



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Estudio morfofuncional del efecto de la carnosina en corteza
motora en un modelo murino por inhalación de vanadio.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

EDITH GUADALUPE PERETE CORTES



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

2016

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno	Perete
Apellido materno	Cortes
Nombres	Edith Guadalupe
Teléfono	(044-55) 14-05-05-52
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o escuela	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	309309127

2. Datos del tutor

Grado	Dra.
Nombre	Laura
Apellido paterno	Colin
Apellido materno	Barenque

3. Datos del sinodal 1

Grado	Dra.
Nombre	Teresa Imelda
Apellido paterno	Fortoul
Apellido materno	Vander Goes

4. Datos del sinodal 2

Grado	Dr.
Nombre	Mario Agustín
Apellido paterno	Altamirano
Apellido materno	Lozano

5. Datos del sinodal 3

Grado	Dr.
Nombre	Paul
Apellido paterno	Carrillo
Apellido materno	Mora

6. Datos del sinodal 4

Grado	Dra.
Nombre	Adriana Elizabeth
Apellido paterno	González
Apellido materno	Villalva

7. Datos del trabajo escrito

Título	Estudio morfofuncional del efecto de la carnosina en corteza motora en un modelo murino por inhalación de vanadio.
Número de páginas	55 páginas
Año	2016

Agradecimientos

Deseo extender un especial agradecimiento a la Dra. Laura Colín Barenque por ser más allá que una tutora durante este trabajo, llego a ser para mí un gran ejemplo como persona tanto en el aspecto profesional como en el personal, ya que estuvo dispuesta en ayudarme en las dificultades que tuve durante el tiempo que compartimos. A su vez quiero agradecerle por la paciencia y la pasión para despertar en mí el interés en las Neurociencias. Le agradezco sus valiosas enseñanzas que siempre tendré presente en la vida.

Agradezco a la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes por abrirme las puertas en el laboratorio y permitir integrarme al grupo de trabajo. Así como a la M.en C. Patricia Bizarro Nevares, Dra. Adriana González Villalva y a la Dra. Marcela Rojas Lemus por su apoyo en cada uno de los aspectos de este trabajo. A su vez agradezco a mis compañeros de laboratorio Susana, Katia, Brenda, Javier y Mariana con quienes pase momentos muy especiales y por contar con su apoyo.

Agradezco al Biol. Armando Zepeda Rodríguez y al Biol. Francisco Pasos Najera por su apoyo en la parte fotográfica.

Agradezco al comité de revisión de tesis: Dr. Mario Altamirano, Dra. Laura Colín, Dra. Teresa Fortoul, Dra. Adriana González y al Dr. Paul Carrillo por su tiempo y sobre todo por sus valiosos comentarios y observaciones para el perfeccionamiento de mi trabajo.

A su vez quiero agradecer desde el fondo de mi corazón a todos los ratoncitos que formaron parte en esta investigación, ya que sin ellos no hubiera sido posible la realización de este proyecto, siempre les estaré agradecida.

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas (PAPIIT) con clave IN220414.

Dedicatorias

A mis padres los cuales día a día han sido mi motivación para alcanzar cada una de las metas que me proponga. Gracias por ser un gran ejemplo para mí, ambos me han enseñado que cuando la vida te pone retos hay que enfrentarlos con determinación y esfuerzo, que nada en la vida es fácil pero tampoco es imposible. Su amor y confianza son unas de las tantas cualidades que me han permitido ser la persona que soy actualmente.

A mis hermanas Jacque y Moesha quienes siempre me han apoyado en cada una de mis decisiones, gracias por ser esas columnas que me dan el sostén cuando estoy desanimada, por darme los ánimos para osarme en nuevos proyectos. Las amó mucho a las dos, mi vida es increíble a lado suyo.

A mis amigos Anahí, Mari Carmen, Nitze, Selene, Isaura y Domeki quienes hicieron inolvidable mi estancia en la facultad, gracias por todos los momentos divertidos que pasamos juntos y por sus palabras de aliento cuando más las necesitaba. Gracias por estos años de amistad, los quiero mucho.

A Clau Rodríguez, Meli Ortiz, Nancy Alcantara, y Gaby Vázquez por contar siempre con su apoyo, brindarme su confianza y amistad.

También agradezco a todos los profesores que me instruyeron en la carrera, gracias por todos los conocimientos tan valiosos que me han comunicado, los cuales cada día me introducen en lo fascinante que resulta ser la biología.

Índice

	<i>Página</i>
• <i>Tabla de abreviaturas</i>	7
<i>I. Introducción</i>	11
<i>I.1 Contaminación atmosférica</i>	11
<i>I.1.1 Contaminación en México</i>	12
<i>I.2 Vanadio</i>	13
<i>I.2.1 Antecedentes</i>	13
<i>I. 2.2 Generalidades</i>	13
<i>I.2.3 Distribución</i>	14
<i>I.2.4 Toxicocinética</i>	15
<i>I.2.5 Toxicodinamia</i>	16
<i>I.2.6 Toxicidad del vanadio en el sistema nervioso</i>	17
<i>I.3 Estrés oxidante</i>	18
<i>I.4 Antioxidantes</i>	18
<i>I.4.1 Carnosina</i>	20
<i>I.5 Corteza cerebral</i>	23
<i>I.5.1 Espinas dendríticas</i>	28
<i>II. Justificación</i>	30
<i>III. Hipótesis</i>	31
<i>IV. Objetivos</i>	31
<i>IV.1 Objetivo general</i>	31
<i>IV.2 Objetivos particulares</i>	31
<i>V. Método</i>	31

V.1 Tratamientos	31
V.2 Prueba motora	32
V.3 Sacrificio	33
V.4 Técnica rápida de Golgi	33
V.5 Cuantificación de espinas dendríticas	33
V.6 Análisis estadístico	34
VI. Resultados	35
VI.1 Prueba motora	35
VI.1.1 Prueba motora en la viga de 1 cm	35
VI.1.2 Prueba motora en la viga de 0.5 cm	36
VI.2 Densidad espinosa	37
VII. Discusión	39
VIII Conclusión	47
IX Anexos	47
X Referencias	48

Abreviaturas

4-HNE	4-hidroxinonenal
6-OHDA	6-hidroxidopamina
µm	Micras
Mg	Microgramos
m³	Metro cubico
Ac	Actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
Ca²⁺	Calcio
CAT	Catalasa
CC	Corteza cerebral
CN1	Carnosinasas ubicadas en suero
CN2	Carnosinasas ubicadas en el citosol
CO	Mónóxido de carbono
DPS	Densidad postsináptica
ED	Espinas dendríticas
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FLC	Factor liberador de corticotropina
GB	Ganglios basales
Glut	Glutamato
GSH-PX	Glutación peróxidasa
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
M	molar
MAPK	Proteína activadora de genes mitógenos
MDA	Malondialdehído
MEC	Matriz extracelular
Mg	Miligramos
Mm	Milímetro
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
Mn²⁺	Manganeso
MnCl₂	Cloruro de manganeso
Mn(OAc)₃	Acetato de manganeso
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida
NDMA	N-metil-D-aspartato
NF-L	Neurofilamentos
NP	Neuronas piramidales

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
SNC	Sistema nervioso central
O₂	Oxígeno
O₃	Ozono
(•O₂⁻)	Radical superóxido
PEPT 1 y 2	Transportador de oligopeptidos
PLP	Potenciación a largo plazo
PM₁	Partículas ultrafinas o partículas suspendidas menores de 1 micrometro.
PM_{2.5}	Partículas finas o partículas suspendidas iguales o menores de 2.5 micrometros
PM₁₀	Partículas burdas o partículas suspendidas menores de 10 micrometros y mayor a 2.5 micrometros
PO₄³⁻	Fosfato
PS	Partículas suspendidas o material particulado
PST	Partículas suspendidas totales
SME	Sistema extrapiramidal
SMP	Sistema piramidal
SO₂	Bióxido de azufre
SOD	Superóxido dismutasa
V	Vanadio
V^V	Vanadato
V^{IV}	Vanadilo
V₂O₅	Pentóxido de vanadio
VO²⁺	Catión vanadilo tetravalente
VO₃	Anion vanadato pentavalente
Zn²⁺	Zinc

Resumen

Actualmente la contaminación atmosférica resulta ser un problema ya que ocasiona cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. La información disponible sobre las enfermedades relacionadas con el medio ambiente procede de estudios experimentales, estudios epidemiológicos y toxicológicos, que permiten extrapolar y estimar posibles riesgos para la salud pública. Dentro de los contaminantes atmosféricos encontramos a las partículas suspendidas (PS), las cuales se componen de un núcleo de carbón central al cual están adheridos diferentes compuestos, entre ellos se incluyen los metales, como el vanadio (V). Este metal existe en diferentes estados de oxidación que van desde el -1 hasta +5, sin embargo, sólo los tres estados más altos, V^{III} , V^{IV} y V^V , tienen funciones biológicas reconocidas. El V induce especies reactivas de oxígeno (ERO), y por consiguiente provoca estrés oxidante. En un modelo murino ante la exposición a pentóxido de vanadio (V_2O_5) por vía inhalada, se observó que este metal provoca pérdida neuronal dopaminérgica en la sustancia nigra y pérdida de espinas dendríticas en neuronas medianas del cuerpo estriado. En otro estudio con el mismo modelo se observó que este metal induce aumento en la producción de ERO, quienes generan estrés oxidante, produciendo peroxidación y generando productos tóxicos como es el 4-HNE en neuronas piramidales en la corteza cerebral.

Una manera de retrasar o inhibir la oxidación causada por los ERO es por medio de los antioxidantes, como la carnosina (β -alanil-L-histidina), dipéptido endógeno que se encuentra ampliamente distribuido abundantes en músculo y tejido nervioso. Este dipéptido media por diferentes mecanismos incluyendo la quelación de iones metálicos, barrador de ERO, interactúa directamente con productos de la peroxidación de lípidos, elimina aldehídos y actúa como neuromodulador.

Se observó que la carnosina tiene efecto neuroprotector ante la inhalación de V, ya que en bulbo olfatorio redujo la pérdida de espinas dendríticas de las células granulosas y en la ultraestructura de corteza cerebral.

La corteza cerebral (CC) es una estructura extremadamente compleja que engloba e integra información, ya que posee múltiples áreas somáticas secundarias, de asociación y motoras, resultando una estructura fundamental en la actividad motora ya que al recibir los estímulos de los órganos sensoriales, la corteza los transforma en impulsos que se dirigen a los ganglios basales, tallo cerebral o la medula espinal. Por eso es importante evaluar el efecto del V sobre la actividad motora y el efecto neuroprotector de la carnosina ante el daño ocasionado por este metal. Se utilizaron 40 ratones machos de la cepa CD-1, se separaron en 4 grupos en cada uno 10 ratones: a) control, se expusieron a solución salina (0.9%) durante una hora, dos veces por semana, durante cuatro semanas, b) expuestos a vanadio, inhalaron 0.02 M de V_2O_5

(Equivalente a $1436 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de V) durante una hora, dos veces por semana, durante cuatro semanas, c) tratados con carnosina, se les administró por vía oral una concentración de $1\text{mg}/\text{Kg}$ de carnosina diariamente durante cuatro semanas y d) expuestos a vanadio y tratados con carnosina, inhalaban 0.02 M de V_2O_5 durante una hora, dos veces por semana y se les administró carnosina simultáneamente por vía oral una concentración de $1\text{mg}/\text{Kg}$ diariamente durante cuatro semanas. A todos los grupos se les evaluó la actividad motora a la semana inicial, a las dos semanas y a las cuatro semanas de tratamiento empleando la prueba de la viga, en la cual se toma el tiempo que tarda el ratón en cruzar la viga. Al pasar las cuatro semanas se sacrificaron y perfundieron vía aorta; posteriormente se extrajeron los cerebros y se procesaron por medio de la técnica rápida de Golgi. El análisis citológico consistió en cuantificar el número de espinas dendríticas en $10 \mu\text{m}$ de dos dendritas secundarias a partir de la primera bifurcación, en 20 neuronas piramidales de la capa V piramidal interna. Los resultados obtenidos. Con los datos obtenidos se realizó una prueba ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se empleó una prueba post-hoc de Tukey.

