

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



## FACULTAD DE CIENCIAS

Alteraciones en la neurogénesis, función y citología de las neuronas granulares del giro dentado, producidas por la inhalación de vanadio. Diferencias por sexo.

### T E S I S

Que para obtener el título de  
**BIÓLOGA**

P R E S E N T A :  
**CAROLINA VEGA BAUTISTA**

DIRECTORA DE TESIS  
**Dra. LAURA COLÍN BARENQUE**

2012





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:	Vega
Apellido materno:	Bautista
Nombre(s):	Carolina
Teléfono:	52596388
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela:	Facultad de Ciencias
Carrera:	Biología
Número de cuenta:	304302202
2. Datos del Tutor	
Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Colín
Apellido materno:	Barenque
Nombre(s):	Laura
3. Datos del sinodal 1	
Grado:	Dra.
Apellido paterno:	Gonsebatt
Apellido materno:	Bonaparte
Nombre(s):	María Eugenia
4. Datos del sinodal 2	
Grado:	Dr.
Apellido paterno:	Ramírez
Apellido materno:	Rodríguez
Nombre(s):	Gerardo Bernabé
5. Datos del sinodal 3	
Grado:	Dr.
Apellido paterno:	Carrillo
Apellido materno:	Mora
Nombre(s):	Paul
6. Datos del sinodal 4	
Grado:	M. en C.
Apellido paterno:	Bizarro
Apellido materno:	Nevares
Nombre(s):	Martha Patricia
7. Datos del trabajo escrito	
Titulo: Alteraciones en la neurogénesis, función y citología de las neuronas granulares del giro dentado, producidas por la inhalación de vanadio. Diferencias por sexo.	
Número de páginas: 54	
Año: 2012	

## **Agradecimientos y dedicatorias**

Mamá, papá, hermanita, les dedico ustedes mi primer trabajo escrito, mil gracias por todo el apoyo y la ayuda que siempre me han brindado, gracias a ustedes he podido realizar una de mis metas con gran satisfacción, los amo.

Ray, también te dedico esta tesis, por estar a mi lado, por ayudarme y apoyarme en todo momento, porque estuviste presente y fuiste parte de esta experiencia, muchas gracias, te amo.

Laura, te quiero agradecer inmensamente todo lo que me enseñaste en este tiempo, gracias por tu infinita paciencia, por tu apoyo y por tu guía durante este trabajo. Gracias a ti crecí como estudiante y me llevo muchísimos nuevos conocimientos y experiencias satisfactorias. Mil gracias.

Paty, Marce, Adri, muchas gracias por todos sus comentarios, por haberme brindado su ayuda durante el tiempo que estuve en el laboratorio, gracias a ustedes tuve una cálida estancia.

Paco y Armando, muchas gracias con su apoyo en la toma de fotos y videos con la prueba del laberinto acuático de Morris y por sus comentarios constructivos sobre la tesis, siempre fueron reconfortantes.

Tere, gracias por permitirme ser parte del gran equipo de trabajo que es el laboratorio, ha sido una muy grata experiencia.

Ani, Dino, Andy, Vero, Stefi, gracias por brindarme su amistad y por todos los momentos que hemos pasado en el laboratorio, las quiero mucho.

A todos mis amigos, por estar a mi lado apoyándome y pasando buenos momentos juntos, Miriam, Sofi, desde la secundaria nos hemos estado apoyando, gracias por su amistad y cariño, las adoro, Ivonne, Andy, gracias por esta linda amistad que tenemos, con ustedes he vivido muchas aventuras, las quiero mucho. Lupi, Citla, Cris, ustedes fueron mis primeros amigos en la facultad y por ello valoro mucho nuestra amistad, gracias por todos los momentos que vivimos juntos.

También agradezco al comité revisor de la tesis por todos sus comentarios y sugerencias;

- Dra. Laura Colín Barenque
- Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
- Dr. Gerardo Bernabé Ramírez Rodríguez
- Dr. Paul Carrillo Mora
- M. en C. Patricia Bizarro Nevares

Así como al laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología celular y Tisular, de la Facultad de Medicina, en especial a la Técnica Académica Verónica

Rodríguez Mata y al Laboratorio de Inmunoterapia e ingeniería de Tejidos, por prestarnos su microscopio para la toma de fotografías.

Y a todos aquellos que pusieron su granito de arena durante mi formación como estudiante y como persona. Muchas gracias.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto DGAPA PAPIIT IN 220211

---

---

# ÍNDICE

---

---

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Contaminación ambiental.....	3
1.1.1 Contaminación en la ZMVM.....	3
1.1.2 Partículas suspendidas.....	4
1.2. Vanadio.....	5
1.2.1 Características generales.....	5
1.2.2 Usos y Fuentes de emisión.....	6
1.2.3 Vías de exposición al vanadio.....	7
1.2.4 Toxicidad del vanadio.....	8
1.2.5 Estrés oxidante.....	9
1.2.6 Efectos tóxicos en el SNC.....	10
1.3 Estrés oxidante y enfermedad de Alzheimer.....	11
1.4 Formación hipocampal.....	12
1.4.1 Estructuras de la formación hipocampal.....	12
1.4.2 Giro dentado.....	13
1.4.3 Neurogénesis en giro dentado en adulto.....	15
1.5 Dimorfismo sexual en SNC.....	18
2. Justificación.....	19
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivos.....	20
4.1 Objetivo general.....	20
4.2 Objetivos particulares.....	20

---

---

## ÍNDICE

---

---

5. Método.....	21
5.1 Laberinto de Morris.....	21
5.2 Exposición a vanadio y sacrificio.....	21
5.3 Cuantificación de espinas dendríticas.....	22
5.4 Neurogénesis.....	22
6. Resultados.....	23
6.1 Memoria espacial.....	23
6.2 Densidad de espinas dendríticas.....	25
6.3 Neurogénesis.....	30
7. Discusión.....	34
8. Conclusión.....	44
9. Anexo.....	45
9.1 Laberinto de Morris.....	45
9.2 Técnica de Golgi rápida.....	46
9.3 Inyección de BrdU.....	47
9.4 Inmunohistoquímica para BrdU.....	47
10. Bibliografía.....	48

## ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPA	A-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propianato
BrdU	Bromodeoxiuridina
CA	Cuerno de Amón
Ca	Calcio
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
GD	Giro Dentado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOO <sup>·</sup>	Radical hidroperóxido
LTP	Potenciación a largo plazo
MMP's	Metaloproteinasas
NMDA	N-Metil-D-aspartato
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Radical Superoxido
OH <sup>·</sup>	Radical Hidroxilo
PKA	Proteína quinasa A
PM	Partículas suspendidas
ROS	Especies reactivas de Oxígeno
Shh	Gen Sonic Hedgehog
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superoxido dismutasa
TH	Tirosina Hidroxilasa
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de Vanadio
V <sub>(IV)</sub>	Vanadil
V <sub>(V)</sub>	Vanadato
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México
ZSG	Zona Subgranular

## RESUMEN

La contaminación ambiental es un problema que afecta la salud de la población a nivel mundial, principalmente en las ciudades en desarrollo como es el caso de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), debido a sus características socio-geográficas como el incremento de la actividad industrial y del parque vehicular que desprende emisiones gaseosas que contribuyen a la contaminación.

Entre las emisiones que se liberan a la atmósfera a partir de la quema de combustibles fósiles se encuentran las partículas suspendidas, donde se adosan metales como el vanadio, que se encuentra en altas concentraciones en la mezcla de petróleo mexicano y sus derivados. Es por eso que la principal vía a la que la mayoría de la población se encuentra expuesta al vanadio es la inhalada.

Se sabe que la exposición a vanadio produce alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, utilizando un modelo por inhalación de vanadio, se observó alteración de la memoria espacial y decremento en el número de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Además si se mantiene un periodo de 8 semanas postexposición sin el metal, se observa que permanecen las alteraciones producidas por la inhalación de vanadio, en las regiones CA1 y CA3 en machos, mientras que en las hembras se observa recuperación parcial de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales y recuperación de la memoria espacial.

Debido a que el Giro Dentado (GD) es una estructura perteneciente al hipocampo, que está involucrado en procesos de memoria y cognición y presenta neurogénesis en el adulto, se planteó como objetivo de este trabajo determinar las alteraciones conductuales y citológicas producidas en el GD, dentro del mismo modelo de inhalación a vanadio durante 4 semanas, con y sin tiempo de postexposición de 8 semanas en ambos sexos.

Se evaluó la memoria espacial de 20 ratones macho y 20 ratones hembra de la cepa CD-1, en el Laberinto acuático de Morris, así como la neurogénesis y la densidad espinosa de las neuronas granulares del Giro dentado, por medio de la técnica de Golgi rápida y la inmunohistoquímica para BrdU respectivamente.

Para su estudio y evaluación, se formaron seis grupos; grupo control, grupo expuesto durante 4 semanas a  $V_2O_5$  y grupo post-expuesto por 8 semanas, subdivididos cada uno en hembras y machos.

Los resultados mostraron que el vanadio produce alteraciones en la memoria espacial, disminución de la densidad espinosa y en la neurogénesis en ratones macho y hembra a las 4 semanas de exposición al vanadio.

A las 8 semanas post-exposición los machos presentan recuperación de la memoria espacial, tendencia a aumentar la densidad espinosa y la neurogénesis. Mientras que las hembras no presentaron alteraciones de la memoria espacial y aumento significativo de la densidad espinosa, lo que nos indica que hay diferencias entre sexos.

Finalmente, podemos concluir que el giro dentado es una estructura cerebral que mostró plasticidad citológica y funcional en un periodo de dos meses de post-exposición.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL**

La contaminación ambiental se define como la presencia de concentraciones elevadas, de alguna sustancia en el ambiente la cuál puede causar algún cambio físico, químico o biológico en la calidad del aire, agua o suelo. (Yang y cols., 2008)

La contaminación ambiental se origina de dos fuentes; la natural y la antropogénica. La natural comprende erupciones volcánicas e incendios forestales naturales, mientras que la antropogénica tiene su origen en la industria, el comercio y el tránsito vehicular que implica la quema de combustibles fósiles. (Bernstein, 2004; Mayer, 1999)

En las últimas décadas la contaminación se debe esencialmente al incremento de la demanda y consumo de energía en todo el mundo, la mayoría de esta energía proviene de la quema de combustibles fósiles como el carbón, el gas natural y el petróleo. (Rojas 2007)

Actualmente, los combustibles fósiles proveen casi el 88% del total de la energía que se consume en todo el mundo, siendo el principal problema de la contaminación atmosférica global la cuál es responsable de daños al ambiente, a la salud pública y a la calidad de vida (Rojas, 2007)

Particularmente se ha observado, que la contaminación atmosférica se incrementa en lugares con alta urbanización y gran crecimiento industrial y tecnológico como las grandes ciudades, por ejemplo la Zona Metropolitana del valle de México. (Caldreón y cols., 2008;Rojas, 2007)

#### **1.1.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA EN LA ZONA METROPOLITADA DEL VALLE DE MÉXICO (ZMVM)**

México es un país que presenta problemas de contaminación ambiental principalmente en las zonas en vías de desarrollo urbano, industrial y tecnológico como es el caso de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) (Caldreón y cols., 2008;Rojas 2007; SMA, 2010)

Actualmente, la ZMVM es uno de los sitios más contaminados del país, debido a sus características socio-geográficas: su área comprende el Distrito Federal más 59 municipios del Estado de México, los cuales suman 7732km<sup>2</sup>, es una cuenca hidrológica situada a 2,240 metros sobre el nivel del mar, la cual se encuentra rodeada por una serie de volcanes y montañas con una altura promedio de 1000m sobre la parte central de la ZMVM, lo que no permite una adecuada dispersión de los contaminantes (Calderón y cols., 2008; SMA, 2010).

En esta zona habitan cerca de 20 millones de personas y operan alrededor de 35,000 industrias en 54 zonas industriales, además debido a la falta de transporte público eficiente, cada año incrementa el parque vehicular particular, por lo que hoy en día circulan cerca de 4 millones de vehículos, los cuales consumen cerca de 40 millones de litros de combustible al día que eventualmente emiten al aire cerca de 2.6 millones de toneladas de partículas y gases contaminantes al año. (Vallejo y cols., 2003; Mckinley y cols., 2005; Calderón y cols., 2008; INEGI, 2010).

En consecuencia se ha observado, un constante incremento en los niveles de partículas suspendidas las cuales han sido asociadas con la morbilidad y mortalidad humana, como las enfermedades cerebro-vasculares y enfermedades neurodegenerativas. (Mckinley y cols., 2005; Calderón y cols., 2008; Amador y cols., 2011)

### **1.1.2 PARTÍCULAS SUSPENDIDAS**

Las partículas suspendidas son una mezcla heterogénea de partículas sólidas y líquidas, que se encuentran en el aire. Hay dos tipos de partículas, las partículas primarias que se emiten directamente a la atmósfera, como el diesel y las secundarias, las cuales se crean a través de la transformación físico-química de los gases como el nitrato y el sulfato.

Se ha observado que la inhalación de estas partículas derivadas de la contaminación, están asociadas con daños en diferentes sistemas, ya que pueden ser vehículo de sustancias tóxicas, como los metales. Uno de los sistemas que se ve afectado es el sistema nervioso, ya que puede incrementar la oxidación lipídica y el estrés oxidante. (Morgan y cols., 2011; Vallejo y cols., 2002)

Para su estudio las partículas suspendidas se clasifican principalmente en tres grupos de acuerdo con su tamaño:

- PM10 o partículas burdas: Su diámetro es de 2.5-10 $\mu$ , y son partículas que pueden entrar a las vías aéreas altas, derivadas del polvo de tierra, escombros de construcción, o agregados de pequeñas partículas de combustión, así como metales, sal marina o polen.
- PM <2.5 o partículas finas: Su diámetro es menor de 2.5 $\mu$  pero mayor que 0.1 $\mu$ , estas pueden llegar hasta los alvéolos. Estas partículas generalmente se originan a partir de la combustión, principalmente de diesel, incluyendo el carbono, el plomo y el vanadio
- PM <0.1 o partículas ultrafinas: Su diámetro, como su nombre lo indica, es menor a 0.1 $\mu$ , y son capaces de llegar hasta los alvéolos y acumularse ahí debido a su tamaño. Son el resultado de los procesos de combustión de gasolina y diesel, su tiempo de vida es corto debido a que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño. (Bernstein, 2004; Fortoul y cols., 2007; Vallejo y cols., 2003)

Uno de los metales que se encuentran adosados a las partículas suspendidas es el vanadio, el cuál es desprendido hacia la atmósfera, principalmente a partir de los procesos de la quema de combustibles fósiles.

## **1.2 VANADIO**

### **1.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.**

El vanadio fue descubierto en el año de 1801 por el químico español Andrés Manuel del Río, quien lo nombró por primera vez eritronio, sin embargo, el científico sueco Nils Sefstrom en el año de 1831 lo nombró vanadio, aludiendo la belleza de la Diosa Vanadis, ya que sus sales poseen hermosos colores. (García, 2006; Mukherjee y cols., 2004)

El vanadio es miembro del grupo VB de la tabla periódica, presenta diversos estados de oxidación que van del -1, 0,+2,+3,+4 (el más estable) y hasta el +5, siendo la forma más

predominante en el ambiente, formando así, un gran número de compuestos. (OMS, 1995; Rodríguez y cols., 2006)

Es el elemento número 22 más abundante en la corteza terrestre, fusionado con otros 68 minerales diferentes y se le encuentra también en alimentos, aunque en pequeña cantidad, como cereales, pescado, frutas frescas y vegetales, en una mayor cantidad solamente en hongos, almejas, pimienta negra, entre otros. (Mukherjee y cols., 2004;García, 2006; Barceloux, 1999)

### **1.2.2 USOS Y FUENTES DE EMISIÓN**

La producción mundial anual de vanadio es de 5.8 millones de kilos, del cual el 75% es utilizado en la industria metalúrgica para la producción y limpieza de aceros especiales y para mejorar la calidad de las superficies de vaciado en la fundición. (UPC, 2007)

El vanadio también es utilizado para hacer el vidrio, barnices y esmaltes para porcelana y cerámica, en lacas y pinturas, como mordientes en la tinción de telas y en sustancias químicas fotográficas, sustancias químicas luminiscentes y tubos de rayos catódicos. Las aleaciones de vanadio no ferroso se emplean en la industria nuclear y aeroespacial, también se utiliza como aditivos para el hule (OMS, 1995; Barceloux, 1999)

El pentóxido de vanadio y los vanadatos se utilizan como catalizadores en la producción de ácido sulfúrico, en la oxidación de compuestos orgánicos, en el cracking del petróleo y en convertidores catalíticos para los gases de escape de motores de combustión interna emitiéndose así 8.4 toneladas globalmente al año. (Fortoul y Rojas-Lemus, 2007)

Por otra parte también se le han encontrado propiedades farmacológicas en modelos animales, se ha demostrado su uso contra la diabetes y la obesidad, debido a que puede reducir las concentraciones de colesterol, triglicéridos y niveles de glucosa, además de que tiene efectos diuréticos. También se ha demostrado, que podría funcionar como anticarcinógeno, a dosis bajas, ya que inhibe la proliferación celular. (Das, 2012; Etcheverry, 2012)

### 1.2.3 VÍAS DE EXPOSICIÓN AL VANADIO

Debido a su versatilidad y a la gran variedad de compuestos que el vanadio puede formar, existen varias formas por las cuales podemos estar en contacto con él, ya que se encuentra presente en el aire, el agua y los alimentos.

