



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores

Iztacala

Neurogénesis en bulbo olfatorio en un modelo de
exposición a vanadio por vía inhalada.

Diferencias por sexo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Rubén Salvador Jiménez Martínez

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Laura colín Barenque

COTUTOR(A) DE TESIS: Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

COMITÉ TUTOR: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca



México, D.F.

Marzo, 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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores

Iztacala

Neurogénesis en bulbo olfatorio en un modelo de
exposición a vanadio por vía inhalada.

Diferencias por sexo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Rubén Salvador Jiménez Martínez

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Laura colín Barenque

COTUTOR(A) DE TESIS: Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

COMITÉ TUTOR: Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca



México, D.F.

Marzo, 2012

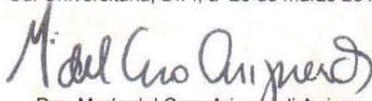
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **JIMÉNEZ MARTÍNEZ RUBÉN SALVADOR** con número de cuenta 302501928 con la tesis titulada "**NEUROGÉNESIS EN BULBO OLFATORIO EN UN MODELO DE EXPOSICIÓN A VANADIO POR VÍA INHALADA. DIFERENCIAS POR SEXO.**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. LAURA COLÍN BARENQUE**:

Presidente: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL
Vocal: DR. GERARDO BERNABÉ RAMÍREZ RODRÍGUEZ
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente: DRA. GLORIA BENÍTEZ KING
Suplente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de marzo 2012.


Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi proyecto de investigación y continuar con mi formación profesional.

La presente tesis se realizó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el número de convocatoria 290564 y el número de registro de CVU, 325995.

También se contó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el número de proyecto IN220211 a cargo de la Dra. Laura Colín Barenque.

Extiendo un agradecimiento especial a mi Comité Tutor:

A la Dra. Laura Colín Barenque, por haber dirigido este trabajo de investigación. Agradezco profundamente sus atenciones, el respeto y la confianza ofrecida durante todo el proceso. Ha sido un honor poder contar con su dirección de tesis y poder llevar sus enseñanzas en mi desarrollo personal y profesional.

A la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes, por todo su apoyo, su confianza y por permitirme integrarme a ese gran grupo de trabajo del que estoy orgulloso de pertenecer.

Al Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca, por sus valiosas observaciones y su asesoría en el proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

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

A la M.V.Z. Silvia Reyes Maya y la M. en C. María Góngora por el registro de imágenes obtenidas con el Microscopio Confocal LEICA TC5-SP5.

Al Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular por la obtención de las muestras histológicas, en especial a la Téc. Aca. Verónica Rodríguez Mata.

A la M. en C. Marcela Rojas Lemus, por su asesoría en la tesis, fue todo un gusto compartir con ella el trabajo en el laboratorio y llevarme como aprendizaje los consejos ofrecidos durante las largas charlas.

A la M. en C. Gabriela Piñón Zárata, por haberme enseñado las técnicas utilizadas en el trabajo de laboratorio y ser mi guía en cualquier aspecto técnico en la realización del proyecto.

Al Biol. Armando Zepeda y Francisco Pasos por su apoyo en la grabación de videos utilizados en el presente proyecto.

De igual forma, hago un agradecimiento especial:

Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, por abrirme las puertas desde un inicio y permitirme formar parte de su grupo de investigación; entre ellos, mis compañeros de trabajo en el laboratorio: Adriana González, Patricia Bizarro, Martha Ustarroz, Carlos Falcón, Nelly López, Jesús Silva, Carolina Vega, Aanaid Arenas, Sofía Zepeda, Vianey Rodríguez, por compartir el espacio de trabajo y contar con su apoyo y respeto.

A mis compañeros, amigos de la facultad y mis queridos amigos de toda la vida; guardo un recuerdo especial de todos ellos.

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis es el resultado de una investigación que desarrollé en el Departamento de Biología Celular y Tisular en la Facultad de Medicina de la UNAM. Tuve la oportunidad de aplicar, en el caso práctico que me ocupó, los conocimientos adquiridos durante mis estudios de Posgrado. Los apoyos recibidos durante este proceso me alentaron para continuar y poder concluir de manera alentadora con la versión final de este trabajo.

Por lo anterior, este trabajo está dedicado a mi familia: mi padre, madre y hermana. Todo el apoyo y cariño que recibí de ellos está reflejado en cada una de las páginas de este escrito. Son mi principal motivación para continuar mi formación, orientándome para participar de manera activa y responsable en la vida social y política que me corresponde.

Índice

1. Tabla de abreviaturas	13
2. Resumen	15
3. Abstract	17
4. Introducción	19
4.1 Contaminación ambiental	19
4.2 Partículas suspendidas (PS)	20
4.3 Efecto de la contaminación en enfermedades neurodegenerativas	21
4.4 Vanadio	22
4.5 Generalidades del vanadio	22
4.6 Mecanismos de acción y toxicodinamia	22
4.7 Toxicocinética del vanadio	23
4.8 Toxicidad del vanadio en Sistema Nervioso Central (SNC)	23
4.9 Efectos en bulbo olfatorio	24
4.10 Sistema Olfatorio	24
4.11 Bulbo olfatorio	27
4.12 Interneuronas en el bulbo olfatorio	31
4.13 Neurogenesis en bulbo olfatorio	34
4.13.1 Proliferación en la Zona Subventricular (ZSV)	35
4.13.2 Migración celular en el TRM	36
4.13.3 Diferenciación celular en bulbo olfatorio	38

4.14 Factores que participan en la neurogénesis -----	39
4.15 Hormonas sexuales -----	40
4.16 Diferencias por sexo -----	41
4.16.1 Estrógenos en el SNC -----	41
4.16.2 Efectos genómicos -----	42
4.16.3 Efectos no genómicos -----	42
4.16.4 Actividad antioxidante -----	42
4.17 Relación de estrógenos y enfermedades neurodegenerativas ---	44
5. Justificación -----	47
6. Objetivo general -----	48
7. Objetivos particulares -----	48
8. Método -----	49
8.1 Protocolo de administración de BrdU -----	51
8.2 Pruebas olfatorias -----	52
8.2.1 Prueba de reconocimiento de odorante -----	52
8.2.2 Prueba de preferencia olfatoria -----	54
9. Resultados -----	55
9.1 Prueba de reconocimiento del odorante -----	56
9.2 Prueba de preferencia olfatoria -----	56
9.2.1 Heptaldehído -----	56
9.2.2 Etanol -----	57
9.2.3. Ácido acético -----	58
9.3 Análisis citológico -----	60
9.3.1 Zona subventricular (ZSV) -----	60

9.3.2. Tracto Rostral Migratorio -----	65
9.3.3. Bulbo olfatorio -----	70
9.4. Inmunohistoquímica -----	73
9.4.1 ZSV -----	73
9.4.2 TRM -----	75
10. Discusión -----	77
10.1 Pruebas olfatorias: reconocimiento olfatorio y preferencia olfatoria ---	77
10.2 Toxicidad del vanadio en la neurogénesis -----	81
10.3 Diferencias por sexo -----	86
10.4 Plasticidad sináptica -----	90
10.5 Relación entre la edad, enfermedades neurodegenerativas y la neurogénesis -----	94
11. Conclusiones -----	96
12. Bibliografía -----	97

Tabla de abreviaturas

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
BO	Bulbo Olfatorio
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CAMKII	Ca ²⁺ /Calmodulina Proteína Cinasa II
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CO	Monóxido de carbono
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CCK	Colecistoquinina
DCX	Doblecortina
FGF2	Factor 2 de crecimiento básico de fibroblastos
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GMPc	Monofosfato de guinidina cíclico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
HB-EGF	Factor de crecimiento epidermal unido a heparina
IFG1	Factor de crecimiento de la insulina 1
IP ₃	Inositol Trifosfato 3
JNK	c-Jun N-terminal kinases
K	Potasio
MAO	Monoaminoxidasa
MMP's	Metaloproteinasas
Na	Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NO _x	Óxidos de nitrógeno

O ₃	Ozono
PS	Partículas suspendidas
PK2	Prokineticina 2
ROS	Reactive oxygen Species
SNC	Sistema Nervioso Central
SAI	Sistema de Asociación Intrabulbar
SO ₂	Dióxido de azufre
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
TRM	Tracto Rostral Migratorio
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México
ZSV	Zona Subventricular

Resumen

La exposición a metales como el vanadio generan daños en la salud y en el sistema nervioso central. Las enfermedades neurodegenerativas se han asociado a la exposición a metales, y se presentan en su mayoría en personas adultas. Se sabe que el cerebro adulto es capaz de generar nuevas neuronas en el bulbo olfatorio. En este trabajo se estudió la neurogénesis del bulbo olfatorio y su función durante la inhalación de pentóxido de vanadio, y en un periodo de 8 semanas libre del metal. Se utilizaron ratones machos y hembras CD-1 de 30-35 gr. Se dividieron en tres grupos por sexo: a) control, b) expuesto a vanadio por 4 semanas y c) expuesto al metal 4 semanas y 8 semanas sin exposición. La función olfatoria se evaluó con una prueba de reconocimiento del odorante y de preferencia olfatoria.

Los animales se sacrificaron y los cerebros se procesaron con inmunohistoquímica, utilizando BrdU, e inmunofluorescencia, utilizando como marcadores: PCNA para proliferación celular, GFAP para astrocitos, NCAM para neuroblastos y NeuN para neuronas diferenciadas.

La prueba de reconocimiento de odorantes reveló diferencias significativas entre los grupos de estudio. Los animales de ambos sexos mostraron alteración en el olfato después de la exposición a vanadio, pero con 8 semanas posteriores a la exposición al metal mejoraron el tiempo de localización.

En el análisis citológico observamos que las hembras presentaron mayor proliferación celular en la ZSV y migración celular en el TRM. Para los grupos de post-exposición, la proliferación de astrocitos fue mayor en las hembras, y la de neuroblastos fue mayor en los machos.

En el bulbo olfatorio hubo pérdida neuronal en los grupos expuestos de los machos, pero en el periodo post-exposición se observó incremento significativo en la densidad neuronal. Las hembras no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Con la BrdU, no hubo muchas diferencias significativas entre ambos sexos.

La exposición a vanadio produjo alteraciones en las diferentes etapas del proceso neurogénico en ambos sexos y en la función olfatoria. 8 semanas postexposición a vanadio permitieron que se presentara la neurogénesis y se conservara la función olfatoria en ambos sexos, mostrando la capacidad plástica del bulbo olfatorio para revertir los daños y conservar el sistema.

Palabras clave: Vanadio, neurogénesis, bulbo olfatorio, plasticidad.

Abstract

Vanadium can induce alterations in Central Nervous System. Neurodegenerative diseases are associated with metal exposure and are presented mainly in adults. The brain and the olfactory bulb have been identified as structures in which new neurons are continually evolving in normal circumstances, and after distressful events. We have demonstrate that after the inhalation exposure to vanadium pentoxide [0.02M] for an 4-week period, and the 8 weeks free of exposure CD-1 mice showed sex differences in the cytology as well as in the olfactory function evaluated by odorant recognition and preferences test.

Animals were sacrificed by pentobarbital i.p., overdose and perfused with saline and paraformaldehyde (4%). Brain tissue was dissected and process for immunohistochemistry to BrdU and the immunofluorescence, to PCNA, GFAP, NCAM and NeuN, to observe cellular proliferation and migration in the Subventricular Zone (ZSV) and the Rostral Migratory stream (TRM), also differentiation in the olfactory bulb

The odorant recognition test revealed significant differences between groups. Animals of both sexes showed alteration in the olfactory function as soon as they ended the 4-week vanadium exposure, although after the exposure, an improvement in the recognition test was observed. The cytological analysis, showed that females had more cellular proliferation in the ZSV and cellular migration in the TRM, compared with male. After the 8-week discontinued exposure astrocyte proliferation was more evident in females than in males while neuroblasts proliferation was higher in males compared with males.

Neural loss in the olfactory bulb after 4-week exposure was noticed but in post-exposure period there was a significant increase on neuronal density. Females did not present significant differences in the three groups evaluated in this structure. With BrdU, there was any significant difference observable between sexes.

Exposure to vanadium resulted in alterations among different stages of the neurogenic process and in the olfactory function in both sexes. An 8-week of

discontinued exposure allowed neurogenesis that maintained cellular density and olfactory bulb function in both sexes, demonstrating the plasticity of the olfactory bulb and its functional recovery after being injured by vanadium inhalation.

Keywords: Vanadium, neurogenesis, olfactory bulb, plasticity.

4. Introducción

4.1 Contaminación ambiental

La contaminación ambiental es un problema que va en aumento en megaciudades de todo el mundo, afectando de manera importante la salud (Brunekreef y Holgate, 2002).

Las actividades antropogénicas son las principales fuentes de contaminantes emitidos a la atmósfera. Estos involucran a la actividad industrial, emisiones gaseosas por los vehículos, incineración de la basura y actividades domésticas que impliquen la quema de alimentos. Las partículas desprendidas por dichas emisiones, en especial por el tráfico vehicular, incrementan con el paso de los años, debido al crecimiento poblacional, que repercute en el aumento del tráfico vehicular, intensificando las emisiones y acumulando más del 50% de las emisiones totales de las partículas de áreas urbanas (Briggs, 2007).

La contaminación es más seria en países subdesarrollados, como es el caso de México, y en especial, la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM). Las condiciones socioeconómicas y la ubicación geográfica de ésta área conurbada, están implicadas de tal forma que la ciudad presenta los niveles de contaminación más altos en el mundo. Localizada en un valle de más de 3,500 km y una altitud de 2,200 metros sobre el nivel del mar (snm), y rodeada por altas montañas con alturas promedio de 1,000m. Esta ZMCM, que abarca la Ciudad de México y aproximadamente 20 municipios del Estado de México, tiene alrededor de 20 millones de habitantes (SEMARNAT, 2000). Estas condiciones limitan la circulación de aire limpio (Calderón-Garcidueñas, 2002; SEMARNAT, 2000).

Debido a la altura de la ciudad, la concentración de oxígeno es 23% menor a la del nivel del mar. Esto promueve que los procesos de combustión interna de los motores sean menos eficientes y generen mayor contaminación (Leal et al., 1997). Aunado a esto, la ZMCM presenta más de 3.3 millones de automóviles registrados, de los cuales un 95% utilizan gasolina, el 4% diesel, y el 1% utiliza gases derivados como combustible. Además, la eficiencia de los motores de combustión interna

disminuye en grandes altitudes, y aumentan las concentraciones de hidrocarburos en el aire, favoreciendo a su vez la exposición a radiaciones capaces de transformar compuestos oxidantes como óxidos metálicos (Vallejo et al., 2003; SEMARNAT, 2000).

Los principales contaminantes son el bióxido de azufre (SO_2), el monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno (NO_x), compuestos orgánicos volátiles (COV), ozono (O_3) y las partículas suspendidas (PS), en las cuales se adosan diferentes compuestos metálicos (SEMARNAT, 2000).

4.2 Partículas suspendidas (PS)

Las partículas suspendidas incluyen al polvo que encontramos en la calle o materiales liberados de procesos de la combustión de hidrocarburos (Calderón-Garcidueñas et al. 2008). Pueden ser emitidas directamente (emisiones primarias), o también pueden formarse de forma secundaria cuando reaccionan algunos gases en la atmósfera tales como los óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, el amoníaco, compuestos orgánicos, etc. (Block y Calderón-Garcidueñas, 2009).

Las PS son parte de los contaminantes que pueden causar daños a la salud. Varían significativamente en tamaño, forma y composición, dependiendo de su origen.

De esta forma, las PS pueden clasificarse por su tamaño, en fracciones gruesas o burdas, finas y ultrafinas. La fracción gruesa la componen partículas cuyo diámetro aerodinámico se encuentra entre 2.5 y 10 μm (PM 10); la fracción fina que incluye aquellas partículas con diámetro aerodinámico menor a 2.5 μm y mayor a 1 μm (PM 2.5), y la fracción ultrafina incluye a las partículas menores de 1 μm (Jiménez. 2009).

Debido a sus características fisicoquímicas, las partículas más pequeñas son las que pueden llegar a las vías respiratorias bajas y generar efectos tóxicos.

Las partículas finas se forman a partir de la condensación de vapores a altas temperaturas. La mayor fuente emisora de estas partículas son refinerías petroleras, industrias automotrices, procesadoras de metales, y plantas de poder. Existen reportes que sugieren que las partículas finas y ultrafinas dañan el sistema

nervioso central (Fernández-Bremauntz, 2008). Una partícula suspendida se compone de un núcleo de carbono central al cual están adheridos diferentes compuestos entre los cuales se incluyen metales y lipopolisacáridos de bacterias. En el 2002, se realizó un estudio donde compararon en la Ciudad de México en el que se compararon partículas finas generadas por el transporte público. En este estudio se reportó que de las emisiones generadas, sólo el 11% de las partículas finas contenía carbono, un indicador del diesel. Esto implica que el consumo de la gasolina empleada por estos transportes es bajo (Fernández Bremauntz, 2008).

4.3 Efecto de la contaminación en enfermedades neurodegenerativas

Los mecanismos de entrada de las partículas suspendidas al cerebro, son objeto de estudio. En dichos procesos participan el transporte activo dentro de la célula, rompimiento de la barrera hematoencefálica, y traslado hacia el bulbo olfatorio. Se han realizado estudios con perros expuestos a altas concentraciones de contaminantes como níquel y vanadio, resultando en daño celular en mucosa olfatoria, bulbo olfatorio y corteza cerebral frontal (Calderón-Garcidueñas et al. 2008). Otro estudio reportó que las partículas que se localizan en el diesel afecta a la función de la barrera hematoencefálica, por incremento en la actividad de glicoproteína P, cuya función es transportar tóxicos para su eliminación, además de la inhibición de la oxidasa de NADPH y JNK, e incremento de TNF- α (Hartz et al. 2008).

Las enfermedades de Alzheimer y Parkinson son multifactoriales que presentan muerte neuronal progresiva en corteza cerebral, hipocampo, sustancia nigra entre otras estructuras cerebrales., y uno de los síntomas tempranos que presentan dichas patologías, es la alteración de la función olfatoria (Block y Calderón-Garcidueñas. 2002, Doty, 2008), en especial, la discriminación de olores. Además, la exposición de contaminantes atmosféricos, de manera particular los metales, ha sido relacionada como factor de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas (Valko et al., 2005).

Los metales son elementos no biodegradables, persisten largo tiempo en la atmósfera, y forman compuestos poco solubles con otras moléculas como el carbonato (CO_3^{2-}) o el sulfuro (S_2) (Ghio y Samet, 1999). Entre ellos, el vanadio

forma parte de las partículas finas y ha aumentado significativamente sus concentraciones es el vanadio (Fortoul et al. 1996 y 2002).

4.4 Vanadio

El vanadio (V) es considerado uno de los principales elementos traza de los combustibles fósiles como el carbón y el petróleo. Los niveles de este metal en la atmósfera pueden variar de 30 a 400 ng/m³ y sus niveles más altos se reportan en zonas urbanas (Leonard y Geber, 1994). La concentración de este compuesto en el ambiente varía dependiendo de las condiciones geográficas (Barceloux, 1999).

Este metal de transición fue descubierto en 1803 por Andrés Manuel del Río en México a partir del mineral de plomo pardo al que denominó en un principio pancromio, por la variedad de colores que el metal desprende al pasar por diferentes estados de oxidación. Posteriormente, el elemento fue redescubierto en 1831 por un científico sueco llamado N.G. Sefstrom y le adjudicó el nombre “vanadin” en honor a Vanadis, la diosa de la belleza de los antiguos arios. En el mismo año, Wohler estableció la identidad del eritronio como vanadio. (Guevara 1996, Tsiani y Fantus 1997).

4.5 Generalidades del vanadio

La masa atómica del vanadio es de 50.942, y se localiza en la familia VB. Es un metal de transición, con número atómico 23, presenta estados de oxidación que van de -1 a +5, siendo esta última valencia la que presenta mayor reactividad. Se combina con otros elementos como el oxígeno, sodio, azufre o con cloruro. El vanadio y sus compuestos se encuentran distribuidos en la corteza terrestre, en las rocas y en depósitos de petróleo crudo (Lenntech, 2004). El compuesto de vanadio más utilizado y más tóxico es el pentóxido de vanadio (V₂O₅) (Barceloux, 1999).

4.6 Mecanismos de acción y toxicodinamia

Debido a la similitud de su estructura con los grupos fosfato y las especies pentavalentes de vanadio, compite con los grupos fosfato (Tsiani y Pantus. 1997), en especial interfiriendo con algunas enzimas como fosfatasas y ATPasas (Byczkowski y Kulkarni 1998). El metal entra a las células por un sistema de

transporte aniónico, donde la enzima glutatión lo reduce de su valencia (+V) a vanadil (+IV) (Barceloux 1999). Se ha observado que es inhibidor de la ATPasa Na⁺/K⁺ (Barceloux, 1999), además de inhibir la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico y las fosfodiesterasas (Krivanek, 1994).

4.7 Toxicocinética del vanadio

Por vía inhalada, se absorbe hasta el 90% del vanadio soluble, después de la instilación en los pulmones (Barceloux, 1999). Por vía oral, casi no se absorbe, es eliminado por la orina. Una vez dentro de organismo, el vanadio se transporta en el plasma. La distribución es rápida (1 a 1.5 hrs aprox.), la mayor absorción se da en riñones, hígado bazo y hueso. En el plasma el vanadil se transporta por las proteínas transferrina y albúmina, la concentración de vanadio en el cerebro es aproximadamente del 5% de la concentración en sangre. La principal ruta de eliminación es por excreción urinaria (90%) y el restante es excretado por heces fecales. Los alimentos que contienen mayor concentración del metal son el trigo, semilla de soya y aceite de oliva; sin embargo, inhalamos normalmente alrededor de 1 mg de vanadio por día (French y Jones, 1993). En total, recibimos cerca de 10-70 mg de vanadio diariamente, como resultado de la exposición a la combustión del petróleo y sus derivados, como el carbón, aceites pesados (aceite crudo y carbón fósil), así como la generación de electricidad y calor (IPCS, 1990, Barceloux, 1999).

4.8 Toxicidad del vanadio en Sistema Nervioso Central (SNC)

La toxicidad por vanadio depende de la ruta de administración, la dosis y el compuesto particular, el vanadio en su forma pentavalente es más tóxico, comprenden un espectro funcional y bioquímico alto (Syed Saleem Haider et al., 1998).

La exposición a compuestos que contienen vanadio se asocia a alteraciones en la morfología y fisiología neural con repercusiones a nivel cognoscitivo y afectivo. En humanos se ha asociado a enfermedades maniaco-depresivas, deficiencias en habilidades viso-espaciales, y en roedores con alteraciones en la atención y aprendizaje (Taylor et al., 1984, Sánchez et al., 1998, Barth et al., 2002). En un modelo de exposición a V₂O₅ por vía inhalada se observó que la concentración de

vanadio en el cerebro se estabiliza entre 0.1 y 0.15 $\mu\text{g/g}$ de tejido seco, después de la primera semana. Esta concentración se mantiene durante el periodo de exposición y conduce a alteraciones citológicas en la vía nigroestriatal, en el epitelio ependimario e hipocampo (Ávila Costa et al., 2004, 2005, 2006). Además, el vanadio también actúa sobre las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* pars compacta (Ávila-Costa et al. 2005), e incrementa la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 en bulbo olfatorio, corteza prefrontal, estriado e hipocampo (Colín Barenque et al., 2007). Muchos de los efectos del vanadio en SNC se relacionan con la generación de estrés oxidante (Jiménez, 2009). Se ha observado que la exposición al metal causó una disminución en la proliferación celular en la Zona Subventricular y el Tracto Rostral Migratorio de ratones macho, las cuales participan en la formación de nuevas células en el bulbo olfatorio. Además, un mes posterior sin que los animales fueran expuestos al metal, no fueron suficientes para generar un aumento significativo en dichas estructuras (Olivos, 2007),

4.9 Efectos en bulbo olfatorio

En el modelo de exposición de vanadio por vía inhalada, se observó que los ratones CD-1 expuestos a V_2O_5 en periodos de una a doce semanas, presentaban una disminución significativa en el número de espinas dendríticas y en el tamaño del soma de las células de la capa granular del BO (Aguirre et al., 2002, Mondragón et al., 2003, Moscoso 2009). A partir de la segunda semana de exposición, las células presentaron invaginaciones nucleares, aparato de Golgi y retículo endoplásmico dilatados, mitocondrias electrodensas, gránulos de lipofuscina y muerte celular por necrosis y apoptosis (Colín Barenque et al., 2003, 2004).

4.10 Sistema Olfatorio

La percepción sensorial es un proceso mediante el cual la información del exterior es detectada e interpretada en el organismo. La comunicación entre el ambiente y los organismos a través de señales químicas es un proceso que determina la sobrevivencia de los animales, los cuales detectan señales químicas en el ambiente mediante los órganos sensoriales. En los mamíferos, la quimiosensación involucra

a los sentidos del gusto y del olfato, y la mayoría de ellos utilizan este sentido como el principal quimiosensor. Por tal motivo, el sistema olfatorio de los mamíferos regula una gran cantidad de procesos fisiológicos, respuestas emocionales, funciones reproductivas y comportamientos sociales (Mcnamara et al. 2008). El sistema olfatorio del humano detecta alrededor de 10,000 olores y miles de compuestos químicos. Esto se da por la integración de señales químicas de alrededor de 10 millones de neuronas olfatorias localizadas en el interior de la cavidad nasal (Lledo et al. 2006).

La olfacción es un sistema de alarma que no sólo nos mantiene alerta, sino que también cumple con otras funciones en la conducta de animales. Los caninos y los roedores dependen mucho más del olfato en comparación con el humano, que depende mucho más del sistema visual para formar una representación interna del ambiente que lo rodea (Lledo et al. 2006).

El sistema olfatorio contiene dos áreas neurogénicas en el sistema nervioso adulto. Las neuronas olfatorias que forman parte del epitelio olfatorio, y que se localizan en las fosas nasales, se originan de una población de células precursoras que se encuentran fuera del sistema nervioso central y que se encuentran en el mismo epitelio olfatorio (González y De Castro. 2011).

