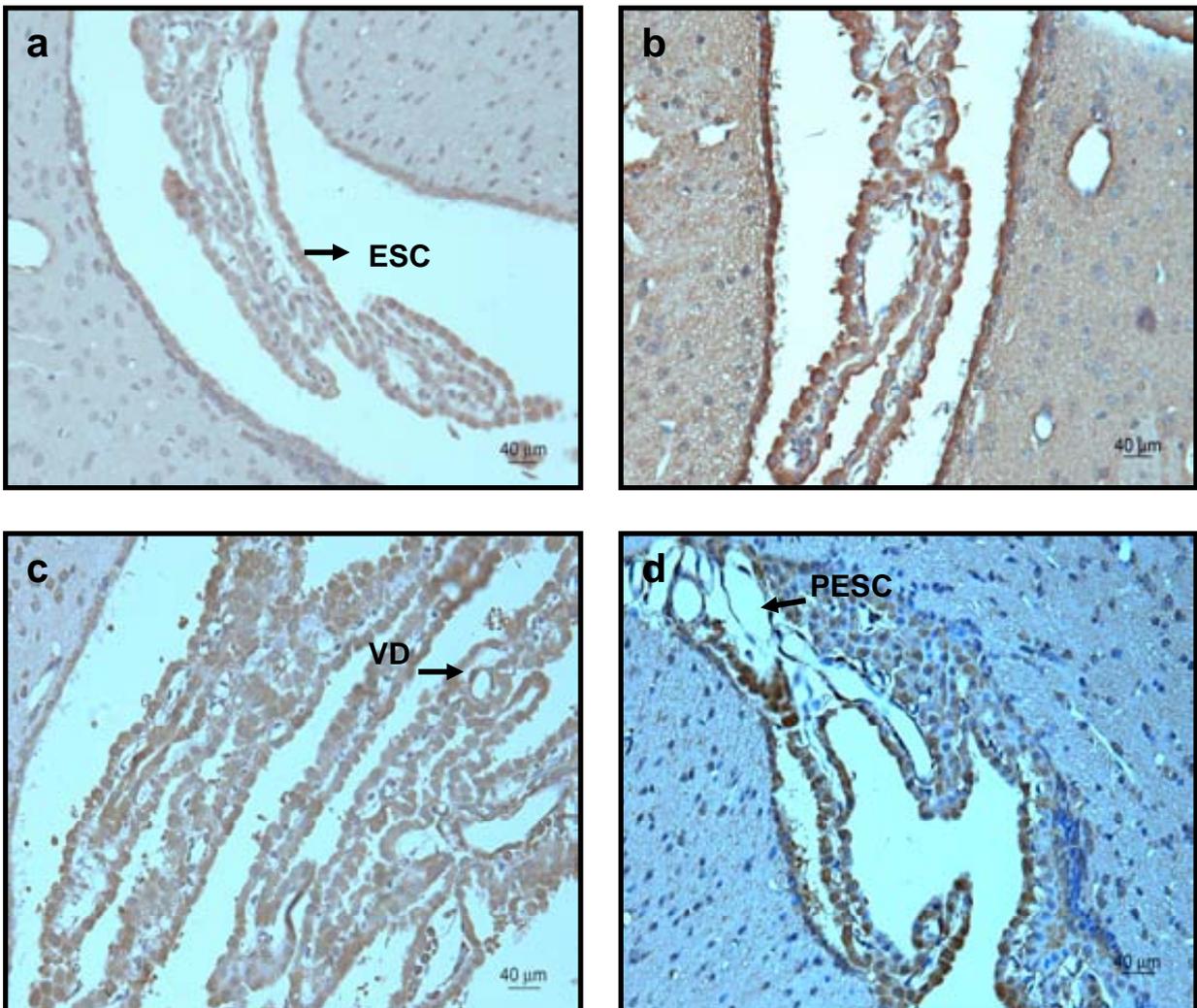


Fig. 18 Inmunohistoquímica MMP2 plexo coroideo. a) Control b) 2 semanas V_2O_5 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . ESC= epitelio simple cúbico. PESC= pérdida del epitelio simple cúbico. VD= vasos sanguíneos dilatados

INMUNOHISTOQUÍMICA MMP9:

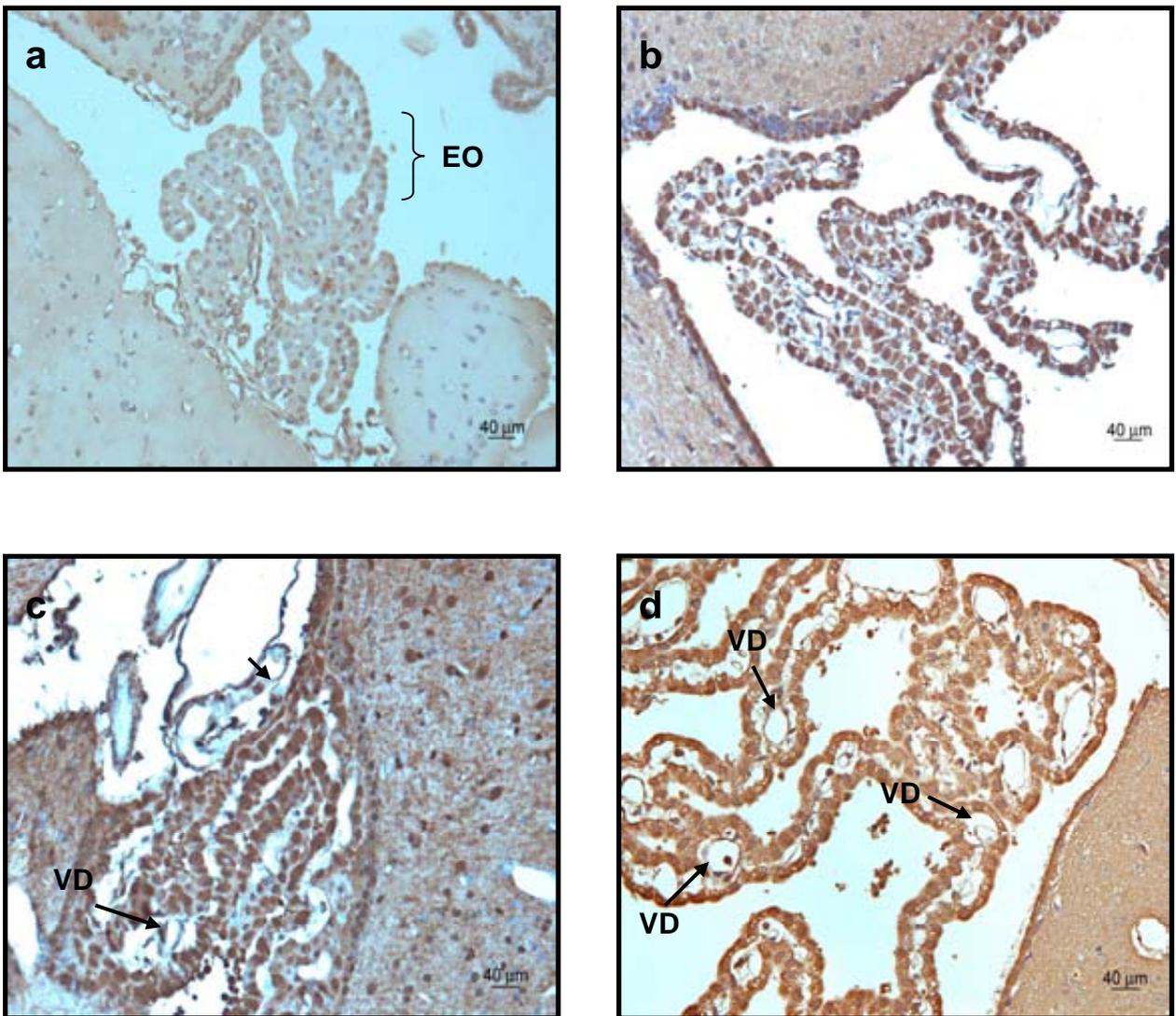


Fig. 19 Inmunohistoquímica MMP9 plexo coroideo. a) Control b) 2 semanas V_2O_5 c) 3 semanas V_2O_5 d) 4 semanas V_2O_5 . EO= estructura en ovillo. VD= Vasos sanguíneos dilatados

La gráfica que se obtuvo para plexo coroideo es similar al de las otras estructuras (estriado e hipocampo). Hay un aumento significativo de la MMP2 y 9 desde la segunda semana de inhalación respecto al control, este aumento se mantiene similar en las siguientes semanas (Fig. 20). Para cada metaloproteasas no hay variación conforme aumenta la semana de exposición, sin embargo, el daño morfológico en la estructura del plexo fue muy evidente. En la gráfica se observa mayor aumento de la metaloproteasa 9 que de la metaloproteasa 2.

11.9 GRÁFICA METALOPROTEASAS 2 y 9 EN PLEXO COROIDEO

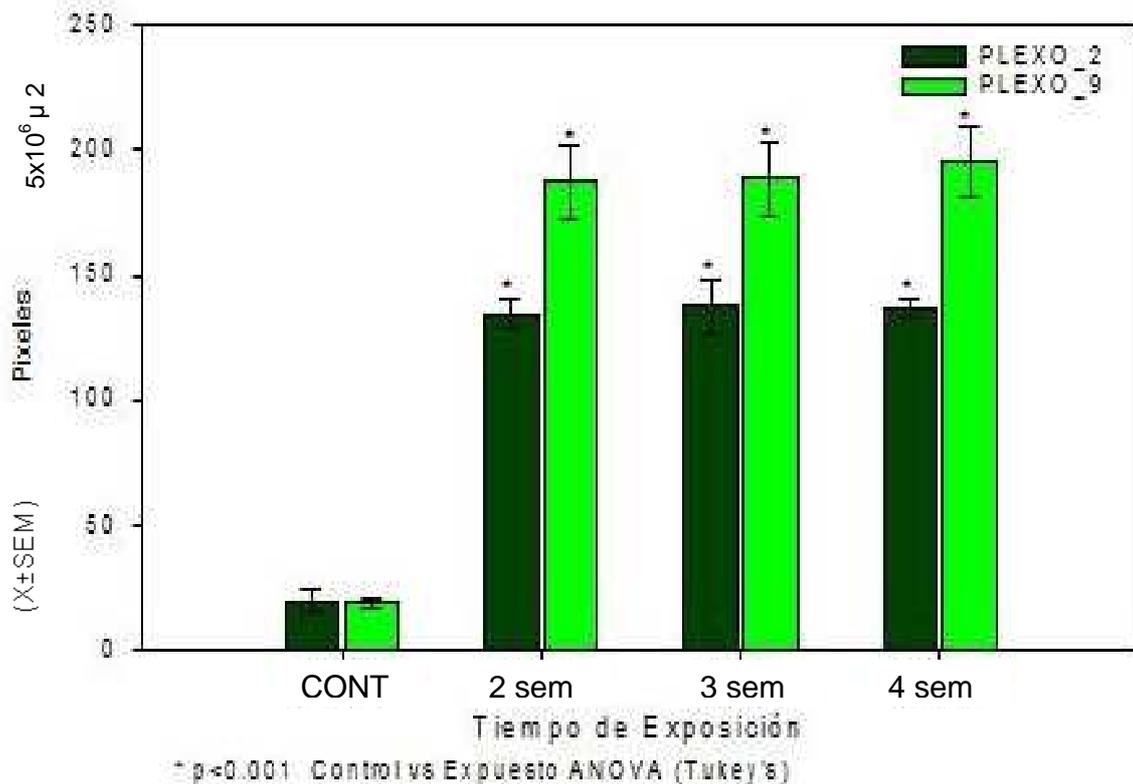


Fig. 20 Gráfica MMP 2 y 9 en plexo coroideo.