Se sabe que en el agua de mar se puede encontrar vanadio disuelto en su forma pentavalente en concentraciones de 0.3 µg/L a 29µg/L y en agua dulce en concentraciones de 0.1µg/L a 220µg/L. Resaltando que las altas concentraciones de vanadio en agua dulce fueron encontradas en cuerpos de agua cercanos a plantas metalúrgicas. (IARC, 2003)

En los alimentos lo podemos encontrar en hongos, en algunas bebidas como la cerveza, en pescados y mariscos. (OMS, 1995)

Nos encontramos expuestos vía aérea debido a que el vanadio se localiza en aerosoles marinos, en el polvo y en las emisiones volcánicas como producto de la actividad natural, y como consecuencia de las actividades antropogénicas; la actividad metalúrgica y la quema de restos fósiles los cuáles emiten al ambiente entre 70,000 y 210,000 toneladas anuales de vanadio a la atmósfera. (IARC, 2003)

Por lo tanto se sabe que según la fuente el vanadio tiene tres vías de acceso al organismo, la dérmica, la entérica y la inhalada.

La vía dérmica es la menos importante debido a que la absorción es mínima a causa de la poca solubilidad de este elemento. Por medio de la vía entérica, dependiendo la dieta, se puede ingerir, en promedio, no más de 30µg/día del cual solo se absorbe aproximadamente el 10% en el tracto gastrointestinal. (OMS, 1995; Rodríguez y Altamirano, 2006)

Finalmente se encuentra la vía inhalada, a la que la mayoría de la población se encuentra expuesta en mayor o menor medida. En la exposición laboral las concentraciones pueden alcanzar los 10-100mg/m<sup>3</sup>, siendo que el máximo permitido es de 0.05-0.1mg/m<sup>3</sup>. (OMS, 1995; Kulkarni, 2007). Mientras que el resto de la población se encuentra expuesta por el incremento de las emisiones de V provocadas por el aumento del consumo de los combustibles fósiles, en áreas rurales se observan concentraciones menores a 0.024µg/m<sup>3</sup>, mientras que en las áreas urbanizadas las concentraciones de vanadio van de 0.15 a 1.4 µg/m<sup>3</sup>, como es el caso de la ZMVM que es de aproximadamente 0.114 µg/m<sup>3</sup> en aeropartículas de 10 µm y 0.093 µg/m<sup>3</sup> en aeropartículas de 2.5µm, siendo que el límite

permitido de la concentración de vanadio es de  $0.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . (J-Son Lagerkvist B. y Oskarsson, 2007; García, 2006; Rodríguez y Altamirano, 2006; Barceloux, 1999; OMS, 1995)

#### **1.2.4 TOXICIDAD DEL VANADIO**

La toxicidad del vanadio depende de varios factores, como son el compuesto, la concentración, la vía y el tiempo de exposición. (OMS, 1995; Rodríguez y Altamirano, 2006).

La vía por la cual se absorbe mayor cantidad de vanadio es por la inhalada, ya que cuando se inhala el vanadio ingresa por la nariz para ser llevado por medio de las vías respiratorias altas hasta los pulmones dónde dependerá de la solubilidad de los compuestos en el que se encuentre el vanadio para que llegue hasta los alvéolos. (OMS, 1995)

Una vez que se encuentra ahí es absorbido y llevado al torrente sanguíneo en forma de vanadato, reduciéndose una parte de este al ión vanadil por el glutatión de los eritrocitos o el ácido ascórbico presente en el plasma sanguíneo. (García, 2006; Rodríguez y Altamirano, 2006)

En el torrente sanguíneo el vanadil y el vanadato son transportados por la transferrina y albúmina respectivamente hasta llegar a distintos órganos como los riñones, el hígado, el hueso, el bazo y el sistema nervioso central (SNC). (García, 2006; Rodríguez y Altamirano, 2006)

El pH neutro del plasma propicia la abundancia de vanadato, el cuál entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico inespecífico, principalmente por los canales de fosfato. Una vez en el interior de la célula vuelve a reducirse a vanadilo por el glutatión al que permanece unido. (Rodríguez y Altamirano, 2006)

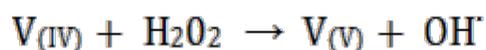
Esto provoca estrés oxidante dentro de la célula, ocasionando alteraciones en el mecanismo antioxidante en los tejidos, lo que puede producir peroxidación lipídica, estimulación de la proliferación celular, y/o apoptosis. Además también puede estimular la oxidación del NADPH, una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas de oxígeno. (Byczkowski, 1998)

Las reacciones que se llevan a cabo dentro de las células y donde se producen las especies reactivas de oxígeno (ROS), pueden formar peroxivanadil y vanadil hidropéroxido. (Byczkowski, 1998). El vanadio que no es absorbido se desecha en su forma vanadato, siendo la orina y las heces fecales los principales medios de excreción, o bien como ruta secundaria en la excreción biliar y la saliva. (Mukherjee y cols., 2004; Rodríguez y Altamirano, 2006; Baran, 2008)

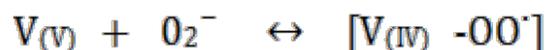
### 1.2.5 ESTRÉS OXIDANTE

El estrés oxidante se define como el resultado de un desequilibrio entre los sistemas prooxidantes, como el aumento de metales, inflamación, fármacos etc. y los antioxidantes como el glutatión intracelular, la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD), acompañado de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical superóxido  $O_2^-$ , el radical hidróxido  $OH^\cdot$ , el radical hidropéroxido  $HOO^\cdot$  y el peróxido de hidrógeno, esto acompañado de daño celular y/o tisular. (Bernstein, 2004; Baymes, 2005)

Los mecanismos por los cuales el vanadio puede promover la formación de ROS son principalmente tres, uno de ellos se lleva a cabo mediante la reacción Fenton en donde el peróxido de hidrógeno puede reaccionar con el vanadil produciendo el radical libre hidróxido y al vanadil al vanadato (Byczkowski, 1998):



Si el vanadio se encuentra en un ambiente quelante en superóxido, puede seguir haciendo complejos con la mitad del vanadato y el oxígeno disponible, formando peroxivanadil, el cual no durará mucho bajo condiciones normales biológicas (Byczkowski, 1998):



Este último compuesto desaparece por la extracción del hidrógeno por biomoléculas, reacción que a su vez producirá vanadil hidroperóxido como intermediario para que continúe el ciclo con la reacción Fenton (Byczkowski, 1998) una vez que vuelva a su forma de vanadil:



En el caso del SNC, si las especies reactivas no están equilibradas pueden promover daño severo, ya que el cerebro presenta grandes concentraciones de ácidos grasos polinsaturados en la mielina que rodea a los axones, su alta actividad metabólica y a que posee menor cantidad de antioxidantes en comparación con otros órganos. (Patricò, 2008)

### **1.2.6 EFECTOS TÓXICOS EN EL SNC**

Uno de los sistemas afectados debido al aumento de ROS generados por el vanadio es el SNC, debido a que tiene altas cantidades de lípidos, a su gran actividad metabólica y que tiene bajas concentraciones de antioxidantes. (Ávila y cols., 2007; Cooper y Lowenstein, 2007)

Un estudio realizado en ratas adultas inyectadas con metavanadato por vía intraperitoneal, demostró que las ratas presentaban hipoactividad, decremento de la mielina en el cuerpo calloso y en el cerebelo, así como alta peroxidación lipídica en el cerebelo y en el hipocampo (García y cols., 2004).

Estudios realizados con pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) al 0.02M en un modelo por inhalación en ratones CD1 durante cuatro semanas, mostraron evidente pérdida de neuronas tirosina hidroxilasa (TH) inmunoreactivas en la sustancia nigra y decremento de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del estriado, alteraciones de la barrera hematoencefálica, como pérdida de cilios en el epitelio ependimal del cuarto ventrículo, desprendimiento de la membrana basal y la ruptura de las uniones entre las células ependimales. Así como alteración de memoria espacial, pérdida de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, necrosis y vacuolización del neuropilo. (Ávila y cols., 2004, 2005, 2006).

En el mismo modelo se evaluaron las alteraciones en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratones hembras y machos expuestos a vanadio durante 4 semanas con y sin un periodo de 8 semanas libres de exposición, se observó que ambos sexos presentaban alteraciones en la memoria espacial y en la densidad espinosa y que a las 8 semanas libres de exposición, los machos no presentaron recuperación de la memoria espacial y prevalecía la pérdida de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de ambas regiones a diferencia de las hembras que presentaron mejoría de la memoria espacial y recuperación de las espinas dendríticas. (Niño y cols., 2004; Martínez y cols., 2009)

Por otra parte también se realizó un estudio ultraestructural en dónde se encontró muerte celular en las neuronas del giro dentado (GD), invaginación nuclear, dilatación del retículo endoplásmico y aparato de Golgi y edema mitocondrial. (Colín y cols., 2009)

Uno de los factores de riesgo en la enfermedad de Alzheimer es el estrés oxidante, el cual se caracteriza principalmente por presentar pérdida de memoria en los pacientes y muerte neuronal en el hipocampo, asociado con la contaminación ambiental, como se ha observado dentro de nuestro modelo de inhalación a vanadio. (Valencia y Yang, 2012)

### **1.3 ESTRÉS OXIDANTE Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por el deterioro progresivo de la memoria y de las habilidades cognitivas, la cual se acompaña de pérdida de neuronas en el hipocampo, numerosas placas extracelulares neuríticas y marañas neurofibrilares intracelulares. (Nowonty y cols., 2001).

Además de estos marcadores patológicos, el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan evidencia de que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), formadas por las reacciones metabólicas normales del organismo (Patricò, 2008), se pueden identificar como proteínas oxidadas por los ROS, como los carbonilos, que se encuentran incrementados en los lóbulos frontal y parietal, así como en el hipocampo. Otros biomarcadores que se han observado en los cerebros de pacientes con Alzheimer son el malondialdehído y el 4-hidroxinonal que se ven incrementados en múltiples regiones del cerebro, principalmente en la corteza temporal y prefrontal y el

hipocampo principalmente así como en el líquido cefalorraquídeo. (Patricò, 2008; Markesberry, 1997)

## **1.4 FORMACIÓN HIPOCAMPAL**

La formación hipocampal es un conjunto de estructuras que forman parte del sistema límbico en el SNC, se divide en 6 diferentes regiones citoarquitectónicas las cuales consisten en el parasubiculum, el presubiculum, el subiculum (también llamadas en conjunto complejo subicular), la corteza entorrinal, el hipocampo propiamente dicho y el giro dentado. (Andersen y cols., 2007; Castro y cols., 2007).

Desde 1881 el hipocampo propiamente dicho ha sido una estructura ampliamente estudiada debido a su función, ya que participa en el proceso de consolidación de la memoria. (Amaral y cols., 2007)

### **1.4.1 ESTRUCTURAS DEL HIPOCAMPO**

El hipocampo se encuentra en los mamíferos de manera pareada, en el humano se localiza en el lóbulo temporal mientras que en los roedores en la parte subcortical y se llama así debido a la forma que presenta en el humano, ya que semeja a un caballito de mar, se encuentra el Cuerno de Amón (CA) que está dividido en tres regiones principales, CA1, CA2 y CA3, en el cuál se distinguen tres capas; la molecular, la celular y la polimorfa, donde el principal tipo celular son las neuronas piramidales. (Amaral y cols., 2007; Castro y cols., 2007; Cooper y cols., 2002; Andersen y cols., 2007).

Por otro lado también se encuentra el Giro Dentado (GD) el cual es una corteza trilaminar, la cual se encuentra en contacto con las regiones de CA gracias a las neuronas granulares las cuales presentan neurogénesis.

## 1.4.2 GIRO DENTADO

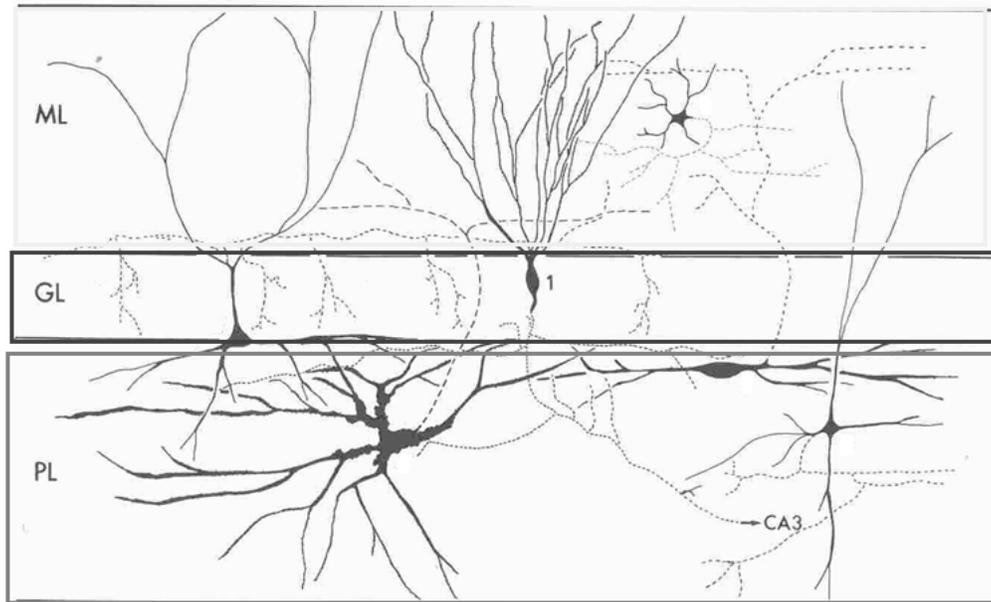
El giro dentado es una estructura que está relacionada con la memoria y el aprendizaje, es el primer lugar al que llegan los impulsos nerviosos desde la corteza entorrinal, por lo que se considera que es el primero en procesar la información que finalmente consolidará la memoria espacial y episódica. Esta estructura presenta tres capas: la capa molecular, la capa granular y la polimórfica. (Amaral y cols., 2007; Cooper y Lowenstein, 2002; Witter y Amaral, 2004)

La capa molecular está constituida principalmente por dendritas de las células granulares y neuronas llamadas en canasta debido a su forma, aunque también se encuentran en menor proporción dos tipos de células, una de ellas se encuentra en lo más profundo de la capa y tiene cuerpo multipolar, estas células no tienen espinas en sus dendritas; y las segundas son las llamadas “arañas”. (Menno y Amaral, 2004)

La segunda capa es llamada la capa granular, en donde se encuentran las células granulares, las neuronas principales del GD y las únicas neuronas que presentan neurogénesis dentro de la formación hipocampal. (Menno y Amaral, 2004)

El soma de las neuronas granulares mide aproximadamente 10µm de diámetro, presentan espinas dendríticas, que son importantes porque son las neuronas que reciben la información de la corteza entorrinal y la transmiten a las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. Estas neuronas son principalmente glutamatérgicas, sin embargo pueden llegar a actuar como GABAérgicas en condiciones patológicas. (Menno y Amaral 2004; Johnston y Amaral, 1998)

La última capa es la polimórfica, predominan las fibras musgosas que son los axones de las neuronas granulares y un gran número de neuronas, multipolares y fusiformes las cuales pueden tener o carecer de espinas dendríticas (Ver fig. 1). (Menno y Amaral, 2004)

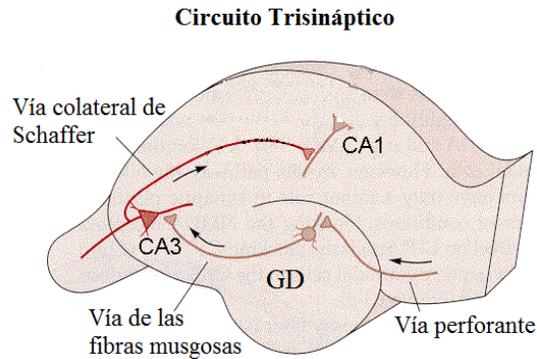


**Figura 1** En este esquema se muestran las tres láminas del Giro Dentado, en amarillo la capa molecular, en rojo la capa granular (en dónde se muestra con el número 1 las neuronas granulares) y en naranja la capa polimórfica. Esquema modificado de Paxinos 2004