La otra población se localiza dentro del SNC, el bulbo olfatorio, donde se originan dos tipos de neuronas que se forman a partir de células progenitoras localizadas en las paredes de los ventrículos laterales. Uno de los procesos que mejor representa al olfato es la memoria, característica en todos los mamíferos. Una sola señal es suficiente para llevar a cabo asociaciones y recordar eventos. Dentro del SNC, la información olfatoria se procesa en dos estructuras funcional y anatómicamente separadas. El sistema olfatorio principal, que detecta solamente sustancias volátiles, mientras que el sistema olfatorio accesorio detecta sustancias no volátiles y solubles. El epitelio olfatorio detecta más de mil moléculas volátiles presentes en el ambiente, denominados odorantes; y está conectado a la principal estructura de procesamiento de la información olfatorio, el bulbo olfatorio (González y De Castro, 2011).

El órgano vomeronasal se especializa en la detección de compuestos químicos no volátiles, como las feromonas, y transfiere la información al bulbo olfatorio accesorio, el cual regula la información que tiene que ver con el comportamiento social y sexual del organismo.

El sistema olfatorio principal de los mamíferos tiene características en común en cuanto a la forma del procesamiento olfatorio que incluyen: receptores olfatorios localizados en el fluido (moco) dentro de las cavidades nasales; receptores olfatorios unidos a proteínas G y cascadas de señalización para la transducción de información olfatoria.

El epitelio olfatorio contiene neuronas sensoriales u olfatorias, células de soporte o sustentaculares y células basales, y también una población, de reciente descubrimiento, que muestra características de células mesenquimales y que derivan de la cresta neural (REFs) . Éstas últimas dos poblaciones actúan como células madre que pueden dar lugar a nuevas neuronas olfatorias.

Las neuronas olfatorias son bipolares y extienden una dendrita hacia la superficie del epitelio, la cual contiene numerosos cilios rodeados por el moco de la cavidad nasal. Las moléculas odorantes se disuelven en el moco y se unen a los receptores en los cilios de las neuronas, activando diversas cascadas de señalización tales como Ca^{2+} , IP3, o GMPc. En el ratón, existen de 1000 a 1300 de genes receptores de odorantes, que comprenden a la familia de genes más numerosa de todos los mamíferos.

Las neuronas sensoriales proyectan sus axones hacia la lámina basal y la placa cribosa, hasta llegar al bulbo olfatorio. Estos axones son amielínicos, y viajan junto con células de la glía para formar el nervio olfatorio. Cuando alcanzan el bulbo olfatorio, las terminales axónicas de las neuronas olfatorias que expresan el mismo receptor, convergen en un solo glomérulo. En los mamíferos, la convergencia de las neuronas al bulbo es aprox de 1000 a 1 o 2 glomérulos (Imagen 1).

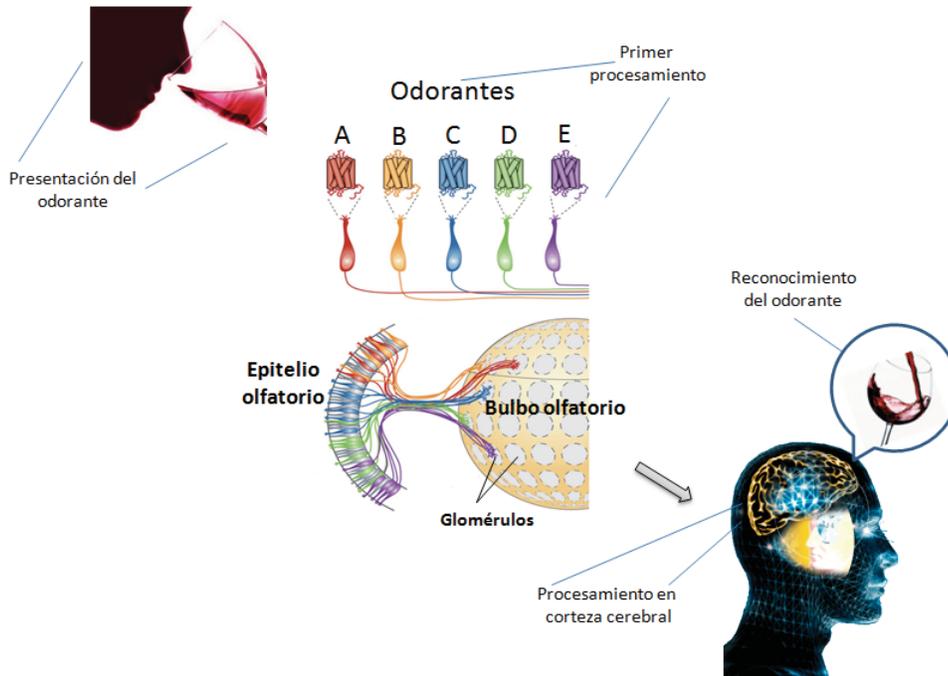


Imagen 1 - Representación del procesamiento de los olores en el cerebro. Cuando percibimos un aroma, ésta hace contacto con los receptores localizados en las dendritas de las neuronas olfatorias en la cavidad nasal. Posteriormente, éstas neuronas envían sus aferencias hacia una zona específica en el bulbo olfatorio, donde la información del aroma que olemos, va a ser procesada y enviada a la corteza cerebral, donde terminamos de interpretarla para generar una respuesta consciente de lo que olemos (Modificado de Demaría y ngai, 2010)

4.11 Bulbo olfatorio

El bulbo olfatorio es el primer centro neuronal, que participa en el procesamiento temprano de la información de odorantes. La vía directa entre fibras aferentes y neuronas eferentes puede sugerir un proceso computacional de patrones de actividad de receptores para ser llevados a la corteza. La actividad de neuronas principales está modulada por una gran población de interneuronas locales del bulbo, que también reciben retroalimentación desde la corteza olfatoria y otras estructuras como el núcleo olfatorio anterior, la corteza entorrinal, corteza periamigdalóide, corteza piriforme y núcleo del rafe. La información olfatoria es codificada como patrones de actividad neuronal modulados de tal forma que es un

proceso paralelo de circuitos neuronales complejos antes de ser enviados a la corteza (Lowe. 2007).

El bulbo olfatorio de los roedores está situado en el polo rostral del cráneo y se conecta a la corteza frontal. Está compuesto por diferentes capas celulares organizadas en círculos concéntricos. Estas capas desde la más superficial hasta la más profunda se divide en las capas Glomerular, Plexiforme Externa, Mitral, Plexiforme Interna y Granulosa. En este orden, las capas presentan las siguientes características:

Capa Glomerular: La capa más superficial del bulbo, formada por estructuras ovoides denominadas glomérulos, compuestos de neuropilo. Cada glomérulo está rodeado de células de la glía y pequeñas células, las células periglomerulares. Un glomérulo contiene una gran variedad de sinapsis de diferentes tipos celulares, que son axones de las neuronas receptoras olfatorias, dendritas de células mitrales y células en penacho, y dendritas de las células periglomerulares. El número de glomérulos varía entre especies, en los ratones el número de estas estructuras va desde 1800 hasta 2000. Los astrocitos participan en el mantenimiento y el aislamiento de los glomérulos (Ennis et al. 2007).

Las células periglomerulares son las más abundantes en esta capa. Son neuronas ovoides, inhibitorias gabaérgicas, que reciben sinapsis excitatorias de las neuronas receptoras olfatorias, en penacho y de las mitrales.

Existen componentes que modulan las sinapsis de estas células, como la carnosina y algunos metales como zinc y cobre. La carnosina es un péptido sintetizado por las neuronas olfatorias (Ennis et al. 2007).

Capa Plexiforme Externa- Se localiza debajo de los glomérulos, y consiste principalmente de una capa densa de neuropilo formado por dendritas de las células mitrales y granulosa de capas más profundas. Presenta baja densidad celular, las más abundantes son las células en penacho, que son neuronas excitatorias que realizan sinapsis con los glomérulos principalmente, sus axones proyectan hacia la Capa Plexiforme Interna, aunque algunas de sus proyecciones que salen del bulbo olfatorio llegan al Bulbo Olfatorio Accesorio.

Los axones de estas neuronas no proyectan siempre fuera del bulbo, muchas de estas células contienen una hormona que actúa como neurotransmisor llamada colecistoquinina (CCK) y forman una red denominada Sistema de Asociación Intrabulbar (SAI), que conectan regiones laterales de cada bulbo olfatorio. Estos axones llegan hasta la Capa Plexiforme Interna, donde se juntan y viajan en tractos hacia el bulbo opuesto, terminan en las dendritas apicales de las células de la Capa Granulosa, y pueden llegar a la Plexiforme Externa también. De esta forma, este sistema complejo conecta la información procesada en los dos bulbos olfatorios, mediante una organización topográfica muy eficiente. La CCK presente en los somas de las células en penacho, se encuentra activa en las sinapsis con las neuronas granulosas.

Capa Mitral- Contiene los somas de las células mitrales, que son las otras neuronas de proyección glutamatérgica. A diferencia con las de penacho, las mitrales son las únicas neuronas que proyectan la información desde el bulbo olfatorio hacia la corteza cerebral. Mandan una dendrita apical hacia la capa glomerular, donde se arboriza y hace sinapsis con un glomérulo. Existen aproximadamente 25 mitrales asociadas a un solo glomérulo. Sus dendritas secundarias son enviadas hacia la Plexiforme externa y la mayoría hace contacto con las numerosas dendritas de la capa granulosa, para enviar toda la información a través de sus axones mielinizados.

Capa Plexiforme Interna- Es la capa más delgada del bulbo olfatorio, con muy baja densidad celular, compuesta principalmente por dendritas provenientes de la capa granulosa y axones de células mitrales y en penacho. Contiene además una red de axones positivos a CCK que forman parte del SAU.

Capa Granulosa- La capa más profunda del bulbo olfatorio es la que posee la mayor densidad celular. La mayoría de las células son neuronas granulosas, pero también podemos encontrar células de Golgi y de Cajal. Las neuronas granulosas están en contacto con las mitrales. Sus dendritas proyectan en muchas direcciones, son células que carecen de axón. Esta capa recibe diferentes aferencias de zonas corticales, esto ayuda a modular las sinapsis de las granulosas (Imagen2).

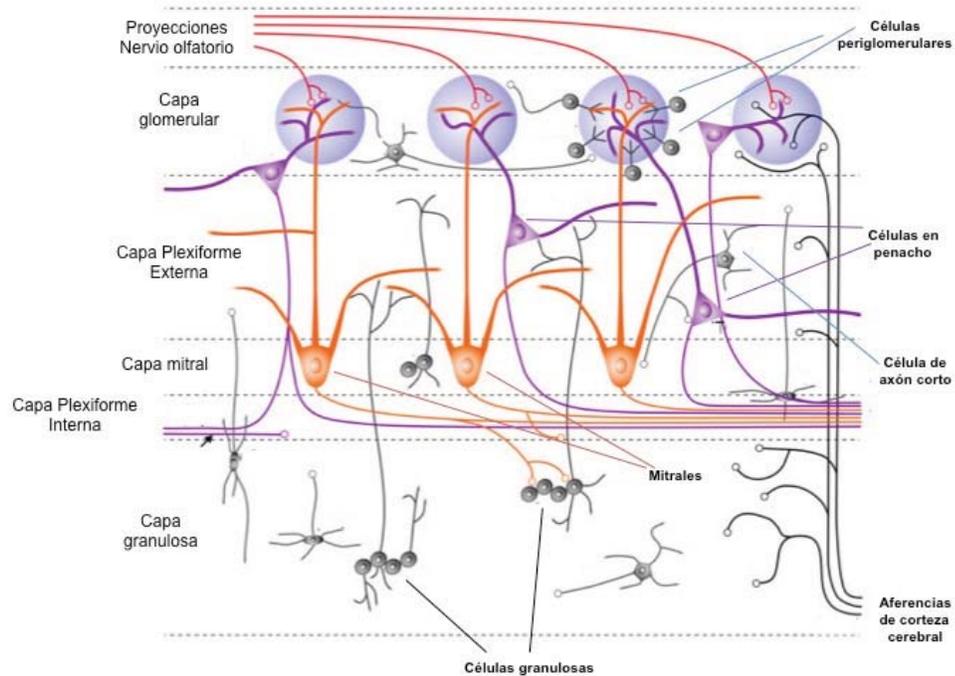


Imagen 2- Esquema de las capas celulares del bulbo olfatorio. Se observa la disposición de las células presentes en cada una de las capas. Modificado de Marie-Lledo et al., 2008.

Las proyecciones axonales provenientes de las neuronas receptoras olfatorias que expresan el mismo receptor convergen hacia uno o dos glomérulos fijos específicos para ese receptor. Las señales de diferentes tipos de receptores de odorantes llegan a diferentes glomérulos. De esta forma, la imagen olfatoria está dada por un odorante que es codificado por una combinación específica de glomérulos activados.

Los odorantes están compuestos por diferentes moléculas, las cuales son reconocidas por los receptores de las neuronas olfatorias, y cada receptor proyecta a un glomérulo en particular. La distribución espacial y la estructura temporal de actividad neuronal es muy precisa.

Las sinapsis excitatorias entre las neuronas olfatorias con las mitrales y las células en penacho están moduladas a su vez por las interneuronas de los glomérulos y de la capa granulosa. Dentro del glomérulo, la regulación por parte de las células

periglomerulares, conforman la primera regulación inhibitoria, La segunda regulación está a cargo de las neuronas granulosas (Lowe, 2007).

Las sinapsis de los circuitos del bulbo olfatorio tienen dos características inusuales. La mayoría de las granulosas se comunican mediante sinapsis dendrodendríticas, La despolarización sináptica de las mitrales induce la liberación de GABA modulando su propia actividad a través del neurotransmisor que libera.

Una vez procesada la información en bulbo olfatorio, debe ser transmitida a la corteza cerebral. Los axones de las mitrales proyectan a estructuras cerebrales sin llegar al tálamo. Estas estructuras incluyen al núcleo olfatorio anterior, que conecta ambos bulbos olfatorios mediante el tubérculo olfatorio. También proyectan a la corteza piriforme (considerada como la corteza olfatoria primaria), y a núcleos corticales de la amígdala y el área entorrinal. La información olfatoria es procesada finalmente mediante el tubérculo olfatorio al núcleo medial dorsal del tálamo, que proyecta a la corteza orbitofrontal, implicada en procesos conscientes del olfato.

Los axones de las neuronas mitrales y en penacho convergen para formar el tracto olfatorio lateral, que proyecta a la corteza olfatoria.

4.12 Interneuronas en el bulbo olfatorio

Las neuronas granulosas carecen de axón, por lo que las sinapsis con otras neuronas las realizan a través de sus dendritas y espinas dendríticas. Las células periglomerulares son GABAérgicas o dopaminérgicas. Pueden generar dos tipos de inhibición. Las periglomerulares gabaérgicas inhiben las excitaciones de las células mitrales provenientes de capas más profundas del bulbo olfatorio (Lledo et al. 2004). Esta inhibición es por receptores GABA_A postsinápticos. Además, estas células pueden regular las sinapsis entre bulbo olfatorio y nervio olfatorio por receptores presinápticos GABA_B y D₂, expresados en los axones de las neuronas olfatorias (Lledo et al. 2004) (Imagen 3). El contacto entre dendritas provee un balance estrecho entre la señalización inhibitoria y excitatoria. La

retroalimentación entre neuronas excitatorias y granulosas se relaciona con la plasticidad sináptica que presentan estas células.

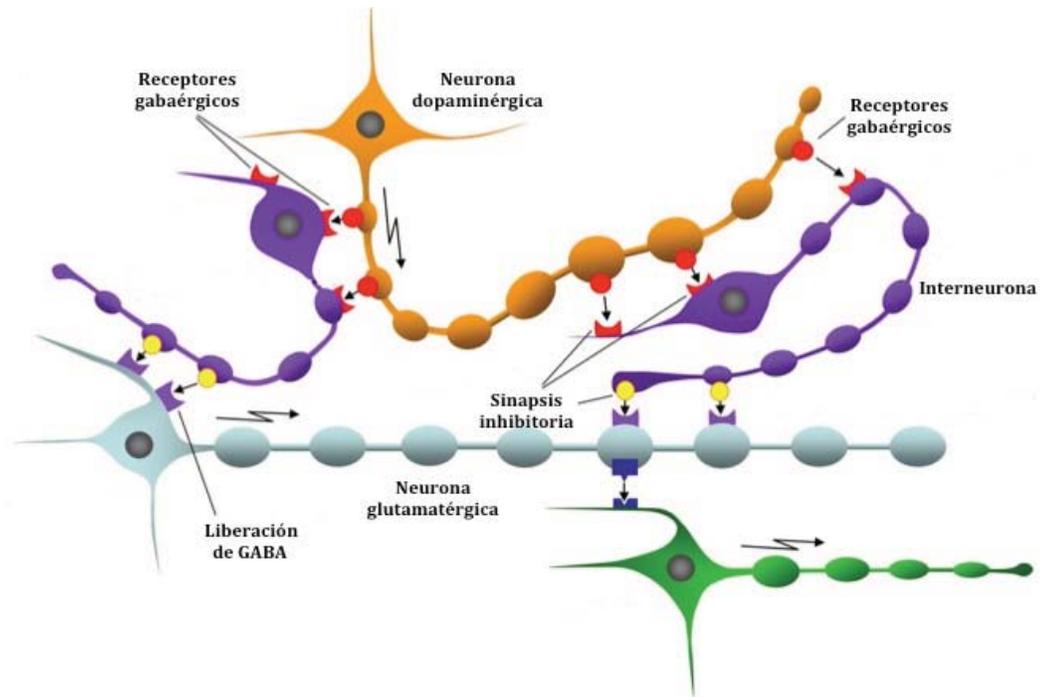


Imagen 3 -Comunicación entre los múltiples contactos sinápticos entre neuronas gabaérgicas (morado) en el bulbo olfatorio con neuronas glutamatergicas (azul) y dopaminérgicas (naranja y verde).

Las neuronas gabaérgicas inhibitorias tienen un papel importante en el patrón de excitación de las neuronas mitrales. En la capa granular, mientras las neuronas granulosas maduran, los somas extienden sus neuritas hacia partes más profundas de la capa y una dendrita apical hacia la plexiforme externa donde se ramifica ampliamente. Las reglas que gobiernan la incorporación de nuevas neuronas generadas en las redes neuronales maduras difieren a las del desarrollo del cerebro. Las propiedades eléctricas de estas células junto con las sinapsis de nuevas neuronas influyen en la maduración e integración de procesos celulares y representan un mecanismo por el cual la actividad neuronal regula su propia neurogénesis. La secuencia del desarrollo de canales iónicos dependientes de

voltaje y conexiones sinápticas revelan más diferencias entre ambos tipos de interneuronas en bulbo olfatorio.

En las células periglomerulares, la maduración de la corriente dependiente de sodio, y la capacidad de nuevas neuronas para disparar potenciales de acción, influencia nuevos contactos sinápticos, mientras que en las neuronas granulosas, el desarrollo de la corriente de sodio se observó después del establecimiento de las conexiones sinápticas. Esta diferencia indica que el patrón de integración funcional depende de la naturaleza de la neurona (Lledo et al. 2004) (Imagen 3).

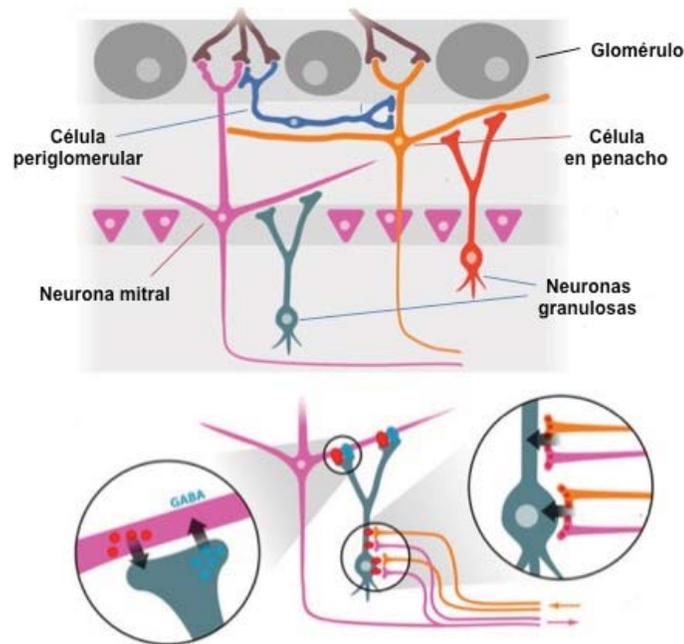


Imagen 4- Esquema de las sinapsis entre interneuronas y neuronas de proyección en el bulbo olfatorio. Muestra la disposición de las células mitrales (rosa), y la comunicación dendrodendrítica con las granulosas (verdes). Las células periglomerulares (azul) mantienen contacto con las mitrales, células en penacho y los axones de las neuronas olfatorias. Modificado de Kelsch et al., 2010

La reducción en el número de nuevas neuronas incorporadas al bulbo olfatorio está relacionada con una disfunción en el proceso neurogénico (Lledo et al. 2004).

4.13 Neurogenesis en bulbo olfatorio

La continua generación y el reemplazo de neuronas dentro del bulbo olfatorio en la vida adulta refleja la necesidad de readaptar esta estructura para desafiar los cambios en el ambiente y mantener una discriminación olfatoria óptima.

Las señales que percibimos por medio del olfato guían diferentes procesos conductuales y fisiológicos. Además, hay un continuo remodelaje en la circuitería del bulbo olfatorio durante toda la vida, por lo que hay un reemplazo continuo de neuronas, un proceso conservado entre especies de diferente phylum (Nissant et al. 2006).

En este proceso, dos tipos de interneuronas sufren recambio; las células periglomerulares y las células granulosas, continúan formándose durante toda la vida, y éstas deben integrarse a la circuitería del bulbo, sin alterar la función olfatoria. Esto ocurre en todas las especies, incluso en los humanos.

El sistema olfatorio es una de las áreas cerebrales de los mamíferos, que presentan neurogénesis continua en el adulto. En este proceso, las nuevas células se forman en la zona subventricular (ZSV), y migran aproximadamente 5mm (para el ratón) cada día en una ruta establecida, el Tracto Rostral Migratorio (TRM), hacia el bulbo olfatorio, en donde se diferencian en células periglomerulares o células granulosas.

La gran mayoría de las nuevas neuronas (95% aprox) se diferencian en neuronas granulosas (Whitman et al. 2007) (Imagen 5).

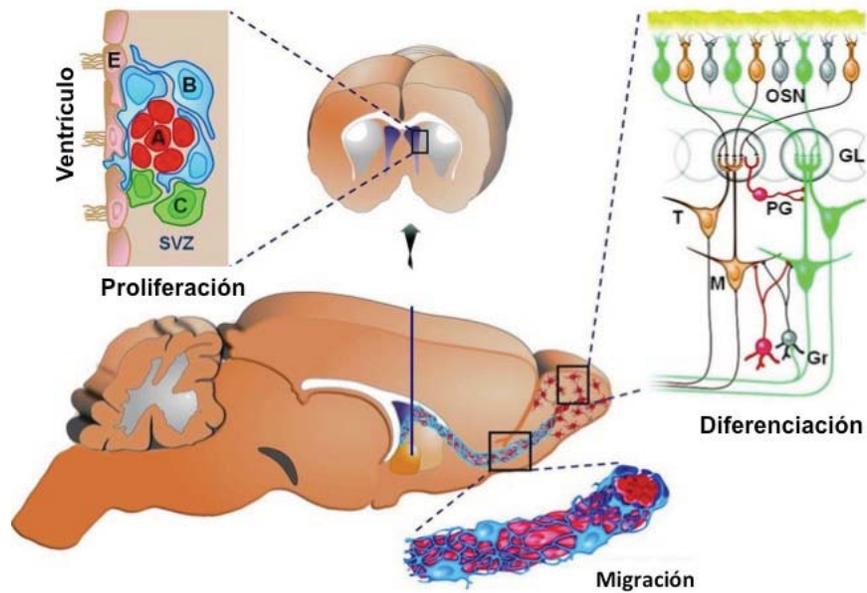


Imagen 5 - Esquema de las tres etapas de la neurogénesis en bulbo olfatorio. En un corte sagital de cerebro, se observa la ZSV, donde se lleva a cabo la proliferación de nuevas células; el TRM, donde ocurre la migración hasta llegar al bulbo olfatorio, para que los neuroblastos terminen de diferenciarse. Modificado de http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=7&materia_id=495&materiaver=1

4.13.1 Proliferación en la Zona Subventricular (ZSV)

La ZSV presenta proliferación de diferentes células (Liu et al. 2006) (Imagen 6).

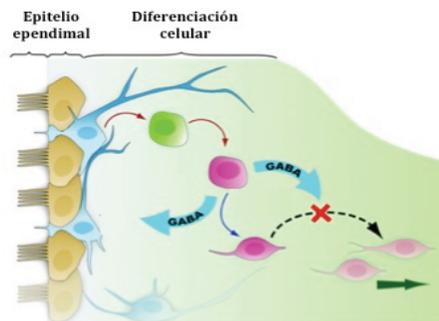


Imagen 6- Esquema de la composición de la ZSV, se observan los astrocitos entre las células ependimarias que dan lugar a la formación de más astrocitos o neuroblastos. Algunos neurotransmisores como GABA participan en este proceso. Modificado de Lledo PM et al., 2008

Las células troncales en la ZSV son conocidas como células B, se dividen lentamente para dar lugar a células denominadas células amplificadores transitorias o células tipo C, las cuales se dividen rápidamente para generar precursores neuronales, que son neuronas inmaduras (células tipo a), o para generar astrocitos. Los neuroblastos expresan marcadores como la Doblecortina (DCX) y el PSA-NCAM delectrear , que son marcadores de superficie celular. La proliferación celular depende de la acción conjunta de diferentes factores. Uno de ellos es el nicho neurovascular, el cual está controlado por las células endoteliales que se localizan en los ventrículos cerebrales, éstas células secretan factores solubles como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

4.13.2 Migración celular en el TRM

Una vez que se forman estos dos tipos celulares, deben migrar hacia el bulbo olfatorio, dicho proceso requiere de una estructura que mantenga en buenas condiciones a los neuroblastos. Éstos se organizan en estructuras en cadena y se dirigen hacia el Tracto Rostral Migratorio (TRM), migrando rostralmente hacia el bulbo olfatorio, asociados estrechamente con los astrocitos que también se formaron en la ZSV (Imagen 5). Las velocidades de migración varían, en promedio se lleva a cabo desde 70-80 mm/hr. Además están estrechamente relacionados con vasos sanguíneos, o cual aumenta la velocidad de migración.