12. DISCUSIÓN

El pentóxido de vanadio provocó un aumento en la concentración de las metaloproteasas 2 y 9 en todas las estructuras: estriado, hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) y plexos coroides.

12.1 PENTÓXIDO DE VANADIO Y METALOPROTEASAS

El vanadio es una especie química que puede generar especies reactivas de oxígeno. Al igual que para otros metales (hierro, cromo, cobre) el vanadio tiene un mecanismo común involucrado en la reacción de Fenton, la génesis de radicales superóxido y radicales hidroxilo (Mussali *et al.* 2007). Se ha documentado que la expresión y la actividad de las MMPs puede ser inducida por especies reactivas de oxígeno, citocinas, óxido nítrico, y metabolitos de la ruta araquidónica. Basados en esta premisa la generación de radicales libres estimula la expresión y la activación de las MMPs (Lorenz S *et al.* 2002). Por lo tanto un incremento en el estrés oxidante podría activar a las metaloproteasas de matriz.

El mecanismo de activación aún no ha sido dilucidado por completo. Su activación por medio de la nitración u oxidación es llevada a cabo por una modificación de un grupo tiol de los residuos de metionina y cisteína que forman parte del sitio catalítico de las metaloproteasas, es decir, desenmascaran al sitio catalítico por la pérdida de la unión entre el prodominio y el dominio (Ethell I. *et al.* 2007).

Haorah J. y colaboradores plantean que la activación de la proteína tirosina cinasa (PTK) por especies reactivas de oxígeno incrementa la fosforilación de las proteínas que forman parte de la estructura de la barrera hematoencefálica: uniones adherentes, uniones estrechas (GAP junctions), lo que conlleva a la pérdida de esta barrera. Asimismo, receptores de la familia de la ruta de señalización PTK están involucrados como segundos mensajeros en la activación de las metaloproteasas.

Por lo que se tiene la hipótesis de que el estrés oxidante activa a las metaloproteasas a través de la señalización de PTK (Haorah J. *et al.* 2007).

Se propone que la estructura de las MMPs puede ser alterada debido a una excesiva oxidación, lo que conllevaría a una alteración en su función biológica. (Martín-Aragón S. *et al.* 2009).

Un mecanismo global supone que la MMP9 degrada los componentes de la lámina basal (fibronectina y laminina), provocando proteólisis de la MEC, lo que contribuye a la lesión y muerte celular, lo anterior se lleva a cabo a través de diversos mecanismos: aumento de la permeabilidad, destrucción de receptores de membrana y alteración de la comunicación celular (Castillo J. *et al.* 2004).

La expresión aberrante de las metaloproteasas ha sido descrita en diversas estructuras del sistema nervioso central, como el estriado y el hipocampo, estructuras que se ven alteradas en patogénesis como Parkinson y Alzheimer.

12.2 ESTRIADO

Se ha documentado que la MMP2 y 9 se expresan en neuronas, glia y endotelio (Kaczmarek L. *et al.* 2001). En este trabajo, la inmunolocalización se hizo en las neuronas espinosas medianas y no en la glia, la marca se presentó desde la segunda semana de inhalación en el núcleo de las neuronas, conforme aumentaba el tiempo de exposición la marca no sólo fue nuclear sino también citoplasmática, esto se puede deber a las fases de activación de las metaloproteasas, su expresión y activación es llevada a cabo por un proceso muy complejo y fuertemente regulado. A nivel nuclear se ha descubierto que estas metaloproteasas son capaces de adherirse a la polimerasa poly-ribosa-ADP (enzima de reparación del DNA), las metaloproteasas pueden inactivarla de forma similar a la de la caspasa 3 jugando un papel benéfico, sin embargo cuando hay una sobreexpresión de esta polimerasa se dificulta la reparación del DNA. . (Mannello F. *et al.* 2005)

La presencia de la MMP2 y 9 en el núcleo sugiere que pueden tener funciones similares a la de las caspasas en el núcleo. (Mannello F. *et al.* 2005)

Las metaloproteasas son reguladas a nivel transcripcional, en respuesta a oncogenes, factores de crecimiento, citocinas y hormonas, su activación es llevada a cabo dentro del núcleo (Dzwonek J. *et al.* 2004). Nuestro grupo de investigación reportó con anterioridad que el pentóxido de vanadio (vía inhalada) puede activar a estas metaloproteasas, en el estriado se observó un aumento en la actividad de la MMP2 desde la primera hora de inhalación, mientras que la MMP9 tuvo cambios significativos hasta la cuarta semana de inhalación (Colín B. *et al.* 2008).

Asimismo el pentóxido de vanadio (vía inhalada) provoca pérdida en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del estriado (Ávila-Costa *et al.* 2004). Este resultado podría correlacionarse con el aumento en las metaloproteasas observadas en este trabajo, ya que estas MMPs pueden influenciar el desarrollo de las espinas dendríticas y su remodelación (Bozdagi O. *et al.* 2007; Szklarczyk A. *et al.* 2002).

Se hizo un estudio piloto por este laboratorio en el que se evaluó la coordinación motora (por medio de la prueba de viga de equilibrio) en ratones expuesto a pentóxido de vanadio. La evaluación mostró alteración de la coordinación motora a partir de la segunda semana de inhalación (Cortés E. *et al.* 2008), lo que se asocia con la pérdida de las espinas en la neuronas estriatales (Ávila-Costa *et al.* 2004) que podría ser consecuencia de la degradación de la matriz extracelular.

Estos resultados en conjunto se asocian a la enfermedad del Parkinson (trastorno motor); como ya se había mencionada los niveles de las metaloproteasas 2 y 9 en tejido cerebral (postmortem) se encuentran elevados, lo que se vincula con la pérdida neuronal en dicha enfermedad, ya que las MMPs pueden ejercer un efecto neurotóxico causando la muerte neuronal; si se mantiene el estímulo la matriz continúa degradándose evitando la regeneración del circuito neuronal (Lorenzl S *et al.* 2002).