Los resultados obtenidos en la prueba de la viga en los dos grosos se observó que a partir de la segunda semana el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina su tiempo fue menor que el grupo expuesto a Vanadio y similar al grupo Control. Mientras que el grupo tratado con Carnosina presentó menor tiempo que los grupos anteriormente mencionados. Tras las 4 semanas, se observó que el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina presentó un tiempo similar al grupo Control, mientras que el grupo expuesto a Vanadio aumentó su tiempo en comparación de los tres grupos. El grupo tratado con Carnosina presentó un tiempo menor que el grupo Control y los grupos expuestos a vanadio con y sin carnosina. Sin embargo los ratones presentaban mayor tiempo de recorrido en la viga de 0.5 cm a comparación de la viga de 1 cm .

En el análisis citológico se observó que tras las 4 semanas el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina presentó mayor cantidad de espinas dendríticas a comparación del grupo expuesto a Vanadio, mientras que este grupo y el grupo Carnosina presentaron menor cantidad de espinas a comparación del grupo Control.

Con base en los resultados se puede decir que la inhalación de vanadio produce pérdida de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral, debido a la capacidad del vanadio de inducir especies reactivas de oxígeno, las cuales están implicadas en el estrés oxidante; se ha demostrado la capacidad neuroprotectora de la carnosina ya que atenúa la pérdida de espinas. Además se observó que esta neuroprotección influye en la mejora de la actividad motora, debido que el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina presentó menor tiempo de latencia que el grupo vanadio. Sin embargo en los resultados se observó que la carnosina por sí sola causa hiperactividad ya que el tiempo de latencia era menor en comparación con el grupo control.

I. Introducción

I.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, que en ciertas cantidades resultan ser perjudiciales para la vida, ya que afectan estructuras, materiales, y ocasionan cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Vallejo et al., 2003). La información disponible sobre las enfermedades relacionadas con el medio ambiente procede de estudios experimentales, estudios epidemiológicos y toxicológicos, que permiten extrapolar y estimar posibles riesgos para la salud pública (Vargas, 2005).

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales, por ejemplo el humo, los polvos, los gases, las cenizas, las bacterias, los residuos y los desperdicios. Estos contaminantes se clasifican según su origen en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios son generados por procesos naturales o por actividades antropogénicas, como son el monóxido de carbono (CO) y el bióxido de azufre (SO₂). Los contaminantes secundarios se forman en la atmosfera por reacciones químicas o fotoquímicas que involucran a los contaminantes primarios, por ejemplo el ozono (O₃) y los sulfatos (Vallejo et al., 2003).

Dentro de los contaminantes primarios y secundarios se ubican las partículas suspendidas (PS), las cuales se componen de un núcleo de carbón central al cual están adheridos diferentes compuestos, entre ellos se incluyen los metales (Jiménez, 2012) (plomo, hierro, vanadio, níquel, cobre, platino y otros), compuestos orgánicos, material de origen biológico (virus, bacterias, restos de animales y plantas, tales como fragmentos de polen), iones (sulfatos, nitrato y acidez) y gases reactivos como el ozono, peróxidos y aldehídos (Tzintzun et al., 2005).

Se clasifican en (Vallejo et al., 2003):

1. Partículas burdas, con un diámetro aerodinámico menor a 10 µm (PM₁₀) y mayor a 2.5 µm. Compuestas principalmente de sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro y cloruros.
2. Partículas finas, con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 µm (PM_{2.5}). Compuestas por productos derivados de la combustión, particularmente de diesel, e incluyen carbono, plomo, vanadio, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno.
3. Partículas ultra finas, con un diámetro aerodinámico menor a 1 µm (PM₁) Compuestas por los productos de quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel. Sin embargo permanecen aisladas en la atmosfera durante periodos muy cortos, ya que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño.

Una gran variedad de efectos en la salud están asociados con la exposición de PS, comenzó con el aumento del riesgo de mortalidad en las ciudades con altas concentraciones de PS, más tarde se reportó una alta incidencia de infarto del miocardio y una alta emisión proveniente de los motores de combustión interna (Fortoul et al., 2015).

La exposición a concentraciones altas de PS por breves periodos en adultos mayores, niños, pacientes con enfermedades cardiorespiratorias y con asma, están relacionados con un aumento en la morbilidad por enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía y mortalidad por cardiopatía isquémica (Vallejo et al., 2003).

En un modelo murino se observó que en la exposición concentrada a partículas ultrafinas (<100 nm de diámetro) se producen alteraciones postnatales como disfunción locomotora; y cambios dopaminérgicos y glutamatérgicos en la sustancia nigra pars compacta y cuerpo estriado (Allen et al., 2014).

Se ha observado que en la exposición a PS durante el ejercicio tiene consecuencias sobre la salud como alteraciones en los patrones de respiración, aumento en sensibilidad bronquial y resistencia de las vías respiratorias. También se activa la cascada inflamatoria que altera el sistema cardiovascular provocando disfunción endotelial, coagulación, trombosis y estrés oxidante (Giles & Koehle, 2014).

En un estudio realizado en hombres y en mujeres, se evaluó la acumulación respiratoria de partículas ultrafinas (PM₁) durante reposo y ejercicio, se observó alta acumulación respiratoria de PUF, además, conforme se da el aumento en la acumulación, el tamaño de partícula disminuye y también que la acumulación aumenta aún más con el ejercicio (Daigle et al., 2003).

A su vez, se ha reportado que las PS inducen estrés oxidante en el endotelio; A través de la nariz estas partículas penetran el bulbo olfatorio. La función pulmonar es reducida y las enfermedades respiratorias son frecuentes. Trombosis, modificaciones de la presión arterial se han asociado con la exposición (Anderson et al., 2012) y anomalías metabólicas tales como alteración en el metabolismo de la glucosa. Bajo peso al nacer, infertilidad, genotoxicidad y cáncer (Loomis et al., 2013), son parte del espectro de alteraciones asociadas con PS. Los metales son algunos de los componentes adheridos a la superficie de las PS, los cuales están asociados con su toxicidad (Fortoul et al., 2015).

1.1.1 Contaminación en México

Las partículas suspendidas totales (PST) y las PM₁₀, se adoptaron en México como parámetros de evaluación y regulación de la calidad del aire en la norma oficial mexicana NOM-025-SSA1-1993. Se han reportado los efectos para la salud, como son los incrementos en los índices de mortalidad y los efectos citotóxicos y genotóxicos en la Ciudad de México, por lo cual la Secretaria de Salud trabaja en la modificación de dicha norma, que incluye una adición muy

importante en términos de gestión de calidad del aire y la salud pública, normando la fracción fina de 24 horas para $PM_{2.5}$ ($65\mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio de 24 horas y $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual). También se proponen reducciones para los límites de 24 horas de PST de 260 a $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y de PM_{10} de 150 a $120\mu\text{g}/\text{m}^3$. Finalmente se mantiene el valor de la norma anual actualmente vigente para PM_{10} ($50\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Tzintzun et al., 2005).

Las emisiones de PM_{10} son generadas por el tráfico vehicular en el oriente del Área Metropolitana de la Ciudad de México (AMCD), incluyendo varios municipios vecinos del Estado de México, y aunque las principales emisiones de $PM_{2.5}$ tienen la misma distribución geográfica que PM_{10} , son más concentradas las de $PM_{2.5}$ en las áreas de tráfico pesado junto con los vehículos diesel (Calderón-Garcidueñas et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, a las PS se le adosan algunos metales, entre ellos el vanadio, este metal se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, debido a que se produce por actividades antropogénicas; como el procesamiento de los minerales en fundiciones y la quema de combustibles fósiles (Avila-Costa et al., 2005).

1.2 VANADIO

1.2.1 Antecedentes

Su nombre proviene de la diosa escandinava Vanadis, la diosa de la belleza y la fertilidad. Andrés Manuel del Río en 1801, fue el primer químico para proporcionar la idea de este nuevo elemento (Mukherjee et al., 2004). Sin embargo, su descubrimiento se atribuye al químico sueco Nils Sefstrom, en 1831, quien lo llamo así en honor a Vanadis, debido a que sus sales poseen hermosos colores (García, 2006).

1.2.2 Generalidades

El vanadio (V) es un metal de color grisáceo, con densidad de $6.11\text{ g}/\text{cm}^3$. En la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo VB, tiene como número atómico 23, configuración electrónica $[\text{Ar}] 4s^2 3d^3$, peso atómico 50.95, punto de fusión $1950\text{ }^\circ\text{C}$ y punto de ebullición $3600\text{ }^\circ\text{C}$. Existe en diferentes estados de oxidación que van desde el -1 hasta +5, y generalmente pasa de un estado a otro por medio de la transferencia de un electrón dado por procesos de óxido-reducción. Sin embargo, sólo los tres estados más altos, V^{III} , V^{IV} y V^{V} , tienen funciones biológicas reconocidas (Rodríguez & Altamirano, 2006).

Este metal participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. Su requerimiento para los humanos no ha sido confirmado, pero debido a sus múltiples mecanismos de acción se ha estimado que, en el caso de ser necesario, la ingesta aproximada sería de $15\mu\text{g}$ por día (Lagerkvist et al. 1986).

En los alimentos se encuentra en los estados de oxidación III y IV. Las concentraciones en peso fresco de grasas, aceites, frutas y vegetales van de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en granos, alimentos de mar y carnes de 5 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$; en eneldo o pimienta negra las cantidades detectadas se encuentran en 431 y 987 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente y en tabaco para fumar de 1 a 8 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Rodríguez & Altamirano, 2006).

En los últimos 10 años, distintos complejos orgánicos y compuestos inorgánicos de V han adquirido importancia, especialmente en farmacología. En atletas, en el mejoramiento del rendimiento físico y en biología de la reproducción como anticonceptivo vaginal. Además, por sus propiedades moduladoras de la expresión de diversos genes, es usado en modelos experimentales como agente anticarcinogénico (Rodríguez & Altamirano, 2006).

Se encuentra presente en los humos de soldadura en forma de pentóxido de vanadio (V_2O_5), el cual es emitido por las soldaduras empleadas en la construcción. Tiene varias aplicaciones en la industria metalúrgica, en la producción de aceites resistentes a las temperaturas, pigmentos (Ngwa et al., 2014), así como en la manufactura de aleaciones de alta resistencia y baja corrosión; forma amalgamas principalmente con aluminio (Al), titanio (Ti), Boro (B), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Manganeseo (Mn) y Tungsteno (W). Se utiliza en la preparación de vidrio, de pinturas de aplicación común, en colorantes para fotografía y cinematografía. En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes, además en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético. Se utiliza en materiales de superconductividad y es importante en la industria de la energía atómica, en la construcción de maquinaria aérea y tecnología espacial (Rodríguez & Altamirano, 2006).