La comunicación que presenta el giro dentado entre estas capas ha sido estudiado ampliamente, es importante para los procesos cognitivos y de memoria, es por ello que se sabe que es un circuito trisináptico en donde participa el GD (Johnston y Amaral, 1998 y Witter y Amaral, 2004):

1. La vía perforante, en donde las neuronas localizadas en la corteza entorrinal proyectan sus axones hacia las neuronas granulares, perforando el subiculum.
2. La vía de las fibras musgosas, que son las proyecciones axonales de las neuronas granulares, llamada así por la forma que adquiere la ramificación, y que conectan con las neuronas CA3, y finalmente
3. La vía colateral de Schaffer en dónde la información se trasmite de las neuronas de la región CA3 a la CA1

Como se observa en el siguiente esquema:



**Figura 2** En este esquema se muestran el circuito trisináptico en donde participa el GD. Modificado de [www.unmc.edu](http://www.unmc.edu)

Como se puede observar, las neuronas granulares están involucradas en las tres láminas del giro dentado y son las que mantienen la comunicación de los estímulos que entran desde la corteza entorrinal y las regiones CA1 y CA3. Como esta estructura es importante para la consolidación de la memoria, se cree que presenta neurogénesis, lo cual se ha observado en varios experimentos que cuando se dañan las células precursoras de la Zona subgranular (ZSG), para evitar su proliferación, se observa que los ratones presentan deficiencias para aprender, en comparación con los ratones controles (Kempermann, 2006)

### **1.4.3 NEUROGÉNESIS EN GIRO DENTADO EN ADULTO**

La neurogénesis es el proceso por el cual se da la producción e integración de nuevas neuronas en el cerebro adulto. (Kempermann, 2006)

En la formación hipocámpal, las células progenitoras neurales se generan en la Zona Subgranular (ZSG) del giro dentado donde se encuentran astrocitos radiales, células precursoras. (Arias y cols., 2007; Ramírez y cols., 2007)

La neurogénesis comprende de cuatro procesos, la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la sobrevivencia. La proliferación celular involucra la división simétrica o asimétrica de las células precursoras, ya que si la división es asimétrica, se dan dos células hijas diferentes, en el proceso de diferenciación una de ellas puede tener las características para diferenciarse hacia neurona, si está sobrevive, ya que

solamente una proporción de estas células llega a diferenciarse e integrarse como una neurona más en el cerebro adulto. (Gould y cols., 1999, Kemperman, 2006)

Una vez haya iniciada la diferenciación de la neurona comienza la migración de la progenie. (Ramírez y cols., 2007) Cuando ya están diferenciadas, las células emiten las dendritas y el axón, aproximadamente dos semanas después de la mitosis, para que pueda tener una óptima comunicación sináptica con las otras neuronas, lo cual constituye el proceso de maduración e integración al circuito del GD. (Arias y cols., 2007, Ramírez y cols., 2007)

En el hipocampo se ha reportado que gracias a la neurogénesis se integran aproximadamente 250,000 neuronas nuevas al mes lo que representa el 6% de la población total del giro dentado. (Arias y cols., 2007 y Ramírez y cols., 2007)

La neurogénesis es regulada por factores extrínsecos o intrínsecos. (Ramírez y cols., 2007). Entre los factores extrínsecos se encuentra todo lo que rodea al organismo y sus hábitos como la actividad física, ambientes enriquecidos, restricción energética y la modulación de la actividad neuronal (Arias y cols., 2007). Entre los factores intrínsecos se encuentran los factores genéticos y moleculares que inducen a la neurogénesis y morfogénesis embrionaria, como son los genes Notch, BMP, Eph/ephrins, noggins y Shh, los factores de crecimiento como BDNF, VEGF y las hormonas sexuales, como los estrógenos. Estos en conjunto regulan el destino celular que puede determinar el tamaño de la población neuronal. (Arias y cols., 2007)

De estos factores, los estrógenos han sido ampliamente estudiados debido a que se encuentran a mayor concentración en hembras que en machos y a que se sabe que pueden favorecer el proceso de la proliferación celular y de sobrevivencia. (Arias y cols., 2007, Galea, 2008, Kempermann 2006)

Algunos estudios han indicado que los esteroides así como los estrógenos tienen un efecto estimulante en la proliferación celular de los precursores granulares, por ejemplo en el embarazo, que es cuando hay más producción de hormonas, se observa un pico máximo de neurogénesis. (Arias y cols., 2007, Galea, 2008, Tanapat y cols., 1999)

Algunos estudios han indicado que los estrógenos endógenos pueden estar involucrados en la neurogénesis, teniendo un efecto estimulante en la proliferación de las

células precursoras de neuronas granulares, ya que se ha observado que durante el embarazo la tasa de neurogénesis puede incrementar un 65%. (Arias y cols., 2007)

En otros estudios se ha demostrado que ratones hembras con actividad estrogénica normal, a diferencia de otras a las cuales se les dio letrozol, un fármaco que inhibe la formación de estrógenos hay mayor número de sinaptogénesis y de espinas dendríticas, elementos que son importantes para la sobrevivencia tanto de neuronas nuevas como de las preexistentes. (Bendery cols., 2010)

Para poder estudiar la neurogénesis se utilizan varias técnicas, entre las cuales se encuentra la técnica de inmunohistoquímica para bromodeoxiuridina (BrdU), la cual se basa principalmente en inyectar un marcador permanente de división celular, lo que permite observar proliferación celular. (Kempermann, 2006; Taupin, 2007)

Esto es posible ya que la BrdU compite con la timidina endógena durante la fase S (de síntesis) del ciclo celular, incorporándose al DNA permanentemente, lo que permite localizar las nuevas neuronas con anticuerpos monoclonales específicos por medio de la inmunohistoquímica, aún tiempo después de que haya ocurrido la división celular. La ventaja de esta técnica es que se pueden identificar las células en proliferación. (Kempermann, 2006, Taupin, 2007)

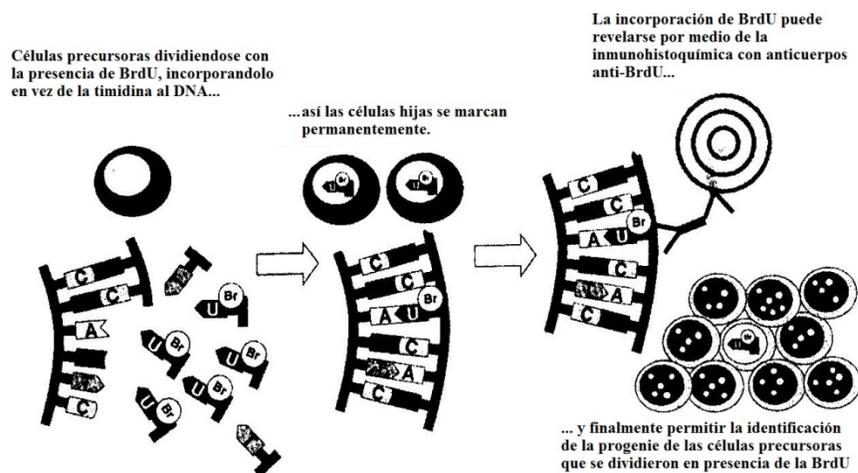


Figura 3. El método de Bromodeoxiuridina (BrdU) marca permanentemente las células en proliferación. La BrdU compite con la timidina para incorporarse al DNA.

## 1.5 DIMORFISMO SEXUAL EN SNC

Debido a la influencia hormonal, el SNC presenta diferencias conspicuas tanto en el desarrollo morfológico como en el fisiológico entre hembras y machos. El cerebro presenta familias de receptores esteroideos específicos para la progesterona, los andrógenos, los estrógenos, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y la hormona tiroidea. (Pak y Handa, 2008).

En el GD los esteroides sexuales, en especial los estrógenos, y sus receptores juegan un papel importante induciendo cambios electrofisiológicos probablemente modulados por receptores GABA y glutamato, ya que se ha observado que en hembras ovariectomizadas decrece la unión del glutamato con el receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA), evento que se puede prevenir con el remplazo estrogénico de estradiol. (Hajszan y cols., 2007)

Además, también se sabe que los esteroides pueden estar involucrados en la plasticidad del GD, se ha reportado que el  $17\beta$ -Estradiol regula la sinaptogénesis en el GD, ya que animales tratados con letrozol (inhibidor de la aromatasa) presentaban menor cantidad de sinapsis que las hembras controles. (Bender et al., 2010)

En el caso de la neurogénesis se ha observado que hay fluctuaciones en el número de nuevas neuronas durante el ciclo estral de las hembras y que la etapa en dónde se observa mayor proliferación neuronal es en el proestro, en dónde los esteroides se encuentran en mayor concentración y no sólo eso, si no que disminuye la cantidad de células picnóticas durante este período, lo que indica que los estrógenos pueden actuar como antioxidantes. (Tanapat y cols., 1999)

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Se sabe que el vanadio es un contaminante ambiental que experimentalmente ha demostrado producir alteraciones de la memoria espacial, pérdida de espinas dendríticas y necrosis en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo, también que a las 4 semanas libres de tratamiento la alteración en la memoria espacial y el daño citológico persiste en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y que existen diferencias por sexo.

Por lo tanto, considerando que el giro dentado presenta recambio neuronal y que es una estructura involucrada en el proceso de la memoria es necesario determinar los cambios en la memoria, la citología y la neurogénesis al exponer ratones de la cepa CD-1 a pentóxido de vanadio y determinar si existe recuperación en ambos sexos a las 8 semanas postexposición.

## **3. HIPÓTESIS**

Si el vanadio es un elemento capaz de promover daño en el CA1 y CA3 entonces se observarán alteraciones en la memoria espacial, citología y neurogénesis diferencial por sexo del Giro dentado del hipocampo.

Sin embargo, el giro dentado, a diferencia de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, presentará recuperación debido a que es una estructura neurogénica.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar las alteraciones producidas en la memoria espacial, citología y neurogénesis del giro dentado de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada con y sin un periodo postexposición libre del metal en ambos sexos.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar la memoria espacial en ratones machos y hembras expuestos 4 semanas a pentóxido de vanadio con y sin un periodo postexposición de 8 semanas libre del metal, en el laberinto acuático de Morris.

2. Analizar los cambios en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas granulares del giro dentado producidas por el vanadio, en ambos sexos y determinar si hay recuperación en el número de espinas dendríticas una vez que se deja libre de tratamiento, con la técnica de Golgi rápida.

3. Evaluar la neurogénesis en giro dentado de ratones machos y hembras expuestos al vanadio, con y sin tiempo libre de inhalación del metal, con la técnica de inmunohistoquímica para BrdU.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO**

Se utilizaron 40 ratones hembras y 40 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso aproximado de  $35\pm 2$ g, los cuales se mantuvieron en condiciones de 12h luz/12h oscuridad y con libre acceso al agua y al alimento. La mitad de estos fueron expuestos a pentóxido de vanadio mientras que la otra mitad se mantuvo como control, al inhalar solamente vehículo (solución salina 0.9% y pH 7.4).

### **5.1 LABERINTO DE MORRIS**

Para evaluar la memoria espacial se utilizó la prueba del laberinto de Morris (Anexo 10.1), con entrenamiento previo. Esta prueba consiste en realizar una prueba semanal en la cual se evaluó el tiempo de latencia de escape de los ratones en alcanzar la plataforma. Se consideró como tiempo cero (T0) el promedio de los tiempos realizados por todos los grupos en su último día de la semana de entrenamiento.

Durante el experimento se tomaron los tiempos en la cuarta semana de evaluación para determinar las alteraciones producidas por la inhalación de vanadio y de la octava semana post-exposición, con sus respectivos controles.

### **5.2 EXPOSICIÓN A VANADIO Y SACRIFICIO**

Los ratones expuestos a pentóxido de vanadio se colocaron en una cámara de acrílico herméticamente cerrada conectada a un nebulizador, para exponer a pentóxido de vanadio [0.02M], dos veces a la semana, una hora por día durante 4 semanas. Los ratones controles sólo inhalaban solución salina, durante el mismo periodo.

De los cuarenta ratones utilizados en el experimento (20 hembras y 20 machos), veinte (10 hembras y 10 machos) fueron sacrificados a la cuarta semana de inhalación, mientras que los otros veinte, permanecieron libres de exposición durante 8 semanas posteriores a la última inhalación, sacrificándose así hasta la doceava semana del experimento.

En cuanto a los ratones control, la mitad fueron sacrificados a la cuarta semana y la otra mitad a la doceava semana.

Para el sacrificio los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (dosis letal: 35mg/kg) y perfundidos vía aórtica con solución fisiológica y paraformaldehído al 4% en PBS. Se les extrajo el cerebro y se procesaron con la técnica de Golgi rápida (ver anexo 10.2) e inmunohistoquímica para BrdU (ver anexo 10.3-5)

### **5.3 CUANTIFICACIÓN DE ESPINAS DENDRÍTICAS**

De los cerebros procesados con la Técnica de Golgi rápida (ver detalles en anexo 10.2) se analizó el giro dentado de 5 ratones por cada grupo y se cuantificaron las espinas dendríticas en 10µm lineales de dos dendritas terciarias, de 20 neuronas granulares por ratón.

Se realizó la prueba de ANOVA de todos los grupos para determinar las diferencias existentes entre grupos.

### **5.4 NEUROGÉNESIS**

Los ratones que fueron seleccionados al azar para que su cerebro fuera procesado con la técnica de BrdU fueron inyectados previamente como se menciona en el anexo 10.3 y 10.4.

A los cortes de cerebro se les realizó inmunohistoquímica para BrdU (ver anexo 10.4-5) se cuantificaron las neuronas marcadas por BrdU en 15 cortes coronales del todo el giro dentado por ratón (5 ratones por grupo). Se realizó la prueba de ANOVA para la comparación entre todos los grupos.

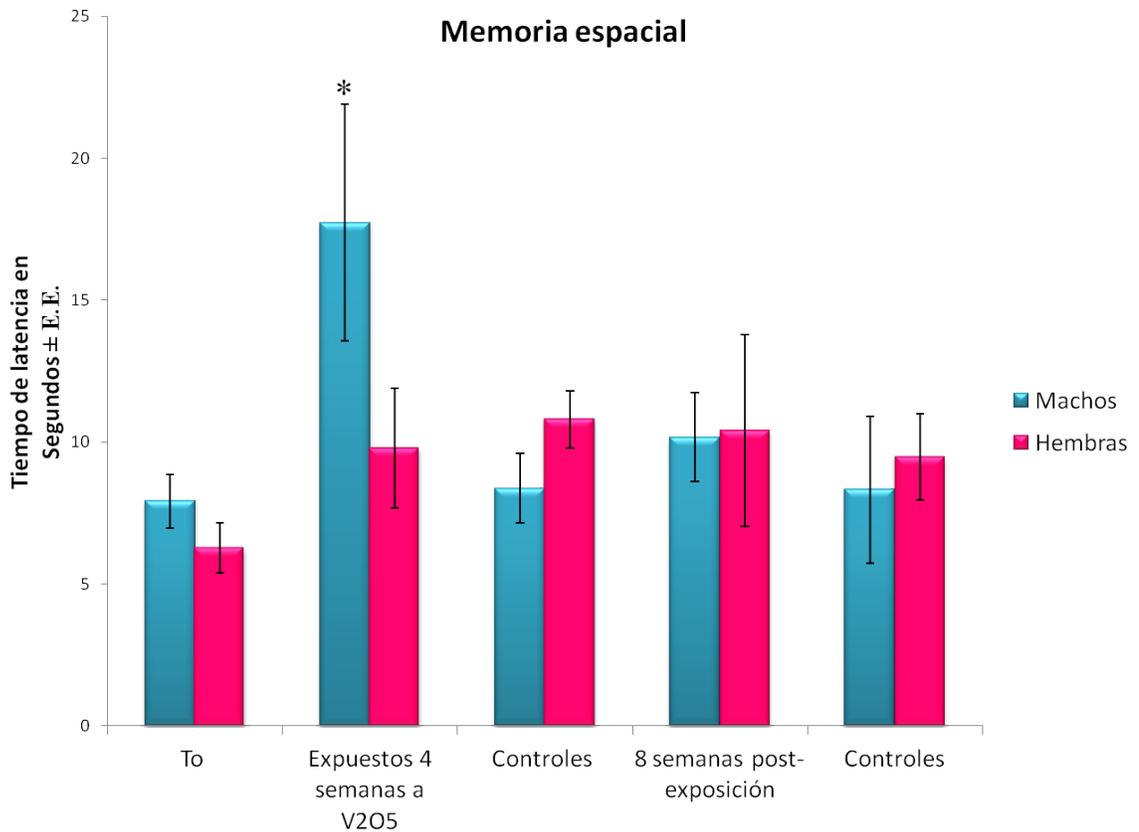
## 6. RESULTADOS

### 6.1 MEMORIA ESPACIAL

Los resultados del estudio conductual, mostraron que el grupo de machos expuestos cuatro semanas a vanadio presentó aumento del tiempo de latencia de escape (17.73s.  $\pm 4.17$ ) en comparación con el T0 (7.91s.  $\pm 0.93$ ) y su grupo control (8.37s.  $\pm 1.23$ ) como se observa en la gráfica 1, sin embargo la latencia del grupo expuesto 4 semanas a vanadio con 8 semanas de post-exposición (10.16s.  $\pm 1.56$ ), no presentó diferencia significativa contra su control (8.13s.  $\pm 2.6$ ) (Gráfica. 1). Indicando recuperación de la función.