12.3 HIPOCAMPO

En un trabajo previo Szklarczyk *et al.* 2002, inyectaron ácido kaínico en cerebros de ratas adultas, este neurotóxico provocó un aumento diferencial en la expresión y activación de la MMP-9 en el hipocampo (únicamente en el giro dentado hubo sobrexpresión de esta MMP). No obstante, en esta investigación se observó que el pentóxido de vanadio provoca un aumento significativo en la concentración de la MMP 2 y 9 en todas las regiones del hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) desde la segunda semana de inhalación. La inmunolocalización de estas metaloproteasas se hizo en las neuronas piramidales y en las neuronas granulares. Esto es importante, ya que estas neuronas poseen numerosos receptores a glutamato (Milward E. A. *et al.* 2007), se sabe que este neurotransmisor participa en la sinaptogénesis y en la supervivencia neuronal, ya que la activación de estos receptores induce la producción de factores neurotróficos como NFG (factor de crecimiento del nervio) y BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro); en conjunto, el glutamato y estos factores, interactúan para regular el desarrollo y la neuroplasticidad en el adulto (Mattson M. 2008; Genoux D. *et al.* 2007). Recientemente se ha vinculado a estos factores (NFG y BDNF) como sustratos de las metaloproteasas, por lo que se reconoce su importancia dentro del sistema de señalización sináptica. (Michaluk P. *et al.* 2007; Ethell I. *et al.* 2007; Kaczmarek L. *et al.* 2002).

Una excesiva activación de los receptores de glutamato, que puede ser resultado del estrés oxidante puede generar muerte neuronal por excitotoxicidad (aumento de calcio intracelular) lo que contribuye a la disfunción neuronal que se observa en la enfermedad de Alzheimer (Mattson M. 2008).

De las tres regiones analizadas del hipocampo, en CA1 se pudo apreciar muerte neuronal a la cuarta semana de inhalación para la MMP9. Se ha documentado que las metaloproteasas juegan un papel importante durante la apoptosis, hay evidencia *in vitro* de que esta metaloproteasa está involucrada en la apoptosis durante el desarrollo de cerebelo, esto lo hace por medio de la degradación de proteínas de la

MEC (Vaillant C. *et al.* 2003). Las metaloproteasas pueden promover la apoptosis vía “anoikis” (alteración en la interacción entre célula-matriz) por su unión directa con integrinas y moléculas de adhesión como las cadherinas, influyendo en procesos como organización del citoesqueleto y adhesión celular (Milward E. A. *et al.* 2007; Munshi H. G. *et al.* 2006; Mannello F. *et al.* 2005).

En el hipocampo también se había reportado pérdida de espinas dendríticas de la neuronas piramidales de la región CA1, así como necrosis celular, lo que genera deficiencia en la memoria espacial, lo anterior fue corroborado por medio de la prueba conductual del laberinto de Morris (Ávila-Costa. *et al.* 2004). Se ha demostrado que la MMP9 está involucrada de manera directa en la pérdida de las espinas dendríticas (Michaluk P. *et al.* 2007). Al igual que para el estriado estos resultados se pueden vincular con el aumento de las metaloproteasas, y aún más importante su relación con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Martín-Aragón *et al.* 2008). En esta enfermedad, la MMP9 es capaz de degradar el β -amiloide por lo que se propone que la acumulación de esta proteína en pacientes con Alzheimer puede deberse a una deficiencia de la actividad de la MMP9, que puede ser una consecuencia del deterioro en la capacidad de reconfigurar la matriz extracelular (Wright J. *et al.* 2004).

12.4 PLEXO COROIDEO

En el plexo coroideo al igual que en las estructuras anteriores hubo aumento significativo en la concentración de la MMP 2 y 9. En la gráfica se aprecia una concentración más elevada para la metaloproteasa 9 que para la metaloproteasa 2 (Fig. 20). Este dato se puede ver reflejado en la inmunohistoquímica para la MMP9, en la que se distingue mayor daño a la estructura del plexo: dilatación de los vasos sanguíneos. Lo anterior se explica ya que esta metaloproteasa en especial, es capaz de desarrollar un elevado poder destructivo de estructuras neurovasculares, es decir participa de forma directa en el remodelamiento vascular, lo que favorece