1.2.3 Distribución

Es el 22° elemento más abundante en la corteza terrestre, se encuentra en 68 minerales diferentes y se extrae en Sudáfrica (42,2%), Rusia (39,2%) y China (12,7%) donde existen las mayores reservas. En la biosfera, este metal se encuentra en mayor proporción en la flora y fauna marina, aunque alcanza una importante concentración en hongos y otras especies terrestres menores (García, 2006).

Las emisiones de V a la atmosfera se producen en lugares próximos a las industrias siderúrgicas y refinerías de petróleo. Se estima que se liberan anualmente al medio ambiente cerca de 65,000 toneladas de V, de las cuales el 90% se originan por la combustión de petróleo y carbón, en la industria siderúrgica y el resto son derivadas de la erosión del suelo, emisiones volcánicas, incendios forestales y otros procesos biogénicos (García, 2006; Rodríguez & Altamirano, 2006).

Los niveles en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización, entre otros factores. En grandes urbes se han detectado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y en áreas rurales cantidades menores a

0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan 0.114 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en aeropartículas de 10 μm y 0.093 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en las de 2.5 μm (Rodríguez & Altamirano, 2006).

En un estudio realizado por Fortoul y cols. en el 2002, en residentes de la Ciudad de México de la década de los 90's y de los 60's, se reportó mayor cantidad de V en el pulmón de los habitantes de los 90 (1.36 \pm 0.08 $\mu\text{g}/\text{g}$) en comparación con los que vivieron en la década de los 60 (1.04 \pm 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$).

1.2.4 Toxicocinética

La entrada de V al organismo de los mamíferos ocurre a través de la piel, por el tracto gastrointestinal y por el sistema respiratorio. La absorción por la piel es mínima, varios reportes coinciden en que el 10 % del V ingerido ó el 25 % inhalado respectivamente, es absorbido y transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (Rodríguez & Altamirano, 2006).

La principal vía de entrada es por la inhalación, ya que en las áreas industrializadas trabajadores y pobladores han manifestado síntomas tales como: lagrimeo, lengua verde, rinitis, traqueo bronquitis, faringitis, bronquitis, insuficiencia respiratoria y cardíaca (Montiel et al. 2007).

La exposición aguda en animales por medio de la ingestión de compuestos de V conlleva a parálisis, fallas respiratorias, convulsiones, deposiciones sanguinolentas y muerte (García, 2006). En humanos, la toxicidad de este metal incluye perturbaciones en el sistema nervioso central (SNC) como se observó en trabajadores expuestos a V en China, quienes presentaron alteraciones neuroconductuales tales como un aumento de actitudes de ira-hostilidad, depresión-abatimiento y fatiga, además se observó disminución en la coordinación de movimientos, memoria a corto plazo y reacción lenta (Li et al., 2013).

Reportes previos sugieren que la mayoría de V ingerido (<1-2%) es transformado en forma de vanadil catiónico en el estómago antes de ser absorbido en el duodeno a través de mecanismos desconocidos (Mukherjee et al., 2004), en el cual puede ser encontrado en dos estados de oxidación: en el plasma sanguíneo se presenta como un anión vanadato pentavalente (VO_3^-) y el vanadato es absorbido intracelularmente donde es reducido a un catión vanadilo tetravalente (VO^{2+}) (Capella et al., 2002). Se ha sugerido que el V por la vía inhalada se absorbe en un 90% (Leonard & Gerbet, 1994), siendo la principal vía de entrada al cuerpo, rápidamente es absorbido a través de los pulmones (EPA, 2011), debido a que el V esta adosado a las $\text{PM}_{2.5}$, que son capaces de entrar fácilmente a los sacos alveolares de los pulmones, atravesar la barrera hematogaseosa y una vez ahí la mayor parte del V inhalado es incorporado al torrente sanguíneo (Rosales et al., 2001).

Al ser absorbido, puede encontrarse en los estados de oxidación III, IV y V. El vanadato (V^{V}) es reducido a vanadilo (V^{IV}) por el glutatión de los eritrocitos o por el ácido ascórbico, las

catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma. V^{IV} es transportado por la albúmina y preferentemente por la transferrina. Las condiciones de pH neutro propician el dominio de V^V en plasma. En éste estado entra a la célula por medio de mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato. En el interior de la célula el V^V puede ser nuevamente reducido a V^{IV} por el glutatión celular (Rodríguez & Altamirano, 2006), catecolaminas, cisteína, NADP, NADPH y L-ácido ascórbico (Rodríguez-Mercado et al., 2003).

Dentro de la célula, en estado V^{IV} es considerado un fuerte pro-oxidante, capaz de incrementar los radicales hidroxilo por reacción tipo Fenton ($Metal^{n-1} + H_2O_2 \longrightarrow Metal^n + OH^- + \cdot OH$) y producir estrés oxidante en células de mamífero (Rodríguez & Altamirano, 2006).

En estudios realizados en trabajadores expuestos a óxidos de V y en modelos animales, se detectó que después de ser absorbido es rápidamente desechado por los riñones o a través de la bilis y excretado en la orina o en las heces. La cinética de eliminación por la orina sigue un comportamiento bifásico, en las 20 primeras horas se excreta la mayor cantidad y de 40 a 50 días la otra parte (Elinder et al., 1988).

1.2.5 Toxicodinamia

Se ha mostrado que el V impide las actividades de diferentes ATPasas, proteínas quinasas, ribonucleasas y fosfatasas. Además se ha observado que inhibe o estimula la actividad de muchas enzimas de ADN o ARN, produciendo varios efectos genotóxicos y mutagénicos (Mukerje et al., 2004). La expresión de varios genes se ve afectada por este metal, como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), proteína activadora 1 (AP-1), ras, c-raf, proteína activadora de genes mitógenos (MAPK), p53, factores nucleares- $k\beta$ (NF- $k\beta$) y otros más (Mukerje et al., 2004).

La alta retención de vanadato en el esqueleto puede estar relacionada con el rápido intercambio de fosfato en el hueso, debido a la analogía entre el vanadato y el fosfato (Baran, 2008). El vanadato está ampliamente reconocido como un análogo estructural y electrónico del fosfato (VO_4^{3-} y PO_4^{3-}), porque presenta reacciones similares de protonación (Morinville et al., 1998, Crans et al., 2004). Esta similitud química del V al fosfato ayuda a explicar el efecto de este metal sobre las reacciones de fosforilación en los sistemas biológicos (Fortoul et al., 2002).

Así mismo, tanto el fluido intracelular y extracelular, los cationes y aniones de V normalmente se comportan como iones metálicos de transición y compiten con otros iones metálicos para combinarse con diferentes ligandos biológicos o compuestos, tales como nucleótidos, carbohidratos y fosfatos (Mukerjee et al., 2013).

1.2.6 Toxicidad del vanadio en el sistema nervioso

Los efectos tóxicos del V y sus componentes en el organismo expuesto dependen de la dosis, la vía, la duración de exposición y la naturaleza del compuesto. Los óxidos de V suelen ser más tóxicos que las sales, aunado a que la toxicidad de los compuestos de V aumenta conforme a su valencia, siendo el estado pentavalente el más tóxico (Evangelou, 2002).

En un modelo murino de inhalación a pentóxido de vanadio (V_2O_5), se observó una significativa pérdida neuronal dopaminérgica en la sustancia nigra, así como pérdida de espinas dendríticas de neuronas medianas del cuerpo estriado (Avila-Costa et al., 2004). Alteraciones morfológicas del epitelio ependimal, como la pérdida de cilios, la descamación celular y el desprendimiento de la capa de células ependimales. Lo cual permite el paso de sustancias tóxicas que modifican la permeabilidad del epitelio y así se promueve el acceso de los mediadores inflamatorios en el tejido neuronal causando daño y muerte neuronal, debido al daño ocurrido en la barrera hematoencefálica (Avila-Costa et al., 2005).

En el mismo modelo se observó en hipocampo pérdida de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de CA1, muerte neuronal por necrosis y alteraciones del neurópilo como dendritas edematosas e hiperdensas, además de mitocondrias y terminaciones sinápticas hinchadas, tales daños se correlacionan con la alteración de la memoria espacial (Avila-Costa et al., 2006).

En bulbo olfatorio se observó que tras las 4 semanas de exposición de V, disminuyó la densidad espinosa de las células granulosas e incremento de lipofuscina, la vacuolización del aparato de Golgi, apoptosis y necrosis. Así mismo aumentó la actividad de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Colín-Barenque et al., 2015).

Estos daños se presentan debido a que el V induce especies reactivas de oxígeno (ERO), así como peroxidación de lípidos y daño oxidativo en una gran variedad de sistemas biológicos incluyendo al cerebro del ratón (García et al., 2005). Las ERO son mediadores en varios mecanismos de neurotoxicidad y eventos neuropatológicos, tales como la enfermedad del Parkinson y Alzheimer, en el que está implicado el estrés oxidante (García et al., 2005). Estudios previos han asociado al V con la capacidad de producir alteración enzimática e incremento en la peroxidación lipídica (Soares et al., 2006). El sistema nervioso se caracteriza por tener ácidos grasos, los cuales son altamente peroxidados, además que posee bajos niveles de antioxidantes y un alto metabolismo aeróbico; esto hace que este tejido sea más susceptible al estrés oxidante (Fortoul et al., 2014). Actualmente no existen estudios acerca del efecto que tiene el vanadio sobre la actividad motora.

1.3 Estrés oxidante

El equilibrio de óxido-reducción es esencial para mantener la fisiología celular, sin embargo un desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante capaz de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante, provoca estrés oxidante (Fina, 2009). El estado de estrés oxidante, induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Dorado et al., 2003). Este proceso desempeña un papel importante en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, Alzheimer y Huntington, así como en los procesos de envejecimiento (López & Arancibia, 2008).

Las ERO son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células. Se forman a causa de la reducción parcial de oxígeno (Dorado et al., 2003).

En un estudio murino ante la inhalación de V_2O_5 , se observó que este metal induce muerte neuronal, alteración en plexo coroideo y rompimiento de la barrera hematocefálica, debido que induce aumento en la producción de ERO, que a su vez generan estrés oxidante, el cual tiene una preferencia por los lípidos de membrana, sufriendo peroxidación y generando productos tóxicos como es el 4-HNE en neuronas piramidales en corteza cerebral (Jiménez, 2009).

1.4 Antioxidantes

Un antioxidante, es cualquier sustancia que retrasa o inhibe la oxidación, pueden actuar de diversas formas; 1) disminuyendo la concentración de oxidantes, 2) evitando la iniciación de la reacción en cadena al "barrer" (cubrir o detener una reactividad química muy alta) los radicales libres que se forman, 3) uniéndose a iones metálicos para evitar la formación de especies reactivas, 4) transformando los peróxidos en productos menos reactivos y 5) deteniendo la propagación y el aumento de radicales libres. (Dorado et al., 2003).

Una de las clasificaciones de los antioxidantes son endógenos o exógenos; donde los antioxidantes endógenos son los sistemas enzimáticos producidos por el organismo (Calderón, 2007), como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peróxidasa (GSH-PX), tiorredoxina reductasa, glutatión reductasa y carnosina (López et al., 2012), mientras que los antioxidantes exógenos son sustancias presentes en alimentos, algunos de estos son las verduras, las hierbas, los cereales y las frutas (Calderón, 2007), dentro los cuales podemos encontrar a la vitamina E, vitamina C, betacaroteno, flavonoides y licopeno (Mayor, 2010).