Por otro lado las hembras no presentaron cambios en el tiempo de latencia durante el experimento, los promedios que presentaron en el T0 (6.26s.  $\pm 0.86$ ), el grupo expuesto a vanadio (9.78s  $\pm 2.10$ ), su grupo control (10.8s.  $\pm 1$ ), el grupo post-expuesto (10.16s.) y su respectivo control (8.13s.) no tuvieron diferencias significativas.

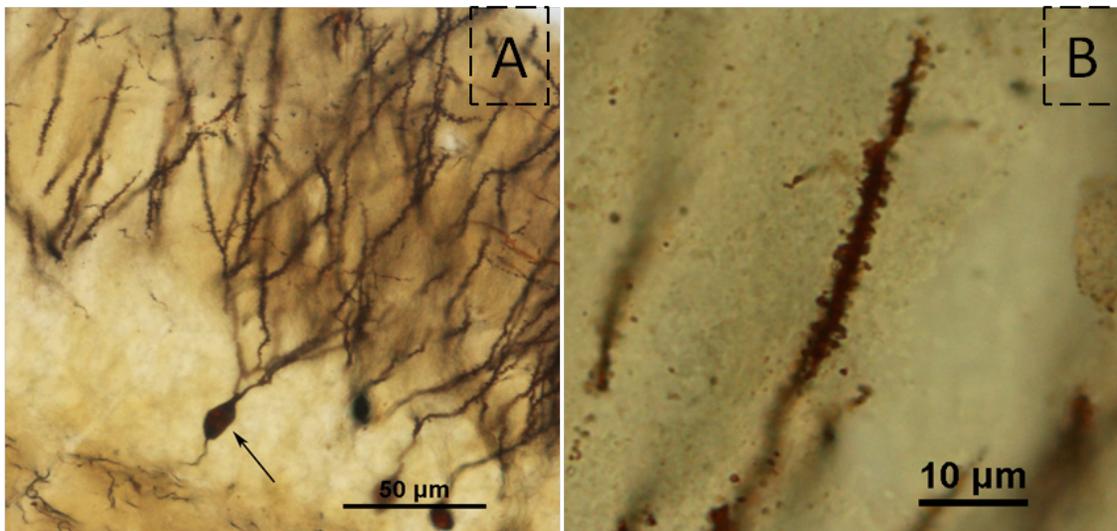
Finalmente el análisis estadístico no mostró diferencia significativa por sexo entre los grupos expuestos 4 semanas a vanadio, a pesar de la diferencia que existe entre los grupos expuestos entre las hembras, que presentan menor daño (9.78s.  $\pm 2.10$ ) y los machos (17.73s.  $\pm 4.17$ ), esto se debe probablemente a la amplia variabilidad entre los individuos del mismo grupo, que dan un error estándar muy grande.



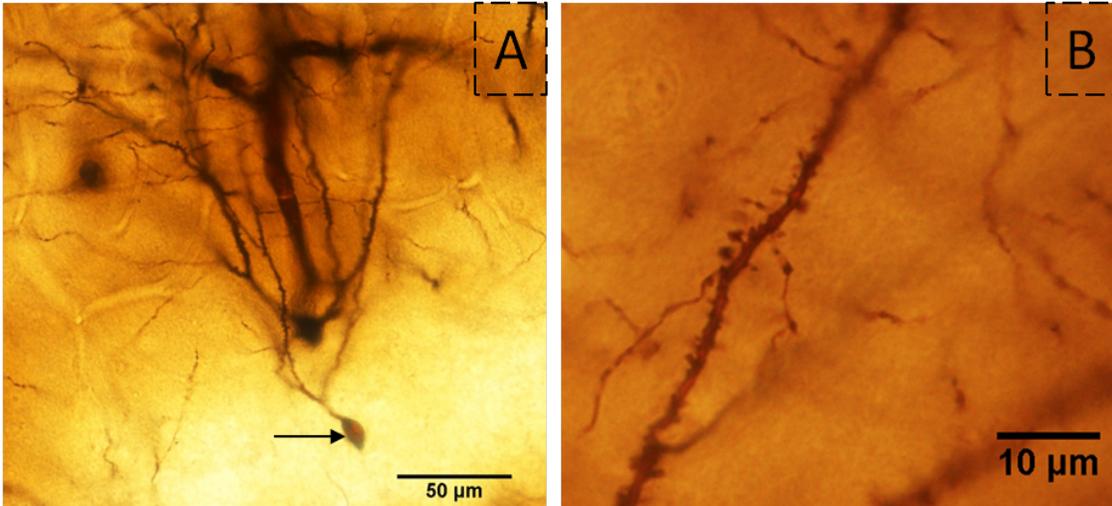
**Gráfica 1. Tiempos promedio de latencia de los grupos controles contra los grupos expuestos 4 semanas a Vanadio y el grupo con 8 semanas post-exposición. Comparación entre sexos. ANOVA \* $p > 0.05$ , comparación contra control (Por grupo  $n = 10$  ratones).**

## 6.2 DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS

En el análisis cuantitativo se observó que la densidad espinosa de las dendritas terciarias de las neuronas granulosas del giro dentado de los ratones machos control ( $13.39/10\mu\text{m}\pm 0.01$ ) y hembras controles ( $12.9/10\mu\text{m}\pm 0.16$ ) no presentaron diferencia significativa (Ver gráfica 2 y Fotomicrografías 1 y 4). En contraste se observa que los grupos expuestos 4 semanas a vanadio de machos ( $9.99/10\mu\text{m}\pm 0.14$ ) y de hembras ( $11.26/10\mu\text{m}\pm 0.17$ ) presentan disminución en la densidad espinosa en comparación con sus grupos controles, siendo las hembras las que presentan menor pérdida de espinas dendríticas estadísticamente significativa que los machos (Ver gráfica 2 y Fotomicrografías 1, 2, 4 y 5).



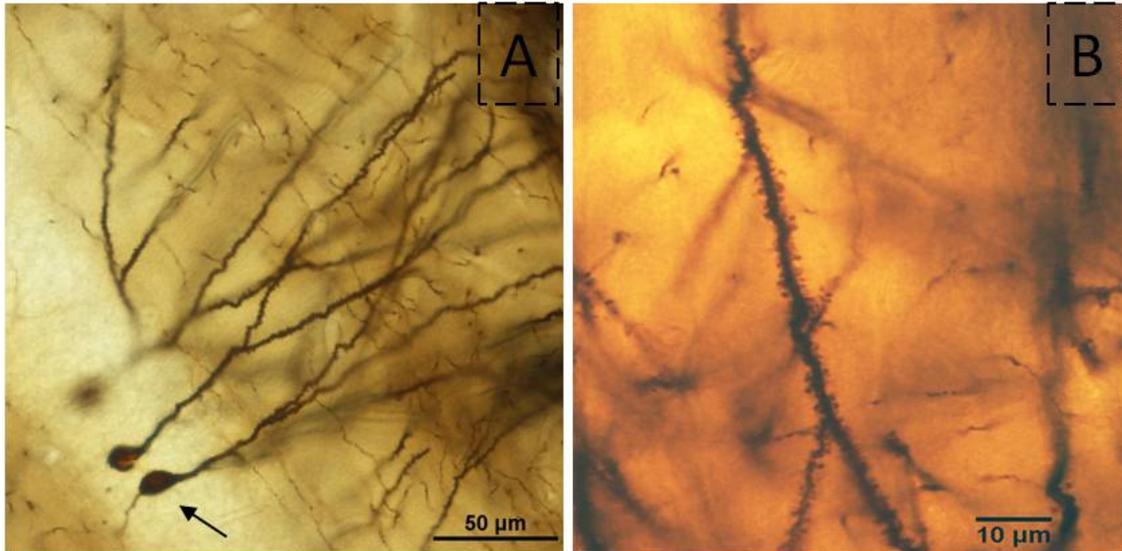
**Fotomicrografía 1. (A) Neurona granular (Flecha) de giro dentado de ratón macho control; (B) Dendrita terciaria de neurona granular de macho control con gran densidad espinosa.**



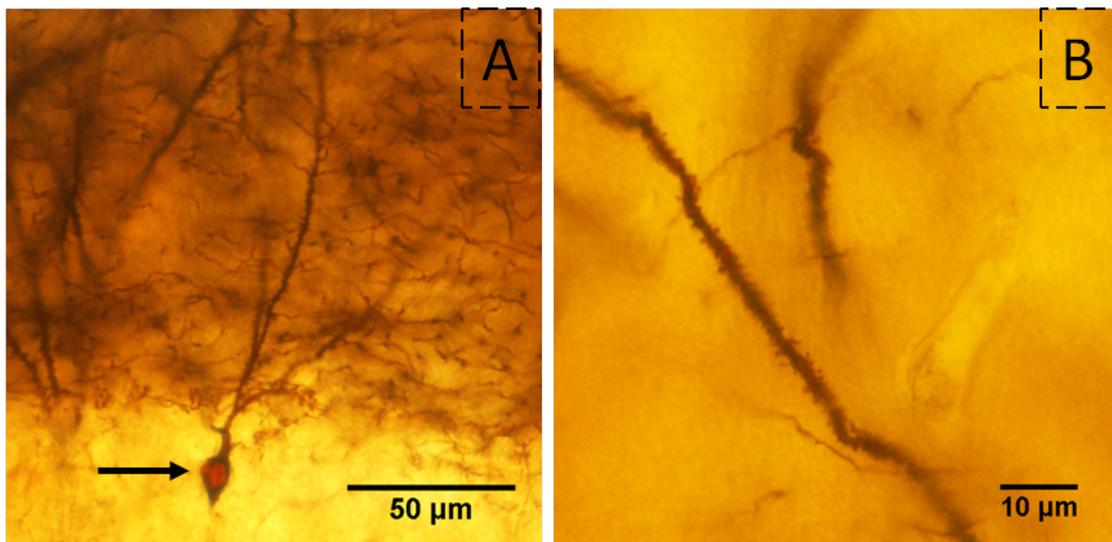
**Fotomicrografía 2. Neurona granular (Flecha) de giro dentado de ratón macho expuesto 4 semanas a vanadio (A) y (B) su respectiva dendrita terciaria.**

Por otro lado los grupos expuestos y con 8 semanas postexposición presentan mayor densidad espinosa en comparación con los grupos expuestos ( $\text{♂}=11.33\pm 0.15$  y  $\text{♀}=12.86\pm 0.17$ ) (Ver Fotomicrografías 2, 3, 5, 6).

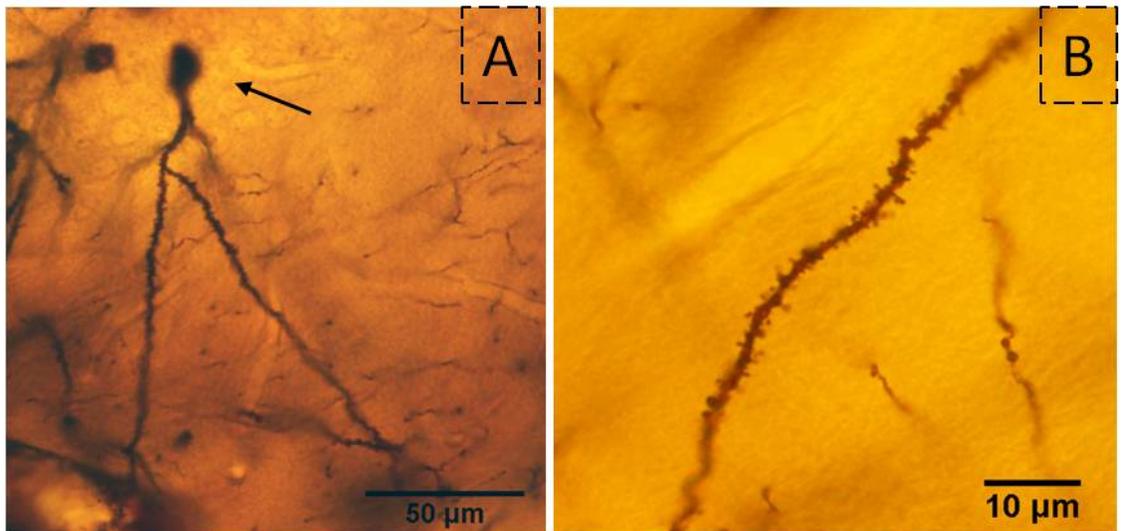
Sin embargo las hembras son las únicas que presentan diferencia significativa con su control como se observa en la Gráfica 2, por lo que hay diferencia significativa entre sexos, ya que las hembras presentan recuperación de la densidad espinosa.



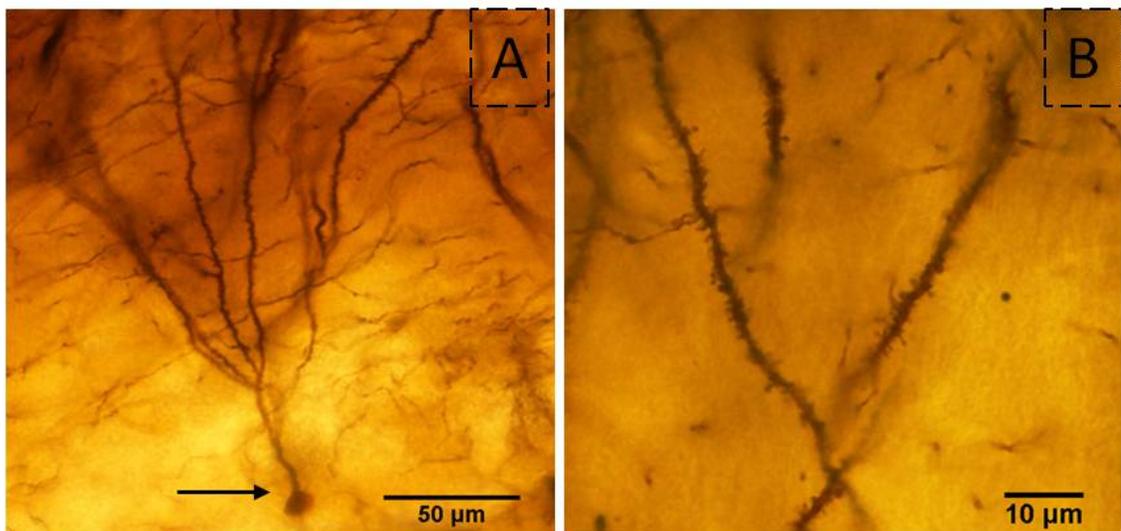
**Fotomicrografía 3. Neuronas granulares (Flecha) de giro dentado de un ratón macho expuesto a vanadio y con 8 semanas post-exposición (A), densidad espínosa de su respectiva dendrita terciaria (B)**