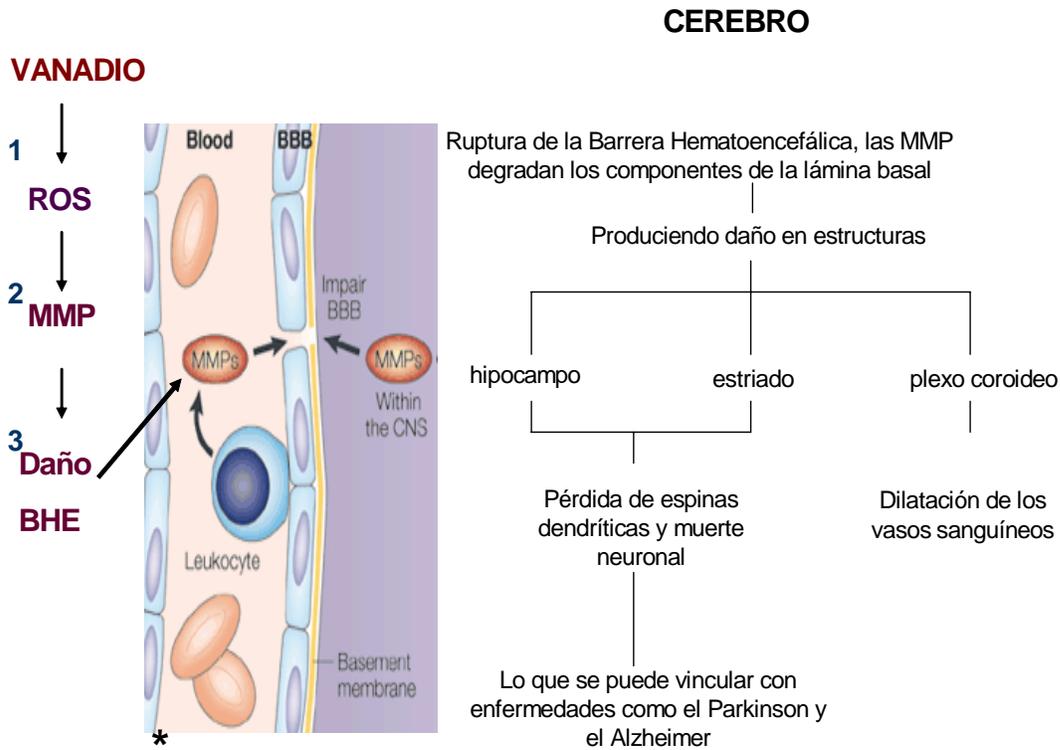
modificaciones en la composición y tamaño del vaso (Castillo J. *et al.* 2004). Se ha documentado que el pentóxido de vanadio provoca alteraciones en la estructura del epitelio ependimal, como ruptura de las uniones entre las células del epéndimo y pérdida de cilios (Ávila-Costa. *et al.* 2005), lo que puede conllevar a la ruptura de la barrera hematoencefálica, esto se asocia al incremento en la actividad de la MMP9 y 2, ya que estas metaloproteasas degradan proteínas de la membrana basal, rompen las uniones estrechas desestabilizando el endotelio e incrementando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Haorah J. *et al.* 2007). Lo anterior se relaciona con investigaciones previas en las cuales se ha observado alteraciones del citoesqueleto por efecto del vanadio, ya que este es catalogado como un agente dañino de microtubulos (Mussali P. *et al.* 2007). Un trabajo de este grupo de investigación ha demostrado que la inhalación a pentóxido de vanadio provoca un decremento en el porcentaje de la gamma-tubulina en las células testiculares de ratones (Sertoli, Leydig y células espermáticas) (Mussali P. *et al.* 2005), por lo que se piensa que el mecanismo del vanadio para inducir citotoxicidad es por medio de su interacción con diferentes elementos del citoesqueleto como la actina, la tubulina y la dineína (Mussali P. *et al.* 2007).

13. CONCLUSIONES

- El pentóxido de vanadio genera especies reactivas de oxígeno que podrían activar a las metaloproteasas a través del desenmascaramiento del sitio catalítico por medio de la modificación de un grupo tiol de los residuos de metionina y cisteína, es decir, pérdida de la unión entre el prodominio y el dominio.
- El pentóxido de vanadio en la concentración de 0.02 M generó un aumento significativo en la concentración de la MMP2 y 9 en las neuronas espinosas medianas del estriado a partir de la segunda semana de inhalación, lo que se puede vincular con la pérdida en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas antes reportadas.
- El pentóxido de vanadio provocó un aumento significativo en la concentración de la MMP2 y 9 en todas las regiones del hipocampo (CA1, CA3 y giro dentado) a partir de la segunda semana. Ambas metaloproteasas fueron localizadas en las neuronas piramidales (CA1 y CA3) y en las neuronas granulares (giro dentado) que poseen receptores de glutamato, que induce la producción de factores neurotróficos como NFG y BDNF y que son sustrato de las metaloproteasas, participando en conjunto en el proceso de sinaptogénesis. Lo anterior también se relaciona con la pérdida de espinas dendríticas de la neuronas piramidales de la región CA1 previamente reportado (Ávila-Costa. *et al.* 2004).
- El pentóxido de vanadio aumenta significativamente la concentración de la MMP2 y 9 en plexo coroideo a partir de la segunda semana de inhalación. El efecto de la metaloproteasa 9 en la arquitectura del plexo es más evidente que con la metaloproteasa 2, lo que puede deberse al poder destructivo de la MMP9 en estructuras vasculares. Este resultado se relaciona con la alteración

del epitelio ependimal, (ruptura de las uniones entre las células del epéndimo y pérdida de cilios) antes reportada, lo que se vincula con la ruptura de la barrera hematoencefálica en la que participan las metaloproteasas 2 y 9.

13.1 RECAPITULACIÓN



*Imagen modificada Yong W. *et al.* 2001

El pentóxido de vanadio puede generar especies reactivas de oxígeno (1) que puede activar a la MMP2 y 9 (2), si el estímulo se mantiene puede haber una segunda activación proteolítica de metaloproteasas, lo que provocaría un daño a la barrera hematoencefálica (degradación de los componentes de la lámina basal) (3). Esta ruptura de la barrera podría generar alteraciones de estructuras como hipocampo, estriado y plexo coroideo, lo que podría deberse a la degradación de la matriz extracelular, lo que conllevaría a una pérdida en la comunicación celular y por lo tanto muerte neuronal, lo que se vincula con enfermedades como Parkinson y Alzheimer.

14. ANEXO

INMUNOHISTOQUÍMICA

1. Para desparafinar los cortes, se dejan de 15-20 minutos en xilol.
2. Se pasan por el tren de alcoholes
3. Posteriormente se enjuagan con agua corriente y se colocan en un kopplin con PBS.
4. Los cortes se meten a la olla de presión (dejar por tres minutos alrededor de 15°C) en un kopplin que contiene 500 mL en una dilución de 1:20 en declere.
5. Se deja enfriar el kopplin con los cortes que acaban de salir de la olla de presión y hacer dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS.
6. Para cortes de cerebro, se inhibe la peroxidasa con peróxido de hidrógeno al 3% durante una hora.
7. Después de este tiempo se vuelven a hacer 3 lavados con PBS.
8. Se hace un cuarto lavado pero con PBS-albúmina para permeabilizar el tejido antes de colocarle en anticuerpo primario.
9. Antes de colocar el anticuerpo primario, se quita el exceso de líquido a la laminilla, sin dejar que se seque por completo el tejido. La concentración utilizada fue 1:200.
10. Las laminillas con el anticuerpo se meten a la estufa (37°C) durante 30 minutos.
11. Al salir de la estufa se hacen otros 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
12. Se hace un lavado más pero con PPS-albúmina, por un periodo de 10 minutos.
13. Una vez más se quita el exceso de líquido y se coloca el anticuerpo secundario (en nuestro caso fue para la MMP2 y la MMP9) en la concentración de 1:1000.
14. Las laminillas con el anticuerpo se meten a la estufa (37°C) durante 30 minutos.