Hay diversos factores que influyen en la migración celular, como el líquido cerebrospinal, el flujo de moléculas secretadas por los plexos coroideos. La actividad que hay en el bulbo olfatorio influye también para la sobrevivencia de los neuroblastos en su ruta de migración. Se ha observado también que la ablación del epitelio olfatorio influye en el incremento de la proliferación y migración en el TRM, mientras que un ambiente enriquecido de odorantes influye en los mismos procesos (Menini et al., 2010).

Las interacciones locales entre las células y el microambiente es muy importante. Los astrocitos son las células responsables para modular la velocidad de

migración. Expresan el transportador de GABA GAT4 para regular la concentración extracelular de este neurotransmisor. La presencia de receptores de integrinas permite que interactúen con la matriz extracelular, en especial con la laminina. La pérdida de NCAM también causa alteraciones en esta fase (Gakhar-Koppole et al. 2008).

Entre los factores solubles y receptores que participan en dicha fase, el factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF) ayuda a mantener la estructura catenaria que controla la migración glial y de los precursores neuronales. La prokineticina 2 (PK2) es otro factor atrayente entre ambas estirpes celulares, expresado en las interneuronas del bulbo olfatorio y sus receptores PKR1 y PKR2 están presentes en los neuroblastos que migran y en las células tipo C (Imayoshi et al. 2008).

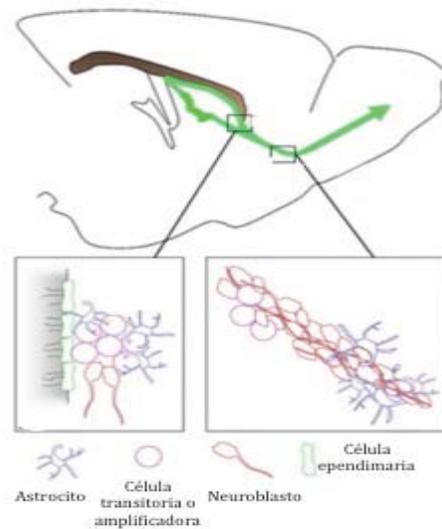


Imagen 7 – Esquema de la estructura catenaria en la que migran los neuroblastos y astrocitos en el TRM. Modificado de Imayoshi et al., 2008. Modificado de Wang y Kriegstein, 2009. Modificado de http://www.antibodyreview.com/protein_image_annot.php?artid=10843.0&article_pmcid=2780296&pmcid_imgid=70249.0&image=article_images%2F19956583%2FPLoS+One%2F4-12%2Fpe8122-2780296%2Fpone.0008122.g001.jpg&select=DCE2,GAD2,GAD65,GAD-65

4.13.3 Diferenciación celular en bulbo olfatorio

Los neuroblastos que llegan al bulbo olfatorio, realizan nuevas sinapsis con las neuronas que ya estaban establecidas en esta estructura, y producen cambios electrofisiológicos en ellas, lo que indica los primeros procesos de maduración neuronal. Los neuroblastos durante su migración, comienzan a expresar calretinina, una proteína que fija calcio la cual identifica las interneuronas dentro del glomérulo, y la capa granular del bulbo. Una vez que llegan al bulbo, las nuevas neuronas comienzan a migrar radialmente dentro de la capa granulosa, hasta llegar a la capa periglomerular.

Se han descrito diferentes fases, en las cuales los neuroblastos pueden llevar a cabo la diferenciación dentro del bulbo olfatorio. En primer lugar, durante los días 2 y 7 desde su formación en la ZSV, las nuevas células llegan al bulbo olfatorio. Posteriormente migran de forma radial hacia la capa granulosa, donde extienden una sola dendrita hacia la capa mitral. Entre los días 11 y 22 desarrollan arborizaciones dendríticas, hasta que alrededor del día 30 de su formación, las células adquieren madurez en su morfología, con espinas dendríticas bien desarrolladas. Este proceso de maduración requiere de diferentes potenciales inhibitorios y excitatorios con las células mitrales.

Una gran proporción de las neuronas que llegan al bulbo olfatorio mueren. A pesar de que en la ZSV y TRM hay una alta densidad de muerte celular, la mayoría ocurre en la última fase de la neurogénesis. Después del día 15 posterior a su formación, aproximadamente el 50% de las nuevas neuronas sufren apoptosis. Estos procesos de muerte celular varían dependiendo de la actividad olfatoria del organismo. Las neuronas que menos activas estén tienden a morir. La memoria olfatoria favorece la sobrevivencia y el reemplazo de las nuevas neuronas. En las periglomerulares, la estimulación excitatoria proveniente del nervio olfatorio influye en el proceso de maduración. En el caso de las células granulosas, pueden recibir estímulos axodendríticos provenientes de células mitrales y en penacho, y de dendritas profundas de otras células granulosas. Estas conexiones se dan después de los 10 días de haberse formado, pero también influyen las estimulaciones provenientes

de fibras nerviosas de otras áreas de la corteza cerebral (Whitman y Greer. 2009) (Imagen 7).

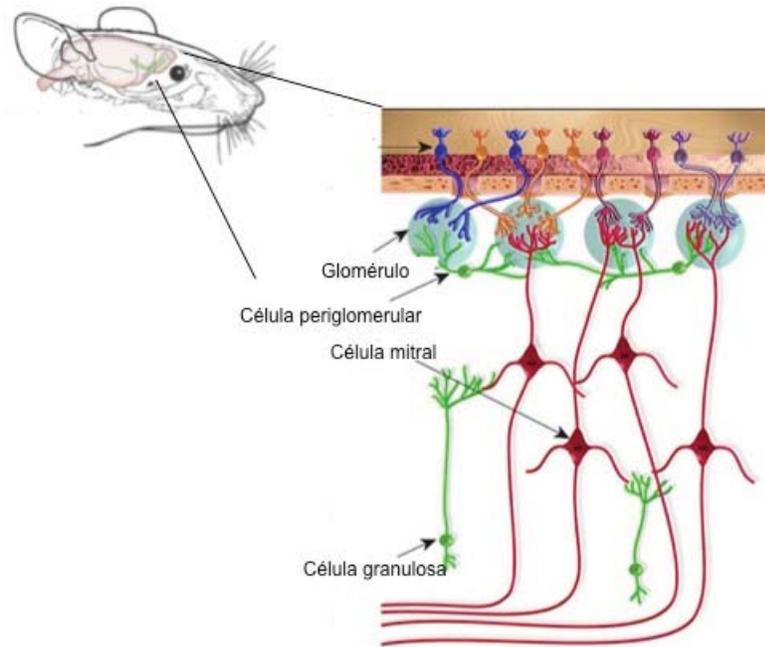


Imagen 8 – Esquema que muestra la localización de los dos tipos de neuronas diferenciadas (granulosas y periglomerulares) durante el proceso neurogénico y la zona del bulbo olfatorio donde llegan <http://archpsyc.ama-assn.org/cgi/content/extract/67/10/983>

4.14 Factores que participan en la neurogénesis

Existe una gran diversidad de factores que están activamente influenciando las tres etapas del proceso neurogénico del bulbo olfatorio. Este proceso está sujeto a fluctuaciones en el ambiente.

Los factores neurotróficos son vitales en la formación de nuevas neuronas, como es el caso de el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), así como el factor neurotrófico ciliar (CNTF). Además, para el crecimiento de las células formadas, los factores de crecimiento son moléculas de señalización extracelular que mantienen este proceso. El Factor de crecimiento epidermal unido a heparina

(HB-EGF), factor 2 de crecimiento básico de fibroblastos (FGF2) y el factor de crecimiento de la insulina 1 (IFG1) intervienen permanentemente (Aguirre et al. 2005). El Factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) es angiogénico, por lo que participa en la formación de vasos sanguíneos y ayuda a nutrir a las nuevas neuronas (Balenci et al. 2007). La producción de precursores neuronales se estimula en la ZSV, durante el embarazo con la producción de prolactina. También hay mecanismos moleculares que ayudan a la migración de los neuroblastos, como la señal quimiorrepulsiva que actúa a través de la señalización SLIT-ROBO y controla la migración. Las efrinas e integrinas benefician de igual forma la migración (Hu. 1999; Li et al. 1999).

Existen factores que propician la integración de las nuevas neuronas a los circuitos neuronales. Uno de estos factores es la relina, secretada por las células mitrales (Hashimoto-Torii et al. 2008) y la expresión de la proteína BCL-2, la cual incrementa la sobrevivencia neuronal. (Lledo PM et al. 2006). Aún así, de las neuronas que se forman, solamente el 50% de las nuevas neuronas sobreviven después de un mes.

Los neurotransmisores juegan un papel importante en la comunicación neuronal, y también son factores clave en la regulación neurogénica. Los neuroblastos formados expresan receptores NMDA y AMPA, un proceso que los prepara para los influjos excitatorios que recibirán en el bulbo olfatorio. Además, los astrocitos presentan el transportador gabaérgico GAT4, lo cual ayuda a regular las concentraciones extracelulares de este neurotransmisor. La dopamina ayuda a regular la proliferación celular en la ZSV y la incorporación de las neuronas en el bulbo olfatorio (Carleton et al. 2003).

4.15 Hormonas sexuales

Otro factor que puede influenciar la neurogenesis en ambos sexos dependiendo de la especie. Son las hormonas, tales como los estrógenos. El efecto de los estrógenos ha sido menos estudiado para el caso del bulbo olfatorio. Se ha observado que la prolactina induce la neurogenesis en bulbo olfatorio. Por

ejemplo, se ha observado que la producción de precursores neuronales se estimula en la ZSV, durante el embarazo con la producción de prolactina (Ping et al. 2008).

Estos resultados se relacionan con una mejor capacidad para olfatear en mujeres embarazadas, pero hasta el momento es especulativo. Tal como sucede con los corticosteroides, los cuales requieren de la actividad del receptor NMDA para actuar en la neurogenesis, los estrógenos pueden depender de la activación del sistema serotoninérgico. Las hormonas esteroideas tienen un papel más activo. En este grupo se encuentran los estrógenos. El efecto de los estrógenos ha sido más estudiado en la Zona Subgranular del hipocampo, pero no en la ZSV (Genazzani et al. 2007)

4.16 Diferencias por sexo

4.16.1 Estrógenos en el SNC

Las hormonas sexuales participan en procesos cognoscitivos. Los estrógenos fueron las primeras hormonas consideradas neuroprotectoras. En el cerebro de los mamíferos, los estrógenos están implicados en varias funciones no reproductivas, tales como la modulación de la excitabilidad neuronal, plasticidad sináptica, inducción de la sobrevivencia neuronal, expresión de respuestas regenerativas, neurogénesis regional en el adulto, regulación de la diferenciación y desarrollo neuronal. Además se ha demostrado su participación en otras funciones del SNC, entre las cuales se encuentran el control de la actividad neuronal relacionada con los procesos de cognición, la modulación del estado de ánimo y otros estados mentales, así como el mejoramiento del aprendizaje y la memoria (Genazzani et al. 2007).

Las acciones de los estrógenos incluyen diferentes mecanismos, tales como efectos genómicos clásicos asociados a receptores de estrógenos (ER); efectos no genómicos, que involucran sistemas de segundos mensajeros y vías de señalización y efectos antioxidantes independientes de receptor.

4.16.2 Efectos genómicos

Las diferentes respuestas a los estrógenos en el SNC son debidas a la actividad de sus receptores y la variedad de señales que éstos pueden activar, así como a la naturaleza de sus células blanco. Los receptores nucleares a estrógenos se dividen en ER-alfa y ER-beta (con sus respectivas isoformas), los cuales son codificados por dos genes. Los receptores ER-alfa y ER-beta residen en el núcleo de las células blanco. La forma en que interactúan con el ADN tiene como consecuencia la síntesis de nuevas proteínas. También pueden regular la transcripción de genes mediante la modulación de factores de transcripción, como pueden ser los de los grupos Hes e Id (Galli et al. 2002. Marín et al. 2005).

4.16.3 Efectos no genómicos

Los efectos no genómicos de los receptores estrogénicos se relacionan con la excitabilidad de la membrana, la apertura de canales iónicos y señalización de neurotransmisores con receptores metabotrópicos. Pueden interactuar con otros receptores de membrana, y estimular diferentes mecanismos de señalización intracelular.

4.16.4 Actividad antioxidante

El SNC es susceptible a presentar estrés oxidante. Existen evidencias que demuestran que los estrógenos pueden funcionar como antioxidantes independientemente de su unión a receptores. Algunos derivados de los estrógenos pueden regular la muerte neuronal. Además del 17 β -estradiol, el estriol, la estrona, el etinilestradiol y el 2- hidroxiestradiol también presentan poderosos efectos protectores. Los requisitos básicos para que las moléculas estrogénicas actúen como antioxidantes es la presencia de un grupo hidroxilo intacto en el anillo A de la molécula esteroide (Imagen 9) (Gennaziani et al., 2006).

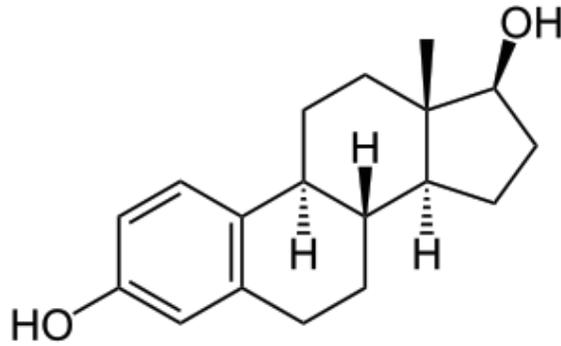


Imagen 9 – El estradiol tiene dos grupos hidroxilos en su estructura molecular.

Los niveles fisiológicos de los estrógenos pueden regular los procesos de apoptosis y sobrevivencia neuronal. En áreas afectadas por enfermedades neurodegenerativas, como la amígdala, corteza, ganglios basales, hipocampo, e hipotálamo, los estrógenos pueden ejercer una interacción dual con los receptores de estrógenos, para modular mutuamente e integrar una respuesta neuroprotectora. La prevención de muerte neuronal por estrógenos se ha asociado con una regulación transcripcional de elementos del citoesqueleto, involucrados en la regeneración axonal, la sinaptogénesis y con factores de crecimiento (Veyrac y Bakker, 2007).

La actividad estrogénica incrementa la expresión de la proteína Bcl-2, que se relaciona con la inhibición de la muerte celular tanto apoptótica como necrótica en respuesta a estímulos tóxicos, además previene la pérdida de citocromo c de la mitocondria (Behl et al. 1997).

El estradiol altera la neurotransmisión de GABA a través de eventos no transcripcionales en neuronas con GABA, propiomelanocortina y dopamina. Uno de los efectos neuroprotectores de los estrógenos es su habilidad para estimular la adenilatociclasa, incrementando los niveles de AMPc (Behl et al. 1997).

Los ER-alfa pueden ser activados por los neurotransmisores y factores de crecimiento. En particular, la dopamina, el factor de crecimiento de la insulina (IGF-1) y el factor de crecimiento epidermal (EGF), pueden activar este receptor. Otro efecto neuroprotector implica la regulación de la concentraciones de Ca⁺.

Estudios electrofisiológicos han demostrado la existencia de receptores a estrógenos membranales que se relacionan funcionalmente con canales de este catión (Wu et al. 2005).

La sobrevivencia de la neurona depende en gran parte de su capacidad para desarrollar neuritas. Se ha propuesto que los estrógenos ejercen efectos sobre el SNC a través de la activación de neurotrofinas; potencian la expresión de mRNAs de agentes neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y el factor de crecimiento neuronal (NGF). La habilidad de éstas hormonas femeninas sobre el mantenimiento y restauración del SNC han sido descritos en varias regiones del cerebro, como hipotálamo, hipocampo, mesencéfalo y la corteza (Falkenstein et al. 2003).

Los ER intracelulares pueden encontrarse en neuronas y células gliales como astrocitos, oligodendrocitos e incluso en microglia. La glia activada observada en varias patologías puede participar en la cascada de eventos que llevan a la muerte neuronal. Los estrógenos pueden modificar la expresión de mediadores inflamatorios (citocinas y quimiocinas) producidos por la microglia y los astrocitos, implicados en la neuroinflamación y neurodegeneración (Arévalo et al. 2011).

4.17 Relación de estrógenos y enfermedades neurodegenerativas

Las personas que padecen enfermedades de Parkinson y Alzheimer, presentan síntomas tempranos que hasta el momento no se han podido explicar, como es la disminución de la función olfatoria, misma que se caracteriza por un mal reconocimiento de odorantes y mala discriminación olfatoria.

Las enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con la edad de las personas. Estas enfermedades se presentan generalmente en personas con edad avanzada, de 65 años en adelante. Además, se sabe que estas enfermedades presentan diferencias por sexo. Las mujeres posmenopáusicas son susceptibles a sufrir alguna de estas enfermedades principalmente por una baja considerable en

las concentraciones de estrógenos.

Entre las enfermedades neurodegenerativas que han sido más estudiadas están la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Además de las alteraciones cognitivas, también se han estudiado por su relación con la actividad estrogénica por estos procesos de neurodegeneración y su relación con actividad estrogénica ha sido la Enfermedad de Parkinson y la Enfermedad de Alzheimer.

En la enfermedad de Parkinson, existe disminución progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, lo cual trae como consecuencia degeneración del sistema nigroestriatal, y la pérdida del control motor. La incidencia de la enfermedad de Parkinson es mucho mayor en hombres que en mujeres, lo cual involucra la acción de hormonas sexuales. También se ha reportado que el estradiol puede potenciar la liberación de dopamina, estimular su síntesis, modificar la sensibilidad de los autorreceptores de dopamina y modular la densidad de receptores. Los estrógenos disminuyen la actividad de la monoaminoxidasa (MAO), que es la enzima que cataliza la desaminación de las monoaminas como la dopamina, disminuyendo así la depleción de dopamina y la capacidad de la MAO para generar toxinas como producto del catabolismo de la dopamina (Hawkes et al. 1997).

La Enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida gradual de la memoria. Afecta a diferentes sistemas de neurotransmisores. Uno de ellos es el sistema colinérgico. Las neuronas colinérgicas del cerebro anterior que degeneran en los pacientes con Alzheimer, presentan pérdida en la actividad de la colina acetiltransferasa, la enzima limitante en la síntesis de acetilcolina (ChAT). Esta pérdida parece ser la responsable del deterioro en la función cognitiva.

Los estrógenos regulan positivamente la ChAT en el cerebro de la rata, además se ha observado que los estrógenos protegen a las neuronas en los depósitos de beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer (reduciendo la generación de más amiloide y aumentando su recaptura por la microglia), mediante sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, el estradiol es ineficaz de proteger en contra de la toxicidad inducida por beta amiloide una vez que el daño ya se ha desencadenado, lo cual indica que el efecto neuroprotector de los estrógenos está restringido a un

periodo de tiempo (Hawkes. 2003).

Los antecedentes descritos anteriormente indican que la exposición a vanadio altera estructuras en donde se lleva a cabo la formación de neuronas en el cerebro adulto como es la ZSV/Bulbo olfatorio. Son embargo, y dadas las acciones benéficas de los estrógenos en el organismo, es posible pensar en la existencia de una respuesta diferencial a la exposición de vanadio entre el sexo masculino y femenino, misma que podría estar implicada como un factor importante para el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas.

5. Justificación

Se sabe por estudios realizados en nuestro grupo de trabajo que el vanadio induce alteraciones en estructuras cerebrales que participan en la neurogénesis en bulbo olfatorio. El cerebro adulto de los mamíferos es capaz de generar nuevas neuronas después de haber sufrido alguna afectación. Una de las zonas del cerebro donde se lleva a cabo el proceso neurogénico es el sistema zona subventricular/Bulbo olfatorio. El proceso consiste en formar nuevas neuronas en un estado inmaduro que viajan por el tracto rostral migratorio hasta llegar al bulbo olfatorio, lugar en el que alcanzan su maduración terminal y en donde son integradas a las redes neuronales de dicha estructura.

Aunado a lo anterior, se ha observado que además de la respuesta diferencial entre machos y hembras en el modelo de inhalación a vanadio, también existe evidencia de recuperación en las neuronas granulosas después de un tiempo de 8 semanas de postexposición.

Por tal motivo, es importante estudiar la neurogénesis en bulbo olfatorio de ratones expuestos a vanadio y mantenidos a un periodo postexposición, asociado a la función olfatoria de los animales en estudio, así como las diferencias entre el sexo.

6. Objetivo general

Evaluar la neurogénesis en la zona subventricular, el tracto rostral migratorio y el bulbo olfatorio de ratones hembras y machos, asociados a la función olfatoria, después de haber sido expuestos a V_2O_5 por vía inhalada y ser mantenidos en un periodo sin exposición de 2 meses

7. Objetivos particulares

- 1) Evaluar la función olfatoria en ratones hembras y machos, por medio de dos pruebas olfatorias, en un grupo de ratones control, un grupo de ratones expuestos a inhalación de V_2O_5 durante un mes, y un grupo con el mismo tiempo de exposición y mantenidos posteriormente a un periodo de 2 meses sin inhalación del compuesto
- 2) Analizar las alteraciones en la proliferación celular en la ZSV y la migración de nuevas células en el TRM. Evaluar la diferenciación celular de nuevas interneuronas incorporadas en el bulbo olfatorio, utilizando los marcadores PCNA, GFAP, NCAM y NeuN para inmunofluorescencia y el marcador BrdU para inmunohistoquímica, en los seis grupos de estudio
- 3) Comparar las diferencias entre sexos en los tres grupos de estudio

8. Método

Se utilizaron 90 ratones de la cepa CD-1, de 30-35 gr. de peso corporal de un mes de edad, 45 animales machos y 45 hembras. Se formaron tres grupos de 15 ratones cada uno: un grupo de ratones testigo, un grupo de ratones expuestos a V2O5 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.02 M por vía inhalada, 2 veces a la semana durante un mes, y un grupo expuesto al mismo protocolo de inhalación y mantenido 2 meses posteriores en un ambiente libre de vanadio.

La inhalación de los animales se realizó en una caja de acrílico conectada a un ultranebulizador. Al término del mes de inhalación, se sacrificó al grupo de 4 semanas de exposición y a un subgrupo de 5 ratones testigo. Al término del periodo de post-exposición (8 semanas) se sacrificó a los ratones de ese grupo y el resto de los testigos. Se utilizó el mismo protocolo para ambos sexos. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (35mg/Kg), después fueron perfundidos vía cardiaca con solución salina 0.9% y paraformaldehído al 4%. Se les extrajo el cerebro, el cual se seccionó sagitalmente, dividiendo ambos hemisferios, y se les colocó en solución de paraformaldehído para ser procesados mediante dos técnicas histológicas. Un hemisferio fue sumergido en Metilbutano; fue congelado y cortado por congelación en un criostato realizando cortes de 40 μm de grosor para procesarlos por inmunohistoquímica por flotación. En esta técnica se utilizó como marcador de proliferación celular a la BrdU, un análogo de la timina. El otro hemisferio se procesó con la técnica histológica convencional, se obtuvieron cortes de 5-10 μm de grosor y se procesaron con la técnica de inmunofluorescencia. Los anticuerpos utilizados en esa técnica fueron los siguientes: PCNA para observar la proliferación celular en LA ZSV y el TRM; GFAP para observar los astrocitos en las mismas zonas; NCAM para las neuronas inmaduras o neuroblastos, y NeuN, para las neuronas maduras.

Las muestras obtenidas fueron observadas en microscopio confocal, modelo Leica TCSP5. Las imágenes se analizaron mediante análisis densitométrico con el programa Image Pro Plus 2.0. El conteo de células positivas a BrdU obtenidas con la inmunohistoquímica por flotación se analizaron con el programa Image J. La comparación entre sexos se realizó con la prueba de ANOVA. Se tomó como datos estadísticamente significativos a la obtención de una $p < 0.05$.

8.1 Protocolo de administración de BrdU

La administración de 5-bromo-2'-desoxi uridina (BrdU) fue por vía intraperitoneal, disuelta en solución salina, a una dosis de 50 mg/Kg de peso corporal.

La inyección se realizó dependiendo de la etapa neurogénica que se pretendió marcar.

Por tal motivo, la primera inyección se realizó 15 días anteriores al sacrificio del animal, para cerciorarse de marcar las etapas de migración celular en el TRM. Para marcar la proliferación, se inyectó 2 días y 24 hrs anteriores al sacrificio.

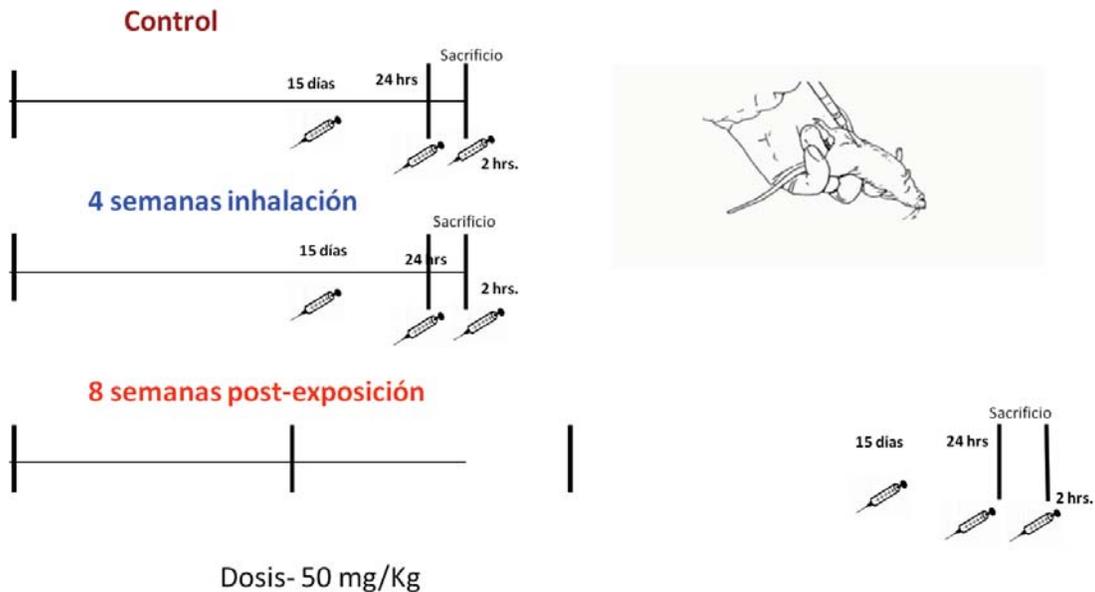


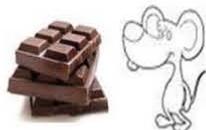
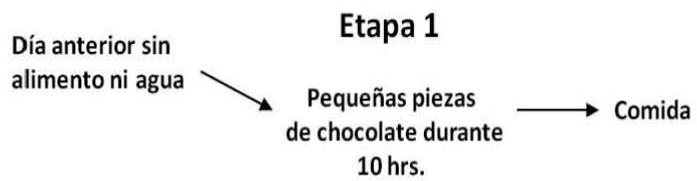
Imagen tomada de Olivos, 2007.