Otra clasificación de los antioxidantes es; a) sistemas enzimáticos, como las enzimas derivadas del sistema citocromo-oxidasa, las superóxido dismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas y

peroxidasas como la glutatión-peroxidasa y la glutatión-reductasa. Así como b) sistemas no enzimáticos, como las vitaminas A, C, E, ácido úrico, aminoácidos como; glicina y taurina, y el tripéptido glutatión, etc., a los que se denominan barredores (scavengers) de radicales libres, debido a su que donan e^- a otras, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas. Estos sistemas trabajan en forma coordinada en una serie de pasos metabólicos, por ejemplo en los sistemas enzimáticos el radical superóxido ($\cdot O_2^-$) al ser metabolizado por la SOD se produce peróxido de hidrogeno (H_2O_2), los peróxidos a su vez son metabolizados hasta la obtención de agua (H_2O) y oxígeno (O_2) por acción de la CAT o la GSH-PX que actúan en forma acoplada con la glutatión reductasa (Dorado et al., 2003) (Fig. 1).

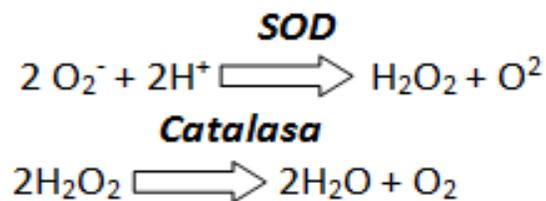


Fig. 1. Representación esquemática de la reacción de superóxido dismutasa (SOD) sobre el radical superóxido ($2O_2^-$) la formación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), en el cual actúan la catalasa que lo reducen para obtener agua (H_2O) y oxígeno (O_2).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Venereo, 2002).

Se ha demostrado la capacidad antioxidante de varios compuestos, en los años ochenta incrementó el interés en el dipéptido, carnosina, dentro de la comunidad de investigación médica por su alta capacidad antioxidante. A su vez muchas funciones se han atribuido a la carnosina y sus dipéptidos afines, incluyendo la cicatrización de heridas promotor, agente quelante de iones, especialmente para el cobre (II) y zinc (II), eliminador de radicales libres e inhibidor de la glicosilación de proteínas (Bellia et al., 2011).

I.4.1 Carnosina

La carnosina (β -alanil-L-histidina), es un dipéptido endógeno que fue descubierto en el músculo esquelético. Se sintetiza por medio de la enzima carnosina sintetasa y se degrada por las carnosinasas presentes en el suero o el líquido intracelular, pero es resistente a las peptidasas que hidrolizan los α -péptidos (Prieto, 2010). La enzima carnosina sintetasa, es una enzima dependiente de ATP, la cual cuenta con una alta afinidad para sintetizar homocarnosina (γ -aminobutiril-histidina) y anserina (β -alanil-1-metil-L-histidina) y con una menor afinidad para sintetizar carnosina (Bellia et al., 2011).

Este compuesto endógeno se encuentra ampliamente distribuido en varios tejidos animales, junto con otros dipéptidos posteriormente aislados relacionados con carnosina, tales como la anserina y homocarnosina. Estos dipéptidos son generalmente abundantes en los tejidos excitables, tales como el músculo y tejido nervioso, y la carnosina pueden alcanzar una concentración muy alta en el músculo esquelético humano (hasta 20 mM) (Bellia et al., 2011).

La carnosina tiene diversas funciones como: antiglicante debido a que compite con las proteínas por la unión con los azúcares circulantes. De este modo, reacciona con los azúcares "reactivos" o reductores (glucosa, galactosa, dihidroxiacetona) para formar "carnosina glicosilada" que es muy fácil de eliminar y no resulta tóxica para el organismo, ya que no se acumula (Prieto, 2010). Regula la concentración de iones de metales de transición en fluidos y tejidos, debido a su capacidad para formar complejos con estos iones (Bertinaria et al., 2011). Además tiene acción amortiguadora que neutraliza la producción de ácido láctico en el músculo esquelético que es producido por glicólisis anaerobia (Kohen et al., 1988). Barredor de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (ERN), que inducen la peroxidación de los lípidos insaturados presentes en las membranas, así como el tóxico reactivo α , β -aldehídos insaturados, acroleína, 4-HNE y malondialdehído (MDA) (Bertinaria et al., 2011).

Se encuentra en regiones cerebrales como la corteza cerebral y plexo coroideo, tejidos y fluidos corporales, la concentración es de 10 a 1000 ($\mu\text{mol/L}$ or $\mu\text{mol/kg}$; logarítmico) menor que en el músculo (Boldyrev et al., 2013). En ratas, por medio de un perfil utilizando el método de alta precisión de la espectroscopia de cromatografía líquida / ionización electrospray de masas en tándem (ESI-MS) (13), se reveló que la carnosina era detectable en un intervalo milimolar en el músculo esquelético (2-6 mmol / kg de tejido húmedo), en el rango micromolar en el cerebro, el cerebelo, y el miocardio (de 25-70 μmol / kg de tejido húmedo.) y no fue detectable en riñón, hígado, pulmón y plasma (Boldyrev et al., 2013).

Cuando la carnosina es ingerida se absorbe en el intestino delgado, y al menos parte de este dipéptido entra intacto a la sangre. Su absorción se da a través de la membrana estando acompañada por el transportador PEPT1. Cuando la carnosina entra al enterocito es hidrolizada, probablemente por la carnosinasa CN2 (citoplásmica). La carnosina en la sangre es hidrolizada por

la carnosinasa CN1 (suero). El transportador PEPT2 contribuye a la reabsorción en el túbulo renal, este transportador se encuentra en la membrana apical de las células epiteliales (Boldyrev et al., 2013) (Fig.2).

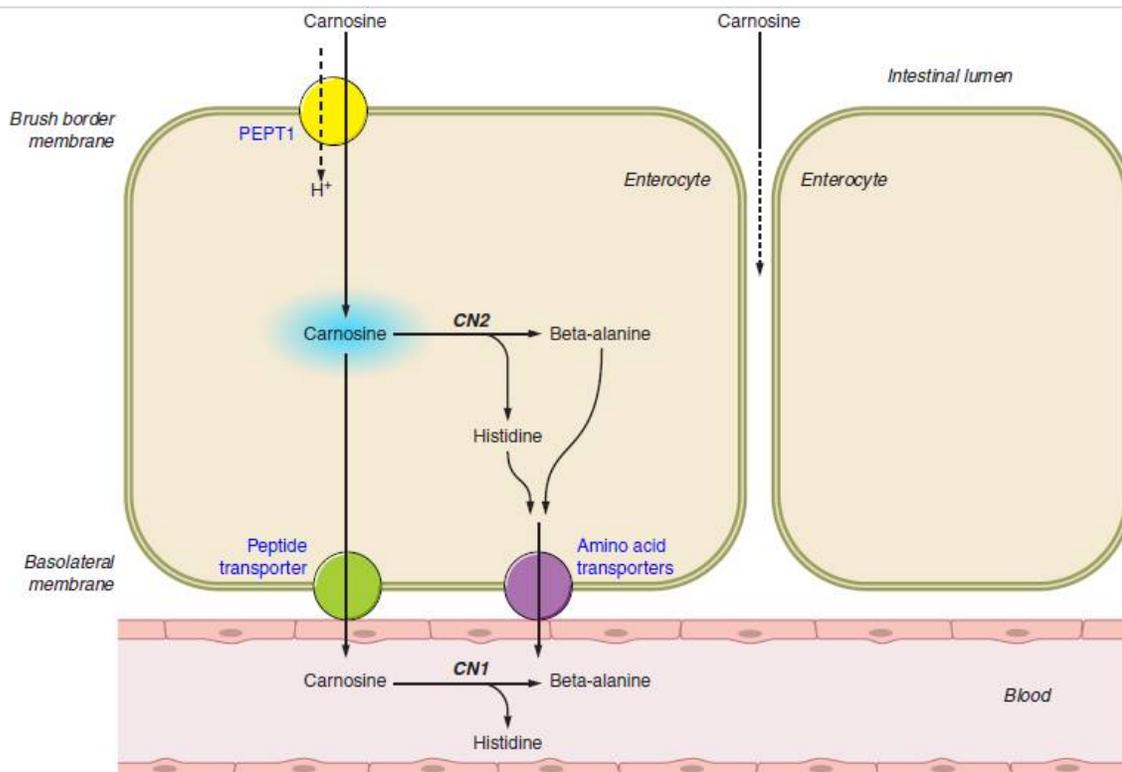


Figura 2. Representación esquemática de la posible vía absorción intestinal de la carnosina. La mayoría de la carnosina es hidrolizada después de la ingestión oral, ya sea en el interior del enterocito por acción de la CN2 o al estar presente en la circulación sanguínea por acción de la CN1 (Boldyrev et al.,2013).

En el SNC, la carnosina tiene un papel muy importante como neuromodulador, ya que se ha observado su liberación después de la despolarización de las neuronas y su colocación con glutamato, por lo cual se le ha atribuido la capacidad para suprimir a éste como un componente tóxico por medio de la función neuromoduladora de glutamato (Glut) (Guiotto et al., 2005).

En un estudio se demostró que la carnosina interactúa directamente con productos de la peroxidación de lípidos, como los radicales de anión superóxido y radicales hidroxilo. También se demostró que puede: eliminar aldehídos (de glucosa a MDA altamente tóxico) y la toxicidad inducida por el aldehído en células cultivadas e *in vivo*; inhibir el aldehído inducido proteína-proteína, la reticulación del ADN-proteína, y la formación de proteínas con grupos carbonilo,

además protege contra la glicación de proteínas y reacciona con los grupos carbonilo de proteínas en la formación de proteínas "carnosiniladas"(Guiotto et al., 2005).

La actividad antioxidante es mediada por diferentes mecanismos incluyendo la quelación de iones metálicos, barredor de ERO y radicales peroxilos (Boldyrev et al., 2013). Se ha encontrado que este dipéptido actúa directamente con el anión superóxido mediante la habilidad de la carnosina de formar un complejo de transferencia de carga con el radical superóxido cambiando la reactividad del O_2^- (Boldyrev et al., 2013).

En estudios previos se ha demostrado que la carnosina atrapa los aldehídos derivados de lípidos trabajando como 'aldehído-secuestrante', a su vez se ha indicado que inhibe los efectos tóxicos del péptido amiloide, MDA e hipoclorito (Cheng et al., 2011).

A su vez se han realizado estudios de este dipéptido en enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer, la cual se caracteriza por el daño oxidativo en neuronas olfativas y una alta acumulación de β -amiloide, y se ha demostrado que la carnosina tiende a atenuar la acumulación de este amiloide por medio de su acción quelante de iones zinc (Hipkiss, 2007), y en pacientes con enfermedad de Parkinson, para lo cual se emplea a la carnosina como un aditivo alimenticio para aumentar la eficiencia del tratamiento con L-DOPA, se observaron cambios positivos en los síntomas neurológicos y la restauración pronunciada de la SOD, que se suprime en los pacientes, con lo cual se demuestra la función neuroprotectora de la carnosina (Boldyrev, et al., 2008).

También se reportó el efecto benéfico de la carnosina en un modelo de Parkinson en rata, al provocar una lesión con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), se observó que al implementar la carnosina como pretratamiento ante la lesión unilateral intraestriatal reducía significativamente la conducta de giro, atenúa la apoptosis y restaura el contenido de MDA y nitrato, por lo cual la administración de carnosina antes de la lesión ejerce neuroprotección contra la toxicidad de 6-OHDA y esto puede ser benéfico en pacientes con enfermedad de Parkinson (Afshin-Majd et al., 2015).

En un estudio se observó que la carnosina tiene efecto neuroprotector en el bulbo olfatorio, ya que redujo la pérdida de espinas dendríticas de las células granulosas en ratones expuestos a la inhalación de V (Reséndiz, 2014), y en la ultraestructura de corteza cerebral en ratones expuestos a V (Colín-Barenque et al., 2014).