15. Nuevamente se hacen 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
16. Para preparar las laminillas para el revelado se ocupa HRP. Se coloca una gota en cada corte de tejido que esté en nuestra laminilla y se deja en la estufa a 37°C durante 30 minutos.
17. Se hacen 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.
18. Antes de revelar se prepara el 1 mL del DAP durante 1 minuto.
- 19.** Se enjuagan los cortes se contratiñen y se montan para su posterior observación al microscopio.

15. REFERENCIAS

- Adels A, R. A. Bergman. (2006). Neuroanatomía Funcional. Texto y Atlas McGraw Hill 2ª Edición. México. Pp. 180-210.
- Amaral D. G, M. P. Witter. (1989). The three dimensional organization of the hippocampal formation *in* Neuroscience (31) 571-591
- Ávila-Costa M. R, T. I. Fortoul, G. Niño, L. Colín, P. Bizarro, A. L. Gutiérrez, J. L. Ordóñez, V. Rodríguez, P. Mussali, P. Díaz, V. Anaya. (2006). Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V₂O₅) promote memory deterioration *in* Neuro Toxicology. 27. pp. 1007-1012.
- Ávila-Costa M. R, L. Colín, A. Zepeda, S. B. Antuna, L. Saldivar, G. Espejel, P. Mussali, M. Ávila, A. Reyes, V. Anaya, T. I. Fortoul. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation, A mice experimental model *in* Neuroscience Letters. 381. pp. 21-25.
- Ávila-Costa M. R, E. Montiel, L. Colín, J. L. Ordóñez, A. L. Gutiérrez, H. G. Niño, P. Mussali, T. I. Fortoul. (2004). Nigrostriatal Modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach *in* Neurochemical Research. Vol. 29 No.7. pp. 1365-1369.
- Bharathi, R. Ravid, K. S. Jagannathan. (2006). Role of metals in neuronal apoptosis: challenges associated with neurodegeneration *in* Current Alzheimer Research. 3. pp. 311-326.
- Barceloux D. (1999). Vanadium *in* Clinical Toxicology Vol 37 (2). pp. 265-278.
- Bernhardt R. (2004). La barrera hematoencefálica en la patología del sistema nervioso central: su importancia en la respuesta inflamatoria *in* Rev. Chilena de Neuro-psiquiatría. 42 (2) SCielo. pp. 121-130.
- Betancourt J. (1992). Efectos Mutagénicos y alteraciones del ciclo reproductivo del ratón producidos por pentóxido de vanadio. Tesis de Doctorado. UNAM. México. pp. 1-35.
- Bozdagi O. *et al.* (2007). In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity *in* The American Physiological Society. 98. pp. 334-344.

- Bravo A. (1998). El ozono y otros contaminantes fotoquímicos en la Ciudad de México. Ecología. Cd. De México.

- Byczkowski J, A. P. Kulkarni. (1998). Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium *in* Vanadium in the environment. Part 2: Health Effects. pp. 235-255.

- Campbell I, A. Pagenstecher. (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the nervous system: the good, the bad and the enigmatic *in* International Conference on Metalloproteinases and the Inhibitors in the Nervous System: Physiology and Disease. Held in Banff, Canada.

- Calderón G, A. Mora, E. Ontiveros, G. Gómez, G. Barragán, J. Broadway, S. Chapman, G. Valencia, V. Jewells, R. Maronpot, C. Henríquez, B. Pérez, R. Torres, L. Herrit, D. Brooks, N. Osnaya, M. E. Monroy, A. González, R. Reynoso, R. Villarreal, A. C. Solt, R. W. Engle. (2008). Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs *in* Brain and Cognition. 68. pp. 117-127.

- Capella M, L. S. Capella, R. C. Valente, M. Gefé, A. G. Lopes. (2007). Vanadate-induced cell death is dissociated from H₂O₂ generation *in* Cell Biol Toxicol. Springer.

- Castillo J. R. Leira, M. Blanco. (2004). Metaloproteasas y lesión neurovascular *in* Neurología. 19(6). pp. 312-320.

- CEC. org. El mosaico de América del Norte: panorama de los problemas ambientales más relevantes. Partículas Suspendidas.

- Colín B, M G. Martínez, G. Baiza, M. Ávila, J. L. Ordóñez, P. Bizarro, V. Rodríguez, G. Piñón, M. Rojas, P. Mussali, T. I. Fortoul. (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation *in* Journal of Applied Toxicology. 28(6):718-723.

- Cortés E, L. Colín, N. Cervantes, R. Jiménez, M. R. Ávila, P. Bizarro, M. Martínez, P. Mussali, T. I. Fortoul. (2008). Alteración de la Coordinación Motora y de la concentración de las metaloproteasas 2 y 9 en estriado en un modelo murino de exposición por inhalación a pentóxido de vanadio. IX Congreso Nacional de Microscopía. Hotel Misión Guanajuato. Pág. 16

- Crans D, A. Tracey. (1998). The Chemistry of Vanadium in Aqueous and Nonaqueous Solution *in* Vanadium Compounds, Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications. (1998). American Chemical Society, Washington Dc. United State of American. pp. 2-22.

- Díaz-Cintra S, L. Granados, A. Aguilar, A. Sánchez, L. Cintra. (2001). El hipocampo y la malnutrición *in* Temas Selectos de Neurociencias II. Velázquez J. *et al.* (2001). Programa Universitario de Investigación a Salud.. UAM. México . pp. 437-453.