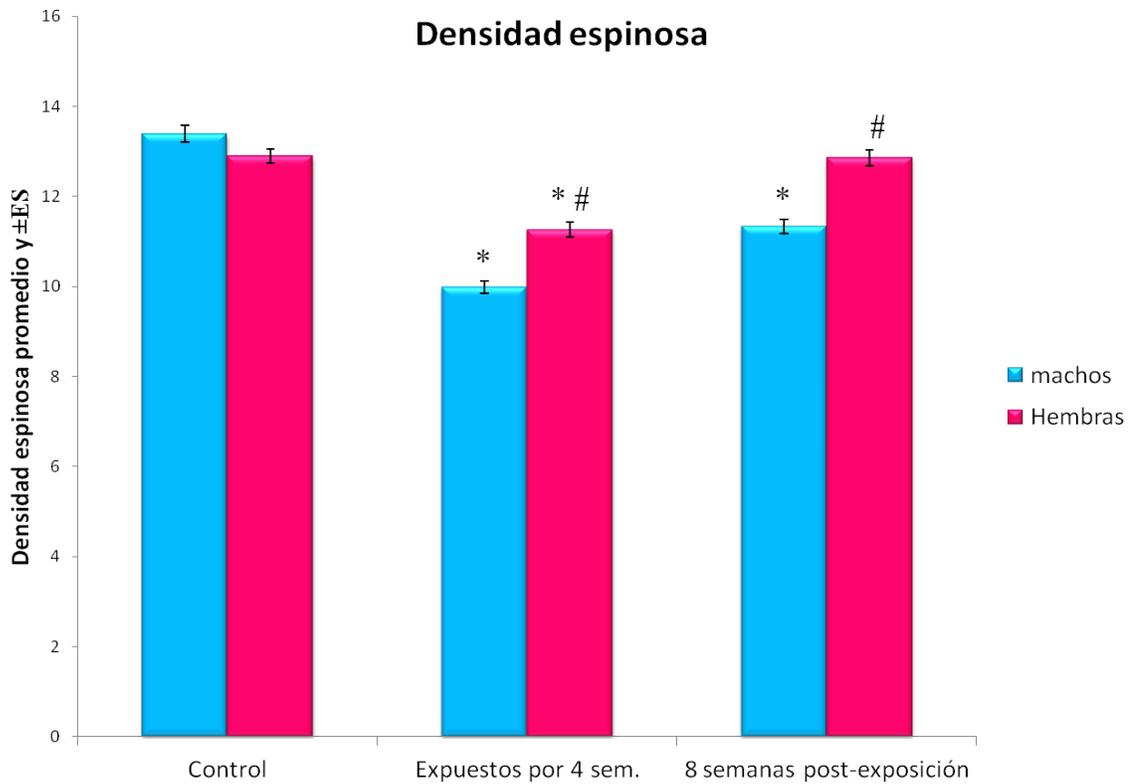
**Fotomicrografía 4. Neurona granular de giro dentado (Flecha) de un ratón hembra control (A) y su respectiva dendrita, mostrando gran densidad espínosa (B).**



**Fotomicrografía 5. (A)Neurona granular de giro dentado (Flecha) de una hembra expuesta 4 semanas a vanadio y (B) la densidad espinosa de su dendrita.**



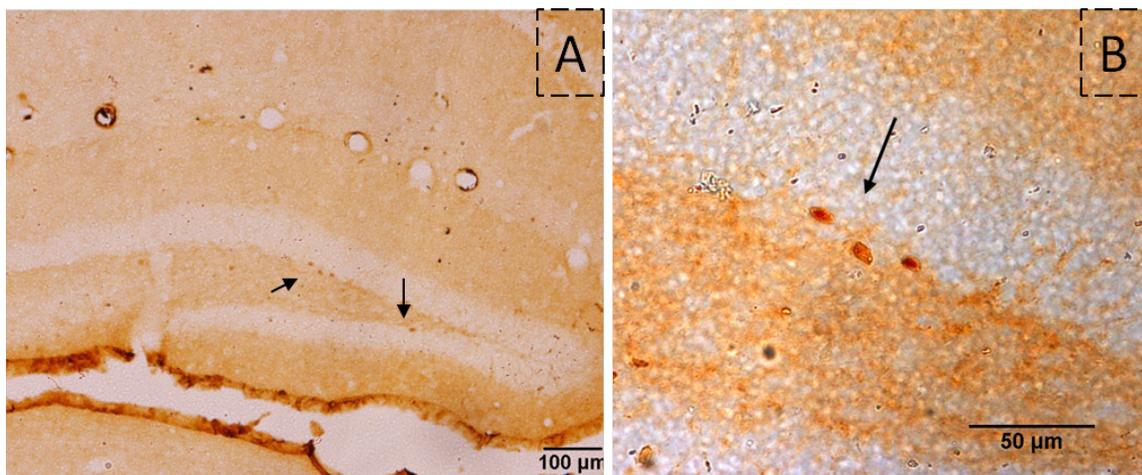
**Fotomicrografía 6. (A) Neurona granular de giro dentado (Flecha) de una hembra expuesta y con 8 semanas post-exposición a y la densidad espinosa de su dendrita (B).**



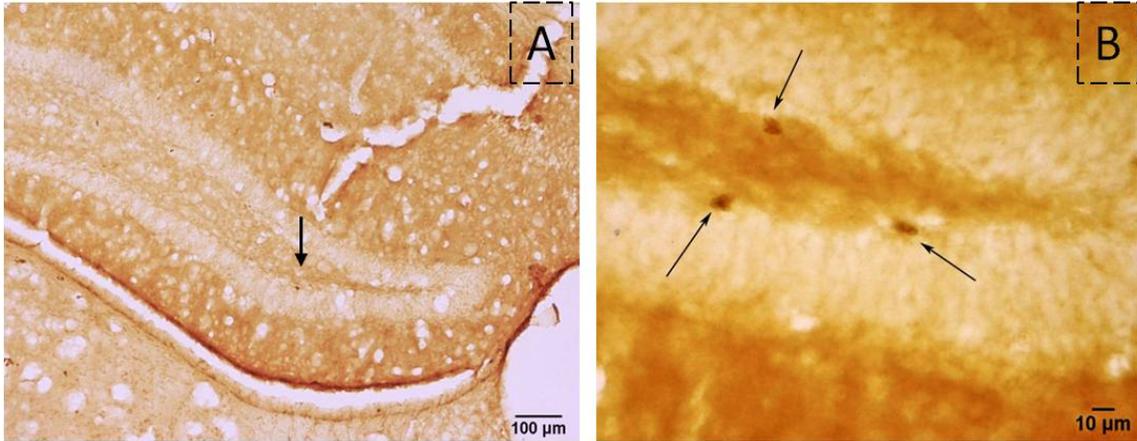
**Gráfica 2. Comparación por grupo y sexo de la densidad espinosa. ANOVA \* $p > 0.05$  comparados contra control y #  $p > 0.05$  comparación entre sexos (por grupo  $n = 5$  ratones).**

### 6.3 NEUROGÉNESIS

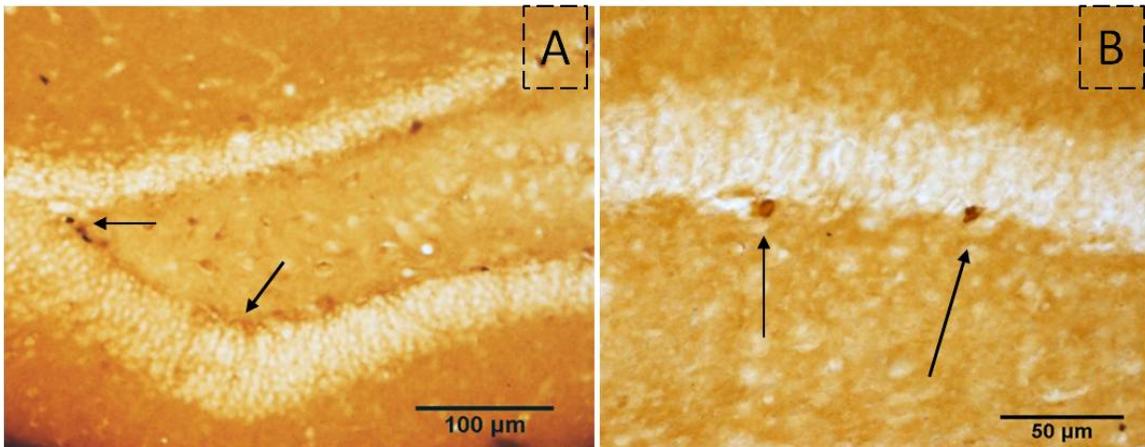
En cuanto a la neurogénesis en el giro dentado, de los grupos control no se encontró diferencia significativa por sexo, machos ( $4.6 \pm 0.13$ ) y hembras ( $4.48 \pm 0.12$ ) (Ver gráfica 3 y fotomicrografías 7 y 10). Los grupos expuestos 4 semanas a vanadio de ambos sexos presentaron disminución significativa de núcleos de neuronas granulares marcados con BrdU en el giro dentado, en comparación con los grupos control, sin encontrarse diferencia significativa por sexo; machos ( $3.14 \pm 0.13$ ) y hembras ( $3.304 \pm 0.11$ ) como se observa en la gráfica 3 y en las fotomicrografías 8 y 11.



**Fotomicrografía 7. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón macho control**

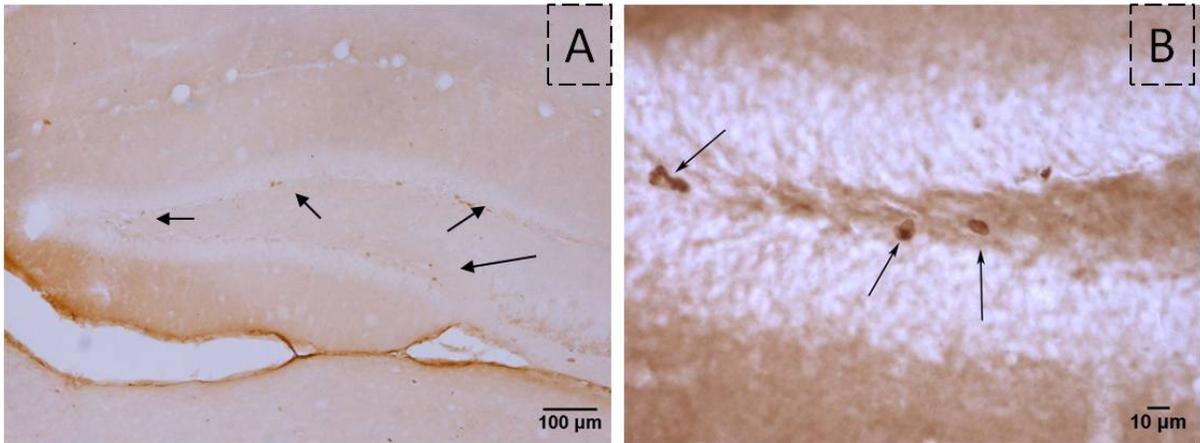


**Fotomicrografía 8. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón macho expuesto 4 semanas a vanadio.**

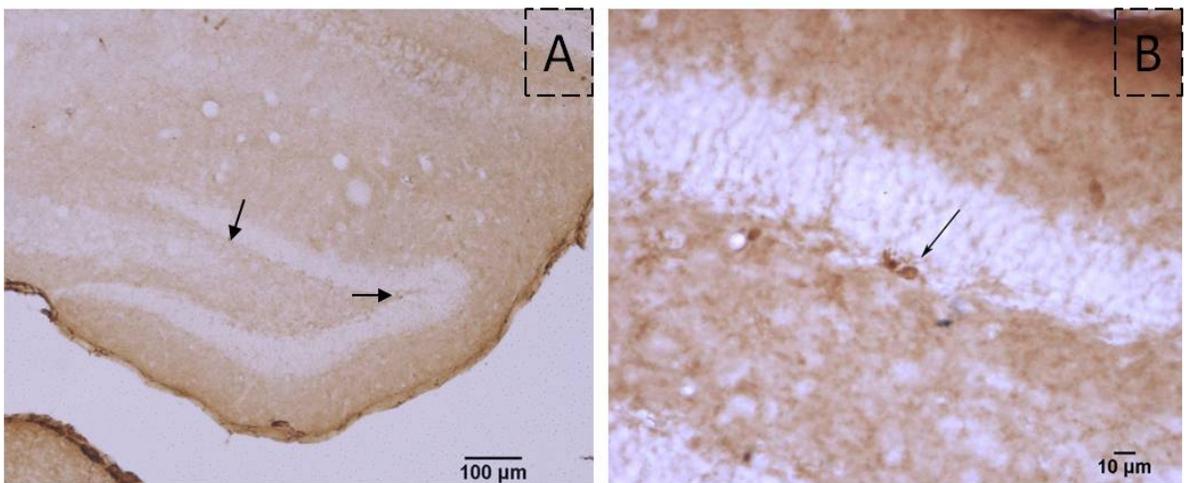


**Fotomicrografía 9. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón macho expuesto 4 semanas a vanadio y con un periodo de post-exposición de 8 semanas.**

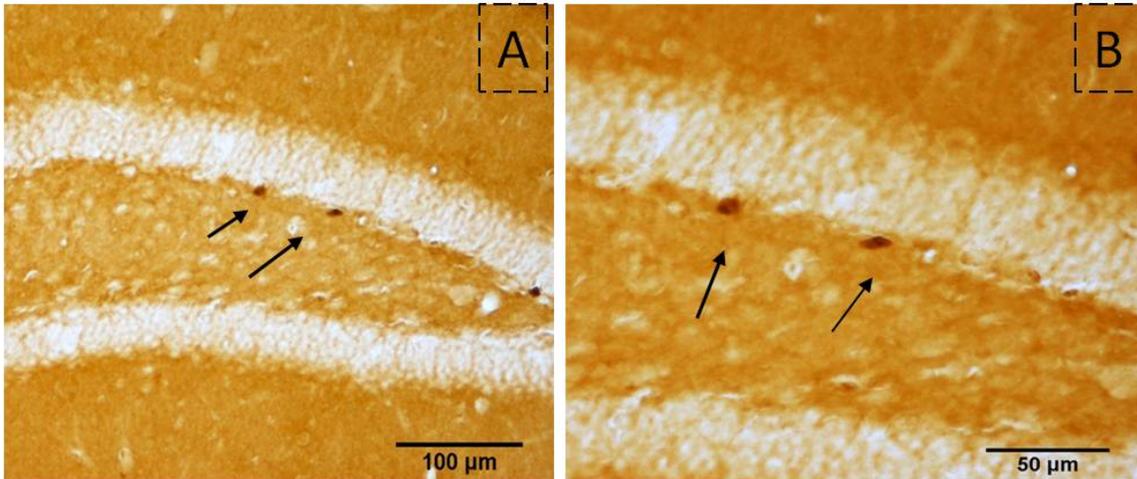
Finalmente en los grupos expuestos a vanadio y con un periodo de 8 semanas postexposición; los machos presentan incremento significativo en marca nuclear de BrdU ( $4.11 \pm 0.16$ ) comparado con el grupo expuesto, mientras que en las hembras el daño permanece ( $3.38 \pm 0.09$ ) comparada con su grupo control. Dando como resultado diferencia significativa entre sexos (Ver gráfica 3 y Fotomicrografías 9 y 12).



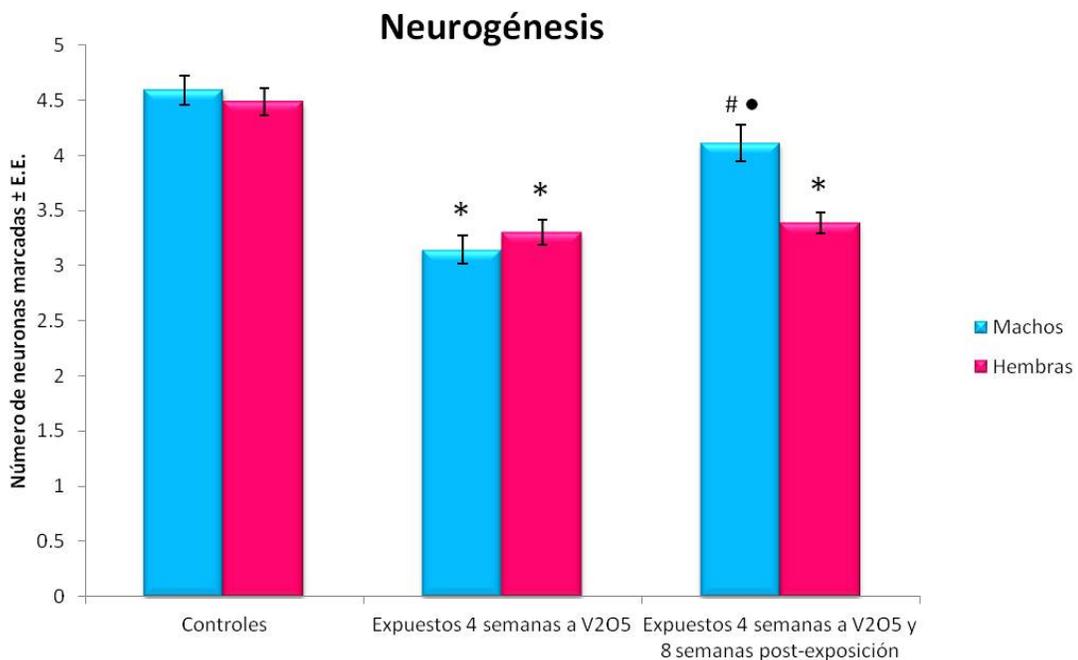
**Fotomicrografía 10. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón hembra control.**



**Fotomicrografía 11. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón hembra expuesto a 4 semanas a vanadio.**



**Fotomicrografía 12. (A) y (B) Núcleos de neuronas granulares del giro dentado marcadas con BrdU (Flechas) de un ratón hembra expuesto 4 semanas a vanadio y post-exposición durante 8 semanas.**



**Gráfica 3 Comparación entre grupos y sexos del número de neuronas marcadas con BrdU. ANOVA \*P>0.05 comparación contra control, ANOVA #p>0.05 comparación entre sexos, ●p>0.05 comparación contra expuesto.**

## 7. DISCUSIÓN

La contaminación ambiental es un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Valencia y Yang, 2012), enfermedad que cursa con alteración de la memoria y alteraciones en la citología y en la neurogénesis en hipocampo.(Ihunwo y Schliebs2010)

Como se pudo observar, la inhalación de vanadio produjo alteración de la memoria espacial en machos, disminución de la densidad espinosa y de la neurogénesis en ratones machos y hembra a las 4 semanas de exposición.