I.5 CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral (CC) de mamíferos está representada por una lámina de sustancia gris que cubre los hemisferios cerebrales. Es una estructura extremadamente compleja en la que los distintos órganos sensoriales aparecen representados en determinadas áreas o zonas conocidas como áreas sensoriales primarias (Valverde, 2002).

Esta estructura tiene varias funciones las cuales consisten en englobar e integrar información, para lo cual analiza, sintetiza, correlaciona y modifica acciones que lleva a cabo el organismo, por lo cual la corteza cerebral participa en distintas áreas de asociación. Desde el sentido del olfato hasta el de la visión, cada modalidad sensorial posee su propio territorio cortical, el cual mantiene una localización relativamente constante en todos los mamíferos. Además de estas áreas sensoriales primarias, posee múltiples áreas somáticas secundarias, de asociación y motoras, en las que los diferentes sistemas aferentes corticales y de asociación son finalmente elaborados en complejas respuestas de aprendizaje, memoria y comportamiento (Valverde, 2002)

La CC sirve como centro integrador de la información, se divide en (Fig.3):

■ *Corteza motora*

Ubicada delante de la cisura central, en el lóbulo frontal (Curtis et al., 2008). Esta corteza manda la orden a las motoneuronas alfa para la ejecución del movimiento. Se divide en a) corteza motora primaria, b) corteza premotora y c) corteza motora suplementaria (Gal et al., 2007).

■ *Corteza visual*

Ocupa el lóbulo occipital. Distintas áreas de la corteza visual se activan cuando se estimulan zonas muy restringidas de la retina con un haz de luz muy fino (Curtis et al., 2008)

■ *Corteza auditiva*

Esta corteza se ubica en el lóbulo temporal superior, procesa señales enviadas por las neuronas sensoriales del oído que responden a diferentes características del sonido (Curtis et al., 2008).

■ *Corteza somatosensorial*

Ubicada por detrás de la cisura central, forma parte del lóbulo parietal, la cual recibe señales táctiles y estímulos relacionados con la propiocepción (percepción del propio cuerpo), la temperatura y el dolor (Curtis et al., 2008).

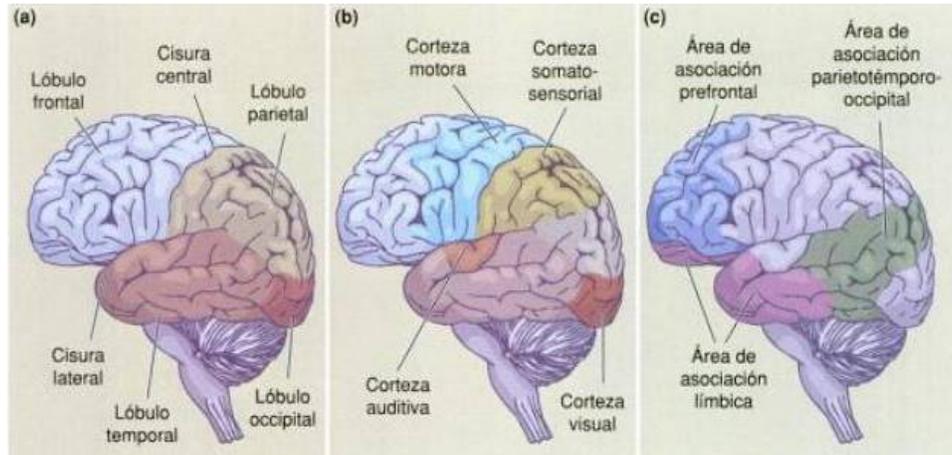


Fig.3. Representación de la división de la corteza cerebral humana en lóbulos; a) La neocorteza está dividida en surcos o ciscuras. b) Las áreas motoras y sensoriales rodean el cerebro. c) Localización de las principales áreas funcionales (primarias y secundarias) y de asociación de la corteza cerebral (Curtis, 2008).

La CC ha sido dividida en dos tipos fundamentales: la *isocorteza* y la *alocorteza*. La *isocorteza* o neocórtex corresponde a aquella parte de la corteza en la que siempre puede reconocerse la estratificación en seis capas, mientras que la *alocorteza*, representado por la *arquicórtex* (hipocampo y giro dentado) y la *palecórtex* (corteza olfativa propiamente dicha), exhiben una estructura laminar simple compuesta por tres capas (Valverde, 2002).

La isocorteza en los seres humanos corresponde al 95% de la corteza cerebral, posee una estructura relativamente uniforme y puede clasificarse en dos grandes regiones funcionales: sensitiva y motora. Mientras que la alocorteza solo corresponde al 5% con una estructura diversa (Welsh, 2008).

Como se mencionó anteriormente, la isocorteza se divide en seis capas (Fig. 4):

- ***I Capa molecular***

Es una capa escasamente poblada y de naturaleza receptora, donde encontramos células horizontales de Cajal y es donde se proyectan las dendritas apicales de las neuronas piramidales para establecer contactos sinápticos. Predominan las ramas terminales de dendritas y axones, que le confieren un aspecto punteado o “molecular” (Redolar, 2008).

- ***II Capa granular externa***

Es una capa receptora y efectora, delgada y densamente poblada por neuronas piramidales pequeñas (7 μm) y células estrelladas, así como terminaciones dendríticas y axónicas (López, 2006).

- **III Capa piramidal externa**

Es una capa efectora y está formada por neuronas piramidales de tamaño medio (15-20 μm) quienes aumentan a medida que se profundiza en la capa. Son las que predominan existiendo un cierto número de células estrelladas (López, 2006). Este tipo de neuronas envían las dendritas apicales a la capa I y sus axones a la sustancia blanca (Redolar, 2008).

- **IV Capa granular interna**

Predomina las células estrelladas (Puelles et al., 2008), están densamente dispuestas, además es una capa receptora (López, 2006). Hay una concentración elevada de fibras en disposición horizontal conocidas en conjunto como la *banda externa de Baillarger* (Snell, 2007).

- **V Capa piramidal interna**

Es una capa efectora y está formada por grandes somas de neuronas piramidales (aprox. 80 μm) llamadas *neuronas de Betz*, que envían las dendritas apicales a la capa I, sus dendritas se establecen de forma horizontal dentro de la misma capa y sus axones alcanzan la sustancia blanca. También encontramos a células fusiformes y células de Martinotti (Redolar, 2008). Además hay una gran cantidad de fibras dispuestas horizontalmente que forman la *banda interna de Baillarger* (Snell, 2007).

- **VI Capa multiforme**

Es la capa más interna, con lo cual queda adyacente a la sustancia blanca. Está conformada por diferentes tipos celulares como las células de Martinotti y las que predominan son las células fusiformes (López, 2006). Los axones de esta capa envían fibras de proyección, siendo así una capa efectora. Además de esta organización horizontal, también se da una organización vertical a modo de columnas funcionales (Redolar, 2008).

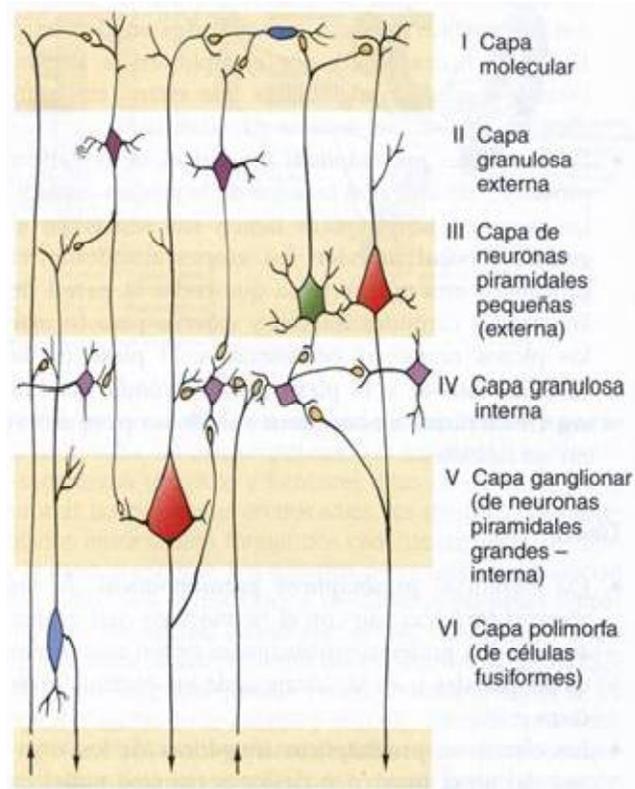


Fig. 4. Representación esquemática de las capas celulares de la corteza cerebral y sus respectivas conexiones entre las neuronas de las diferentes capas que contribuyen a las fibras corticales aferentes (flechas que apuntan hacia abajo) y eferentes (flechas que apuntan hacia arriba). Las pequeñas interneuronas aparecen indicadas en amarillo (Ross & Pawlina, 2006).

La CC está constituida por millones de neuronas, pero habitualmente se describen en cinco tipos; *neuronas piramidales*, *estrelladas* y *fusiformes*, *horizontales de Cajal* y *células de Martinotti* (Escobar & Pimienta, 2006)

Las neuronas piramidales (NP) llevan ese nombre debido a la forma de sus somas, miden entre 10 y 50 μm de longitud. Sin embargo, hay NP gigantes, llamadas *neuronas de Betz*, cuyos somas miden hasta 120 μm , estas se encuentran en la circunvolución pre-central motora del lóbulo frontal (Snell, 2007)

Los vértices de las NP están orientados hacia la superficie de la corteza. Su aspecto es claramente diferencial: muestra una dendrita apical que, en la mayoría de los casos, alcanza la capa I, en donde se ramifica en numerosas colaterales divergentes, y un abanico de dendritas basales originadas en el cuerpo celular que alcanzan distancias variables. (Snell, 2007).

Gran número de ellas utilizan los aminoácidos glutamato o aspartato como principal neurotransmisor. Las NP representan aproximadamente el 70% de toda la población neuronal de la corteza cerebral (Frick & Dodt, 2001).

Los axones de las *neuronas de Betz* forman el *haz piramidal* o *corticoespinal*, siendo una de las vías descendentes directas hacia la médula espinal, este tipo de neuronas proyectan directamente sobre las motoneuronas del asta anterior de la médula o sobre interneuronas medulares. La corteza premotora y la corteza motora suplementaria, son las responsables de la planificación del movimiento, especialmente de las secuencias de movimientos complejos en la musculatura distal, se sabe que la corteza motora suplementaria se activa aproximadamente un segundo antes de la realización del movimiento, las cortezas suplementarias de ambos hemisferios actúan juntas en la elaboración de un plan de movimiento debido a la conexión que tienen con el cuerpo calloso (Gal et al., 2007).

La corteza premotora, recibe un alto número de aferencias de la corteza visual, lo cual se relaciona con la selección de una acción entre las distintas posibles respecto a los estímulos recibidos. Esta corteza junto con la corteza motora suplementaria, además de elaborar planes de movimiento, también están implicadas en el aprendizaje de patrones de movimiento complejos (Gal et al., 2007).