- Dzwonek J, M. Rylski, L. Kaczmarek. (2004). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neural physiology of the adult brain *in* FEBS Letters 567. pp. 129-135.

- El Universal. NOTIMEX (9 de Julio de 2008): Tiene México 106.7 millones de habitantes: INEGI: <http://www.el-universal.com.mx/notas/521396.html>

- Escobar A. (2003). Fisiopatología y neuropatología de la enfermedad de Parkinson *in* Revista Mexicana de Neurociencia 4 (5). Pág. 295-303.

- Ethell I, D. W. Ethell. (2007). Matrix Metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets *in* Journal of Neuroscience Research. 85. pp. 2813-2823.

- Ferrer A. (2003). Intoxicación por metales *in* Anales Sis San Navarra. Vol. 26, suplemento 1. pp 141-153.

- Fortoul T, M. Rojas. (2007). Vanadium as an Air Pollutant *in* Vanadium its impact on health. Fortoul T., M. R. Ávila (2007). Nova Science Publishers, Inc. New York. pp. 1-5.

- Fortoul T, A. Quan, I. Sánchez, E. I. López, P. Bizarro, M. Mendóza, O. Saldivar, G. Espejel-Maya, M. Ávila, M. R. Ávila-Costa, L. Colín, D. Navarro, G. Olaiz. (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960s and 1990s *in* Archives of Environmental Health. Vol. 57 (No. 5). pp. 1-4.

- Fujimura M, Y. Gasche, Y. Morita-Fujimura, J. Massengale, M. Kawase, P. Chan. (1999). Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion *in* Brain. Vol. 842 pp. 92-100.

- García G, A. D. Quiroga, N. Stürtz, A. I. Martínez, M. E. Biancardi (2004). Morfological alterations of central nervous system (CNS) myelin in vanadium (V)-exposed adult rats *in* Drug and Chemical Toxicology. Vol. 27. No. 0. pp. 1-13.

- Genox D, M. Montgomery (2007). Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain *in* Proceedings of the Australian Physiological Society. 38. pp. 1-7.

- Ghislain O. *et al.* (2001). Gelatinase B functions as regulador and effector in leukocyte biology *in* Journal of Leukocyte Biology. Vol. 69. pp. 851-859.

- Goc. A. (2006). Biological activity of vanadium compounds *in* VERSITA. CEJB 1(3). Pp. 314-332

- Gómez-Gómez. M, C. Danglot-Banck. (1998). Contaminación Ambiental en el Valle de México ¿Estamos haciendo lo necesario?. *in* Revista Mexicana de Pediatría. Vol. 65, Núm. 6. pp. 254-260.

- Groft LL, H. Muzik, NB. Rewcastle, RN Johnston, V. Knäuper, MA. Lafleur, PA Forsythe, DR Edwards. (2001). Differential expresión and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas *in* British Journal of Cancer. 85(1). pp. 55-63

- Haorah J, S. Ramirez, K. Schall, D. Smith, R. Pandya, Y. Persidsky. (2007). Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction *in* Journal of Neurochemistry. 101. pp. 566-576.

- Harrison M. (2003). Las ciencias medioambientales *in* El medio ambiente, Introducción a la Química Medioambiental y a la Contaminación. Harrison M. (2001) Ed. Acribia S.A. España. pp. 1-7.

- Kaczmarek L, J. Lapinska, S. Szymczak. (2002). Matrix metalloproteinase in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP1 and remodeling of neuronal connections? *In* The EMBO Journal. Vol. 21, No. 24. pp. 6643-6648.

- Kandel E, J. M. Schwartz, T. M. Jessell. (2001). Principios de Neurociencia. McGraw-Hill Interamericana. España. Pág. 1400.

- Kim J, D, M. Diamond. (2002). Neurobiología de las interacciones estrés-memoria: Modelo neuroendocrino para explicar cómo el estrés modifica el funcionamiento del hipocampo.

- Leonard A, G. B. Gerber. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compound *in* Mutation Research. 317. pp 81-88.
- Lin D. (1993). Free Radical and Disease Prevention. Keats Publishing, INC. New Cannan, Connecticut. Estados Unidos. pág. 78

- López C, J.C. García, A. Colín. (2001). Contaminantes Orgánicos e Inorgánicos en la Atmósfera *in* Daños a la Salud por Contaminación Atmosférica. Rico M, C. López, E. Jaimes, (2001). IMSS. Universidad Autónoma del Estado de México. México. pp. 83-97.

- Lorenzl S, D. Albers, S. Narr, J. Chirichigno, F. Beal. (2002). Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease *in* Experimental Neurology. 178. pp. 13-20.

- Magnoni S, A. Baker, S. George, W. Colin, L. Kerr, J. McCulloch, K. Horsburgh. (2004). Differential alterations in expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 after transient cerebral ischemia in mice *in* Neurobiology of Disease. Vol. 17 pp. 188-197.

- Mannello F, F. Luchetti, E. Falcieri, S. Papa. (2005). Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis *in* Apoptosis. Vol. 10. No. 1. pp. 19-24.

- Martín-Aragón S, P. Bermejo, J. Benedí, E. Felici, P. Gil, J. M. Ribera, Á. Villar. (2009). Metalloproteinases' activity and oxidative stress in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease *in* Neurochem Res. 34. pp. 372-378.

- Mattson Mark P. (2008). Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease *in* Ann N Y Acad Sci. pp. 97-112.

- Mena S, P. Bolam, P. J. Magill. (2001) Los ganglios basales más allá del movimiento.

- Michaluk P, Kaczmarek L. (2007). Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction *in* Cell death and differentiation. 14. pp. 1255-1258.
- Milward E. A, C. Fitzsimmons, A, Szklarczyk, K. Conant. (2007). The matrix metalloproteinases and CNS plasticity: An overview *in* Journal of Neuroimmunology. 187. pp. 9-19.