Sin embargo en los grupos expuestos a vanadio y mantenidos ocho semanas post-exposición libres del metal, se observó que los machos presentaban recuperación de la memoria espacial, y aumento en el número de espinas dendríticas en comparación al grupo expuesto; y en machos se observó aumento de la neurogénesis en comparación con el grupo expuesto.

- **Espinas dendríticas**

La pérdida de espinas dendríticas inducida por vanadio podría deberse a diversos factores, ya que en el mismo modelo de inhalación se observó que el vanadio produce ruptura de la barrera hematoencefálica y aumento en la concentración del vanadio en el tejido cerebral durante la exposición al metal en comparación al grupo control (Ávila y cols., 2005), que podría favorecer a que el vanadio pueda producir alteraciones en el GD.

Está ampliamente descrito que el vanadio es capaz de producir estrés oxidante, debido a la producción de radicales libres como el hidroxilo los cuáles pueden promover peroxidación lipídica (Byckowski y Kullarni, 1998, Mukherjee y cols., 2004); como lo han demostrado García y cols. 2004 en un modelo de exposición a metavanadato por vía intraperitoneal, reportan peroxidación lipídica, marcada con ácido tiobarbitúrico (TBA), que promueve el decremento de mielina en las fibras del cuerpo calloso; así como en nuestro modelo de inhalación se ha observado peroxidación lipídica en neuronas piramidales de corteza cerebral (Jiménez, 2009).

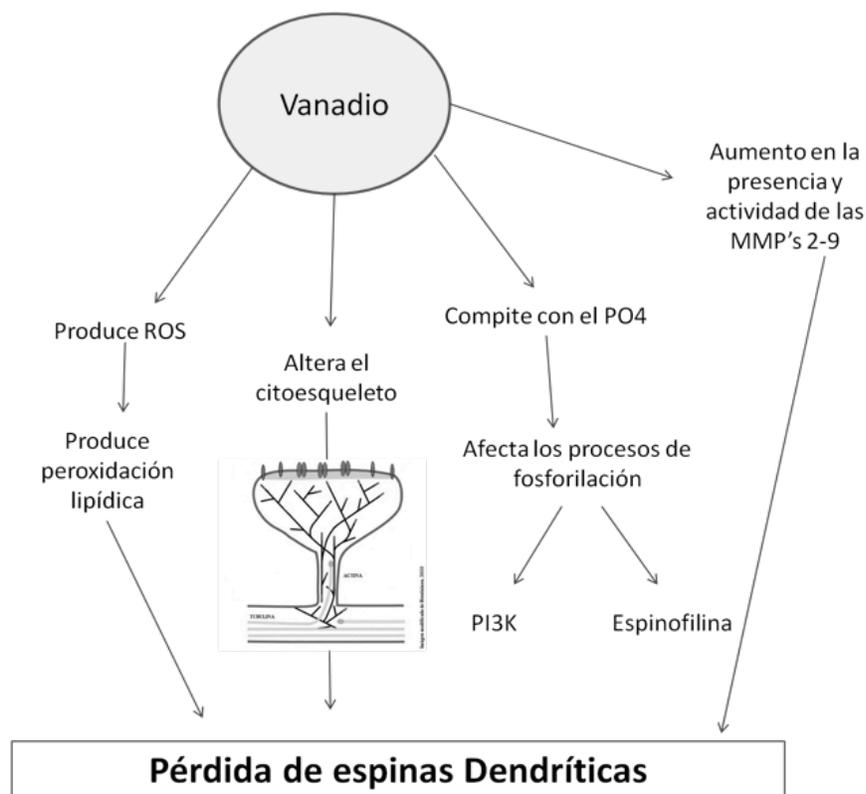
Las espinas dendríticas son estructuras especializadas en recibir gran parte de las aferencias sinápticas, por lo que representan un aumento de la superficie de recepción (Bourne y Harris, 2007; Bender y cols., 2010). Es por ello que probablemente las espinas dendríticas se retraigan, como un mecanismo compensatorio ante el incremento de los radicales libres, para evitar la muerte neuronal. (Ávila y cols., 2006 y 2004)

Estudios previos en el mismo modelo de inhalación se demostró incremento en la actividad de las metaloproteinasas (MMP's) 2 y 9 en el hipocampo, a la cuarta semana de inhalación de vanadio, (Colín y cols., 2008) así como en el giro dentado (Cortés 2009). Estas gelatinasas están involucradas en modificar el microambiente pericelular de las neuronas y participan en el remodelado dendrítico en el hipocampo adulto, por lo que si se incrementan pueden alterar el mantenimiento y formación de las espinas dendríticas, lo que puede reflejarse como la pérdida de estas. (Szklarczyk y cols., 2002).

Además para la formación y el sostén de las espinas dendríticas es importante el citoesqueleto, ya la base de la espina está constituida por microtúbulos formados por tubulina y como soporte propio de la espina están los filamentos de actina. En el mismo modelo de inhalación a vanadio, se ha observado alteración en la polimerización del citoesqueleto. (Mussali y cols., 2005) Debido a que el vanadio compite con el fosfato y la dinámica de los filamentos de actina depende de la fosforilación y defosforilación de la cofilina, proteína de unión entre los microtúbulos, por lo que podríamos sugerir que la pérdida de las espinas dendríticas sea resultado de la alteración del citoesqueleto. (Mussali y cols., 2005 y 2007; Metzler y Metzler, 2001) Slaughter y cols., (1987) propusieron que debido a la afinidad que tiene el vanadio a los iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$ , dicho metal podría interactuar con la cadmodulina, proteína reguladora de los sistemas de microtúbulos, y producir alteraciones en el citoesqueleto y reflejarse en la pérdida de las espinas dendríticas.

Otros factores que están involucrados en la formación y sostén de las espinas dendríticas son las proteínas post y pre-sinápticas, como la espinofilina que es una proteína de anclaje de los filamentos de actina de las espinas dendríticas que participa en la actividad de los receptores de glutamato. (Li y cols., 2005; Feng y cols., 2000). La espinofilina utiliza la proteína fosfatasa I (PPI), como sustrato específico para regular la transmisión sináptica a través de la actividad de los receptores ácido amino-3-hidroxi-5-

metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) presentes en las neuronas granulosas. Por otra parte, la espinofilina es activada al ser fosforilada por la proteína cinasa A (PKA), por lo que el vanadio puede alterar este mecanismo, ya que compite con los grupos fosfatos, lo que podría afectar la fosforilación de la proteína, no permitir la interacción con la actina y la PPI e interferir con la sinapsis y a su vez inhibir la defosforilación de la cascada de señalización que dispara la espinofilina y así promover la pérdida de espinas dendríticas. (Rodríguez y Altamirano, 2006; Li y cols., 2005; Hsieh y cols., 2003; Feng y col., 2000) **Ver esquema 1.**



**Esquema 1** En este esquema se explican las vías por las cuales puede estar actuando el V, en la disminución en el número de espinas dendríticas.

Las diferencias encontradas entre sexos puede explicarse por una parte, a que los estrógenos tienen efecto neuroprotector debido a que su estructura es semejante a la del  $\alpha$ -tocoferol, mejor conocido como Vitamina E, que funciona como un antioxidante (Behl 2002)

Por otra parte, los estrógenos favorecen la espinogénesis y la sinaptogénesis, gracias a varios mecanismos, por ejemplo, favorece la expresión de proteínas pre-sinápticas y post-

sinápticas como la reelina, la espinofilina, la syntaxina, y el PSD95, además de favorecer la maduración de las espinas dendríticas. (Li y cols., 2004; Woolley y McEwen, 1992; Bender y cols., 2010)

Por otro lado se sabe que la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) regula la sinaptogénesis y la espinogénesis, el PI3K está implicado en la morfogénesis de las dendritas, su plasticidad sináptica, formación de la memoria, etc. Por lo que si el vanadio compite con el fosfato la actividad de el segundo mensajero puede verse afectada y por lo tanto la espinogénesis y la sinaptogénesis dando como resultado la disminución de las espinas dendríticas. (Cuesto y cols., 2011)

Además, los estrógenos participan favorablemente en la formación y maduración de las espinas dendríticas, ya que se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que los estrógenos favorecen la maduración de las neuronas, a través de los receptores AMPA, importantes para la formación de la sinapsis, ya que en presencia de estrógenos aumentan su actividad, gracias a este receptor se pueden activar los receptores NMDA, por lo que favorecen la maduración y el mantenimiento de las espinas dendríticas. (Barco, 2010; Li, 2004)

Ahora bien, con respecto a los grupos expuestos y mantenidos ocho semanas post-exposición sin el metal, tanto los ratones macho como hembra presentaron mayor densidad espinosa en comparación con el grupo expuesto a  $V_2O_5$ , esto se puede deber a que a las 8 semanas se encuentran menores concentraciones de vanadio en el organismo, ya que se sabe que el vanadio tiene una fase de eliminación lenta de los 40 a los 50 días de exposición (Rodríguez y Altamirano, 2006), además de que las espinas dendríticas son estructuras sumamente plásticas, por lo que al verse disminuido el vanadio, las espinas dendríticas podrían volver a formarse (Carlisle y Kennedy, 2005).

En el caso de las hembras el número de las espinas dendríticas llega a los valores del grupo control y esto puede estar sucediendo debido a que presenta mayor concentración de estrógenos lo cual puede estar favoreciendo la formación de las espinas dendríticas.

- **Neurogénesis**

La disminución en la neurogénesis observada, tanto en machos como en hembras del grupo expuesto a vanadio, puede explicarse como consecuencia de la alteración del citoesqueleto previamente reportada, (Mussali y cols., 2005 y 2007) afectándose el huso acromático el cual es necesario para la división celular, por lo que si este no se forma no habrá mitosis de las células progenitoras, lo que se vería reflejado en la disminución de la neurogénesis.

Por otra parte se sabe que el vanadio es capaz de inhibir la bomba sodio potasio (Metzler y Metzler, 2001) que se encarga de mantener la homeostasis de las células y si está se pierde la célula se edematiza y eventualmente muere. Si afecta a las neuronas maduras las concentraciones de neurotrofinas que regulan el destino de las nuevas neuronas disminuyen, porque son producidas por las neuronas maduras, lo que en conjunto podría reflejarse en un decremento en el número de las nuevas neuronas. (Kempermann, 2006)

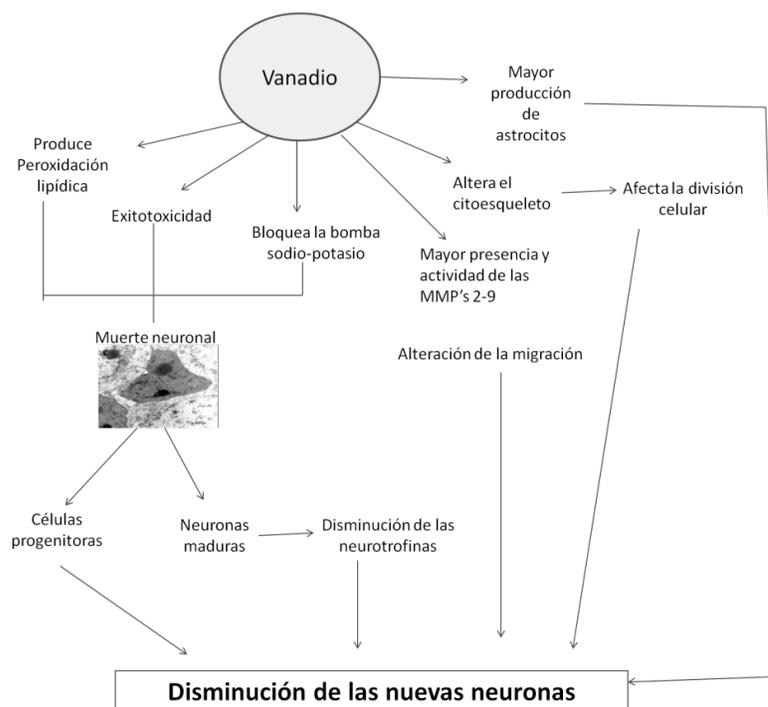
Aunado a esto se ha reportado muerte neuronal en el GD (Colín y cols., 2009), probablemente como resultado de la excitotoxicidad, por el efecto inhibitorio de la tirosina fosfatasa, que puede presentar el vanadio. Esta tirosina interviene en la modulación de los receptores NMDA, regulando la entrada de  $Ca^{2+}$ , el cual entre otras funciones, interviene en la generación del potencial de acción y liberación de neurotransmisores; por lo que al ser inhibida la tirosina entran mayores concentraciones de  $Ca^{+}$ , lo que puede desencadenar muerte neuronal, afectando así a la neurogénesis, al haber muerte de las neuronas maduras que juegan un papel importante al producir neurotrofinas, como el NGF (nerve growth factor, factor de crecimiento nervioso), el BDNF (brain derived neurotrophic factor; factor neurotrófico derivado del cerebro) y las neurotrofinas 3, 4 y 5, que determinarán el destino celular del neuroblasto y posteriormente ayudan a las nuevas neuronas a establecerse en la capa granular y convirtiéndose en neuronas adultas funcionales (Friedman, 2006; Kemperman 2006).

Por otra parte, por efecto del vanadio, las metaloproteinasas 2 y 9 se encuentran aumentadas (Colín y cols., 2008 y Cortés, 2009), y estas son importantes en la remodelación de la matriz extracelular, por lo que se podría sugerir que la migración de nuevas neuronas se vería afectada, al no permitir la migración.

Además, se ha reportado que por efecto de la exposición al vanadio, hay mayor número de astrocitos dentro de la Zona sub-ventricular (ZSV) y el tracto rostral migratorio, (estructuras que presentan neurogénesis en el adulto) lo que también puede, explicar la disminución de las nuevas neuronas, ya que como consecuencia del daño neuronal, las células progenitoras se dividen y se podrían diferenciaren astrocitos. (Jiménez, 2011)

Aunado a esto, está ampliamente documentado que entre los factores que regulan y favorecen la neurogénesis, se encuentran algunos neurotransmisores como la dopamina y en estudios previos, se reporto decremento de la tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia nigra, enzima involucrada en la síntesis de la dopamina, lo que puede dar como resultado un efecto negativo en la neurogénesis (Kemperman, 2006 y Ávila y cols., 2004).

Por otro lado se sabe que los receptores de NMDA están involucrados tanto en la migración como en la sobrevivencia de las neuronas del GD, además las neuronas granulares reciben proyecciones de la corteza entorrinal la cual puede presentar alteraciones como previamente se ha reportado peroxidación lipídica y muerte neuronal en la corteza cerebral, lo que finalmente puede estar alterando la neurogénesis (Jiménez, 2009 y Nacher y McEwen, 2006) **Ver esquema 2.**



**Esquema 2** En este esquema se ilustran las vías por las cuales el vanadio podría inducir disminución en la neurogénesis

A pesar de que hay reportes en donde los estrógenos favorecen el proceso de la neurogénesis, también hay estudios en donde no se observa ningún efecto positivo y no hay diferencias significativas por sexo, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio, ya que, tanto en ratones hembra como en ratones macho se observa disminución de nuevas neuronas. (Lagace y cols., 2007)

A las 8 semanas postexposición el daño persiste en ambos sexos, sin embargo los machos presentan aumento de las nuevas neuronas en comparación con los expuestos y esto puede deberse tal vez a que los machos presentaron mayor daño a las 8 semanas post-exposición, por lo que como mecanismo de compensación los machos presentaron mayor proliferación de neuronas.