Los circuitos corteza-ganglios basales están relacionados con la planeación y ejecución del movimiento. El sistema motor se encuentra separado en dos subsistemas: el sistema motor piramidal (SMP) y el sistema motor extrapiramidal (SME), el primero se relaciona con el movimiento voluntario y el segundo con la iniciación motora (Rosas, 2013). El SMP se compone de neuronas piramidales de la capa V de la corteza motora primaria en la corteza frontal, y de neuronas localizadas en el tallo cerebral, sus axones envían colaterales al estriado. El SME está constituido por el cuerpo estriado (putamen y núcleo caudado), el globo pálido, el núcleo subtálmico y la sustancia nigra todos pertenecientes a los ganglios basales (GB) (Rosas, 2013). La mayor entrada en el sistema de los GB proviene de las neuronas piramidales de la corteza cerebral (Rosas, 2013) al recibir los estímulos de los órganos sensoriales, estas neuronas piramidales de la capa V al ser neuronas de proyección envían sus axones a los GB, el tallo cerebral y la médula espinal (Rosas, 2013).

Una característica fundamental, tanto de las dendritas apicales como de las basales de las NP, es que están cubiertas de espinas dendríticas, que aumentan considerablemente la superficie receptora de las dendríticas. Cada dendrita posee numerosas espinas dendríticas para establecer contactos sinápticos con otras neuronas (Snell, 2007).

1.5.1 ESPINAS DENDRITICAS

A comienzos del siglo XX, Santiago Ramón y Cajal descubrió por primera vez las diminutas protuberancias llamadas espinas dendríticas (ED) que adornan las pequeñas superficies de las neuronas (Bourne & Harris, 2007). Las ED representan el sitio de contacto sináptico excitador en neuronas del hipocampo, la neocorteza y otras regiones cerebrales. La densidad de estas va de 1 a 10 por μm a lo largo de la longitud de la dendrita. Algunas neuronas como las del hipocampo contienen miles de espinas a lo largo de la arborización dendrítica (Soria & Perez, 2012).

Tienen una amplia variedad de tamaños, formas y composiciones subcelulares, dentro y a través de regiones cerebrales (Bourne & Harris, 2007). Su estructura consta de tres elementos básicos: *a)* la base en el cruce con el eje dendrítico, *b)* el cuello, y *c)* la cabeza que puede hacer contacto con el axón. Su forma y tamaño es variable. Su longitud es de 0,2 a 2 μm (Soria & Perez, 2012).

En base a la morfología que presentan se clasifican en: espinas delgadas, espinas cortas sin cuello y espinas con cabeza ancha denominadas espinas hongo (Soria & Perez, 2012). Su importancia radica como sitio receptor de la gran mayoría de las neuronas corticales, además de que son elementos plásticos, desde los tiempos de Ramón y Cajal se les consideró como estructuras implicadas en procesos de aprendizaje y memoria (Ramón & Cajal, 1893).

Más del 90% de las sinapsis ocurren en estas estructuras. La estimulación, especialmente durante el desarrollo post-natal puede conducir a la activación en el cerebro, referido como potenciación a largo plazo (PLP) asociado con el crecimiento de las espinas (Avila-Costa et al., 2007), por lo que la inducción de la potenciación a largo plazo se asocia con el alargamiento espinoso, mientras que la inducción de la depresión a largo plazo es asociado con la regresión de las espinas (Michaluk et al., 2011).

Su función se basa en que estas estructuras neuronales son el principal sitio postsináptico para las sinapsis excitadora en el SNC, la cual es caracterizada por una densidad postsináptica (DPS) ubicada en la cabeza de las espinas, a través de un axón pre-sináptico que contiene vesículas. En DPS se ha identificado más de 30 diferentes proteínas involucradas en la transmisión sináptica o el mantenimiento de la integridad de la sinapsis (Bourne & Harris, 2007).

Contienen la maquinaria postsináptica necesaria para la transmisión del impulso nervioso; incluyen receptores a Glut, proteínas DPS y el citoesqueleto de actina, así como una amplia variedad de organelos del sistema de endomembranas (retículo endoplasmático liso, mitocondrias y endosomas (Soria & Perez, 2012).

Las ED son estructuras plásticas, las cuales desaparecen tras isquemia experimental y reaparecen al cesar ésta (Valverde, 2002), además se ha demostrado que los cambios en la morfología de estas estructuras, se debe a que poseen dominios postsinápticos de sinapsis

excitatoria, los cuales podrían estar implicados en la plasticidad sináptica, así como en el aprendizaje y la memoria (Michaluk et al., 2011). Además su número y morfología están alterados en determinadas patologías y enfermedades mentales (Valverde, 2002), la pérdida permanente de espinas es evidente en trastornos del neurodesarrollo, epilepsia, encefalopatía espongiiforme y en la enfermedad de Alzheimer; al contrario, el exceso de espinas provoca varios tipos de desaferentación; la reducción de tamaño de las ED se han descrito en la privación sensorial, la esquizofrenia y el síndrome de Down son patologías que se han relacionado con la disminución del tamaño de las espinas; mientras que la distorsión de formas están relacionado con la desaferentación, epilepsia y trastornos del neurodesarrollo y encefalopatía espongiiforme (Fiala et al., 2002).

El citoesqueleto de las ED carece de microtúbulos, su citoplasma se caracteriza por una red flexible de filamentos compuestos de actina y las proteínas de unión (Bourne & Harris, 2007). Cuentan con la capacidad de cambio de forma a causa de su densa red de proteínas que le facilitan el montaje y el rápido desmontaje de la actina del citoesqueleto. Estas estructuras contienen una rica variedad de receptores, canales iónicos, proteínas de regulación de actina y otra maquinaria bioquímica que apoya la organización del citoesqueleto de actina (Hsieh et al., 2003).

Las proteínas de unión al citoesqueleto de actina son fundamentales en la formación, eliminación, motilidad, estabilidad, tamaño y forma de las ED, ya que la transición de un filopodio a una espina madura involucra la regulación de la actina (Soria & Perez, 2012). Para la formación de una ED, en los filopodios se distribuye una proteína de unión al citoesqueleto denominada drebrina, en la cual después de que una terminal axónica establece contacto con los filopodios, se forma un complejo con drebrina y F-actina en un sitio de contacto post-sináptico, el complejo drebrina-actina es esencial para la maduración de espinas dendríticas. (Soria & Perez, 2012).

La participación de los tres componentes de la sinapsis tetrapartita (neuronas pre- y postsinápticas con procesos astrocíticos) pueden indicar que las moléculas de la matriz extracelular (MEC) son posibles reguladoras del desarrollo de las prolongaciones de las ED. Las moléculas de la MEC son consideradas como el cuarto componente de la sinapsis tetrapartita que han demostrado una interacción con los componentes sinápticos, incluyendo las partes pre- y postsinápticos y la glía, y que son capaces de modular la actividad de los receptores sinápticos y canales iónicos (Szepesi et al., 2013).

La estructura espinosa puede estar regulada por proteínas de la matriz, tal como la reelina, así como las proteínas superficiales (por ejemplo N-cadherina), receptores de efrina e integrinas. Mientras que el mecanismo exacto de la regulación es poco entendida, las proteasas actúan extracelularmente dirigidos por la MEC y/o proteínas superficiales que recientemente han sido implicadas en diferentes formas de plasticidad neuronal (Michaluk et al., 2011).

Metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia endopeptidasas dependientes de Zn^{2+} que regulan el volumen de las moléculas de la MEC y el mantenimiento de la homeostasis en el desarrollo del tejido y en el cerebro adulto (Szepesi et al., 2013). Estas pueden modificar los componentes de la MEC y controlar el comportamiento celular (Michaluk et al., 2011), tienen una importante atención principalmente en el contexto de problemas y daño en el SNC (Szepesi et al., 2013).

Estas proteínas han sido implicadas en una amplia gama de procesos patológicos incluyendo la aterosclerosis, la artritis, metástasis, neuroinflamación y la neurodegeneración, debido que pueden degradar la mielina y amplificar la neurotoxicidad viral, además se han asociado con la enfermedad de Alzheimer (Colín-Barenque et al., 2008).

Se ha relacionado a las MMPs en la modulación de la morfología de las ED, como la MMP-7 dependiente de N-metil-D aspartato (NDMA), quien causa la maduración de la estructura tipo filopodio a espina con cabeza de hongo. También se ha demostrado que en hipocampo es necesaria la MMP-9 para el alargamiento de espinas asociado con la inducción de potenciación a largo plazo (PLP) (Michaluk et al., 2011).

Colín-Barenque et al., 2008 observaron que en ratones expuestos a V_2O_5 presentaban un aumento de MMP-9 en corteza cerebral, por lo que asociaron el incremento de esta MMP's en la pérdida de ED en hipocampo y estriado, debido que éstas regulan el ambiente pericelular y participan en la remodelación dendrítica en el hipocampo adulto.

Las ED y la morfología neuronal pueden ser observadas en tres dimensiones por medio de un procedimiento histológico llamado "técnica de impregnación argéntica de Golgi" o "técnica de Golgi" (Torres, 2006).

II. Justificación

Se ha reportado que la carnosina al ser un antioxidante endógeno posee una función neuroprotectora, ya que cuenta con la capacidad de interactuar con los radicales libres, atenuando la pérdida de espinas dendríticas ante la inhalación de vanadio.

Considerando que las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral están involucradas en los procesos de aprendizaje y en la actividad motora, es necesario determinar el efecto de la carnosina en la actividad motora y en la densidad de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de corteza motora de ratones expuestos a vanadio.

III. Hipótesis

Si la carnosina tiene efecto neuroprotector en corteza motora, entonces se presentará un mejor desempeño en la actividad motora y atenuará la pérdida de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral ante la exposición de vanadio.

IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

- Determinar el efecto neuroprotector de la carnosina, evaluando la actividad motora y la densidad espinosa de las neuronas piramidales de la corteza motora ante la inhalación de vanadio

IV.2 Objetivos particulares

- Evaluar la actividad motora de los ratones expuestos por inhalación de vanadio con y sin la ingesta de carnosina, mediante la prueba de la viga de equilibrio.
- Cuantificar el número de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral de ratones expuestos a vanadio con y sin ingesta de carnosina, con el método rápido de Golgi.

V. Método

Características del estudio

Se utilizaron 40 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso aproximado entre 30 y 35 g, los cuales permanecieron en cajas de acrílico (45.5x 35.5x 20.5 cm) bajo un fotoperiodo de 12h de luz /12 h de oscuridad, con una alimentación de purina rat chown y agua *ad Libitum*.

Todos los ratones se pesaron y se registró el peso diariamente.

V.1 Tratamientos

➤ Controles

A 10 ratones se les colocó en una caja de acrílico conectada a una nebulizador ultrasónico (Yue Hua[®] modelo: WH-802), donde inhalaban solución salina (0.9%) durante una hora, dos veces por semana, durante cuatro semanas.

➤ ***Expuestos a la inhalación de Vanadio***

A 10 ratones se les colocó en una caja de acrílico conectada al ultra nebulizador, donde inhalaban 0.02 M de V_2O_5 (Equivalente a $1436 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de V) durante una hora, dos veces por semana, durante cuatro semanas.

➤ ***Ingesta de carnosina***

A 10 ratones se les administró por vía oral una concentración de 1mg/Kg de carnosina diariamente durante cuatro semanas.

➤ ***Expuestos a la inhalación de Vanadio y con tratamiento de carnosina***

A 10 ratones se les colocó en una caja de acrílico conectada al ultra nebulizador, donde inhalaban 0.02 M de V_2O_5 (Equivalente a $1436 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de V) durante una hora, dos veces por semana y se les administró carnosina simultáneamente por vía oral una concentración de 1mg/Kg diariamente durante cuatro semanas.

Concluidas las cuatro semanas, se sacrificaron a todos los ratones.