- Mukherjee B, B. Patra, S. Mahapatra, P. Banerjee, A. Tiwari, M. Chatterjee. (2004). Vanadium an element of atypical biological significance *in* Toxicology Letters. 150. pp. 135-143.

- Munshi H.G, M. S. Stack. (2006). Reciprocal interactions between adhesion receptor signaling and MMP regulation *in* Cancer Metastasis Rev. 25. pp. 45-56.

- Muñoz C, M. R. Carmona, M. G. Granados, O. Rivera, Ma. E, Martínez, L. García, R. Gaona. (1998). Informe Annual de Calidad del Aire en el Valle de México. pp. 40.

- Mussali G. P, V. Rodríguez, M. R. Ávila, T. I. Fortoul. (2007). Mechanisms of vanadium toxicity *in* Vanadium its impact on health. Fortoul T., M. R. Ávila (2007). Nova Science Publishers, Inc. New York. pp. 1-5.

- Mussali G, V. Rodríguez, B. Hernández, M. Ávila-Costa, L. Colín, P. Bizarro, G. Martínez, M. Rojas, G. Piñón, L. Saldivar, P. Díaz, M. A, Herrera, E. Tovar, T. I. Fortoul. (2005). Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse teste at different exposure times *in* Toxicology and Industrial Health. 21. pp. 215-222.

- Noback C, R. J. Demarest. (1993). Sistema Nervioso Humano. Fundamentos de Neurología. McGrawHill. México. pp. 51-61.

- Opdenakker G, P. Van den Oteen, B. Dubois, In. Nelissen, E. Van Coillie, S. Masure, P. Proost, J. Van Damme. (2001). Gelatinase B functions are regulator and effector in leukocyte biology *in* Journal of Leukocyte Biology. Vol. 69. pp 851-859.

- Ozlem B, V. Nagy, Kimberly T, T. Kei, G. W. Huntley. (2007). In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity *in* J Neurophysiol. 98. pp. 334.344,

- Pardo A. (2008). Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar *in* XXXII Mensaje Bioquímico. Bustos J. *et al.* (2008). Facultad de Medicina, UNAM. Departamento de Bioquímica. México. pp. 39-47.

- Parquet A, M. F. Romano, M. D. Nissen, N M. Del Huerto. (2007). Enfermedad de Alzheimer *in* Revista de Posgrado de la Via Catedra de Medicina. No. 175. pp 9-12.

- Parsadonian H, S N. Marchenko, K. H. Parsadonian, I. R. Barilyak. (1998). Vanadium as a factor that disturbs phosphorus metabolism in nervous tissue *in* Neuro Toxicology. 19(4-5). pp. 561-564.

- Rangel A. (2001). Contaminantes Atmosféricos. Contaminación y Contaminates *in* Daños a la Salud por Contaminación Atmosférica Rico M. *et al.* (2001). IMSS. Universidad Autónoma del Estado de México. México. pp. 98-121.

- Revista panamericana de Salud Pública. La enfermedad de Alzheimer en el año 2000 (2001) V. 10 n.4. Washington. Pág. 1-11: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s102049892001001000012.

- Rivas S, L. Colín, C. Dorado, T. Fortoul. (2001). Estrés Oxidativo y Neurodegeneración *in* Temas Selectos de Neurociencias II. Velázquez J. *et al.* (2001). Programa Universitario de Investigación a Salud.. UAM. México . pp. 351-366.

- Rodríguez-Mercado J, Altamirano-Lozano M. (2006). Vanadio:Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad *in* Revista Int. Contaminación Ambiental. 22 (4). Pp. 173-189.
- Rosenberg G. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation *in* GLIA. 39. pp. 279-291.

- Serrano-Sierra A, J. Sierra-Monge, M. Gómez-Gómez, (1996). Contaminación Ambiental *in* Urgencias en Pediatría. 4a ed. Interamericana Mc. Graw-Hill, México. pp. 6-10.

- Soria A, E. Díaz, R. Guber, N. Arias, N. Ruiz de Martínez. (2005). Niveles séricos de la metaloproteinasa-9 en mujeres con patologías mamarias *in* Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39 (2). pp. 157-161.

- Szklarczyk A, J. Lapinska. M. Rylski, R. McKay, L. Kaczmarek. (2002). Matrix Metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus *in* The journal of Neuroscience Vol. 22 (3). pp. 920-930.

- Tsiani E, I.G. Fantus. (1997). Vanadium Compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents *in* TEM. Vol. 8. No, 2. pp. 51-56.

- Tsukatani T, H. L. Fillmore, H. R, Hamilton, E. H. Holbrook, R. M. Constanzo. (2003). Matrix metalloproteinase expression in the olfactory epithelium *in* NeuroReport Vol. 14 (8). pp. 1135-1140.

- Vaillant C, C. Meissirel C, M. Mutin, Belin F. Lund LR, N. Thomasset. (2003). MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migrations, and apoptosis in the developing cerebellum *in* Mol Cell Neurosci 24: pp. 395-408.

- Vallejo M, K. Jáuregui-Renaud, A. Hermosillo, M. F. Márquez, M. Cárdenas. (2003). Efectos de la Contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México *in* Gaceta Médica de México. Vol. 139 No. 1. pp. 56-61.

- Wright J. J. W. Harding. (2004). The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory *in* Progress in Neurobiology. 72. pp. 263-293.

- Yong Wee. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS *in* Nature reviews Neuroscience. Vol. 6. pp. 931-944.

- Yong Wee, C. Power, P. Forsyth D. R. Edwards. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system *in* Nature reviews Neuroscience. Vol. 2. pp. 502-511.

- Yong Wee, C. A. Krekoski, P. A. Forsyth, R. Bell, D. R. Edwards. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS *in* Trends Neurosci. 21. pp. 75-80.

- Zhuo Z, C. Huang, J. Li, S. Leonard. R. Lanciotti, L. Butterworth, X. Shi. (2001). Vanadate-Induce cell growth regulation and the role of reactive oxygen species *in* Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 392. No. 2. pp. 311-320