8.2 Pruebas olfatorias

Para la función olfatoria, se realizó registro inicial antes de comenzar el periodo de exposición de vanadio, con la finalidad de observar el comportamiento de los animales de cada sexo y las diferencias que pudieran presentar antes de dividir los respectivos subgrupos (control, un mes de inhalación y el de 2 meses post-exposición).

8.2.1 Prueba de reconocimiento de odorante

Se retira la comida y el agua a los animales 12 horas previas en las dos etapas en que se divide la prueba. En la primera etapa, se colocan pequeñas piezas de chocolate dentro de su caja para que asocien el olor de la pieza con el sabor, durante un periodo de 10-12 hrs. Después de que los animales consumen todas las piezas, se les da nuevamente alimento y agua. Dos días después, una noche previa a la segunda etapa, se les quita nuevamente el alimento a los animales. Al día siguiente, transferimos al animal a una caja diferente a la que estaba habituada; en esa caja escondemos una pieza de chocolate a una profundidad de 2-3 cm, y registramos el tiempo que tarda el animal en localizar el chocolate. Esta prueba se repite 3 veces en el mismo día para cada uno de los ratones cada 15 días (Ferguson et al. 2000).



Cada 15 días...

Repetir tres veces más el procedimiento, ocultando la pieza en diferentes zonas de la caja a 2-3 cm de profundidad



2 días después...

Etapa 2

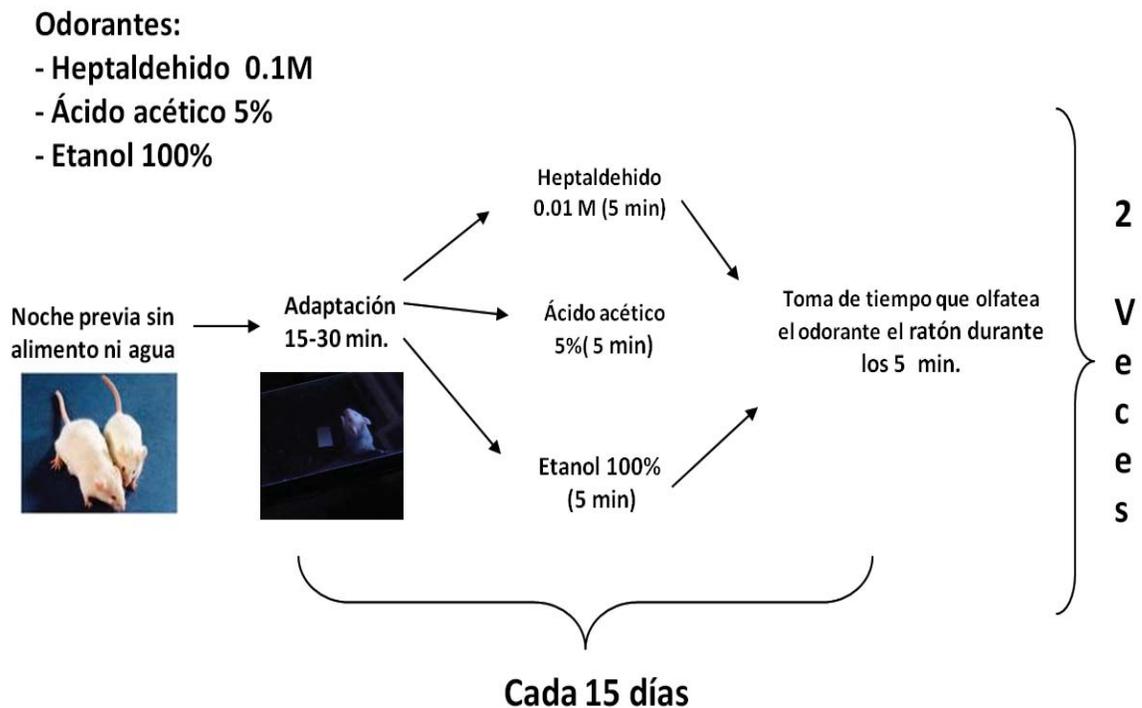


8.2.2 Prueba de preferencia olfatoria

Esta prueba consiste en observar cambios en la preferencia por los odorantes a lo largo de los periodos de estudio. Los odorantes utilizados fueron los siguientes: tres: heptaldehído al 0.1 M, ácido acético al 5% y etanol absoluto.

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

Al día siguiente, cada ratón fue colocado en una caja vacía, durante 15- 30 minutos para su adaptación. Posterior a este paso, fue colocado en la caja un trozo de papel medida del papel con 200 μ l de uno de los odorantes. Se deja el papel durante 5 minutos y se registra el tiempo en que el animal se acerca a percibir el papel. El papel se retira después y se ventila la caja durante 1 minuto. Este paso se repite para los otros odorantes. La prueba se repite dos veces para cada ratón, y se realiza cada 15 días (Kobayakawa *et al.* 2007).

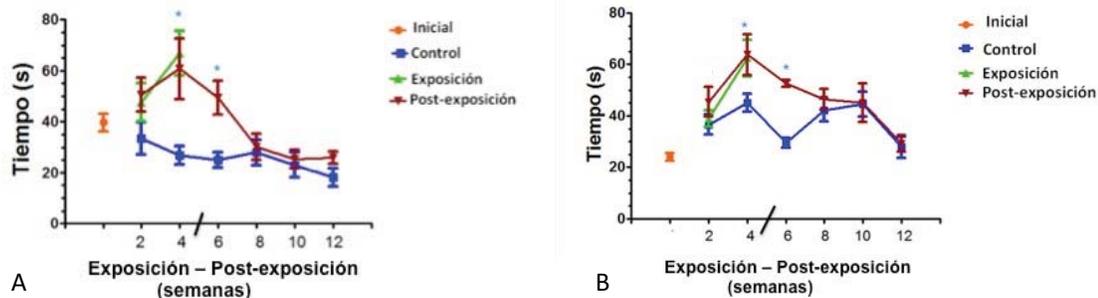


9. Resultados

Antes de separar a los roedores en los grupos de estudio, se realizó la prueba olfatoria para determinar el tiempo inicial o tiempo cero (T0).

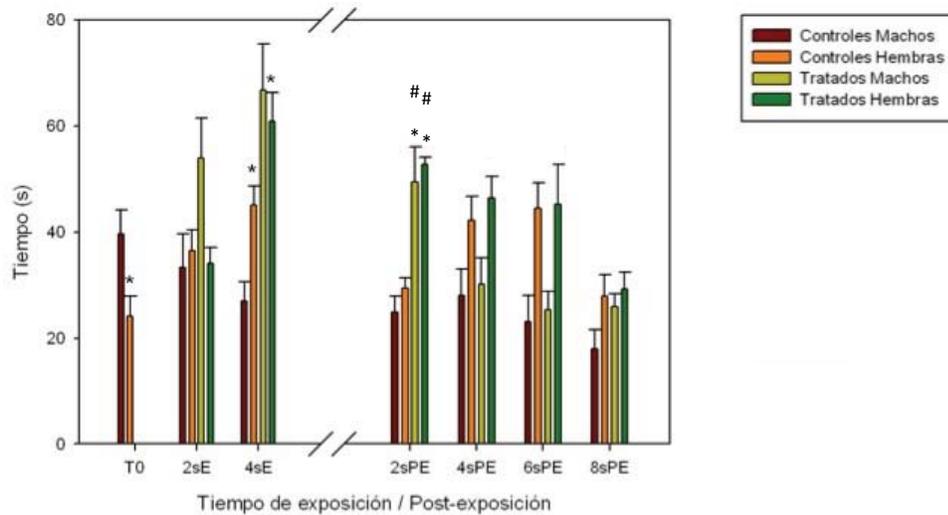
9.1 Prueba de reconocimiento del odorante

Con esta prueba se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos y post-expuestos en ambos sexos. En el registro inicial, los machos (Grafica 1A). requirieron mayor tiempo al registrado por las hembras (Grafica 1B). Después de un mes de inhalación de V_2O_5 , los grupos expuestos de ambos sexos incrementaron significativamente los registros de localización del odorante, en comparación con el grupo control. Sin embargo, después de 8 semanas de haber sido expuestos por última vez a vanadio, el grupo de post-exposición logró reducir los tiempos de localización de forma similar a los controles (25.98 ± 2.31 en machos, 56.24 ± 3.27 en hembras). De manera interesante, los grupos controles de ambos sexos, disminuyeron el tiempo de localización del odorante a lo largo de las 12 semanas.



Gráfica 1- A) Representación gráfica de los tiempos de localización del chocolate a lo largo del tratamiento en machos y en B) hembras . ANOVA (Holm-Sidak) * Diferencias con grupo control $p < 0.05$

Al realizar la comparación entre sexos, observamos diferencias significativas entre los grupos expuestos y de post-exposición. En los controles, solo hubo diferencias en el registro inicial y a las 4 semanas (Gráfica 2).

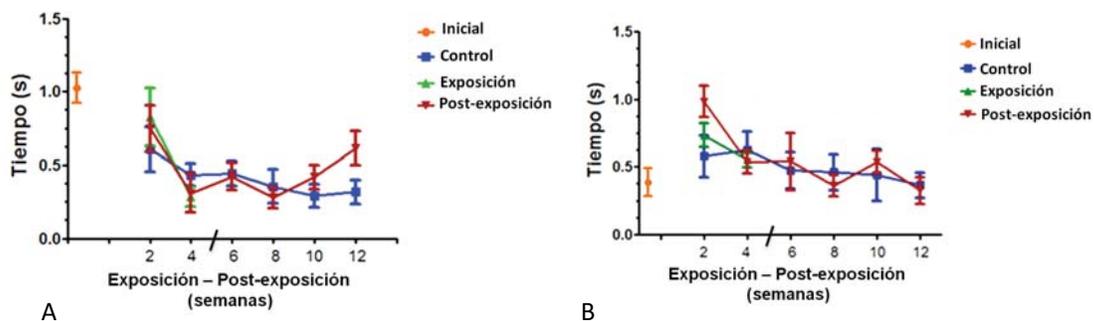


Gráfica 2- Representación gráfica de la comparación entre sexos de la prueba de reconocimiento del odorante, reflejó diferencias significativas entre los grupos tratados en el tiempo inicial; en los grupos expuestos a vanadio y a la octava y décima semana del periodo de post-exposición. *Comparación con macho control # Comparación con hembra control. ANOVA (Holm-Sidak) $p < 0.05$

9.2 Prueba de preferencia olfatoria

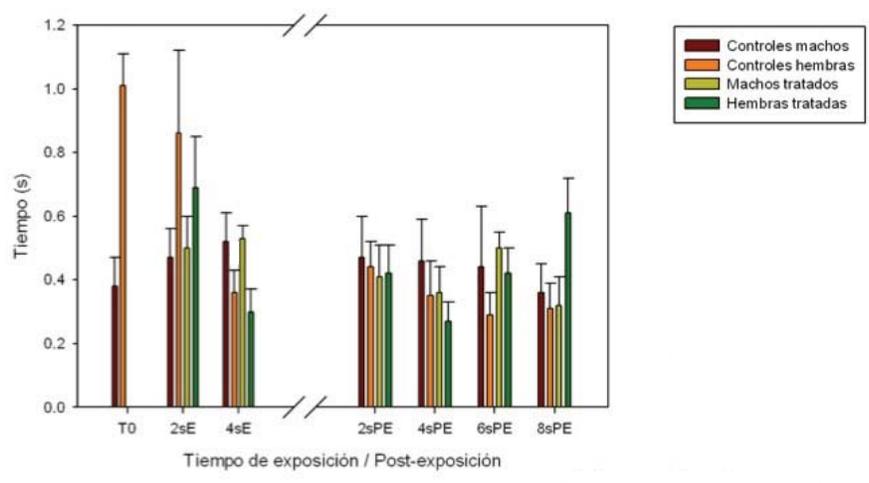
Con esta prueba, no hubo diferencias significativas entre los grupos de estudio. El heptaldehído fue un odorante desagradable para los machos (Gráfica 3A). En las hembras se presentaron diferencias a las 4, 6, 8 y 10 semanas del tratamiento entre los grupos post-exposición y control del mismo tiempo (Gráfica 3B).

9.2.1 Heptaldehído



Gráfica 3- Representación gráfica de la prueba de preferencia olfatorias con el heptaldehído; A) en los machos, no hay diferencias en ningún grupo de estudio para el heptaldehído, B) mientras que en hembras, se presentaron diferencias a partir de la cuarta semana de exposición a vanadio, comparándolas con los controles. ANOVA (Holm-Sidak) * Diferencias con grupo control $p < 0.05$

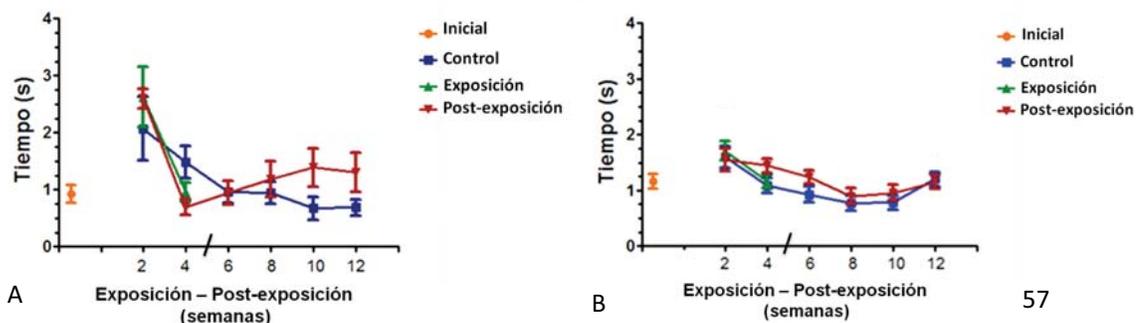
En la comparación entre sexos, sólo observamos diferencias entre los registros iniciales y los grupos controles a las 4 semanas de la exposición a vanadio. .



Gráfica 4- Representación gráfica de la comparación entre sexos para la prueba de preferencia olfatoria con el heptaldehído * Diferencias con sexo en la misma semana. ANOVA (Holm-Sidak) $p < 0.05$

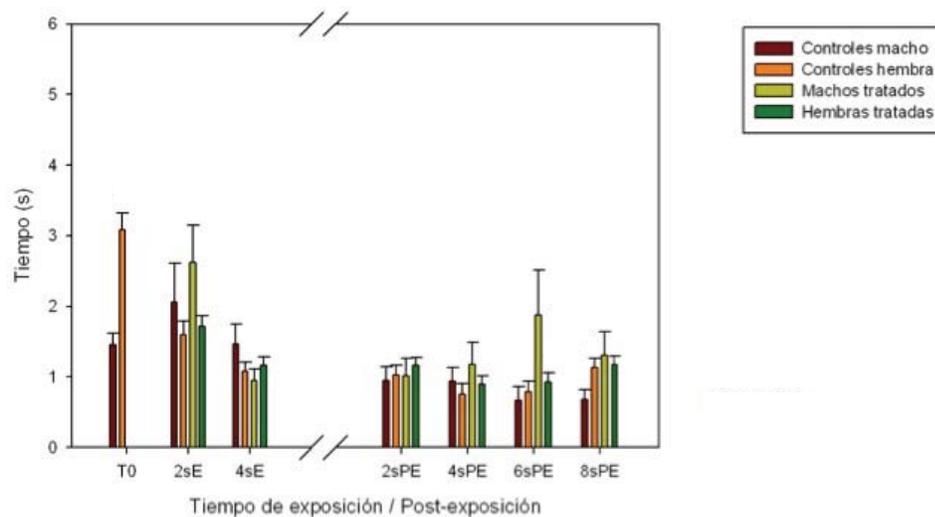
9.2.2 Etanol

Con el etanol, no se obtuvieron diferencias significativas en los grupos de los machos y las hembras. (Gráficas 5A y 5B).



Gráfica 5- Representación gráfica de la prueba de preferencia olfatorias con etanol A) La preferencia olfatoria en el etanol no produjo diferencias entre machos. B) En las hembras, se presentaron diferencias entre todos los grupos de estudio. ANOVA (Holm-Sidak) $p < 0.05$

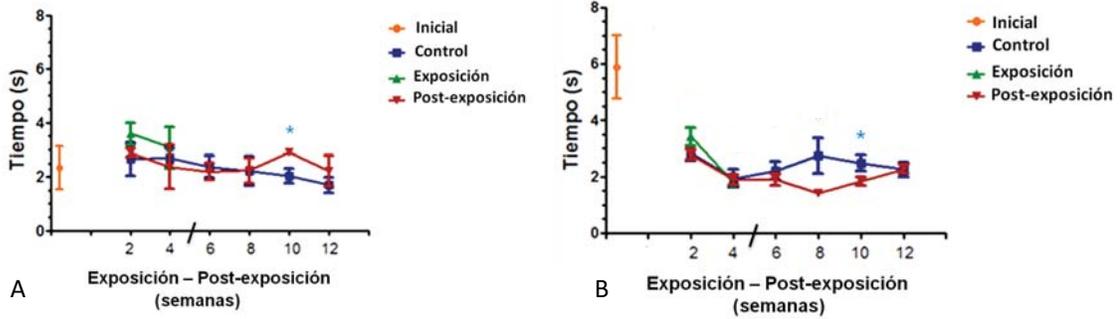
En la comparación entre sexos, se observa que sólo hubo diferencias en el tiempo inicial, y a la sexta y octava semana de post-exposición (Gráfica 6).



Gráfica 6- Representación gráfica de la comparación entre sexos para la prueba de preferencia olfatoria con el etanol. ANOVA (Holm-Sidak)

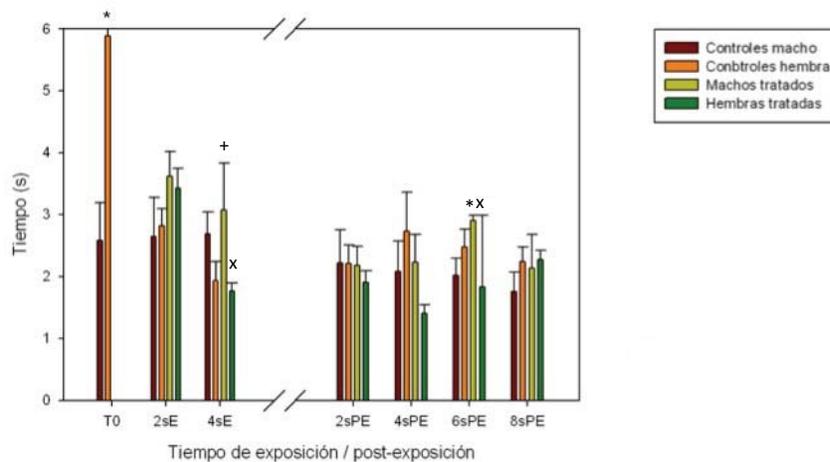
9.2.3. Ácido acético

Los animales de ambos sexos mostraron mayor preferencia por este odorante, en comparación con el heptaldehído y el etanol. El ácido acético fue el odorante que mayormente prefirieron los roedores. El tiempo en los grupos de ambos sexos estuvo en el rango de los 2 y 4 segundos. Sin embargo, los machos sólo mostraron diferencias significativas a la semana 6 del periodo de post-exposición (Gráfica 7A), mientras que las hembras presentaron diferencias en todos los grupos de estudio, a excepción de la semana 8 de post-exposición (Gráfica 7B).



Gráfica 7- Representación gráfica de la prueba de preferencia olfatorias con el ácido acético. A) En los machos, la preferencia por el ácido acético se mantuvo entre los controles y los grupos tratados. B) En las hembras, se observaron diferencias significativas entre controles y grupos tratados, a excepción de las 12 semanas de tratamiento. ANOVA (Holm-Sidak) * Diferencias con grupo control $p < 0.05$

Al realizar la comparación entre sexos, las hembras registraron una preferencia muy alta, cercana a los seis segundos, la cual disminuyó a partir de la segunda semana de inhalación de V_2O_5 . Sólo hubo diferencias significativas entre sexos de los controles de las 8 semanas del tratamiento y los grupos tratados a las 6 semanas post-exposición (Gráfica 8).



Gráfica 8- Representación gráfica de la comparación entre sexos para la prueba de preferencia olfatoria con el etanol ANOVA (Holm-Sidak) * Diferencias con control macho x Diferencias con tratado hembras. $p < 0.05$

9.3 Análisis citológico

9.3.1 Zona subventricular (ZSV)

En la ZSV, la proliferación celular se evaluó en células positivas a PCNA, encontrando que este evento fue similar en ambos sexos. A las 4 semanas de exposición a vanadio, los grupos de hembras y machos mostraron disminuciones significativas de más del 70% en la proliferación celular (Figuras 9B y 10B). Posteriormente, en el periodo de post exposición, ambos sexos mostraron un aumento significativo de la proliferación celular en esta zona (Figuras 9C y 10C).

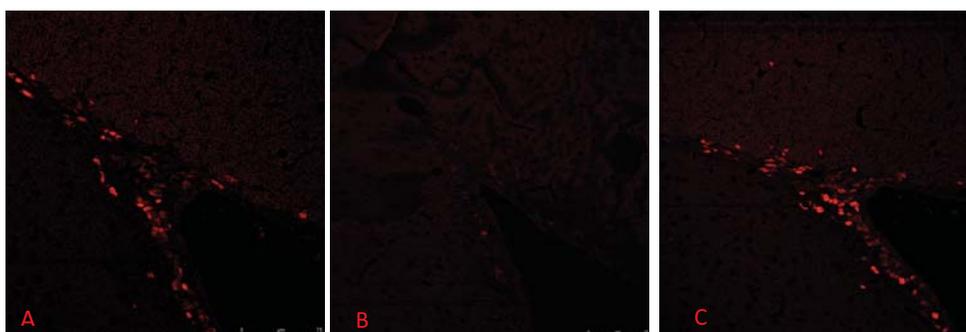


Figura 9- Imágenes de la ZSV de ratones macho donde se observan células positivas a PCNA (rojo) en A) el grupo control. En B) el grupo de 4 semanas de exposición se observan menor número de células marcadas con este anticuerpo y en C) el grupo de post-exposición el marcaje es muy similar al grupo control. 40X

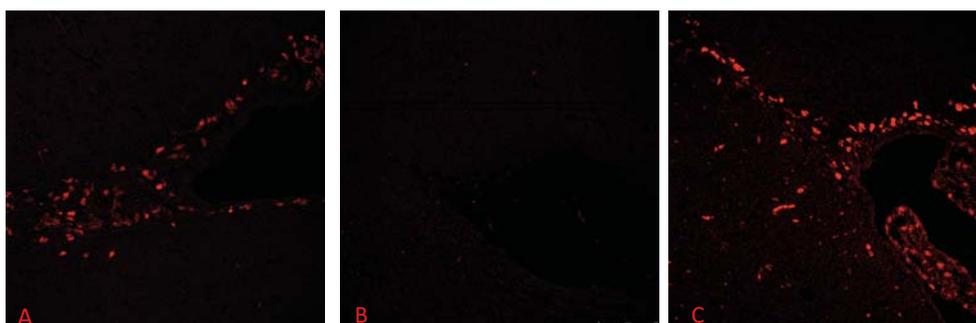


Figura10- ZSV de ratones hembras, en las cuales se observan las células positivas a PCNA (rojo) en A) el grupo control. En B) el grupo de 4 semanas de exposición el marcaje es casi nulo, y en C) el grupo de post-exposición aumenta bastante. 40X

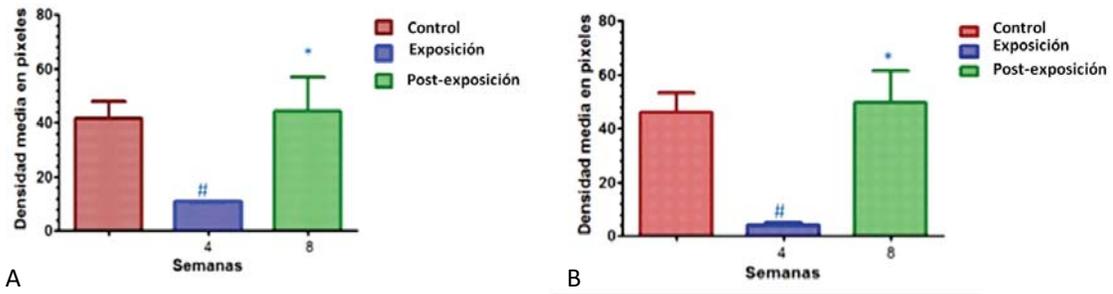


Figura 11- A) Densitometría de células positivas a PCNA en la ZSV de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

La comparación de la proliferación celular entre ambos sexos mostró solamente diferencias significativas en los grupos que fueron expuestos a vanadio durante 4 semanas (Figura 12)..

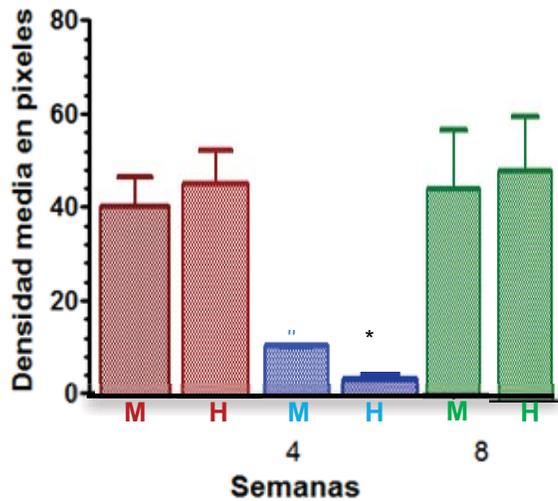


Figura 12- Comparación entre sexos para la densitometría del marcaje con PCNA realizada en ZSV . ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $p < 0.05$

En la ZSV la proliferación de los astrocitos fue mayor en las hembras para el grupo control y post-expuesto, comparado con los machos. Los animales de ambos sexos se ven afectados después de la exposición a vanadio, con diferencias significativas, con más del 50% en machos y el 20% en las hembras (Figuras 13B y 14B).