V.2 Prueba motora

Los 40 ratones fueron evaluados utilizando la prueba de la viga. Para esto, todos los ratones fueron entrenados durante una semana antes del inicio del experimento, en un aparato que consiste en dos pedestales a los cuales va unida una viga de madera de 1m de largo y un grosor de 0.5 cm y 1 cm, elevada del suelo, con inclinación de 15° .

Tanto el entrenamiento y las pruebas se realizaron durante la porción iluminada del ciclo 12/12 hr, en el mismo día y la misma hora. Las pruebas se realizaban durante los días que los animales no inhalaban. Cada ratón se puso a prueba una vez a la semana, un día diferente para cada prueba (Ordoñez et al., 2008).

▪ ***Prueba de la viga de equilibrio***

Esta prueba mide la capacidad del animal para recorrer un haz estrecho para llegar a una plataforma de seguridad. El aparato está construido con una elevación de 75 cm de la superficie del suelo con soportes de madera, la viga cuenta con un área de 10x100cm y 15° de inclinación, en el extremo superior del haz se encuentra una caja pequeña. Los ratones fueron entrenados durante una semana (Ordoñez et al., 2008).

En el entrenamiento, los animales se colocaron en el extremo inferior y se les enseñó el recorrido para llegar al extremo superior e ingresar a la caja, para lo cual fueron entrenados durante 5 días (cuatro ensayos por día).

Durante la prueba se registra el tiempo que tarda el ratón en cruzar de un extremo inferior hasta el extremo superior, con un tiempo máximo de 120 segundos para recorrer la viga. Se registró la latencia para atravesar por cada ensayo (3 veces por ratón) en las dos vigas (0.5 cm y 1 cm) Esta prueba se dividió en tres intervalos de tiempo: A) Inicial, B) 2° semana y C) 4° semana (Ordoñez et al., 2008).

V.3 Sacrificio

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg/Kg) por vía intraperitoneal, posteriormente se perfundieron vía intra-cardiaca, primero con solución salina (NaCl) 0.9%, después se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.4.

Posteriormente se extrajeron los cerebros y se colocaron en paraformaldehído al 4% durante 2 horas a 4°C.

V.4 Técnica rápida de Golgi

El método de impregnación argéntica neuronal, o técnica de Golgi, se dio a conocer en 1873, con esta técnica se logró la visualización de neuronas marcadas que mostraban su estructura completa (cuerpo celular, dendritas y axón) en una preparación histológica. La técnica se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico producidos por la reacción entre el dicromato de potasio y el nitrato de plata. En los años siguientes al descubrimiento del método original, Golgi introdujo modificaciones importantes, una de ellas fue la adición de tetróxido de osmio al dicromato de potasio, técnica aún conocida como el "método rápido de Golgi" (Torres, 2006).

Después de 2 horas, los cerebros se colocaron en frascos ámbar con solución de Golgi (Ver anexo) durante 6 días. En el séptimo día se realizó un lavado con la solución de nitrato de plata (0.75%) y se dejaron en ésta por un día. En el octavo día, los cerebros se encastraron en parafina y se les realizó cortes en el micrótopo (90 µm de grosor). Después los cortes se pasaron en un tren de alcoholes, uno al 96% y dos al 100%, posteriormente a Eugenol y por ultimo en Xilol (Cada uno durante 10 minutos) y finalmente se montaron en portaobjetos con resina sintética y su respectivo cubreobjetos.

V.5 Cuantificación de espinas dendríticas

En los cerebros procesados se analizó cada corte coronal de la corteza cerebral, en la cual se cuantificaron el número espinas dendríticas en 10 µm de dos dendritas secundarias a partir de la primera bifurcación, en 20 neuronas piramidales de la capa V piramidal interna de las áreas motoras M1 y M2 (Fig. 5) por ratón de todos los grupos, utilizando el 40X y un ocular calibrado.

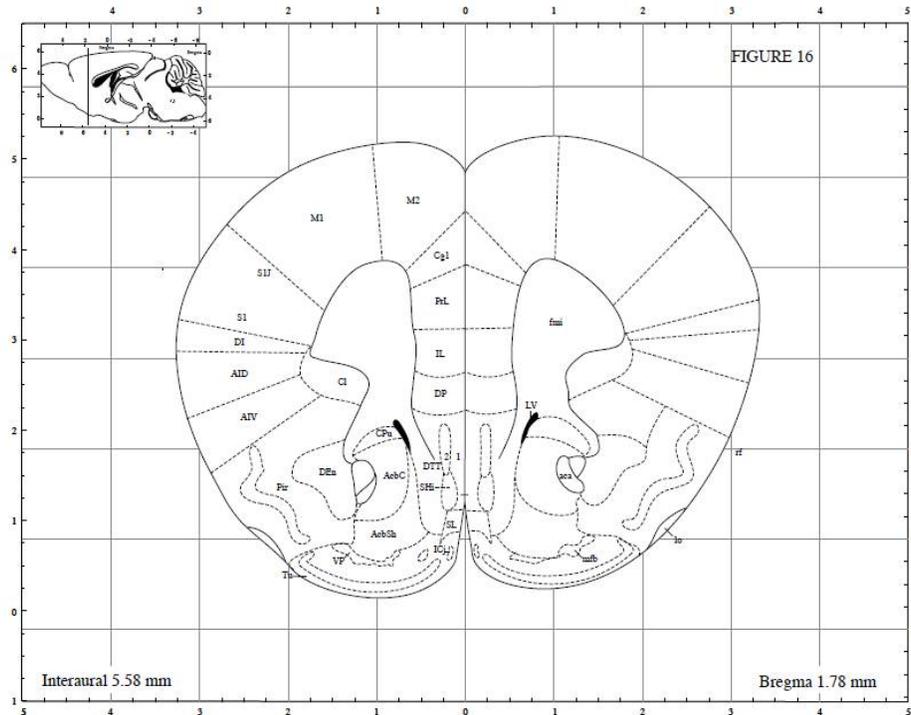


Figura 5. Corte coronal donde se observa las áreas motoras M1 (corteza motora primaria) y M2 (corteza motora secundaria) donde se realizó el conteo de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral (Paxinos & Franklim, 2001).

V.6 Análisis estadístico

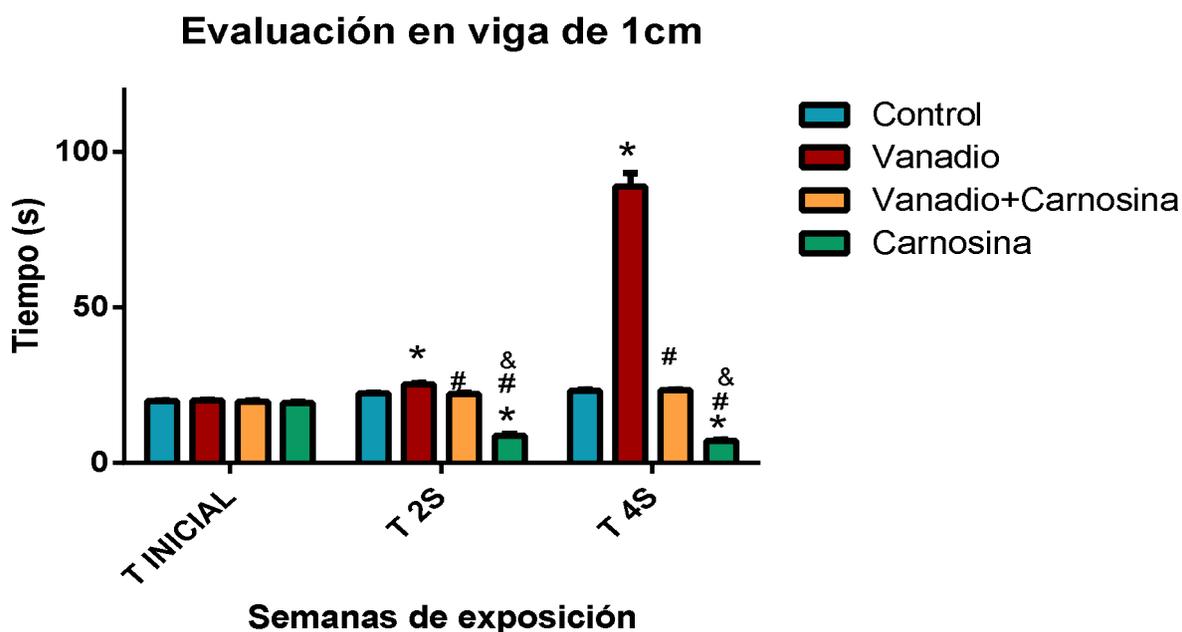
Con los datos obtenidos se realizó una prueba ANOVA con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se empleó una prueba post-hoc de Tukey.

VI. Resultados

VI.1 Prueba motora

VI.1.1 Prueba motora en viga de 1 cm

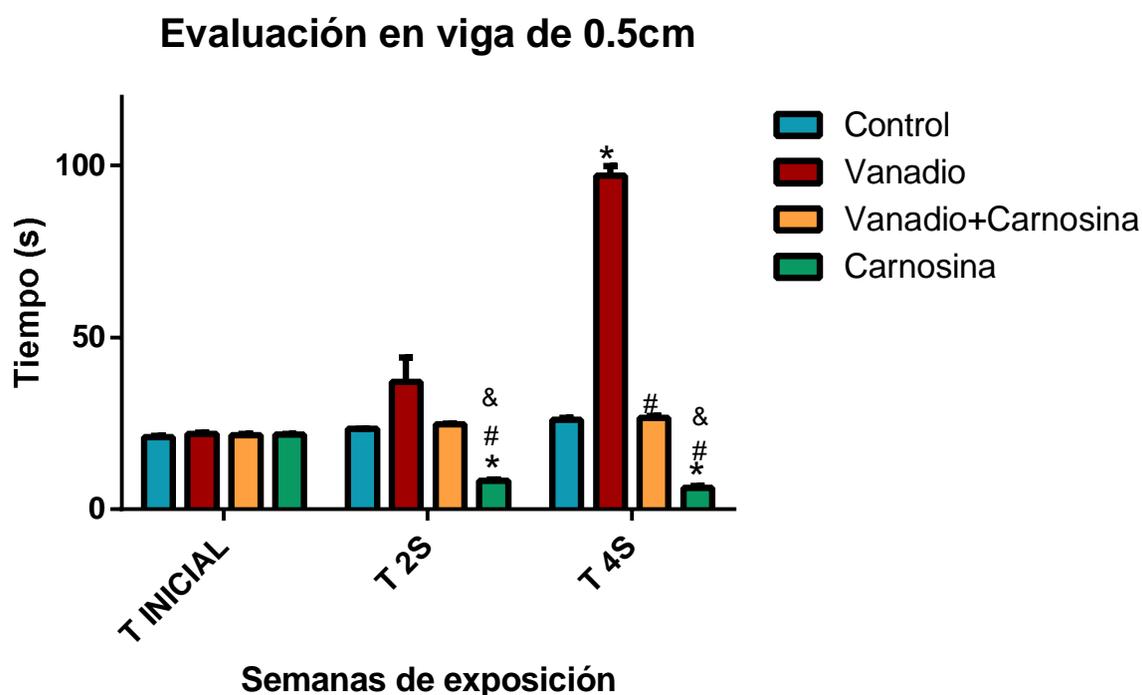
De los resultados de la actividad motora en la viga de 1cm de grosor se observó que a partir de la segunda semana el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina su tiempo fue menor ($\bar{X}=22.25 \pm 0.4137 \text{ seg.}$) que el grupo expuesto a Vanadio ($\bar{X}=25.34 \pm 0.4279 \text{ seg.}$) y similar al grupo Control ($\bar{X}=22.41 \pm 0.1968 \text{ seg.}$). El grupo tratado con Carnosina presentó menor tiempo ($\bar{X}=8.781 \pm 0.6524 \text{ seg.}$) que los grupos anteriormente mencionados. Tras las 4 semanas, se observó que el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina presentó un tiempo similar al grupo Control ($\bar{X}=23.36 \pm 0.1980 \text{ seg.}$), mientras que el grupo expuesto a Vanadio aumentó su tiempo ($\bar{X}=88.82 \pm 4.457 \text{ seg.}$) en comparación de los tres grupos. El grupo tratado con Carnosina presentó un tiempo menor ($\bar{X}=7.023 \pm 0.5176 \text{ seg.}$) que el grupo Control ($\bar{X}=23.20 \pm 0.3042 \text{ seg.}$) y los grupos expuestos a vanadio con y sin carnosina (Gráfica 1).