- **Memoria espacial**

Como se ha mencionado anteriormente, la exposición de vanadio por vía inhalada produce alteración de la memoria espacial que se ha correlacionado con la disminución del número de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA 3 del hipocampo, (Ávila y cols., 2006; Martínez, 2009; Niño y cols., 2004). Hallazgos que concuerdan a los observados en este trabajo; disminución de la densidad espinosa de las neuronas granulares del giro dentado y alteración de la memoria Sin embargo, a diferencia de estudios previos; se observó recuperación en la memoria espacial, aumento en la densidad espinosa y en la neurogénesis, en ratones macho expuestos y mantenidos 8 semanas libres del metal, que podría asociarse a la capacidad del giro dentado para distinguir patrones de ubicación espacial debido a la propiedad que lo caracteriza, la neurogénesis (Aimone, 2011).

Además, se ha demostrado que el vanadio produce alteraciones ultraestructurales y muerte por necrosis en el giro dentado, debido probablemente a la producción de ROS, por lo que la muerte celular este promoviendo alteraciones de la memoria espacial. (Colín y cols., 2009; Jiménez 2009)

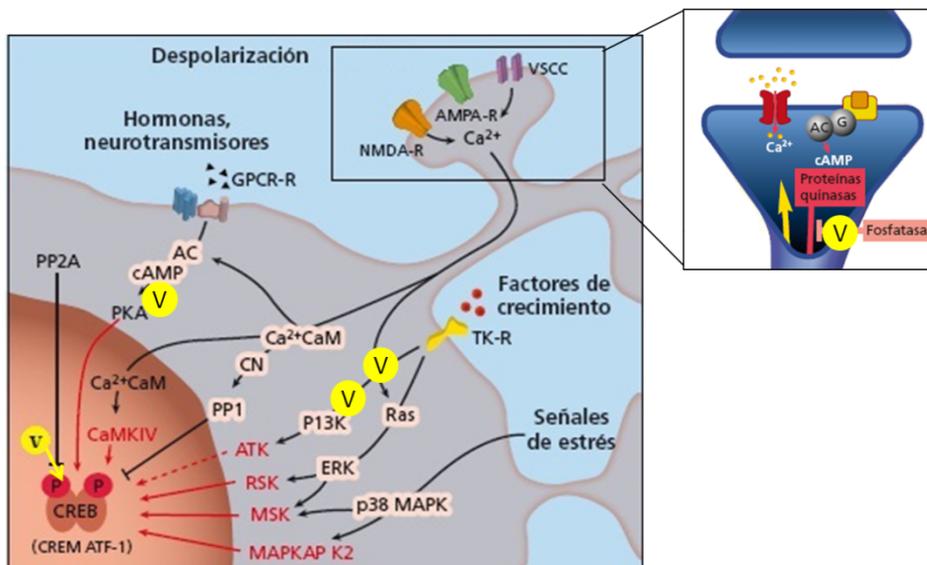
Por otra parte la pérdida de nuevas neuronas puede estar afectando la memoria espacial en los ratones macho, debido a que según reportaron Kee y cols., en el 2007 la memoria espacial está correlacionada con la neurogénesis, ya que las nuevas neuronas son reclutadas para la formación de la memoria espacial.

Además el vanadio puede promover la alteración de la memoria espacial, debido a que probablemente altera el la fosforilación y defosfolilación de la cofilina en citoesqueleto de actina, la cual es importante en procesos de formación de la potenciación a largo plazo (LTP) debido a que está involucrada en la formación de la sinapsis. (Fedulov y cols., 2007)

Conjuntamente, se sabe que los receptores NMDA están involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje, ya que una vez que se abren los canales que permiten la entrada del Ca, se dispara una cadena de reacciones dentro de la célula que permiten iniciar los cambios plásticos que promueven la formación de la memoria. (Barco, 2010; Seok y cols., 2009). Dentro de estos eventos implicados en la formación de la memoria se encuentra la

activación de las cascadas de fosforilación inducidas por la proteína cinasa A (PKA), la cual está regulada por el AMPc (Barco, 2010), segundo mensajero el cuál se inhibe en presencia de vanadio (Das, 2012), por lo que el vanadio puede afectar esta vía de dos formas, inhibiendo el AMPc o bien interfiriendo en la cascada de fosforilación, afectando la formación de la memoria.

Otra vía de activación implicada en la memoria es la ruta modulada por la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB), la cual es importante porque media el cambio en la eficacia de las conexiones sinápticas a nivel genético, la activación de genes por medio de CREB da como resultado la transcripción de moléculas encargadas de modular las conexiones sinápticas que darán como resultado la formación de la memoria. Esta vía de activación depende directamente de su estado de fosforilación controlada por la actividad de la PKA, la cual a su vez es modulada por los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  y de AMPc (Barco 2010 y Seok y cols, 2009), por lo que el vanadio podría estar alterando el funcionamiento de esta vía al interferir en la fosforilación y desfosforilación, de CREB o bien inhibiendo la actividad del AMPc, afectando así la formación de la memoria. (Das, 2012 y Rodríguez y Altamirano, 2006) **Ver esquema 3.**



**Esquema 3. Probables vías por medio de las cuales el vanadio puede afectar la memoria espacial. Modificado de Barco, 2010.**

A pesar de lo mencionado, las hembras no presentaron alteración de la memoria espacial, lo cual probablemente se explique gracias a la acción neuroprotectora de los

estrógenos, ya que, como se mencionó previamente, los estrógenos pueden actuar como antioxidantes, además favorecen la formación y el sostén de las espinas dendríticas y también favorece la actividad de los receptores de NMDA, involucrados en la memoria, es por ello que probablemente las hembras pudieron compensar el daño producido por el vanadio (Behl, 2002; Li y cols., 2004; Woolley y McEwen, 1994; Shors y cols., 2004; Bozak y cols., 2007)

Por último, a las 8 semanas post-exposición los machos presentan recuperación de la memoria espacial, lo cual se puede explicar gracias a la plasticidad que presenta el GD, reflejado en el aumento de la densidad espinosa y de la neurogénesis, por lo que esto puede favorecer la memoria espacial.

## 8. CONCLUSIÓN

La inhalación de vanadio promueve alteraciones en la memoria espacial en los machos, disminución en el número de las espinas dendríticas y de las nuevas neuronas en el GD de ratones macho y hembra de los grupos expuestos a vanadio por 4 semanas.

En contraste con lo encontrado en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, en GD se observó menor alteración a las 8 semanas post-exposición libre del metal, por lo que podemos sugerir que el GD presenta mayor plasticidad que las regiones de CA. Además, pese a que en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo se mantenga el daño producido por la exposición a vanadio, a las 8 semanas post-exposición libre del metal, la memoria espacial se recupera, sugiriendo que el GD juega un papel importante en la fisiología del hipocampo.

## 9. ANEXO

### 9.1 LABERINTO DE MORRIS

Material:

- Un tanque de 150cm de diámetro y 60cm de altura
- Una plataforma de 50cm de alto y 10cm de diámetro
- Objetos que sirvan como puntos de referencia para el animal, por ejemplo, una silla.
- Colorante blanco para el agua; Dióxido de Titanio ( $\text{TiO}_2$ )

Método

1. Se divide el tanque en 4 cuadrantes y se coloca la plataforma en uno de ellos, procurando que quede en medio de este (ver fig. 1a).
2. Se llena el tanque con agua a  $\pm 25^\circ\text{C}$ , dejando que el agua rebase un centímetro la superficie de la plataforma.
3. Se colorea el agua con el dióxido de titanio para evitar que el ratón observe la plataforma.
4. Alrededor del tanque se deben colocar objetos, de referencia por ejemplo una silla, para ayudar al ratón a ubicarse viso-espacialmente y a que, a partir de esto, desarrolle su memoria espacial (ver fig. 1b)
5. Una vez que se tiene preparado el material se realiza la prueba, colocando al ratón al extremo contrario y tomando el tiempo de latencia que utiliza para llegar a la plataforma.
6. Si no llega a los 60 segundos se termina la prueba y se retira al ratón del tanque.
7. Esta prueba se realiza semanalmente, de preferencia a la misma hora y el mismo día de la semana.

\*Nota: Este experimento requiere de un entrenamiento previo de siete días consecutivos, en el cuál se realiza lo mismo que en la prueba, solamente que se requiere repetir el mismo ejercicio 20 veces por ratón para reforzar el aprendizaje en cada repetición.

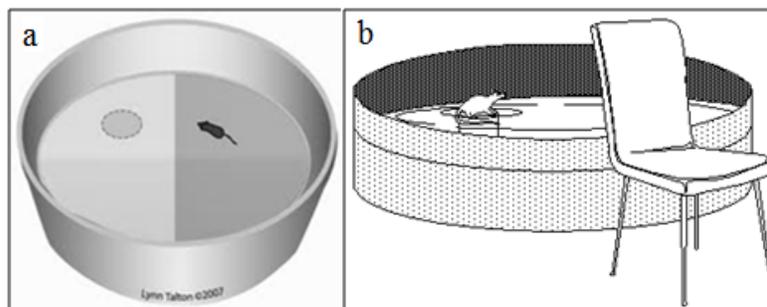


Figura (1a). Muestra como se debe dividir el tanque en cuatro cuadrantes y la correcta posición de la plataforma indicada con la línea punteada. (1b) Muestra como se deben colocar los objetos que ayudaran a la orientación viso-espacial del ratón.

Modificado de Gary L. 2004 y Lynn Talton 2007

## 9.2 TÉCNICA DE GOLGI RÁPIDA

Material:

Solución A (Ósmico dicrómica)

- 300ml de agua destilada
- 8 gramos de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ )
- 1gramo de Tetraóxido de Osmio ( $OsO_4$ )

Solución B (Solución argéntica)

- Nitrato de Plata ( $AgNO_3$ ) 0.75%
- Agua destilada

Método

1. Se colocaron los cerebros en la solución A de 6 a 7 días
2. El sexto o séptimo día se hizo un lavado con la solución B y se dejaron en esta por 1 día.
3. Al siguiente día se encastraron los cerebros en parafina y se cortaron en el micrótopo ( $90\mu m$  de grosor)
4. Se pasaron en un tren de alcoholes, uno al 96% y dos al 100%, 10min. cada uno.
5. Se pasaron a Eugenol (10min.)
6. Posteriormente a Xilol (10min.)
7. Y finalmente se montaron con resina sintética para su análisis cuantitativo

### 9.3 INYECCIÓN DE BrdU

Se inyectó vía intraperitoneal a los ratones 3 días consecutivos cada 24 horas. Dos días antes del sacrificio y el mismo día del sacrificio (dos horas antes de este).

La concentración a la que se inyectó fue la siguiente:

- 50mg por kilogramo (del peso corporal del ratón)
- Se disolvieron 10mg en 1ml de solución salina estéril.

### 9.4 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA BrdU

Obtención y congelación de muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservar el tejido:

1. Después del sacrificio se dejó el cerebro por 2 horas en fijador
2. Se lavó con PB 0.1M durante 10 minutos para eliminar los restos del fijador
3. Se dejó por 24 horas en una solución de sacarosa al 30% en buffer para crioprotegerlo
4. Finalmente se congeló al sumergirlo en metil-butano conservado en un congelador.

Se realizaron los cortes en un criotomo a  $40\mu$ . Una vez que se obtuvieron los cortes se colocaron en pozos previamente llenados con PB 0.1M y se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Incubar 15 min. en PB 0.1M + Tritón 0.03% + Peróxido de oxígeno en oscuridad
2. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M + Tritón 0.3%
3. Incubar 2 horas a  $65^{\circ}\text{C}$  en formamida al 50% en SSC 2X
4. Hacer un lavado de 5 min. con SSC 2X
5. Incubar 30 min. con HCl 1N
6. Incubar 10 min. en Borato de Sodio 0.1M
7. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M + Tritón 0.3%
8. Incubar 30 min. en solución de bloqueo de albúmina
9. Incubar de 12 a 16h. en anticuerpo primario contra BrdU levantado en ratón 3:500 en solución de bloqueo.
10. Dejar incubando mínimo 12h.
11. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M + Tritón 0.3%
12. Incubar 2h. en anticuerpo secundario contra IgG de ratón 1:500 en solución de bloqueo.
13. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M + Tritón 0.3%
14. Incubar 90 min. en Abidina+ Biotina.
15. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M + Tritón 0.3%
16. Incubar 3 min. en DAB
17. Detener la reacción con PB 0.1M
18. Hacer 3 lavados de 10 min. con PB 0.1M
19. Montar en laminillas cubiertas con grenetina al 0.5% + Sulfato de cobre 0.05%.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aimone James B., Deng Wei y Gage Fred H. (2011) *Resolving new memories: A critical look at the Dentate Gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation*, Neuron, vol. 70, 589-596
- Amador -Muñoz O., Villalobos-Pietrini R., Miranda J., Vera-Ávila L.E. (2011) *Organic compounds of PM2.5 in Mexico Valley and temporal patterns, behavior and sources*, Science of the Total Environment, vol. 409(8): 1453-1465
- Amaral David G., Sharfman Helen E., Lavenex Pierre (2007) *The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization*, Progress in Brain Research, vol. 163, 3-22
- Andersen Per, Morris Richard, Amaral David, Bliss Tim, O'Keefe John (2007) *The hippocampus book*, Oxford University Press, Nueva York.
- Arias-Carrión O., Olivares-Bañuelos T., Druker Colín R. (2007) *Neurogénesis en el cerebro adulto*, Revista de Neurología vol 44(9): 541-550
- Ávila-Costa M.R., Colín-Barenque L., Zepeda-Rodríguez A., Antuna Silvia B., Saldivar O. L., Espejel-Maya G., Mussali-Galante P., Ávila-Casado M.C., Reyes Olivera A., Anaya-Martínez V., Fortoul T.I. (2005) *Ependymal epithelium disruptiun after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model*, Neuroscience Letters vol. 381, 21-25
- Ávila-Costa M.R., Fortoul T.I., Niño-Cabrera G., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Gutiérrez-Valdez A.L., Ordoñez-Librado J.L., Rodríguez Lara V., Mussali-Galante P., Díaz-Bech P., Anaya-Martínez V. (2006) *Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of Vanadium pentoxide (V2O5) promote memory deterioration*, Neurotoxicology, vol. 27, 1007-1012
- Ávila-Costa M.R., Fortoul T.T., Colín-Barenque L., Ordoñez-Librado J.L., Gutierrez-Valdez A.L., Anaya-Martínez V. (2007) *Vanadium and the Nervous system*, pp 29-42. En: Vanadium Its Impact on health de Fortoul Teresa I. y Ávila-Costa María Rosa, Nova Sciences Publishers, 2007
- Ávila-Costa M.R., Montiel Flores E., Colín-Barenque L., Ordoñez J.L., Gutiérrez A.L., Niño Cabrera H.G., Mussali-Galante., Fortoul T.I. (2004) *Nigrostriatal Modificatios After Vanadium Inhalation: An immunocytochemical and cytological approach*, Neurochemical Research, vol. 29(7): 1365-1369
- Baran Enrique J., (2008) *Vanadium detoxification: Chemical and biochemical aspects*, Chemistry & Biodiversity, vol. 5, 1475-1484)
- Barceloux Donald G. (1999) *Vanadium*, Clinical Toxicology, vol. 37(2): 265-278
- Barco Angel (2010) *La materia de los recuerdos: Circuitos neuronales y cascadas moleculares*, Mente y cerebro, vol. 40, 24-33.
- Baymes, J.W. (2005) *Oxígeno y vida*, pp 505-515. En Bioquímica médica, de Dominiczak Manek H. Baymes John W., España, 2a edición: Elsevier, 2005
- Behl Christian (2002) *Oestrogen as a neuroprotective hormone*, Nature Reviews Neuroscience, vol. 3, 433-442
- Bender Roland A., Zhou L., Wilkars W., Fester L., Lanowski J.S., Paysen D., König A., Rune G.M. (2010) *Roles of 17  $\beta$ -Estradiol involve regulation of reelin expression and synaptogenesis in the Dentate Gyrus*, Cerebral Cortex, vol. 20, 2985-2995