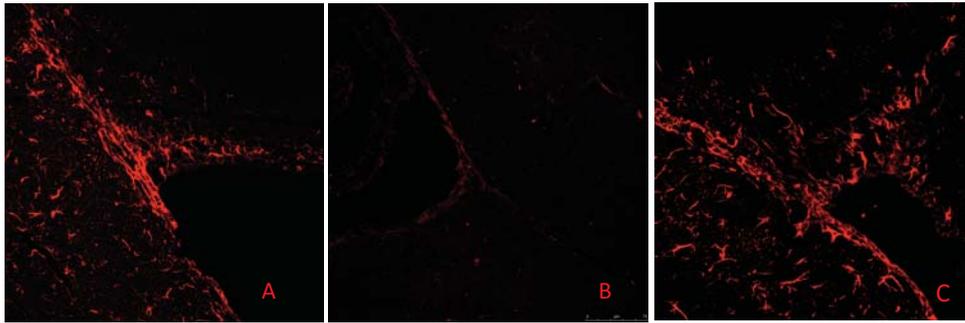


Figura 13- Marcaje de astrocitos (rojo) positivos a GFAP en la ZSV los ratones macho en el A) grupo control, B) el grupo expuesto a vanadio por 4 semanas disminuye bastante y en C) el grupo de post-exposición aumenta nuevamente. 40X

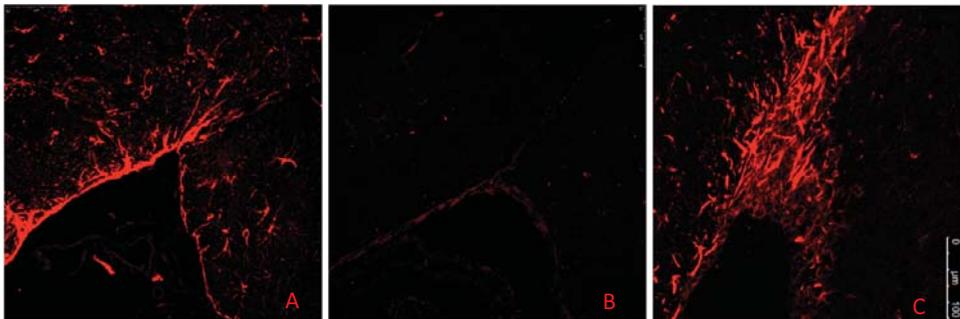


Figura 14- Marcaje de astrocitos (rojo) positivos a GFAP en la ZSV los ratones hembra en el A) grupo control. El B) grupo expuesto a vanadio por 4 semanas muestra una marca muy disminuida en comparación con el control, y C) el grupo de post-exposición, esta marca incrementa considerablemente. 40X

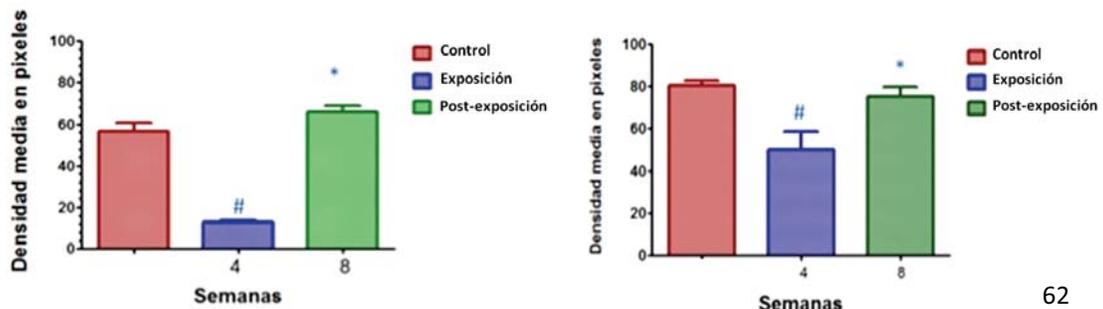


Figura 15- A) Densitometría de células positivas a GFAP en la ZSV de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control p<0.05

En los tres grupos de estudio en la ZSV de las hembras mostraron mayor cantidad de astrocitos marcados con GFAP comparadas con los machos (Figura 16).

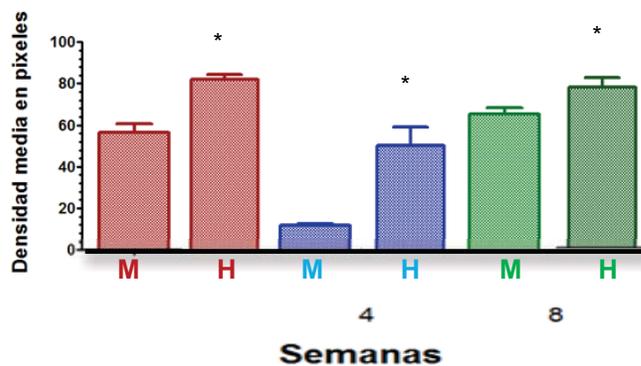


Figura 16- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con GFAP realizada en ZSV. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo p<0.05

En relación a los neuroblastos se encontró que las hembras mostraron un número más estable entre los controles (Figura 17A), el grupo expuesto (Figura 17B) y el de post-exposición (Figura 17C). En los machos, la proliferación disminuyó significativamente, cercano al 60% al mes de exposición a vanadio, y en el periodo de post-exposición hay un aumento del 10% y fue significativo (Figura 19).

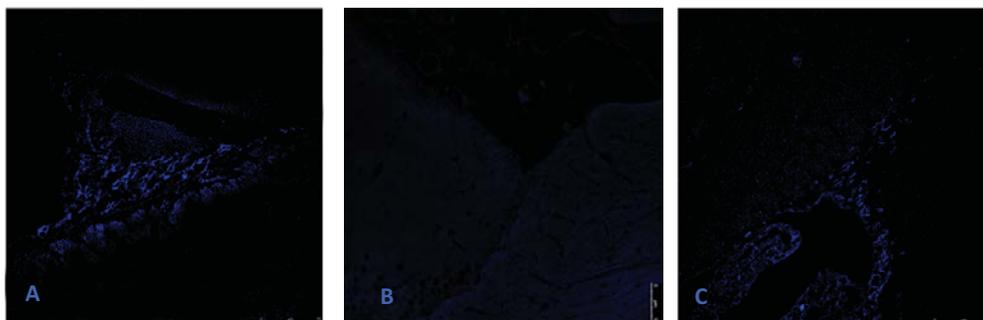


Figura 17- Marcaje de precursores neuronales (azul) positivos a NCAM en la ZSV de ratones macho. Se observa el marcaje en el A) grupo control. En el B) grupo expuesto, la marca disminuye durante 4 semanas a vanadio y en el C) grupo post-exposición el marcaje se incrementa. 40X

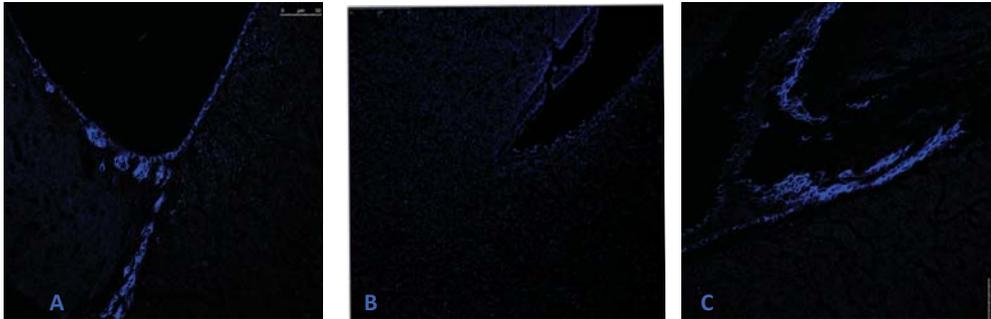


Figura 18- ZSV de ratones hembra con células positivas (azul) a NCAM en A) el grupo control, el B) grupo expuesto a vanadio, en donde es menor la marca, y en C) el grupo de post-exposición. 40X

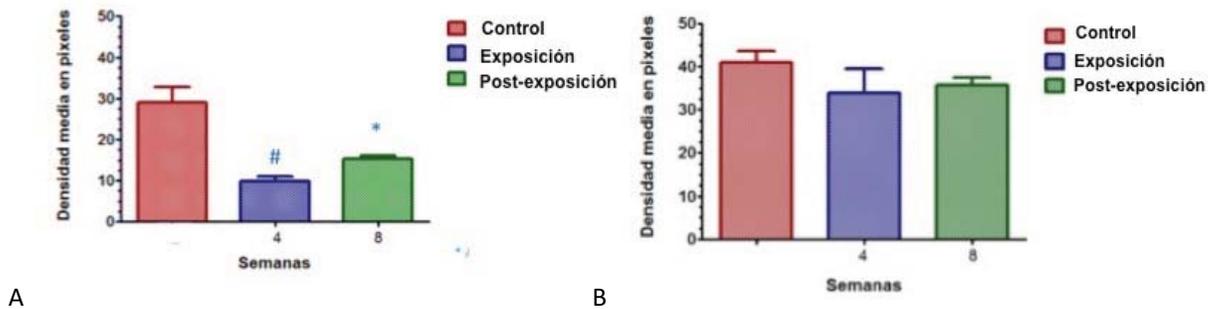


Figura 19- A) Densitometría de células positivas a NCAM en la ZSV de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

En la comparación por sexos, hubo diferencias significativas en los grupos de 4 semanas de exposición a vanadio y el grupo de post-exposición (Figura 20).

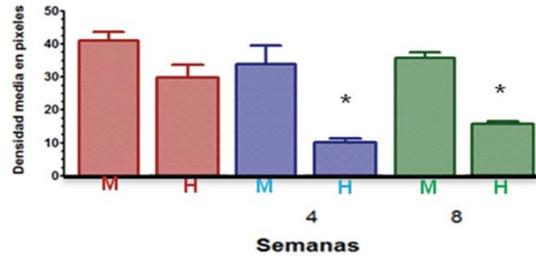


Figura 20- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con NCAM realizada en ZSV. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $p < 0.05$

9.3.2. Tracto Rostral Migratorio

En relación a la proliferación celular en el TRM encontramos que este evento fue similar a lo que se observó en la ZSV. La proliferación es mayor en las hembras del grupo control, respecto a los machos (Figura 23 A). Ambos sexos disminuyeron su proliferación de forma significativa al mes de exposición a vanadio, con el 50% de la dosminución en machos y más del 70 % en las hembras. Además, ambos sexos la aumentan de igual forma (Figuras 21C y 22C).

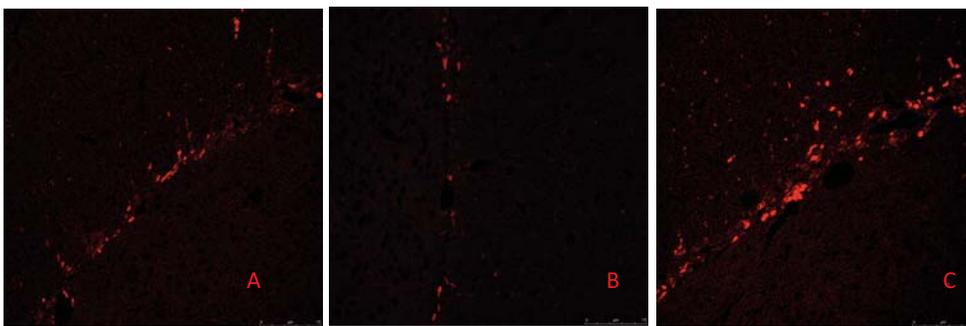


Figura 21- Marcaje en TRM de ratones con células positivas a PCNA en A) el grupo control. El marcaje es menor B) en el grupo de 4 semanas de exposición a vanadio y aumenta nuevamente C) en el período post-exposición. 40X

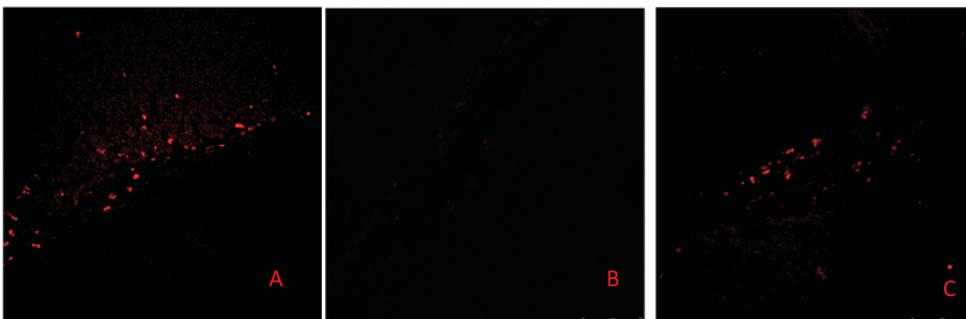


Figura 22- Marcaje con PCNA de células en proliferación en el TRM de ratones hembra, para A) los controles. La marca con este anticuerpo disminuyó excesivamente en el B) grupo expuesto a vanadio y vuelve a aumentar en C) el grupo de post-exposición. 40X

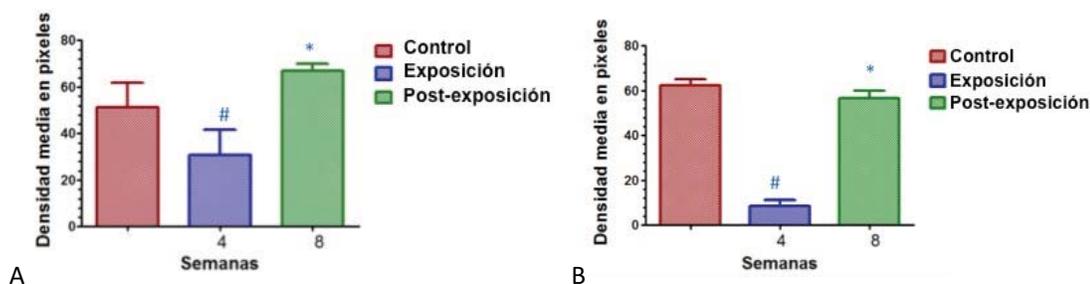


Figura 23- A) Densitometría de células positivas a PCNA en el TRM de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control p<0.05

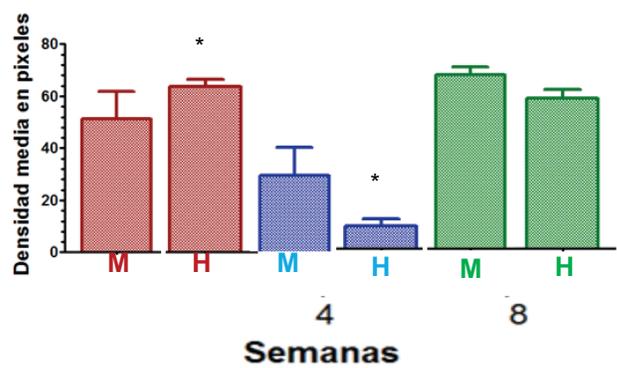


Figura 24- Análisis densitométrico de las células positivas a PCNA en el TRM. Los asteriscos muestran las diferencias significativas entre sexos. ANOVA (Holm-Sidak) P<0.05.

En el TRM de las hembras, la proliferación y migración de astrocitos fue mayor en los controles (Figura 27A), respecto a los machos (Figura 27B). Al mes de exposición a vanadio, los machos presentaron una disminución que las hembras en el marcaje de astrocitos. Sin embargo, en ambos sexos, los grupos postexposición de ambos sexos mostraron valores similares a los controles.

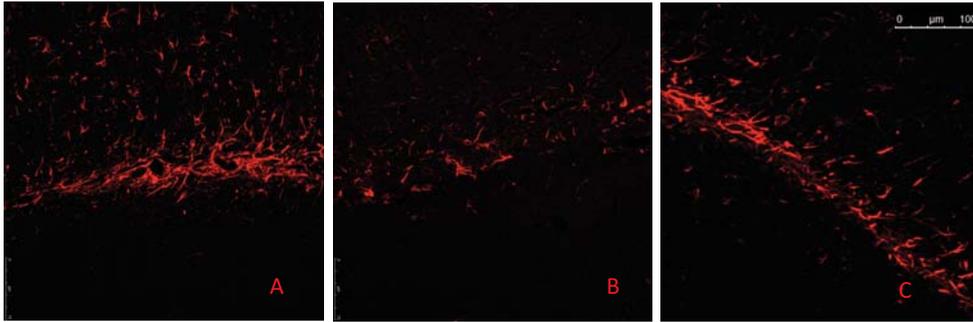


Figura 25- Astrocitos marcados con GFAP en el TRM de ratones machos del A) grupo control. En el grupo B) expuesto a vanadio, la marca de éstas células disminuye y en C) el grupo de post-exposición aumenta de nuevo. 40X

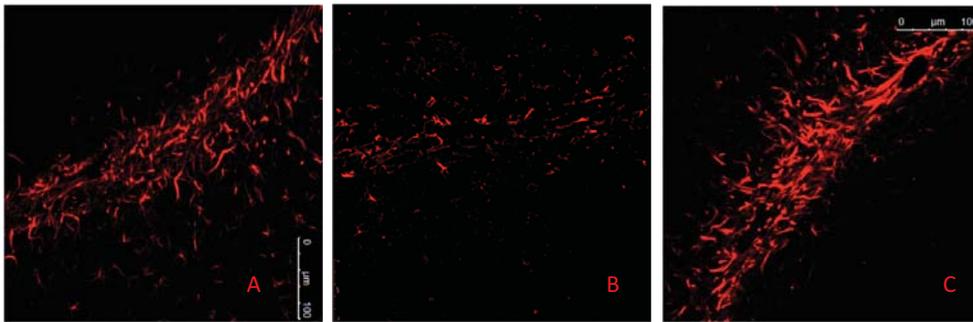


Figura 26- TRM de ratones hembra en el cual se observan astrocitos marcados con GFAP en el A) grupo control. Su marcaje disminuye bastante en el B) grupo expuesto a vanadio; sin embargo, la marca vuelve a aumentar en C) el grupo de post-exposición. 40X

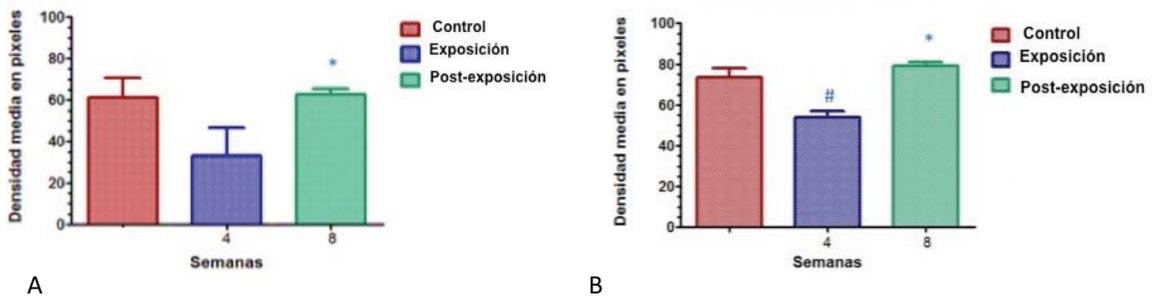


Figura 27- A) Densitometría de células positivas a GFAP en el TRM de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

En relación a la comparación entre sexos del marcaje de astrocitos en el TRM se obtuvieron diferencias significativas en los grupos expuestos con y sin un periodo de post-exposición, mostrando una mayor densidad, cercana al 20% en los roedores hembra, comparado con los machos.

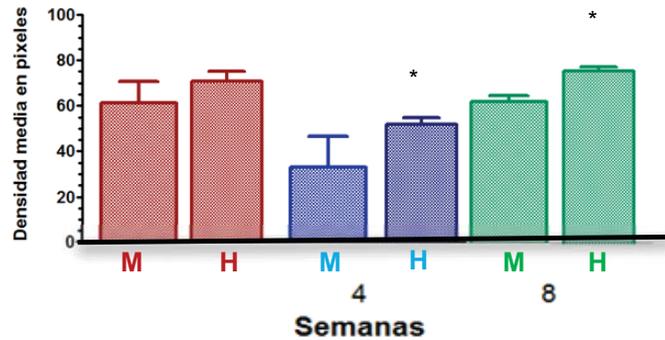


Figura 28- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con GFAP realizada en el TRM. Diferencias entre sexo $p < 0.05$

En los neuroblastos del TRM, se observó un comportamiento diferente, comparado con los astrocitos. Estos precursores neuronales proliferaron y migraron más en los machos (Figura 31A) que en las hembras en los grupos controles (Figura 31B).

Además, al mes de inhalación de V_2O_5 , la proliferación de los neuroblastos disminuyó más en las hembras, sin que se lograra recuperar de forma significativa este evento.

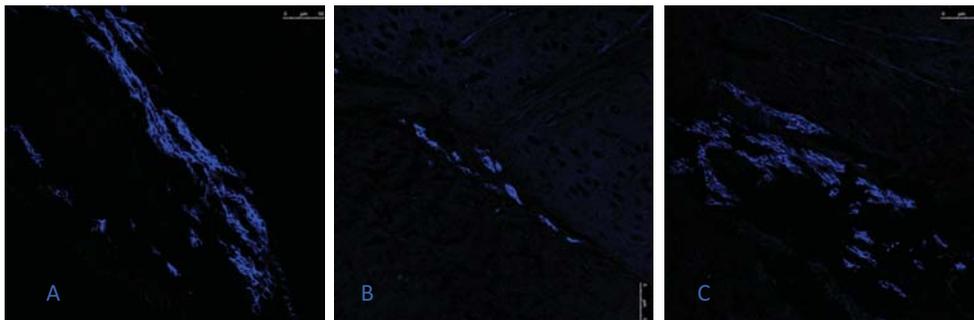


Figura 29- Precusores neuronales marcados con NCAM en el TRM de los ratones machos del A) grupo control; el marcaje disminuye ligeramente en el grupo B) expuesto a vanadio y vuelve a aumentar en C) el grupo de post-exposición. 40X

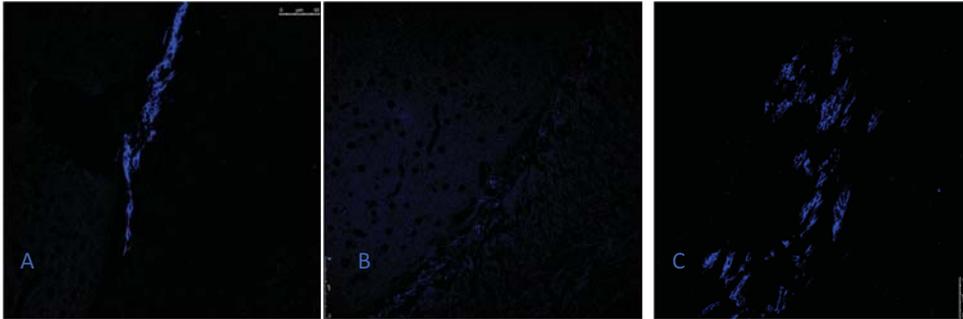


Figura 30- TRM de ratones hembra con precusores neuronales marcados con NCAM en el A) grupo control. Este marcaje disminuye considerablemente en el B) grupo expuesto a vanadio y vuelve a aumentar en C) el grupo de post-exposición. 40X

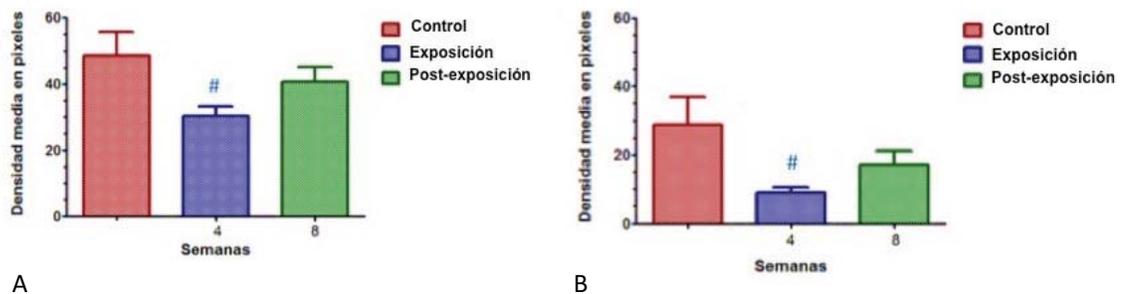


Figura 31- A) Densitometría de células positivas a NCAM en el TRM de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

La proliferación de neuroblastos comparada entre ambos sexos mostró diferencias significativas entre los tres grupos de estudio (Figura 32). Al inicio, la proliferación mostró una disminución de casi el 50%; mientras que a las 4 semanas de exposición, la proliferación de los neuroblastos fue menor en los ratones machos que en las hembras, o encima del 50%. La diferencia en la proliferación de neuroblastos en los en el periodo de post-exposición a vanadio mostró un aumento del 30% en los machos y del 50% en las hembras, comparados con el grupo expuesto a 4 semanas.

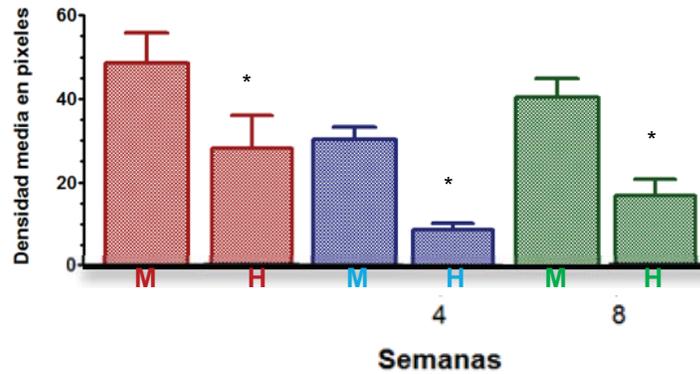


Figura 32- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con NCAM realizada en el TRM. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $p < 0.05$

9.3.3. Bulbo olfatorio

Para marcar las dos capas (glomerular y granulosa) en donde se lleva a cabo la diferenciación neuronal en el bulbo olfatorio, se realizó el marcaje con NeuN.

En ambas capas celulares, la densidad celular se ve más afectada en los machos en grupos expuestos a vanadio (Figuras 35A y 38A). Las hembras conservaron la densidad neuronal, no se obtuvieron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio (Figuras 35B y 38B).

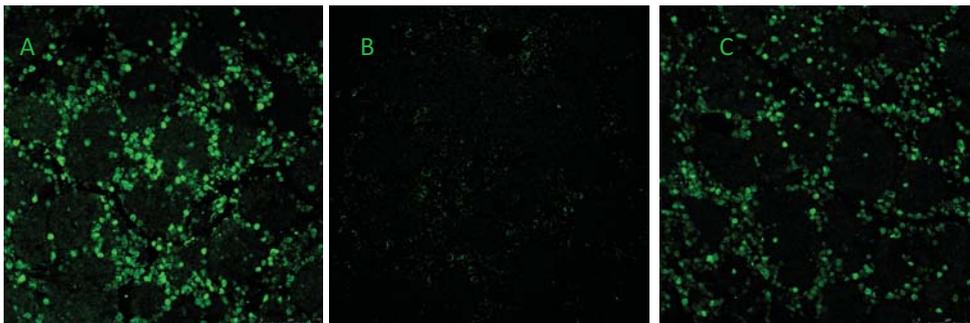


Figura 33- Células periglomerulares marcadas con NeuN en la capa glomerular de ratones macho en A) el grupo control; B) la densidad celular disminuye significativamente al mes de exposición a vanadio y c) aumenta nuevamente en el periodo de post-exposición. 40X

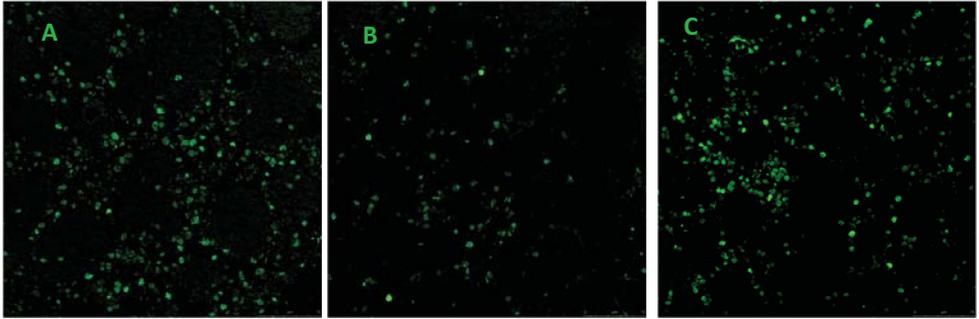


Figura 34- Células periglomerulares en la capa glomerular de las hembras en A) en grupo control; no hay diferencias en la densidad celular del B) grupo expuesto a vanadio, C) en el grupo de post-exposición la densidad celular aumenta. 40X

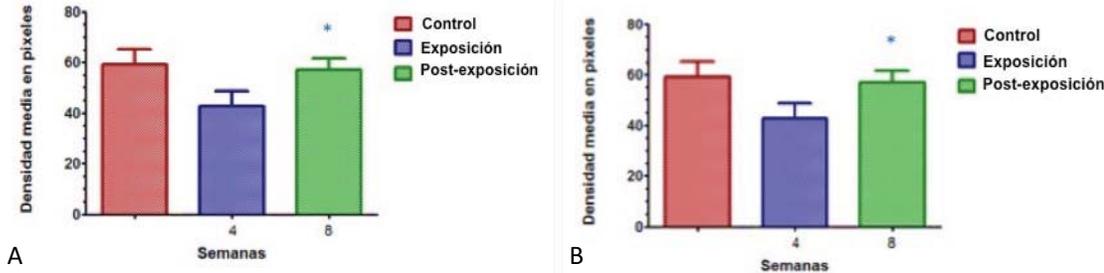


Figura 35- A) Densitometría de células positivas a NeuN en la capa glomerular de bulbo olfatorio de ratones macho y B) de ratones hembra. * Diferencias con grupo expuesto, ANOVA (Tukey) #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

En la comparación entre sexos, observamos que la recuperación fue significativa en los machos, y ambos sexos mostraron valores muy similares entre ellos y entre sus grupos controles (Figura 36).

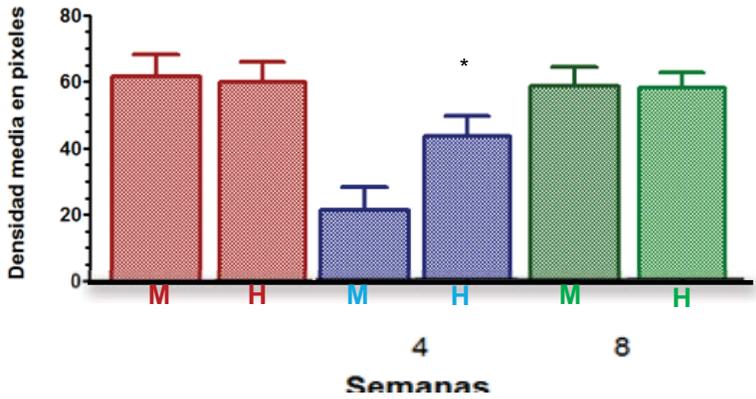


Figura 36- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con NeuN realizada en la capa glomerular del bulbo olfatorio. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $P < 0.05$

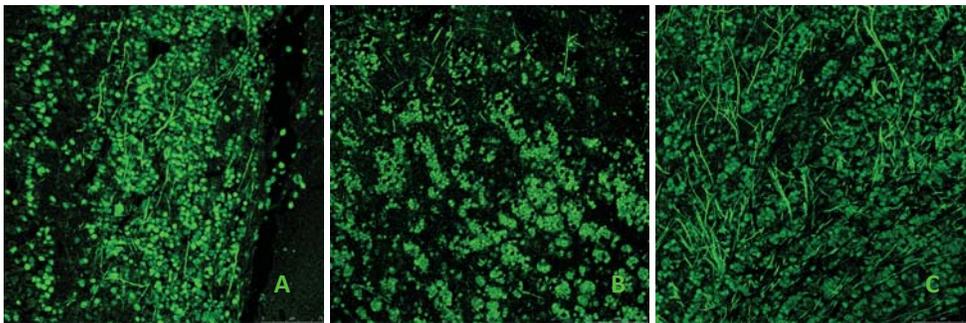


Figura 37- Células periglomerulares marcadas con NeuN en la capa granulosa de ratones macho en A) el grupo control; B) la densidad celular disminuye al mes de exposición a vanadio y C) aumenta nuevamente en el periodo de post-exposición. 40X

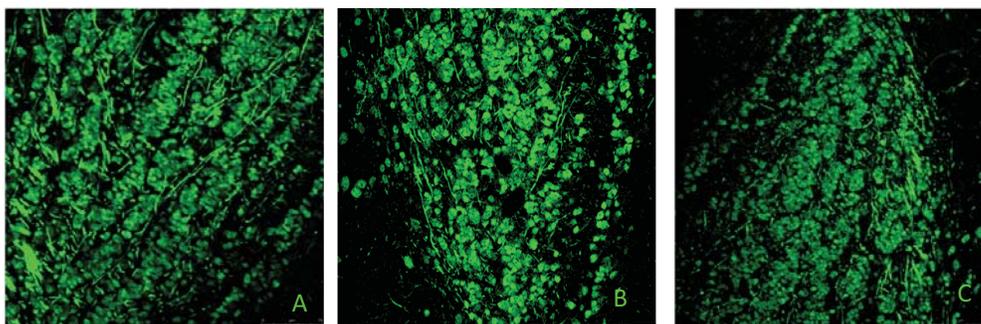


Figura 37- La densidad celular en la capa granulosa, marcada con NeuN de las hembras se conservó en A) los controles, B) el grupo expuesto y C) el periodo de post exposición. 40X

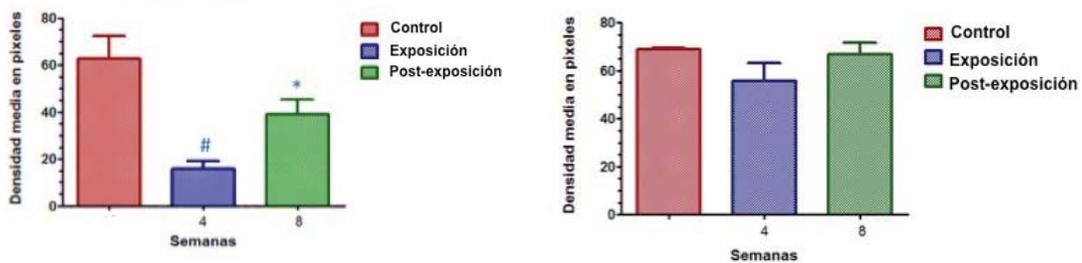


Figura 38- A) Densitometría de células positivas a NeuN en la capa granulosa de bulbo olfatorio de ratones macho y B) de ratones hembra. ANOVA(Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control p<0.05

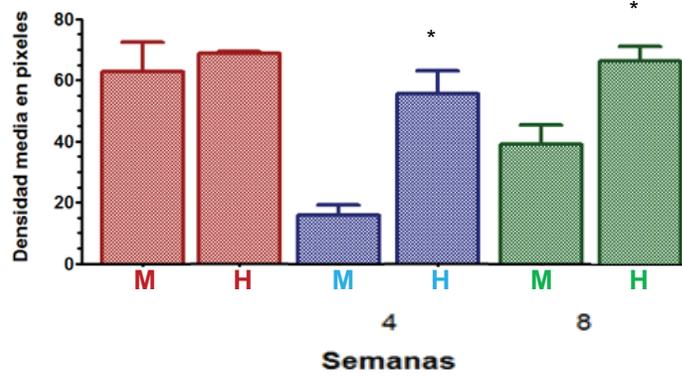


Figura 39- Comparación entre sexos de la densitometría del marcaje con NeuN realizada en la capa granulosa del bulbo olfatorio. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo P<0.05

9.4. Inmunohistoquímica

9.4.1 ZSV

El marcaje obtenido con BrdU en la ZSV fue similar a lo observado con el PCNA. En ambos sexos, la proliferación celular disminuyó al mes de inhalación de V₂O₅ (Figuras 40B y 41B), y 8 semanas sin exposición fueron suficientes para incrementar nuevamente la proliferación (Figuras 40C y 41C).

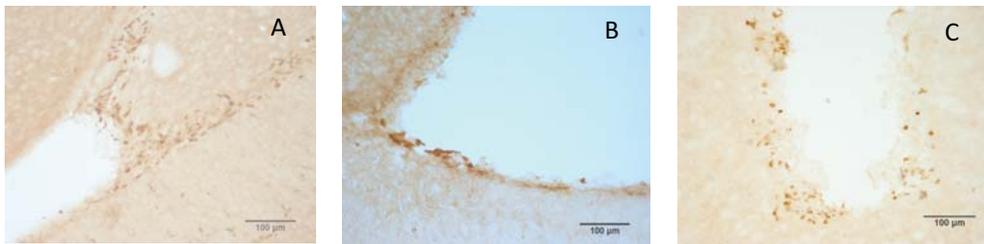


Figura 40- A) Células positivas a BrdU en la ZSV de ratones macho, B) el marcaje disminuye a las 4 semanas de inhalación de V₂O₅ y aumenta. 20X

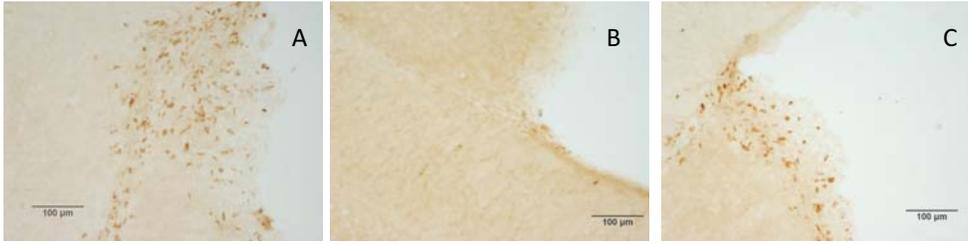


Figura 41- A) Células marcadas con BrdU en ZSV de las hembras controles, B) en el grupo expuesto a vanadio y C) en el grupo del periodo de post-exposición. 20X

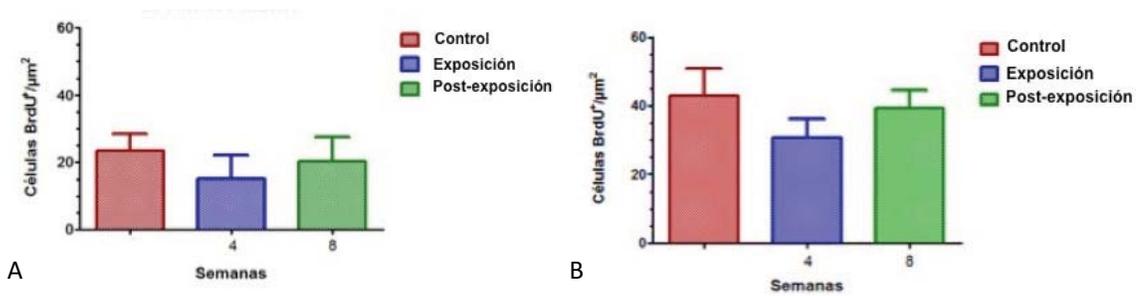


Figura 42- A) Conteo de células positivas a la incorporación de BrdU en l ZSV de machos y de B) hembras. ANOVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

Además, se observó un mayor número de células marcadas con BrdU en la ZSV de las hembras en los tres grupos de estudio, con diferencias significativas en comparación con los machos de los tres grupos (Figura 43).

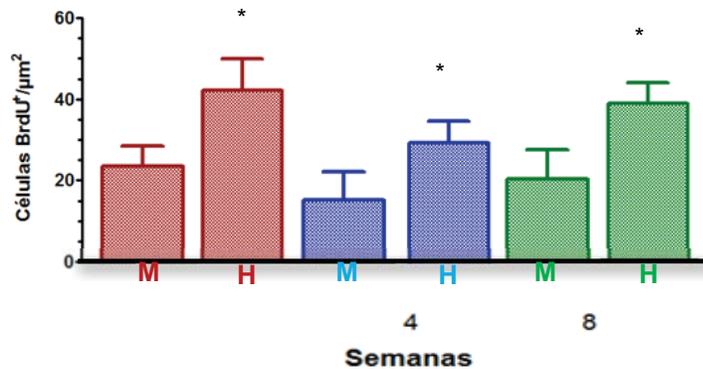


Figura 43- Comparación entre sexos del conteo de células positivas a BrdU en la ZSV . ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $p < 0.05$

9.4.2 TRM

En esta estructura, ocurrió un evento diferente a la ZSV. En el TRM, la proliferación celular fue mayor en los machos; ésta proliferación disminuyó al mes de inhalación (Figuras 44B Y 45B) y fue recuperada 8 semanas posteriores sin exposición a vanadio, se obtuvieron valores superiores a los del grupo control (Figuras 44C y 45C). Sólo se presentaron diferencias significativas en las hembras.

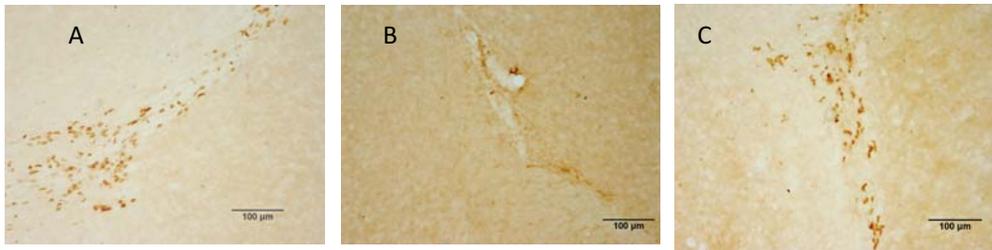


Figura 44- A) Células positivas a BrdU en el TRM de ratones macho, B) el marcaje disminuye a las 4 semanas de inhalación de V2O5 y aumenta en el grupo de post-exposición. 20X

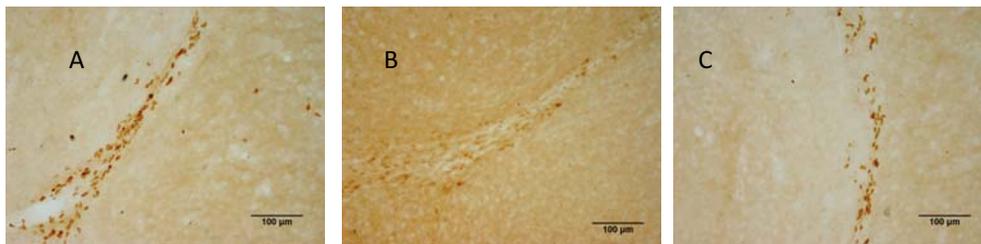


Figura 45- Figura 41- A) Células marcadas con BrdU en TRM de las hembras controles, B) en el grupo expuesto y C) en el grupo del periodo de post-exposición. 20X

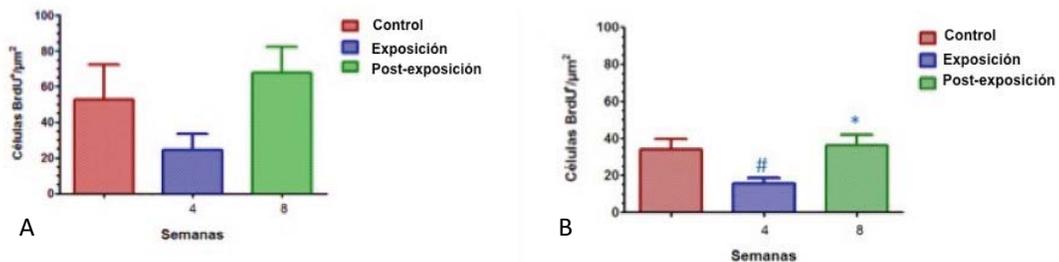


Figura 46- A) Conteo de células positivas a la incorporación de BrdU en el TRM de machos y de B) hembras. ANVA (Tukey) * Diferencias con grupo expuesto, #Diferencias con grupo control $p < 0.05$

En la comparación por sexos, se observó que sólo se presentaron diferencias significativas en los grupos de post-exposición (Figura 47).

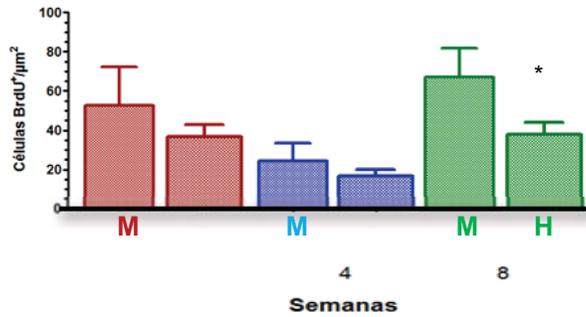


Figura 47- Comparación entre sexos del conteo de células marcadas con BrdU en el TRM. ANOVA (Holm-Sidak) *Diferencias entre sexo $p < 0.05$

10. Discusión

10.1 Pruebas olfatorias: reconocimiento olfatorio y preferencia olfatoria

Los resultados que se obtuvieron en las pruebas olfatorias mostraron una respuesta diferencial en la función olfatoria entre machos y hembras. Sin embargo, sólo en la prueba de reconocimiento del odorante se obtuvieron diferencias significativas que reflejan la acción del vanadio sobre el olfato de los ratones. En la prueba de preferencia olfatoria, no hubo diferencias significativas en los tres grupos de estudio de ambos sexos para los tres odorantes (heptaldehído, etanol y ácido acético).

Para la prueba de reconocimiento, se utilizaron piezas de chocolate, que poseen un olor agradable que los ratones asocian con el sabor, para ser identificado a lo largo de las evaluaciones. En estudios previos, se ha buscado la relación entre una respuesta positiva asociada con el chocolate y la dieta de los ratones. Se ha observado que al añadir varias piezas de chocolate en la dieta de los ratones, su actividad locomotora incrementa, esto puede relacionarse con un efecto placentero generado por el chocolate (Hsu et al. 2010).

En la prueba realizada para la preferencia olfatoria, aún sin obtener diferencias significativas, se observó que el ácido acético fue el odorante con mayor aceptación por los ratones. Se ha reportado previamente que la administración de solución de ácido acético al 1.5% durante 6 semanas por vía oral, suprime la acumulación de grasa en el hígado del ratón. Se ha sugerido que el ácido acético pueda ayudar a de la oxidación de ácidos grasos (Pearson y Haw. 2010). En otro estudio, se han utilizado derivados del ácido acético (ácido propanoico, ácido pentanoico) para realizar estudios de memoria olfatoria en ratas. Al utilizar éstos compuestos, se observó que eran capaces de generar memoria por habituación a corto y largo plazo (Mcnamara, 2008).

El empleo de éstas pruebas olfatorias durante el periodo de inhalación de V_2O_5 y posterior a ella, nos permitió explicar de forma más detallada la forma en que pudo verse alterada la función olfativa.

El procesamiento de todo odorante produce, en primer lugar, la activación de receptores olfatorios en el epitelio olfatorio. Una vez activados, cada receptor es segregado hacia el SNC. La información se va procesando en diferentes etapas hasta llegar a la corteza cerebral. Sin embargo, los circuitos neuronales implicados en todos los procesos, desde la percepción por receptores olfatorios hasta las aferencias a corteza, están poco comprendidos.

Esto implica una organización muy bien formada que posiblemente impidió cambios significantes en la preferencia olfatoria de los tres odorantes que utilizamos (heptaldehído, etanol y ácido acético) para los grupos de estudio. Los odorantes presentan diversas características fisicoquímicas que son reconocidas en el epitelio olfatorio. En el roedor, este epitelio comprende una gran familia de 1000 receptores aprox. Las neuronas sensoriales olfatorias, con un sólo receptor, proyectan hacia los glomérulos del bulbo olfatorio, y a continuación comienza a codificarse la información química mediante un mapa topográfico muy bien determinado; un procesamiento de “primer orden” (Davidson y Ehlers, 2011). A pesar de haber observado alteraciones en epitelio olfatorio en el mismo modelo (Arenas. 2011), no se observó diferencia en la preferencia por los odorantes, probablemente se conservó este proceso.

El procesamiento de segundo orden se da entre las células mitrales y en penacho, las cuales reciben información sensorial de un sólo tipo de receptor olfatorio que converge en uno o dos glomérulos solamente, manteniendo separada la información. Las interacciones entre las células periglomerulares, ayudan a mantener la funcionalidad de los glomérulos, y se llevan a cabo por sinapsis laterales, regulando a su vez la transmisión con las mitrales y las células en penacho (Davidson y Ehlers.2011).

La percepción de un odorante se lleva a cabo en la corteza cerebral, pero es modificada desde el bulbo olfatorio. En nuestro modelo se ha observado que la toxicidad en corteza cerebral por peroxidación de lípidos (Jiménez, 2009), podría estar relacionada a una afectación en diferentes áreas de la corteza, como la corteza prefrontal, una de las primeras vías que recibe las aferencias del bulbo olfatorio. Sin embargo, se ha observado que un solo odorante puede unirse a múltiples receptores olfatorios y activar varios glomérulos a su vez. Esta

segregación de la información asegura que la función del olfato se mantenga aún estando expuesto a elementos tóxicos, como el vanadio (Belluzzi et al., 2003) (Imagen 10).

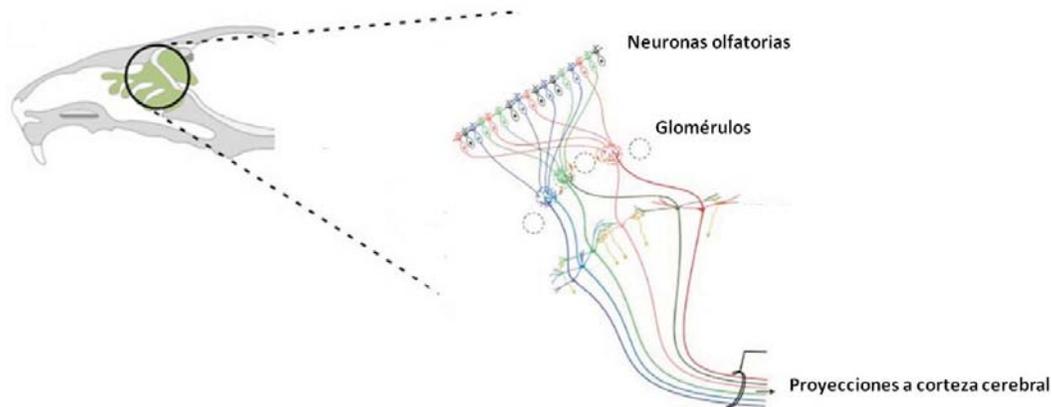


Imagen 10- En la imagen se muestra la segregación de la información olfatoria que comienza en el epitelio olfatorio, continúa hacia los glomérulos y finalmente proyecta a corteza cerebral. Modificado de <http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e/chapter06.05.html>

Las neuronas de la corteza piriforme, otra de las primeras regiones donde proyecta la información del bulbo olfatorio, responden a la actividad multiglomerular, y se sugiere que esta sea una de las formas que conserva la información que llega a corteza cerebral y que pueda ser llevada a otras zonas del cerebro (Davidson y Ehlers.2011).

Además, este ordenamiento de la información implica la participación de un gran número de neuronas, que aseguran el mantenimiento de la función en buenas condiciones y cuidando las aferencias hacia la corteza cerebral, con el fin de no perjudicar la discriminación olfatoria.

En nuestro modelo, se sugiere que cada uno de los odorantes sean procesados y segregados por tres elementos que están presentes en el epitelio olfatorio: la activación de diversos receptores olfatorios; el moco de la cavidad nasal, que contiene proteínas y enzimas que sirven para transportar y descomponer los odorantes volátiles; y las glándulas de Bowman, que secretan a su vez varias

enzimas como citocromo P450, deshidrogenasas, oxidasas, reductasas y esterasas que degradan las moléculas (Fried et al. 2002).