- Berg Daniel A., Kirkham M., Wang H., Frisén J., Simon A. (2011) ***Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine neurons***, Cell Stem Cell, vol 8, 426-433
- Bernstein J.A., (2004) ***Health effects of air pollution***, Journal of Allergy and clinical Immunology, vol. 114(5): 1116-1123
- Bourne J.N., Harris K.M. (2007), ***Dendritic spines***, Encyclopedia of Life Sciences, 1-7
- Bozak Jelks Karen, Wylie Rebecca, Floyd Candance L., Kimberly McAllister A., Wise Phylis (2007) ***Estradiol Targets Synaptic proteins to induce Glutamatergic synapse formation in cultured hippocampal neurons: critical role of estrogen receptor-  $\alpha$*** , The Journal of Neuroscience, vol. 27(26): 6903-6913
- Byczkowski Januz z., Kullarni Aurun P. (1998) ***Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium***, pp 215-227. En Vanadium in the environment. Part 2: Health effects de Nriagu Jerome O., Editorial Wiley John & Sons, Incorporated, 1998
- Calderón-Garcidueñas L., Mora-Tiscareño A., Ontiveros E., Gómez-Garza G., Barragán-Mejía G., Broadway J., Henríquez-Roldán C., Pérez-Guillé B., Torres-Jardón R., Herrit L., Brooks D., Osnaya-Brizuela N., Monroy M.E., González-Maciél A., Reynoso-Robles R., Villareal-Calderón R., Solt Anna C., Engle Randall W. (2008) ***Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs***, Brain and Cognition, vol. 68, 117-127
- Castro-Sierra E., Chico Ponce de León F., Gordillo Domínguez L.F., Portugal Rivera A. (2007) ***Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, GABA y memoria***. Primera parte, Salud Mental, vol. 30(4):7-15.
- Colín-Barenque L., Ávila-Costa M.R., Martínez M., Zepeda A., Bizarro-Nevarés P., Pasos F., Espinosa-Villanueva J., Aley P., Fortoul T.I. (2009) ***Alteraciones ultraestructurales en Giro Dentado de ratones expuestos a la inhalación de Pentóxido de Vanadio***, X Congreso interamericano de Microscopía.
- Colín-Barenque L., Martínez-Hernández M.G., Baiza Gutman L.A., Ávila-Costa M.R., Ordóñez-Librado J.L., Bizarro-Nevarés P., Rodríguez Lara V., Piñón -Zarate G., Rojas Lemus M., Mussali-Galante P., Fortoul T.I. (2008) ***Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation***, Journal of Applied Toxicology, vol. 28, 718-723
- Cooper Edward C., Lowenstein Daniel H. (2002) ***Hippocampus***, Encyclopedia of Life Sciences, 1-9
- Cortés Torres Estephania (2009) ***Efecto del pentóxido de vanadio en la concentración de las metaloproteasas (MMP-2 y 9) en estriado, hipocampo y plexo coroideo e un modelo murino de exposición por inhalación***. Tesis de Licenciatura UNAM
- Cuesto Germán, Enriquez Barreto Lilian, Caramés Cristina, Cantarero Marta, Gasull Xavier, Sandi Carmen, Ferrús Alberto, Acebes Ángel y Morales Miguel (2011) ***Phosphoinositide-3-kinase activation controls synaptogenesis and spinogenesis in hippocampal neurons***, The Journal of Neuroscience, vol. 31(8):2721-2733
- Das Subhadeep, Chatterje Mary, Janarthan Muthumani, Ramachandran Hari, Chatterjee Malay (2012) ***Vanadium in cancer prevention***, en: Vanadium; Biochemical and molecular biological approaches de Michibata Hitoshi (2012) ,

Springer, New York, pp 166

- Etcheverry Susana B., Di Virgilio Ana L., Barrio Daniel A. (2012) ***Vanadium effects on bone metabolism*** En: Vanadium; Biochemical and molecular biological approaches de Michibata Hitoshi (2012) , Springer, New York, pp.145-151
- Fedulov Vadim, Rex Christopher S., Simmons Danielle A., Palmer Linda., Gall Christine M. y Lynch Gary (2007) ***Evidence that Long-Term Potentiation Occurs within Individual Hippocampal synapses during learning***, The Journal of Neuroscience, vol. 27(30): 8031-8039
- Feng Jian, Yan Zhen, Ferreira Adriana, Tomizawa Kazuhito, Liauw Jason A., Zhuo Min, Allen Patrick B., Ouimet Charles C., Greengard Paul (2000) ***Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines***, PNAS, vol. 97(16): 9287-9292
- Fester L., Ribeiro-Gouveia V., Prange-Kiel J., Von Schassen C., Böttner M., Jarry H., Rune G.M. (2006) ***Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis***, Journal of Neurochemistry, vol. 97, 1136-1144
- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López I.E., Bizarro-Nevarez P., Mendoza M.L., Saldivar Osorio L., Espejel-Maya G., Ávila-Casado M.C., Ávila-Costa-M.R., Colín-Barenque L., Navarro Villanueva D., Olaiz-Fernández G. (2002) ***Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960s and 1990s***, Archives of Environmental Health, vol. 57(5):446-449
- Fortoul T.I., Rojas-Lemus M. (2007) ***Vanadium as an air pollutant***, pp 1-6. En Vanadium Its Impact on health de Fortoul Teresa I. y Ávila-Costa María Rosa, Nova Sciences Publishers, 2007
- Friedman Linda K. (2006) ***Calcium in neuroprotection***, Molecular interventions, vol. 6(6): 315-329
- Galea Liisa A.M. (2008) ***Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents***, Brain research review vol. 57, 332-341
- García Graciela B. (2006) ***El vanadio, un elemento ambiguo***, Acta Toxicologica Argentina, vol. 14(2): 32-36
- García Graciela B., Quiroga Ariel D., Stürtz Nelson, Martínez Aleandra I., Biancardi María E. (2004) ***Morphological alterations of Central Nervous System (CNS) myelin in vanadium (V)-exposed adult rats***, Drug and Chemical Toxicology, vol. 27(3): 281-293
- Gould Elizabeth, Tanapat Patima, Hastings Nicholas B., Shors Tracey J. (1999) ***Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning***, vol. 3(5): 186-192
- Hajszan Tibor., Milner Teresa A., Leranath Csaba (2007) ***Sex steroids and the dentate gyrus***, pp 399-415. En The Dentate Gyrus. A comprehensive guide to structure, function and clinical implications de Sharfman Helen E., Editorial Elsevier, 163 Progress in Brain Research, Amsterdam, 2007
- Hsieh Wilson Linda C., Benfenati Fabio, Snyder Gretchen L., Allen Patrick B., Nairn Angus C., Greengard Paul (2003) ***Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments***, The Journal of Biological Chemistry, vol. 278(2); 1186-1194
- IARC, International Agency for research on Cancer (2003) ***Cobalt in Hard Metals***

- and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide.*** World Health Organization International Agency for Research on Cancer, vol. 86
- Ihunwo Amadi O. y Schliebs Reinhard (2010) ***Cell proliferation and total granule cell number in dentate gyrus of transgenic Tg2576 mouse***, Acta Neurobiologiae Experimentalis, vol. 70, 362-369
  - Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), disponible en: ***<http://www.inegi.org.mx/default.aspx>***
  - Jiménez Martínez R.S., Colín Barenque L., Vega C., Arenas A., Bizarro P., Zepeda A., Pasos F., Fotoul T. (2011) ***Vanadium inhalation, olfaction and neurogenesis***, Neurosciences 41 Annual Meeting for Neuroscience, Washington D.C.
  - Jiménez Martínez Rubén Salvador (2009) ***Daño oxidante en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inalada***, Tesis de Licenciatura.
  - Johnston Daniel, Amaral David G. (1998) ***Hippocampus***, pp 417-434. En The synaptic organization of the brain de Sheperd G.M., Editorial Oxford University, New York, 1988
  - Jomova Klaudia, Vondrakova Dagmar, Lawson Michael, Valko Marian (2010) ***Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders***, Molecular Cell Biochemistry, vol. 345, 91-104
  - J-Son Lagerkvist B., Oskarsson A. (2007) ***Vandium***, pp 905-918. En Handbook on the toxicology of metals de Nordberg Gunnar F., Flower Bruce A., Nordberg M., Friberg L., Editorial Academic Press Elsevier, San Diego California, 2007
  - Kee Nohjin, Teixeira Cátia M., Wang Alfra H. y Frankland Paul W. (2007) ***Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus***, Nature Neuroscience, vol. 10(3): 355-362
  - Kempermann Gerd (2006) ***Adult neurogenesis***, Editorial Oxford University Press, EUA.
  - Kulkarni G.K., 2007, ***Vanadium pentoxide inhalation***, Indian Journal of Occupational and environmental medicine, vol. 11(3): 95-102
  - Lagace Diane C., Fischer Stephanie J. y Eisch Amelia J. (2007) ***Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice***, Hippocampus, vol. 17, 175-180
  - Li Chenjian, Brake Wayne G., Romeo Russell D., Dunlop John C., Gordon Marisa, Buzescu Rodica, Magarinos Ana María, Allen Patrick B., Greengard Paul, Luine Victoria y McEwen Bruce S. (2004) ***Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice***, PNAS, vol. 101(7): 2185-2190
  - MacKinley Galen, Zuk Miriam, Höjer Morten, Avalos Montserrat, González Isabel, Iniestra Rodolfo, Laguna Israel, Martínez Miguel A., Osnaya Patricia, Reynales Luz M., Valdés Raydel, Martínez Julia (2005) ***Quantification of local and global benefits from air pollution control in Mexico City***, Environmental Science & Technology, vol. 39(7): 1954-1961
  - Markesbery William R., (1997) ***Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease***, Free Radical Biology & Medicine, vol. 23(1): 134-147
  - Martínez Pedraza M., Colín-Barenque L., Rojas-Lemus M., Piñón-Zarate G., Bizarro -Nevarez P., Souza-Gallardo L., Ordóñez-Librado J.L., Fortoul T.I. (2009)

*Alteraciones morfológicas y funcionales en hipocampo inducidas por la inhalación de V2O5 en un modelo murino*, LII Congreso Nacional de Fisiología, Morelia, Michoacán

- Mayer Helmut (1999) *Air pollution in cities*, Atmospheric Environment, vol. 33, 409-4037
- McGrath L.T., McGleenon B.M., Brennan S., McColl D., McIlroy S., Passmore A.P. (2001) *Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonenal but not malondialdehyde*, QJM, vol. 94, 485-490
- McKinley Galen, Zuk Miriam, Höjer Morten, Avalos Montserrat, González Isabel, Iniestra Rodolfo, Laguna Israel, Martínez Miguel A., Osnaya Patricia, Reynales Luz M., Valdés Raydel y Martínez Julia (2005) *Quantification of Local and global benefits from air pollution control in Mexico City*, Environmental Science Technology, vol. 39, 1954-1961
- Menno P. Witter, Amaral David G. (2004) *Hippocampal Formation* En: The Rat Nervous System de George Paxinos, Elsevier Academic Press, pp 633-699
- Metzler David E. y Metzler Carol M. (2001) *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, Volumen 1, Harcourt/Academic Press, pp 889
- Molina-Holgado Francisco, Hilder Robert C., Gaeta Alessandra, Williams Robert, Francis Paul (2007) *Metals ions and neurodegeneration*, Biometals, vol. 20, 639-654
- Morales-Rivero A., Rodríguez-Lara V., Ávila-Costa MR., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Piñon-Zarate G., Rojas-Lemus M., Ordóñez-Librado JL., Fortoul TI (2006) *Alteraciones sobre la actina de células testiculares secundarias a la inhalación de V2O5. Modelo murino.*, 2º Congreso Académico Dr., Roberto Kretchmer Schmid. Facultad de Medicina, UNAM.
- Morgan Todd E., Davis David A., Iwata Nahoko, Tanner Jeremy A., Snyder D., Ning Zhi, Kam Winnie, Hsu Yu-Tien, Winkler Jeremy W., Chen Jiu-Chiuan, Petasis Nicos A., Baudry Michel, Sioutas Constantinos, Finch Caleb E. (2011) *Glutamatergic Neurons in rodent Models Respond to Nanoscale particulate urban air pollutant in vivo and in vitro*, Environmental Health Perspectives, vol. 119(7): 1003-1009
- Mukherjee Biswajit, Patra Balaram, Mahapatra Sushmita, Banerjee Pratik, Tiwari Amit, Chatterjee Malay (2004) *Vanadium-an element of atypical biological significance*, Toxicology Letters, vol. 150, 135-143
- Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Ávila-Costa M.R., Fortoul T.I. (2007) *Mechanisms of vanadium toxicity*, pp 8-19. En: Vanadium Its Impact on health de Fortoul Teresa I. y Ávila-Costa María Rosa, Nova Sciences Publishers, 2007
- Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Hernández-Tellez B., Ávila-Costa MR., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Martínez-Levy G., Rojas-Lemus M., Piñon-Zarate G., Saldivar -Osorio L., Díaz -Bech P., Herrera-Enríquez MA., Tovar-Sánchez E., Fortoul TI. (2005) *Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times*, Toxicology and Industrial Health, vol. 21, 215-222
- Nacher Juan y McEwen Bruce S. (2006) *The role of N-methyl-D-aspartate receptors in Neurogenesis, Hippocampus*, vol. 16, 267-270
- Niño-Cabrera H.G., Martínez Méndez R., Ávila-Costa M.R., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Acevedo Nava S., González Villalva A.E., Pasos Nájera F.,

- Fortoul T.I. (2004) *Evaluación de la recuperación de las alteraciones en la memoria espacial y citológica por inhalación de V2O5. Modelo en ratón*, XLVII Congreso Nacional de Fisiología, Veracruz
- Nowonty Petra, Kwon Jennifer M., Goate Alison M., (2001) *Alzheimer Disease*, Encyclopaedia of life Sciences, 1-6
  - OMS (1995) *Vanadio y algunas sales de vanadio*, Vanadio; Salud y guía de seguridad no. 42, 1-34
  - Pak Toni R., Handa Robert J. (2008) *Steroid Hormone Receptors and Sex Differences in Behavior*, pp 109- 138. En: Sex differences in the brain from genes to behavior de Becker Jill B., Berkley Karen J., Geary Nori., Hampson E., Herman James P., Young Elizabeth A., Editorial Oxford University Press, New York, 2008
  - Patricó Domenico (2008) *Oxidative stress hypothesis i Alzheimer's disease: a reappraisal*, Trends in Pharmacological Sciences vol. 29(12): 609-615
  - Ramírez-Rodríguez Gerardo, Benítez-King Gloria, Kempermann Gerd (2007) *Formación de neuronas nuevas en el hipocampo adulto: Neurogénesis*, Salud Mental, vol. 30(3): 12-19
  - Reynolds Chandra A., Crowe Michael (2005) *Alzheimer Disease*, Encyclopedia of life Sciences, 1-8
  - Rodríguez-Mercado Juan J., Altamirano-Lozano Mario A. (2006) *Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad*, Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 22(4): 173-189
  - Rojas Avellaneda D. (2007) *Fossil fuels pollution and air quality modeling*, pp 113-121. En Towards a Cleaner Planet, Klapp Jaima, Cervantes Cota Jorge L., Chávez Alcalá José Federico, Editorial Springer, Berlín, 2007.
  - Seok Lee Yong, Silva Alcino J. (2009) *The molecular and cellular biology f enhanced cognition*, *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 10, 126-140
  - Shors TJ., Falduto J., Leuner B., (2004) *The opposite effects of stress on dendritic spines in male vs female rats are NMDA receptor-dependent*, *European Journal of Neuroscience*, vol. 19, 145-150
  - Slaughter, R.G., Needleman, S.D. and Means, R.A. (1987), *Developmental regulation of calmodulin, actin, and tubulin RNAs during rat testes differentiation*, *Biology of reproduction* 37, pp 1259-1270
  - SMA (Secretaría del Medio Ambiente) (2010) *Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM 2008*
  - Szklarczyk Arek, Lapinska Joanna, Rylski Marcin, McKay Ronald D. G. y Kaczmarek Leszek (2002) *Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during remodeling in adult hippocampus*, *The Journal of Neurosciences*, vol. 22(3): 920-930
  - Tanapat Patima, Hastings Nicholas B., Reeves Alison J., Gould Elizabeth (1999) *Estrogen stimulates a transient Increase in the Number of New Neurons in the Dentate Gyrus of the Adult Female Rat*, *The Journal of Neuroscience*, vol 19(14): 5792-5801
  - Taupin Philippe (2007) *BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation*, *Brain Research*, vol. 53, pp. 198-214
  - Valencia Moulton Paula y Yang Wei (2012) *Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease*, *Journal of Environmental and Public Health*, vol. 2012, 1-9.

- Vallejo Maite, Jáuregui -Renaud Kathrine, Hermosillo Antonio G., Márquez Manlio F., Cárdenas Manuel (2003) *Efectos de la Contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México*, Gaceta Médica de México, vol. 139(1): 57-63
- Wise Phyllis M., Dubal Dena B., Wilson Melinda E., Rau Shane W., Liu Ying (2001) *Estrogens: Trophic and protective Factors in the Adult Brain*, Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 22, 33-66
- Witter Menno P., Amaral David G. (2004) *The hippocampal Formation*, pp 633-699. En The Rat Nervous System de Paxinos George, Elsevier Academic Press, 2004
- Woolley Catherine S. y McEwen Bruce S. (1992) *Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during estrous cycle in the adult rat*, The journal of Neuroscience, vol. 12(7): 2549-2554.
- Yang Wei, Omaye Stanley T. (2008) *Air pollutants, oxidative stress and human Health*, Mutation Research, vol. 674(1-2): 45-54