Además, observamos en la prueba de reconocimiento del odorante, durante el tratamiento, los animales controles y el grupo de post-exposición registraron tiempos similares de localización, en hembras y machos. Estos resultados se relacionan con la memoria olfatoria; los ratones aprendieron a localizar el chocolate y esto se reflejó en menor tiempo de localización.

El aprendizaje olfatorio tiene varias regiones implicadas que actúan de forma conjunta. Se han llevado a cabo estudios en los que se observa la participación de las áreas del sistema olfatorio principal implicadas en la memoria, en los cuales se pretendió demostrar la importancia del GABA, que regula el proceso memoria y aprendizaje. A través de la inactivación de receptores de GABA, utilizando un anestésico (tertacaína) o un agonista del receptor (muscimol) por microdiálisis, se ha demostrado que el bulbo olfatorio, y las cortezas piriforme y entorrinal son esenciales para la formación de la memoria del reconocimiento selectivo del odorante. (Wilson y Lister. 2008).

Las neuronas que se forman en la neurogénesis son neuronas inhibitorias, gabaérgicas en su mayoría, y ayudan a regular constantemente las proyecciones glutamatérgicas hacia la corteza cerebral. Las sinapsis excitatorias-inhibitorias son cruciales en la formación de la memoria y aprendizaje (Menini, 2010).

La presentación del chocolate que le dimos a nuestros animales se llevó a cabo en intervalos constantes de tiempo. Las neuronas olfatorias en el epitelio olfatorio se adaptan a la estimulación repetida de olores. En esta habituación también se lleva a cabo una respuesta diferencial entre neuronas corticales. En particular, las neuronas de la corteza piriforme, presentan mayor actividad sináptica a estimulaciones prolongadas, a diferencia de las mitrales, dentro del bulbo olfatorio, las cuales responden en tiempos menos prolongados.

La adaptación cortical y el reconocimiento son específicos del odorante. En el rodador, la habituación puede durar minutos u horas, y en los humanos, hasta semanas. En los trabajos de Mcnamara en 2008, se determinó la diferencia entre la habituación larga y corta. Todas las neuronas de proyección que participan en el

bulbo olfatorio y corteza piriforme responden diferente, dependiendo de la estimulación que se le dé al animal, generando memoria de corto y largo plazo. Ambos tipos implican una actividad diferencial de los receptores glutamatérgicos en las neuronas inhibitorias. La activación del receptor NMDA está más relacionado a la habituación de largo plazo, Además, la actividad de este receptor participa en una gran cantidad de funciones, entre ellas, la plasticidad sináptica (Wilson y Lister. 2008).

En nuestro modelo, se ha observado daño en las neuronas mitrales y en la corteza cerebral (Jiménez, 2009); esto podría explicar el aumento en los tiempos registrados por los animales en ambos sexos, debido a que hay un retraso en el reconocimiento del chocolate. No obstante, la localización del odorante no se pierde. Las neuronas mitrales proyectan a partir de glomérulos hacia la corteza piriforme. Un solo odorante activa aprox del de 3% al 15% de las células de la corteza piriforme. Al contrario de las neuronas mitrales, las células piriformes no presentan tanta selectividad hacia los odorantes (Stettler y Axel, 2009); esto puede permitir que la función olfatoria no se pierda y pueda seguir proyectando al resto de la corteza cerebral .

Como se mencionó previamente, la gran mayoría de las interneuronas del bulbo son renovadas durante la neurogénesis en el adulto, un proceso que fue analizado en nuestro modelo.

10.2 Toxicidad del vanadio en la neurogénesis

La exposición a vanadio durante cuatro semanas produjo alteraciones en la función olfatoria y en la neurogénesis. En la ZSV y el TRM, disminuyó la proliferación celular, en especial de los astrocitos. En el bulbo olfatorio, se observó que la inhalación de V_2O_5 produjo pérdida neuronal en machos, con diferencias significativas en los tres grupos evaluados. La densidad neuronal en bulbo olfatorio en las hembras no presentó diferencias en los tres grupos evaluados. .

Una de las vías sugeridas de la entrada de vanadio al SNC es la ruptura de la barrera hematoencefálica (Ávila-Costa et al., 2004). La inhalación de V_2O_5 produce

ruptura del epitelio ependimal en ventrículos laterales (Jiménez, 2009) y cuarto ventrículo (Ávila-Costa et al., 2004). Además del pentóxido de vanadio, existen otros compuestos de vanadio que producen un efecto negativo en el SNC. Se ha reportado que el ortovanadato de sodio inhibe a las fosfatasas, alterando las uniones GAP (Vinken et al., 2010). Este tipo de uniones se encuentran en el epitelio ependimario de los ventrículos cerebrales. La comunicación mediante uniones tipo Gap en el tejido nervioso implica la difusión intercelular de sustancias hidrofílicas, como glucosa, glutamato, glutatión, etc. Esta unión gap es considerada como mecanismo fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso (Vinken et al., 2010).

La otra vía de entrada del vanadio es por medio del epitelio olfatorio. Los metales pueden entrar directamente por la cavidad nasal y hacer contacto con el epitelio olfatorio, y atravesar la placa cribosa por medio del nervio olfatorio (Doty, 2009). Este efecto se observó previamente en nuestro grupo de trabajo (Arenas, 2011). Dentro del SNC, los efectos del vanadio se atribuyen principalmente a su papel como generador de estrés oxidante. El SNC es susceptible al estrés oxidante por diversas formas, y esto podría repercutir en cambios degenerativos en nuestro modelo. En estudios previos, se observó muerte celular por necrosis y apoptosis en las células granulosas del bulbo olfatorio. El vanadio también genera alteraciones en corteza cerebral por peroxidación de lípidos (Jiménez, 2009), por lo cual diversas áreas de la corteza también podrían verse afectadas, como el caso de la corteza piriforme, que recibe aferencias del bulbo olfatorio.

La proliferación en la ZSV requiere de una gran diversidad de factores que pueden provenir de la irrigación. En los ventrículos cerebrales se produce el líquido cerebroespinal, un filtrado de la sangre que puede transportar moléculas necesarias para la proliferación. La alteración en la estructura de los plexos coroideos, observado en nuestro modelo (Jiménez, 2009) puede generar un efecto negativo en esta estructura.

Por otra parte, el vanadio produce daño genotóxico, entre los que se incluyen la oxidación de bases nitrogenadas o residuos de azúcares, entrecruzamientos entre cadenas de ADN (Fortoul et al., 2011). Entre los procesos que puede provocar la exposición a agentes tóxicos se encuentran el arresto mitótico (Fortoul et al.,

2011), inducción de la transcripción de genes, errores en la replicación e inestabilidad genética, generando como consecuencia la afectación en la proliferación celular en la ZSV .

Además, el óxido nítrico (ON) es un radical libre gaseoso producido por la enzima óxido nítrico sintasa, y participa como segundo mensajero en la señalización celular del sistema nervioso. En condiciones fisiológicas, el ON puede actuar como un agente positivo, al secretar el factor de crecimiento endotelial, después de un daño, y beneficiar la actividad proliferante (Moreno-López et al., 2004).

En la neurogénesis, la expresión del óxido nítrico sintasa en la ZSV es elevada, y dependiendo de su concentración puede promover o inhibir la proliferación de precursores neuronales (Sulz y Bacigalupo, 2006), sin embargo, no afecta la apoptosis. La afectación se da en la disminución de células en la fase del ciclo G2/M de los precursores neuronales. Estudios *in vitro* e *in vivo* se ha observado que la exposición a compuestos de vanadio incrementan la actividad de la óxido nítrico sintasa, lo que podría incrementar las concentraciones de ON en el tejido (Matarredona et al., 2005) y provocar un efecto negativo en la proliferación celular.

Otro de los factores que participan en la proliferación en la ZSV, son las aferencias de neuronas dopaminérgicas provenientes de la substantia nigra. Se ha observado en nuestro modelo, pérdida de neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra y decremento de espinas dendríticas en neuronas estriatales (Ávila-Costa et al., 2005).

Una vez llevada a cabo la proliferación de nuevas células, los precursores neuronales viajan junto con las células gliales hacia el bulbo olfatorio a través del TRM. El nicho neurogénico también está constituido por componentes extracelulares como la matriz extracelular. El contacto de los precursores con estos componentes es importante para su regulación (Matson y maguns, 2006). La composición del nicho neurogénico implica la participación de interacciones célula-célula, moléculas de la matriz extracelular y sustancias que llegan a la región neurogénica a través de los vasos sanguíneos o bien, son producidas por las propias células del nicho. Los neuroblastos dependen profundamente de la matriz

extracelular y del contacto con otros neuroblastos para su migración en pequeños grupos. Una de las características propias de la migración en cadena es que las células que migran continúan dividiéndose en el camino, aunque la tasa de proliferación es menor que en la ZSV y el ciclo celular se alarga. Ésta migración no solo depende de moléculas difusibles y de la relación entre los neuroblastos y de los astrocitos sino que, además, la dirección de la migración depende de la dirección del movimiento del líquido cefalorraquídeo en los ventrículos laterales, marcada fundamentalmente por los cilios de las células ependimarias. Por lo tanto, si hay una afectación en su epitelio, repercute en la migración celular.

La migración celular requiere un sustrato adecuado para la estructura catenaria entre neuroblastos y astrocitos. Esa tarea la realizan proteínas de la matriz extracelular como las integrinas y lamininas, así como las metaloproteinasas, que ayudan a degradar la matriz extracelular. La exposición a vanadio incrementa la actividad de las MMP's 2 y 9 (Colín-Barenque, et al 2007), lo cual podría afectar la migración de neuroblastos en el TRM. Además, el citoesqueleto formado por filamentos de actina y microtúbulos, es importante durante la migración y la diferenciación neuronal de neuroblastos a lo largo del TRM,.

Con respecto al proceso de diferenciación neuronal en el bulbo olfatorio, gran parte de las sinapsis se deben al desarrollo de neuritas de las neuronas. Esto implica la polimerización de elementos del citoesqueleto, como son filamentos de actina y microtúbulos. Por estudios previos, es conocido que el vanadio inhibe componentes del citoesqueleto como es la gamma-tubulina (Mussali-Galante et al., 2005). Otro de los blancos preferenciales que puede alterar los contactos sinápticos y puede generar neurotoxicidad, son las proteínas de membrana. El vanadio inhibe la ATPasa Na^+/K^+ ; este efecto altera las concentraciones iónicas de las células, y podría causar muerte por excitotoxicidad en el bulbo olfatorio (Imagen 11).

Como se mencionó anteriormente, las neuronas del bulbo olfatorio participan en la formación de memoria a corto y largo plazo. Estos procesos implican la participación de receptores, entre ellos, los glutamatérgicos. La formación de memoria se relaciona, entre otras cosas, a la fosforilación de algunas proteínas que participan en cascadas de señalización. El vanadio activa las ERK's e inhibe la

tirosina fosfatasa, bloqueando el sitio catalítico de la enzima, relacionada con la regulación de los receptores NMDA, que mantiene las concentraciones de Ca intracelular y está implicado en la formación de la memoria (Imagen12).

Se ha observado pérdida de espinas dendríticas de las neuronas granulosas del bulbo olfatorio, así como alteraciones ultraestructurales como vacuolización y condensación del citoplasma, rompimiento de mitocondrias, y muerte celular por necrosis y apoptosis (Fortoul et al., 2011).

Otra estructura cerebral que recibe aferencias de la corteza entorrinal y del bulbo olfatorio es el hipocampo. En dicha estructura también se reportó pérdida de espinas dendríticas de la región CA1 y alteraciones ultraestructurales (Ávila-Costa et al., 2006).

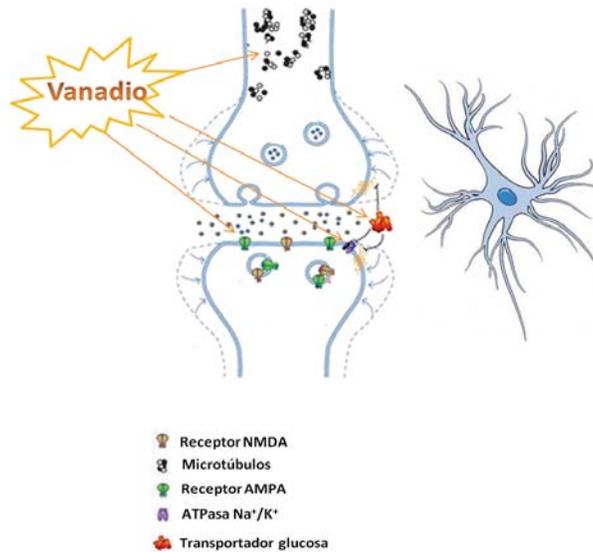


Imagen 11- El vanadio tiene diferentes blancos, como el citoesqueleto, inhibición de la ATPasa Na⁺/K⁺, esto puede generar una desregulación iónica y alterar otras proteínas de membrana como los transportadores de glucosa, y receptores NMDA, lo que puede producir muerte por excitotoxicidad. Modificado de <http://www.hindawi.com/journals/ijad/2011/189728/fig3/>

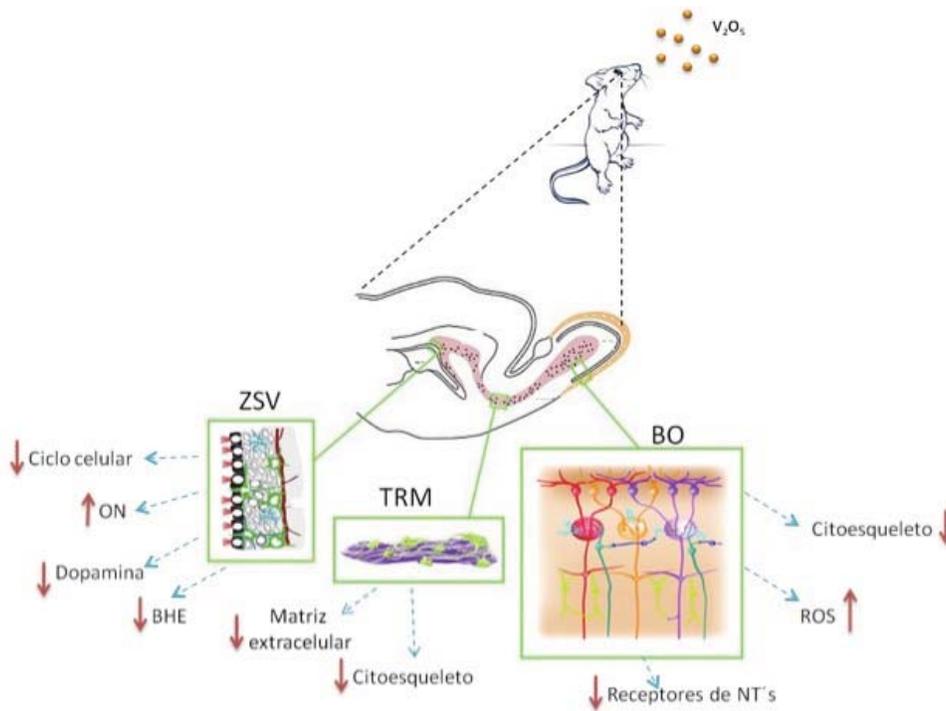


Imagen 12- Representación de las alteraciones que genera la inhalación de V_2O_5 en los animales.

10.3 Diferencias por sexo

En este estudio, observamos que la respuesta entre sexos fue diferente. Los machos sufrieron mayor pérdida neuronal en el bulbo olfatorio en comparación con las hembras. En los grupos de post-exposición, también se observó una respuesta diferencial. La proliferación de astrocitos fue mayor en las hembras, mientras que la proliferación de neuroblastos fue mayor en los machos.

Las hormonas sexuales han marcado diferencia en los procesos neurogénicos entre machos y hembras (Testas et al., 1992). Las neuronas y la glía en el SNC expresan las enzimas necesarias para la síntesis de neuroesteroides que son producidos en altas concentraciones suficientes para ejercer efectos en el sistema. La síntesis de neuroesteroides decrece con la edad, en condiciones tóxicas y en las enfermedades neurodegenerativas (Birger et al., 2003).

La diferenciación sexual en mamíferos en el SNC tiene un papel importante para modular la preferencia sexual y respuestas relacionadas con la reproducción.

Entre las hormonas esteroideas, la testosterona, una hormona masculina, actúa como una feromona; convierte la 5-alfa-dihidrotestosterona, y actúa sobre los receptores de andrógenos en el sistema, y puede ser convertida a estradiol por la enzima aromatasa, y actuar sobre los receptores de estrógenos que están en concentraciones más bajas en los machos, comparándolos con las hembras. Esta hormona se caracteriza por modular el comportamiento del macho. La agresividad en el comportamiento del macho se correlaciona con la actividad de la aromatasa en su cerebro (Birger et al., 2003).

La testosterona es secretada por los testículos y hormonas glándulas adrenales y transportada por la sangre por globulinas y la albúmina (Bialek et al., 2004).

Una de las acciones menos conocidas para esta hormona es la neuroprotección. Se sugiere que la testosterona ejerce acciones neurotróficas, por crecimiento de neuritas después de la activación de vías de señalización inducida por andrógenos en neuronas en cultivo. También aumentan el tamaño del soma y crecimiento de espinas dendríticas en motoneuronas (Bialek et al., 2004). Además, también hay evidencias de un papel no protector. No funciona como neuroprotector contra neurotoxicidad por metanfetaminas, por ejemplo. Tampoco ejerce neuroprotección contra neurotoxicidad excitatoria (Farooqui et al., 2008).

Por el contrario, la molécula que participa en diversas funciones neuroprotectoras, y en especial, sobre la neurogénesis, es el β -estradiol. Los estudios con estradiol en las etapas posnatales y adultas en el bulbo olfatorio principal, han reflejado que ratones hembra ovariectomizadas con administración exógena de β -estradiol, disminuye la proliferación celular en comparación con hembras intactas (Batista-

Brito et al. 2008). Se sabe que el tratamiento con estradiol exógeno disminuye la tasa de nuevas neuronas en la ZSV y en el bulbo olfatorio. A diferentes dosis se ha observado que el aumento en la proliferación requiere, junto con el estradiol, de la participación de otras moléculas, provenientes de otras hormonas sexuales, como la prolactina, que pudieran estar incrementando las acciones neuroprotectoras de los estrógenos en el proceso neurogénico (Batista-Brito et al. 2008).

Dentro de los efectos benéficos que tienen los estrógenos para estimular la neurogénesis, está la modulación y recaptura de los neurotransmisores, como es el caso de la dopamina. Los estrógenos ejercen control en la transmisión de la dopamina. Los receptores estrógenicos regulan la actividad transcripcional de numerosos genes, incluidos genes que codifican para proteínas del sistema dopaminérgico, como es el caso del precursor de la dopamina, la tirosina hidroxilasa. Se ha reportado que la activación del receptor alfa incrementa la transcripción y síntesis de ésta enzima precursora (Jones y Miller, 2008).

En este estudio se observó, que en las hembras control, la proliferación de los astrocitos es mayor, comparado con la proliferación de los neuroblastos. Sin embargo, el grupo expuesto a vanadio, mostró mayor disminución en la proliferación de la glía que los machos. A diferencia de la proliferación y migración de los neuroblastos, donde no se observaron cambios en los tres grupos de estudio, debido probablemente al aumento de la respuesta estrógenica por medio de los astrocitos (Batista-Brito et al. 2008) (Imagen 13).

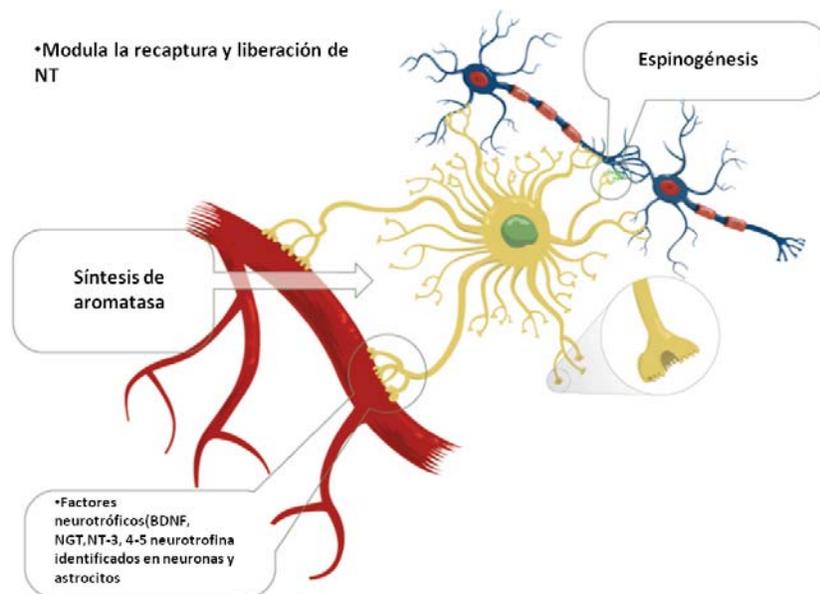


Imagen 13- Los astrocitos son las principales neuroprotectoras a través de la síntesis de aromatasas inducida por la acción estrogénica. Modificado de <http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/reward/cells.html>

Se ha demostrado que la actividad de los estrógenos incrementan la proliferación astrocítica (Testas et al., 1992). En este trabajo se observó que al suspender la exposición a vanadio, la proliferación y migración de los astrocitos aumento por encima de lo mostrado en los controles.

En la comparación entre sexos, observamos en el bulbo olfatorio, diferencias en la densidad neuronal en los tres grupos de estudio de las hembras. El efecto de los estrógenos en astrocitos beneficia la plasticidad sináptica (Dhandapani y Brann, 2002) (imagen 14).

Los astrocitos tienen el potencial para mediar los efectos neuroprotectores de los estrógenos. Son las células más abundantes del SNC y están implicadas en procesos de remodelación sináptica. Algunos estudios señalan la ruta de señalización de TGF- β 1 entre estrógenos y astrocitos, que puede tener implicaciones en los efectos de neuroprotección en el cerebro.

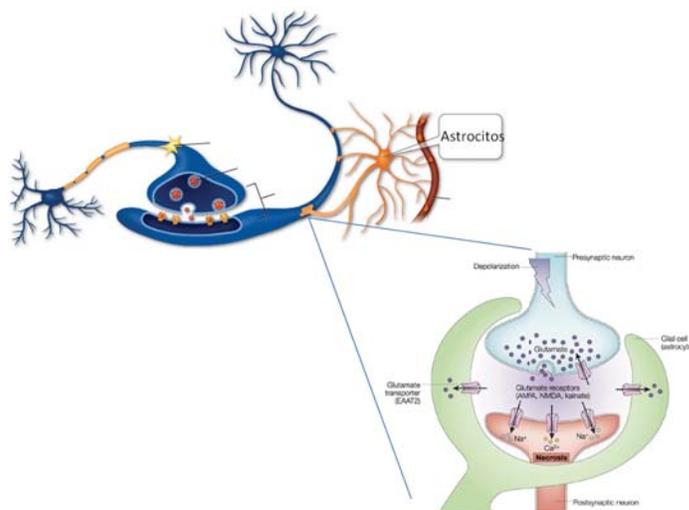


Imagen 13- La glía es parte del sistema que induce la plasticidad sináptica. Su principal modulación es a través de la recaptura de neurotransmisores, de esta forma, modula la concentración de neurotransmisores extracelulares, evitando la excitotoxicidad. Modificado de <http://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/reward/cells.html>

Como sucede en otros mamíferos, el sistema olfatorio del humano es sexualmente dimórfico, reportado con mayor frecuencia en roedores. Sin embargo, en humanos, algunas estructuras son dimórficas. Se sabe que los hombres adultos presentan cerebros más grandes, y compartimentos más grandes. Pero hay algunas áreas que en el cerebro no permiten diferenciarlas. Se ha observado en diversos estudios que los hombres presentan mayor volumen celular en la corteza entorrinal que las hembras, una región que es considerada como corteza olfatoria primaria que recibe aferencias del bulbo olfatorio. En roedores, su sistema olfatorio accesorio también es dimórfico, lo cual también ocurre en los humanos. Aunque se sabe el efecto de las feromonas en el humano, relacionado a la reproducción, su aparato vomeronasal no es funcional, por lo que el sistema olfatorio principal también tiene efecto con las feromonas (García Falgueras et al., 2006). En este estudio, sólo se observaron diferencias significativas en la prueba de reconocimiento de odorante. Sin embargo, a las 8 semanas de post-exposición, ambos sexos no presentan diferencias para la localización del chocolate, se comportaron de forma similar.

10.4 Plasticidad sináptica

Una de las características que presenta el bulbo olfatorio para llevar a cabo el proceso neurogénico es la capacidad plástica que presenta la circuitería del bulbo olfatorio. En este estudio, observamos que la neurogénesis se afectó con la exposición a vanadio, pero la proliferación y migración celular continuó realizándose.

El sistema olfatorio del mamífero está organizado por medio de los mapas sensoriales que se han formado desde el desarrollo del SNC, y puede permanecer dinámico más allá de las alteraciones que se presenten, como se observó en la

pérdida de las células granulosas en el bulbo olfatorio observada en este estudio. Estudios previos, refieren aumento en el número de espinas dendríticas de las neuronas granulosas de bulbo olfatorio de ratones de ambos sexos con 8 semanas posteriores a la inhalación de V_2O_5 (Moscoso, 2009), así como recuperación en el epitelio olfatorio con el mismo modelo de exposición (Arenas, 2011), lo que sustenta las observaciones realizadas en este estudio y refleja la plasticidad de esta estructura cerebral.

El microambiente influencia en todo momento la proliferación de los precursores neuronales. En la ZSV y el TRM, los factores que circulan en la sangre, ayudan a regular el potencial pluripotencial de los astrocitos. Los precursores neuronales adquieren propiedades funcionales de membrana para integrarse en las redes funcionales en el bulbo olfatorio (Ortega et al., 2008).

La transmisión sináptica es muy dinámica, los circuitos neuronales del bulbo olfatorio presentan continuamente cambios morfológicos, dependiendo de la repetición de los estímulos a los que están expuestos, de la experiencia y de la apoptosis que sufre el sistema. Las interneuronas del bulbo olfatorio presentan diferencias morfológicas y fisiológicas, lo que las hace responder distintamente a los estímulos. Por ejemplo, las células periglomerulares expresan receptores dopaminérgicos y gabaérgicos, a diferencia de las granulosas, que sólo presentan receptores gabaérgicos (Batista-Brito et al. 2008).

En este estudio, observamos con NeuN las neuronas maduras en las capas glomerular y granulosa del bulbo olfatorio a las 4 semanas de inhalación de V_2O_5 y a las 8 semanas de post-exposición. La capacidad de éstas células para integrarse a las redes neuronales de ambas capas se atribuye a la diversidad de contactos sinápticos que establecen. Entre los componentes que determinan ésta capacidad plástica, el citoesqueleto es fundamental. Hay factores de crecimiento que ayudan a regular la formación de filamentos del citoesqueleto para establecer sinapsis. Uno de ellos es el NGF y la cofilina, El primero promueve la migración neuronal, y mantiene la despolimerización de los filamentos de actina mediante la desfosforilación de la cofilina (Kronenberg et al., 2010). Esta sincronización entre la expresión de ambos factores participa en la maduración de los neuroblastos en el bulbo olfatorio (Kronenberg et al., 2010).

La plasticidad que presentan las células del bulbo olfatorio, está acompañada tanto de la repetición del estímulo presentado en el animal, como de la experiencia que represente para éste. En la prueba de reconocimiento del odorante, utilizamos piezas de chocolate, un aroma y un sabor que fue agradable para los animales utilizados. Estos factores pudieron estar implicados en el desarrollo de la memoria olfatoria que generaron a lo largo del tratamiento. Se ha estudiado que la conjunción en la respuesta del animal en el condicionamiento de un aroma desagradable y un evento que provoque miedo en él, modifica la morfología de los glomérulos que procesan este aroma, y produce aprendizaje a la estimulación negativa que percibió el animal previamente (Jones et al., 2008).

Los niveles de excitación e inhibición neuronal en la circuitería del bulbo olfatorio, es clave para la plasticidad sináptica, y para generar memoria olfatoria (Mcnamara et al., 2008). En respuesta a la repetición y la estimulación en el bulbo olfatorio, los circuitos olfatorios presentan muchos cambios neuronales: plasticidad sináptica a corto y largo plazo.

En el sistema olfatorio, la plasticidad a corto plazo ocurre en el bulbo olfatorio y la corteza piriforme. Se ha demostrado en roedores, que ésta adaptación se debe principalmente a la activación de receptores presinápticos metabotrópicos (mGluR) en las células mitrales. Este mecanismo provoca una adaptación en corteza piriforme. La plasticidad a corto plazo implican cambios en las neuronas en presentaciones muy breves de los estímulos (Urbana y Arevianb, 2009)..

Las sinapsis dopaminérgicas también son mediadoras de los procesos de memoria olfatoria. Los axones de las neuronas olfatorias expresan dopamina y tienen receptores D2. Las neuronas periglomerulares pueden ser dopaminérgicas o gabaérgicas. El contacto entre neuronas olfatorias y periglomerulares ayuda a regular la activación de receptores dopaminérgicos, localizados en la membrana de las mismas periglomerulares, como el receptor NMDA. Esto tiene efecto en la regulación de las células mitrales. En nuestro modelo, la afectación en el epitelio olfatorio provocada por la entrada de vanadio (Arenas 2011), podría actuar sobre la afinidad de las neuronas olfatorias hacia los glomérulos y perjudicar esta plasticidad a corto plazo.

Los receptores NMDA también están presentes en las células mitrales y en las neuronas granulosas, y contribuyen al feedback de la circuitería. La liberación de GABA depende de la activación del NMDA, lo que genera la entrada de corrientes de Ca intracelular (Mcnamara et al., 2008).

Las sinapsis entre neuronas granulosas y mitrales han estado implicadas en la plasticidad a largo plazo. La granulosas expresan receptores NMDA, AMPA y altos niveles de CAMKII, cinasas implicadas en rutas de señalización que actúan como mediadores en procesos de memoria y aprendizaje.

El balance entre la excitación e inhibición sináptica dentro del bulbo olfatorio, representa un reto constante para las neuronas; esto puede generar una sincronía que aumente a su vez la probabilidad de tener plasticidad y aprendizaje (Urbana y Arevianb, 2009).

Sugerimos que al suspender la exposición a vanadio, los animales de ambos sexos, desarrollaron cambios en en la circuitería para responder de mejor forma a las estimulaciones olfatorias que presentábamos con el chocolate. Entre los procesos que implican plasticidad sináptica, hay mayor actividad de los receptores glutamatérgicos y gabaérgicos y además se presentan cambios en la morfología de las dendritas dentro del bulbo olfatorio y la corteza piriforme.

Por otra parte, ocho semanas posteriores a la inhalación de V_2O_5 fueron suficientes para que el sistema aumentara la proliferación y migración celular en un ambiente libre de vanadio, y se incrementara el reemplazo de nuevas neuronas en el bulbo olfatorio, como se observó en los machos. Este recambio posiblemente permitió una mejor respuesta observada en la prueba del reconocimiento del chocolate.

Nuestros resultados reflejan que la neurogénesis disminuye ante la exposición a un elemento tóxico como es el vanadio, repercutiendo en la función olfatoria del animal y el proceso neurogénico en ZSV, TRM y la densidad neuronal en el bulbo olfatorio. Durante el periodo de post-exposición, la respuesta de los animales fue diferente entre sexos. Los neuroblastos proliferaron y migraron más en el caso de los machos, mientras que las hembras lo hicieron con los astrocitos.

Existe mucha controversia al momento de explicar la funcionalidad de la neurogénesis. Algunos autores la describen como un mecanismo necesario para mantener la estabilidad del sistema olfatorio a lo largo de toda a vida; mientras que otros lo ven como un mecanismo de respuesta a los constantes desafíos a los que se encuentra el olfato (López et al 2004).. Consideramos que estas concepciones depende del modelo utilizado y del tipo de estudio a realizar. En nuestro modelo, la neurogénesis nunca se interrumpió, pero disminuyó durante la inhalación de V_2O_5 . Esto pudo significar un “desafío” para los animales de ambos sexos; y se vio reflejado en los valores que mostraron los animales en el grupo de post-exposición.

10.5 Relación entre la edad, enfermedades neurodegenerativas y la neurogénesis

La transición de la edad adulta a la vejez es un proceso natural, en el cual se presenta, dependiendo del individuo, el deterioro de funciones biológicas después de que el organismo ha llevado a cabo su plena etapa reproductiva.

El estrés oxidante también es un proceso terminal común. Sin embargo, la exposición a agentes contaminantes puede acelerar estos procesos y causar un grado de deterioro mayor en el organismo. Esto está relacionado con la pérdida de la memoria, afectado e la corteza prefrontal, donde se ubica el bulbo olfatorio.

Con la edad, los astrocitos generan grandes concentraciones de ON, que puede afectar el proceso de proliferación.

Las neuronas y la glía en el SNC expresan las enzimas necesarias para la síntesis de neuroesteroides que son producidos en altas concentraciones suficientes para ejercer efectos en el sistema. La síntesis de neuroesteroides decrece con la edad, en condiciones tóxicas y en las enfermedades neurodegenerativas.

En relación a la cepa de ratón que utilizamos, podemos decir que es una cepa de crecimiento rápido y con alta tasa reproductiva. Estos ratones pueden llegar a vivir hasta los 2 años. Cabe señalar que una vez que se registró el tiempo cero, los ratones tenían un mes de vida. Al terminar el periodo de exposición a vanadio y el

periodo post-exposición, los ratones tenían 4 meses de vida, y ya eran considerados como una edad adulta en éstos roedores.

En el cerebro adulto, las neuronas experimentan altos niveles de estrés oxidante, homeostasis alterada, acumulación de proteínas dañadas, daño en los ácidos nucleicos y alteraciones en los neurotransmisores (Mattson y Magnus, 2006). Estos cambios pueden resultar en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, asociado a factores genéticos y ambientales, como puede ser la exposición a contaminantes.

La disminución de la neurogénesis se presenta en el envejecimiento en humanos y en las enfermedades neurodegenerativas. En etapas tempranas los pacientes con enfermedad de Alzheimer y Parkinson muestran disfunción olfatoria, asociada a una significativa pérdida neuronal en el bulbo olfatorio y en el núcleo olfatorio anterior (Zhao et al. 2008, Doty, 2009). Los metales son parte de los factores de riesgo en la generación de dichas enfermedades. Las personas expuestas a la contaminación atmosférica muestran disfunción en el olfato, inflamación del bulbo olfatorio y otras estructuras de corteza cerebral relacionadas con el olfato (Doty, 2009).

En relación a la neurogénesis en bulbo olfatorio, se ha observado en pacientes con Alzheimer la acumulación de beta amiloide en la ZSV y genera muerte celular de precursores neuronales. En los pacientes con enfermedad de Parkinson, hay reducción en las aferencias dopaminérgicas provenientes de la substantia nigra, lo que origina muerte de las células tipo C, que contienen receptores dopaminérgicos D2 y D3 (Curtis et al., 2007).

Los metales son de los neurotóxicos más conocidos (Caban-Holt et al., 2005). En nuestro estudio, el vanadio, resultó ser un elemento neurotóxico en la neurogénesis, en diferentes blancos celulares. Estos efectos se suman a las evidencias de otros trabajos utilizando el mismo modelo. (Jiménez, 2009).

11. Conclusiones

- La exposición a V_2O_5 por vía inhalada tiene como consecuencia disminución en la proliferación celular en la ZSV y el TRM en el cerebro adulto. La proliferación celular en la ZSV y la migración en TRM fue mayor en las hembras.
- La función olfatoria se afecta más en los machos después de 4 semanas de exposición a vanadio. Sin embargo, la capacidad para recuperar las alteraciones generadas por el vanadio no presentó diferencias en ambos sexos después de 8 semanas de exposición al vanadio
- La presentación crónica de un odorante como el chocolate a través de intervalos constantes de tiempo produjo el desarrollo de memoria olfatoria en los animales de ambos sexos.
- El vanadio produce alteraciones en la neurogénesis, en las hembras hubo mayor pérdida de astrocitos. En los machos, la pérdida de neuronas maduras en el bulbo olfatorio fue mayor
- Las hembras conservan la densidad neuronal en ambas capas del bulbo olfatorio observadas, su mecanismo de regulación puede deberse a la regulación en la proliferación y migración de astrocitos.
- Después de 8 semanas de haber suspendido la inhalación a vanadio, el bulbo olfatorio recuperó la densidad neuronal de las capas que presentan neurogénesis. Además, durante este tiempo se revirtieron las alteraciones generadas en la función olfatoria
- En este estudio se demostró la capacidad del bulbo olfatorio para recuperarse después de haber sufrido un daño tóxico y conservar su función, la cual es vital para mantener la principal vía de sobrevivencia del ratón, su sistema olfatorio.

12. Bibliografía

Aguirre A, Rizvi T.A., Ratner N., Gallo V. 2005. **Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors.** J Neurosci 25:11092–11106.

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

Altman J. 1962. **Are new neurons formed in the brains of adult mammals?** Science 135:1127–28.

Altman J. 1969. **Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.** J Comp Neurol 137:433–58.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo J.M., Tramontin A.D. 2001. **A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells.** Nat Rev Neurosci 2:287–93.

Arévalo M, Santos-Galindo M, Lagunas N, Azcoitia I y Garcia-Segura L. 2011. **Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents.** Journal of Molecular Endocrinology 46: R1–R9

Arenas A. 2011. **Efecto de la exposición por inhalación de vanadio sobre la mucosa olfatoria en un modelo murino. Diferencias por sexo.** Tesis de licenciatura

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

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

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

Axel R. 2009. **Representations of odor in the piriform cortex.** Neuron 63: 854-864

Batista-Brito R. 2008. **The Distinct Temporal Origins of Olfactory Bulb Interneuron Subtypes.** The Journal of Neuroscience 28(15):3966 -3975

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

Balenci L, Saoudi Y, Grunwald D, Deloulme J.C., Bouron A, Bernards A, Baudier J. 2007. **IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro.** J Neurosci 27:4716-24.

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

Bath K y Lee F. 2010. **Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis.** Develop Neurobiol 70: 339-349

Behl C, Skutella T, Lezohualch F. 1997. **Neuroprotection against oxidative stress by estrogens sctstructure activity relationship.** Mol Pharmacol 51:535-541.

Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J y Lo Turco J. 2003. **Electrophysiological Differentiation of New Neurons in the Olfactory Bulb.** The Journal of Neuroscience 23(32):10411-10418

- Bialek M, Zaremba P, Borowicz K, Stanislaw J. 2004. **Neuroprotective role of testosterone in the nervous system.** Pol. J. Pharmacol 56: 509-518
- Block M y Calderón-Garcidueñas L. 2009. **Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease.** Trends in Neuroscience 32(9): 506-516
- Briggs D. 2003. **Environmental pollution and the global burden of disease.** Br Med Bull 68:1-24.
- Brunekreef B y Holgate S. 2002. **Air pollution and health.** Lancet 360:1233-42.
- Caban-Holt A, Mattingly M, Cooper G y Schmitt F. 2005. **Neurodegenerative Memory Disorders: A Potential Role of Environmental Toxins.** Neurol Clin 23 (2005) 485-521
- Calderón-Garcidueñas L, Mora-Tiscareño A, Ontiveros E, Gómez-Garza G, Barragán-Mejía G, Broadway G, Chapman S, Valencia-Salazar G, Jewells V, Maronpot R, Henríquez-Roldán C, Pérez-Guillé B, Torres-Jardón R, Herrit L, Brooks D, Osnaya-Brizuela N, Monroy M, González-Maciel A Reynoso-Robles R, Villarreal-Calderon R, Solt A y Engle R. 2008. **Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs.** Brain and Cognition :1-11
- Carleton A., Petreanu L.T., Lansford R., Alvarez-Buylla A., Lledo P.M. 2003. **Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb.** Nat Neurosci 6:507-18.
- Cecchi G.A., Petreanu L.T., Alvarez-Buylla A., Magnasco M.O. 2001. **Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis.** J Comput Neurosci 11:175-82.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris A y Gravanis A. 2008. **Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival** Cell Press :300-307
- Dalton PH y Jaén C. 2010. **Responses to odors in occupational environments.** Curr Opin Allergy Clin Immunol.10(2):127-32.
- Davison I y Ehlers M. 2011. **Neural Circuit Mechanisms for Pattern Detection and Feature Combination in Olfactory Cortex.** Neuron 70: 82-94

- De Maria y Ngai J. 2010. **The cell biology of smell.** J. Cell Biol. 191(3): 443-452
- Doty R. 2009. **The olfactory system and it's disorders.** Semin Neurol 29: 74-81
- Doty, R.L. 2008. **The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? .** Ann. Neurol 63: 7-15
- Doty R. 2009. **The Olfactory System and Its Disorders.** Seminars in Neurology 29(1):74-81
- Ennis M, Hamilton K y Hayar A. 2007. **Neurochemistry of the main olfactory system.** Springer-Verlag Heidelberg: 139-182
- Falkenstein E, Tillman HC, Christ M, Feuring M, y Wehling M. 2003. **Multiple actions os steroid hormones- afocus on rapid, nongenomic effects.** Pharmacol Revs 52(4):513-556.
- Farooqui, T, Farooqui, A. 2009. Aging: An Important Factor for the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases, Mechanisms of Ageing and Development 130(4):203-215
- Ferguson J, Young L, Hearn E, Matzuk M, Insel T y Winslow J. 2000. **Social amnesia in mice lacking the ocytocin gene.** Nature Genetics 25: 284-288
- Fernández-Bremauntz A. 2008. **Air Quality Management in Mexico.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 71:1, 56 - 62
- Fortoul TI, Osorio LS, Tovar AT, Salazar D, Castilla ME, Olaiz-Fernandez G. 1996. **Metals in lung tissue from autopsy cases in mexico City residents: comparison of cases from the 1960s and the 1990s.** Environ Health Perspect 104:630-632.
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldivar-Osorio L, Espejel-maya G, Ávila-Casado MC, Avila-Costa MR, Colín Barenque L, Navarro-Villanueva D y Olaiz-Fernández G. 2002. **Vanadium in ambient air: Concentrations in Lung Tssue from Autopsies of Mexico city residents in 1960s and 1990s.** Arch Environ Health 57:446-449.

Fortoul TI, Rodriguez-Lara V, Gonzalez-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano- Gutierrez G, Ustarroz-Cano M, Colin-Barenque L, Montaña LF, García-Pelez I, Bizarro-Nevarés P, Lopez-Valdez N, Falcon-Rodriguez CI, Jimenez-Martínez RS, Ruiz-Guerrero ML, López-Zepeda LS, Morales-Rivero A y Muñoz-Rivera-Cambas A. 2011. **Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particles systemic repercussion.** Journal of Biomedicine and Biotechnology

Fried HU, Fuss SH, Korsching SI 2002. **Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli.** Proc Natl Acad Sci 99:3222–3227.

Galli R., Fiocco R., De Filippis F.L., Muzio L., Gritti A., Mercurio S., Broccoli V., Pellegrini M., Mallamaci A., Vescovi A.L. 2002. **Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system.** Development 129:1633–44.

Gakhar-Koppole N., Bengtson C.P., Parlato R., Horsch K., Eckstein V., Ciccolini F. 2008. **Depolarization promotes GAD 65-mediated GABA synthesis by a post-translational mechanism in neural stem cell derived neurons.** Eur J Neurosci. 2008;27:269–83.

García-González D y de Castro F. 2011. **¿Cómo se conecta la olfacción? Mecanismos celulares y moleculares que dirigen el desarrollo de las conexiones sinápticas desde la nariz hasta la corteza (I).** Rev Neurol 52: 477-488 (González y De Castro. 2011)

Genazzani A, Pluchino N, Luisi S y Luisi M. 2007. **Estrogen, cognition and female ageing.** *Human Reproduction Update* 13(2): 175–187

Hashimoto-Torii K., Torii M., Sarkisian M.R., Bartley C.M., Shen J., Radtke F., Gridley T., Sestan N., Rakic P. 2008. **Interaction between Reelin and Notch signaling regulates neuronal migration in the cerebral cortex.** Neuron 60:273–84.

Hawkes C. 2003. **Olfaction in Neurodegenerative disorder.** Movement Disorders 18(4): 364-372.

Hawkes C, Shepard B, Daniel S. 1997. **Olfactory dysfunction in Parkinson's disease.** J Neurol Neurosurg Psychiatry 65:436-446.

Hu H. 1999. **Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain.** Neuron. 1999;23:703-11.

Hartz A, Bauer B, Block M, Hong J y Miller D. 2008. **Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier.** The FASEB Journal 22

Hudson R, Arriola A, Martínez-Gómez M y Distel H. 2006. **Effect of air pollution on olfactory function in residents of Mexico City.** Chem Senses 31: 79-85.

Hsu CT, Patton DF, Mistlberger RE, Steele AD. 2010. **Palatable Meal Anticipation in Mice.** PLoS ONE 5(9)

Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T y Kageyama R. 2009. **Continuous neurogenesis in the adult brain.** Develop. Growth Differ. 51: 379-386

Jones D y Miller G. 2008. **The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction.** Biochemical pharmacology 76: 569-581

Kelsch W, Sim S y Lois C. 2010. **Watching Synaptogenesis in the Adult Brain.** Annual Review of Neuroscience 33: 131-149

Kennedy M y Ehlers M. 2011. **Mechanisms and Function of Dendritic Exocytosis.** Neuron 69(5): 856-875

Kosaka T y Kosaka K. 2011. **"Interneurons" in the olfactory bulb revisited.** Neuroscience Research 69:93-99

Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K y Sakano H. 2007. **Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb.** Nature. 450(7169): 503-508.

Krishnan M Dhandapani y Darrell W Brann. 2002. **Estrogen-Astrocyte interactions: Implications for neuroprotection** *BMC Neuroscience* 3 no esta citada,incompleta

Kronenberg G, Gertz K, Baldinger T, Kirste I, Eckart S, Yildirim F, Ji S, Heuser I, Schrock H, Hörtnagl H, Sohr R, Djoufack PC, Jüttner R, Glass R, Przesdzing I, Kumar J, Freyer D, Hellweg R, Kettenmann H, Fink K y Endres M. 2010. **Impact of Actin Filament Stabilization on Adult Hippocampal and Olfactory Bulb Neurogenesis.** *The Journal of Neuroscience* 30(9):3419 –3431 • 3419

Imayoshi I, Sakamoto M., Ohtsuka T., Takao K., Miyakawa T., Yamaguchi M., Mori K., Ikeda T., Itohara S., Kageyama R. 2008. **Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain.** *Nat Neurosci* ;11:1153–61.

Lledo PM, Saghatelian A y Lemasson M. 2004. **Inhibitory interneurons in the olfactory bulb: from development to function.** *Neuroscientist* 10: 292-303

Lledo PM, Gheusi G y Vincent J. 2006. **Information Processing in the Mammalian olfactory system.** *Physiol Rev* 85: 281-317

Lledo PM, Merkle F y Alvarez-Buyila A. 2008. **Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity.** *Trends in Neuroscience* 31(8): 392–400

Lledo PM, Saghatelian A y Lemasson M. 2004. **Inhibitory Interneurons in the Olfactory Bulb: From Development to Function.** *Neuroscientist* 10; 292

Li H.S., Chen J.H., Wu W., Fagaly T., Zhou L., Yuan W., Dupuis S., Jiang Z.H., Nash W., Gick C., Ornitz D.M., Wu J.Y., Rao Y. 1999. **Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons.** *Cell* 96:807–18.

Lowe G. 2007. **Olfactory Bulb: Synaptic Organization.** *Encyclopedia of life Sciences*

Martončíková M, Lievajová M, Orendáčová J, Blaško J y Račková E. 2011. **Odor enrichment influences neurogenesis in the rostral migratory stream of young rats.** Acta Histochem 113(3): 326 no esta citado

Mattson P y Magnus T. 2006. **Ageing and neuronal vulnerability** Nature Reviews 7:278-294

McNamara A, Magidson P, Linster C, Wilson D y Cleland T. 2008. **Distinct neural mechanisms mediate olfactory memory formation at different timescales.** 15:117-125

Menini A. 2010. **The neurobiology of olfaction.** Frontiers in Neuroscience. CRC Press. USA. 418 pp.

Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K y Wedzony K. et al. 2004. **Neurogenesis in the adult brain.** Revista de Neurología 44 (6): 673-687

Marin R, Guerra B, Alonso R, Ramírez CM y Díaz M. 2005. **Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection.** Curr Neurovasc Res 2(4):287-301.

Mcnamara A, Magidson P, Linster C, Wilson D y Cleland T. 2008. **Distinct neural mechanisms mediate olfactory memory formation at different timescales.** Learning and Memory 15: 117-125

Menini A. 2010. **The neurobiology of olfaction.** CRC Press. USA. 418 pp.

Moreno-López B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona E y Estrada C. 2004. **Nitric Oxide Is a Physiological Inhibitor of Neurogenesis in the Adult Mouse Subventricular Zone and Olfactory Bulb.** The Journal of Neuroscience, 24(1):85-95

Moscoso F. 2010. **Recuperación funcional y citológica en Bulbo Olfatorio posterior al daño inducido por la inhalación a Pentóxido de Vanadio (V₂O₅) en un modelo murino. Diferencias por género.** Tesis de licenciatura

Nagashima A y Touhara K. 2010. **Enzymatic Conversion of Odorants in Nasal Mucus Affects Olfactory Glomerular Activation Patterns and Odor Perception.** J Neurosci 30(48):16391-16398

Nissant A, Bardy C, Katagiri H, Murray K y Lledo PM. 2006. **Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb.** Nature Neuroscience 12(6): 728-730

Nicola A. 2003. **Vaivenes de las hormonas esteroideas en el sistema nervioso central: de la toxicidad a la neuroprotección.** MEDICINA 200(63): 475-478

Ping S, Trieu J, Wlodek M y Barrett G. 2008. **Effects of Estrogen on Basal Forebrain Cholinergic Neurons and Spatial Learning.** Journal of Neuroscience Research 86:1588-1598

Ramon y Cajal S. **Degeneration and Regeneration of the Nervous System.** London: Oxford University Press; 1913. 1928. Trans. R. M. Day, from the Spanish.

Stettler D y Ruiz L y Bacigalupo J. 2006. **Role of nitric oxide during neurogenesis in the olfactory epithelium.** *Biol Res* 39: 589-599, 2006

Sánchez G, James B y Kendrick K. 2005. **Neural encoding of olfactory recognition memory.** Journal of Reproduction and development 51(5): 547-558.

Stettler D y Axel r. 2009. **Representations of Odor in the Piriform Cortex.** Neuron 63, 854-864

Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene Gl y Baulien EE. 1992. **Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:621-631

Upadhyay U y Holbrook E. 2004. **Olfactory loss as a result of toxic exposure.** Otolaryngol Clin N AM 37: 1185-1207

Urbana N y Arevianb A. 2009. **Computing with Dendrodendritic Synapses in the Olfactory Bulb.** International Symposium on Olfaction and Taste: Ann. N.Y. Acad. Sci. 1170: 264-269

Veyrac A y Bakker J. 2011. **Postnatal and adult exposure to estradiol differentially influences adult neurogenesis in the main and accessory olfactory bulb of female mice.** The FASEB Journal (25): 1048-1057

Vinken M, Ceelen L, Vanhaecke T y Rogiers V. 2010. **Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by Toxic Metals.** Chem. Res. Toxicolc23:1862–1867

Yuan T. 2010. **Smell with new neurons.** Cell Tissue Res :340:211

Whitman M y Greer C. 2009. **Adult neurogenesis and the olfactory system.** Progress in neurobiology 89: 162-175

Wooley C. 1999. **Effects of estrogen in the CNS.** Current Opinion in Neurobiology 9:349-354

Whitman M y Greer C. 2009. **Adult neurogenesis and the olfactory system.** Progress in neurobiology 89: 162-175

Wu T, Wang J, Chen S y Brinton R. 2005. **17 B-estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type alcium channels activates the potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection.** Neuroscience 135(1): 59-72.

Zhao C, Deng W y Gage F. 2008. **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** Cell 132: 645-660

Wilson A y Linster C. 2008. **Neurobiology of a Simple Memory** *J Neurophysiol* 100: 2–7,

Wilson D. **Olfaction as a model system for the neurobiology of mammalian short-term habituation.** Neurobiology of Learning and Memory 92 (2009) 199–205

Zhao C, Deng W y Gage F. 2008. **Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis.** Cell 132: 645–660