Gráfica 1. Tiempo de latencia en la viga de 1 cm tras las semanas (S) de exposición a V_2O_5 , se observa las diferencias entre grupos; (*) Control vs Grupos experimentales, (#) Vanadio vs Grupos experimentales y (&) Vanadio + Carnosina vs Carnosina. N: 10 ratones por grupo. Las barras representan el promedio \pm error estándar. Significancia ANOVA Post-hoc Tukey $p \leq 0.05$.

VI.1.2 Prueba motora en viga de 0.5 cm

Los resultados de la actividad motora en la viga de 0.5 cm de grosor muestran que conforme más estrecha sea la viga, mayor será el tiempo de recorrido; en la segunda semana se observó que el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina ($\bar{X}=24.60 \pm 0.3547$ seg.) su tiempo fue menor que el grupo expuesto a Vanadio ($\bar{X}=37 \pm 7.257$ seg.); con respecto al grupo Control ($\bar{X}=23.36 \pm 0.1349$ seg.) su tiempo fue similar. El grupo tratado con Carnosina presentó menor tiempo ($\bar{X}=8.178 \pm 0.5006$ seg.) en comparación de los otros grupos. A las 4 semanas se observó que el tiempo de latencia fue mayor en el grupo expuesto a Vanadio ($\bar{X}=97.16 \pm 2.720$ seg.) en comparación con los otros grupos. Mientras que el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina ($\bar{X}=26.61 \pm 0.4534$ seg.) presentó un tiempo similar al grupo Control ($\bar{X}=26.02 \pm 0.5102$ seg.). A diferencia el grupo tratado con Carnosina su tiempo fue menor ($\bar{X}=6.215 \pm 0.3972$ seg.) en comparación de los otros grupos (Gráfica 2).



Gráfica 2. Tiempo de latencia en la viga de 0.5 cm tras las semanas (S) de exposición a V_2O_5 , se observa las diferencias entre grupos; (*) Control vs Grupos experimentales, (#) Vanadio vs Grupos experimentales y (&) Vanadio + Carnosina vs Carnosina. N: 10 ratones por grupo. Las barras representan el promedio \pm error estándar. Significancia ANOVA Post-hoc Tukey $p \leq 0.05$.

V.I. 2 Densidad espinosa

En el análisis cuantitativo de espinas dendríticas de las dendritas secundarias de las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral, se observó que tras las 4 semanas el grupo expuesto a Vanadio y tratado con Carnosina ($\bar{X}=5.605 \pm 0.04697$), presentó mayor cantidad de espinas dendríticas a comparación del grupo expuesto a Vanadio ($\bar{X}=4.255 \pm 0.07254$), mientras que este grupo y el grupo Carnosina ($\bar{X}=8.310 \pm 0.05417$) presentaron menor cantidad de espinas a comparación del grupo Control ($\bar{X}=8.540 \pm 0.05708$) (Figura 6 y 7; Gráfica 3).

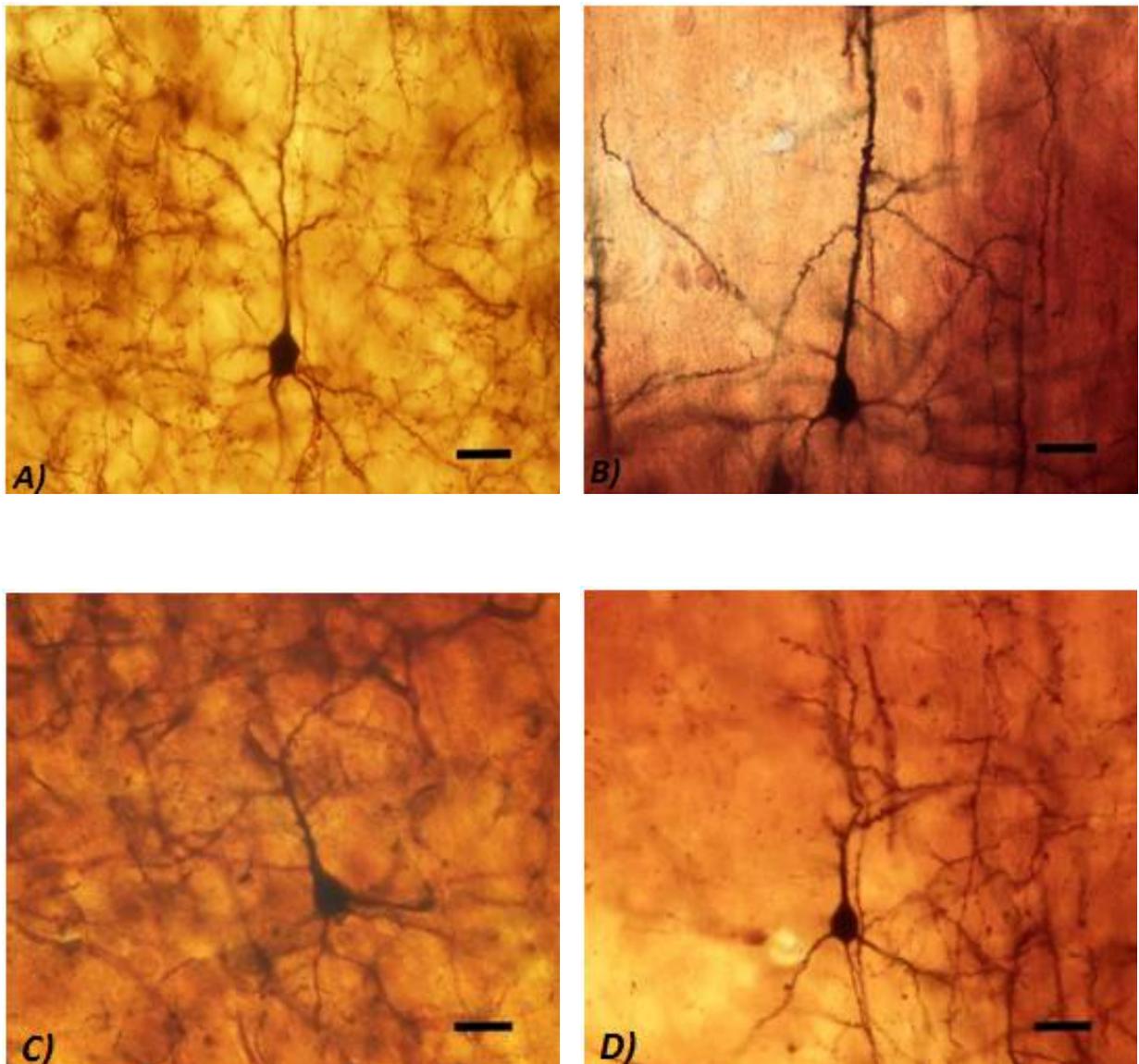


Figura 6. Fotomicrografía de neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral; A) Control, B) Expuesto a V_2O_5 , C) Expuesto V_2O_5 y tratado con Carnosina, y D) Tratado con Carnosina. Escala 25 μm .

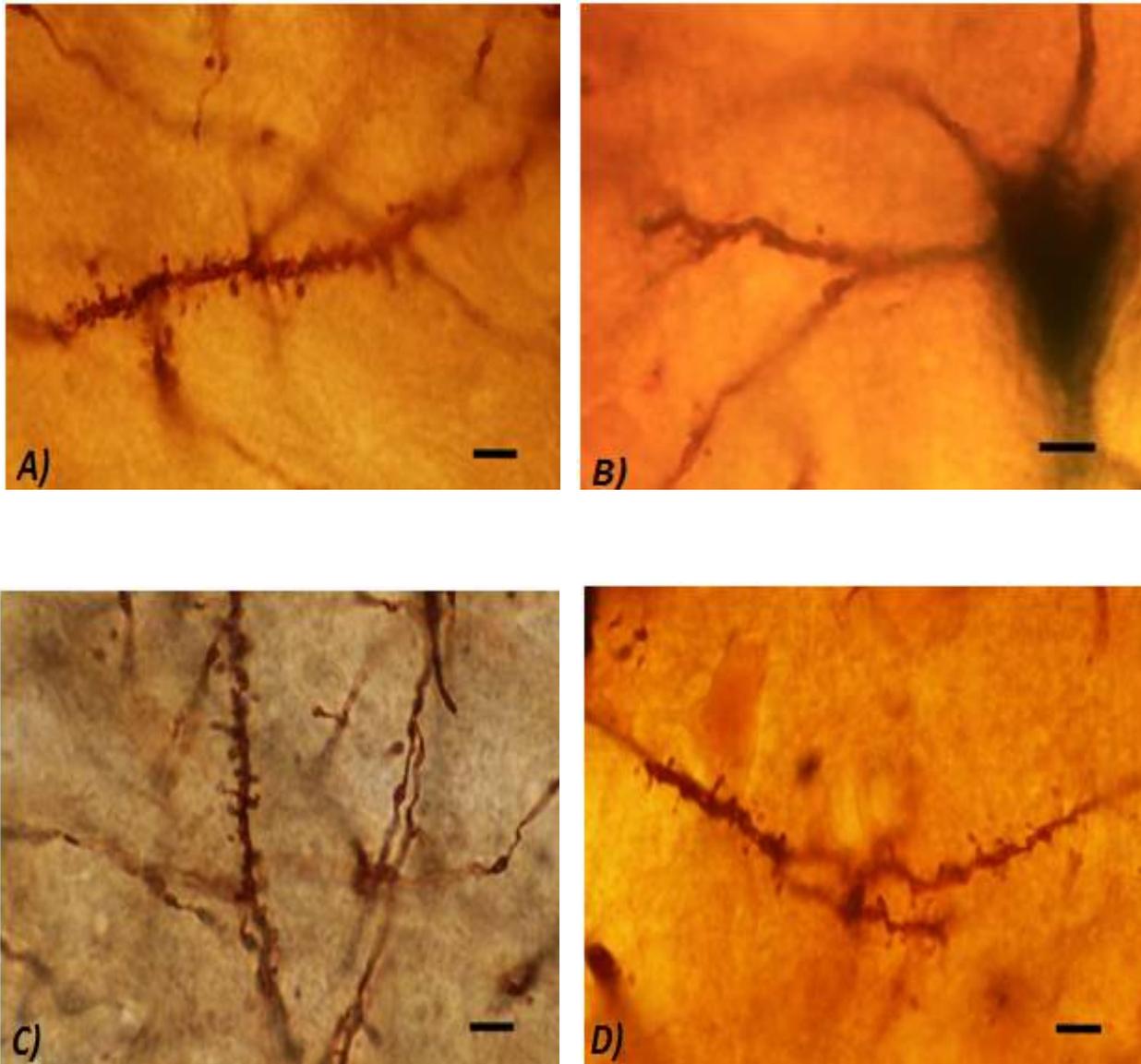
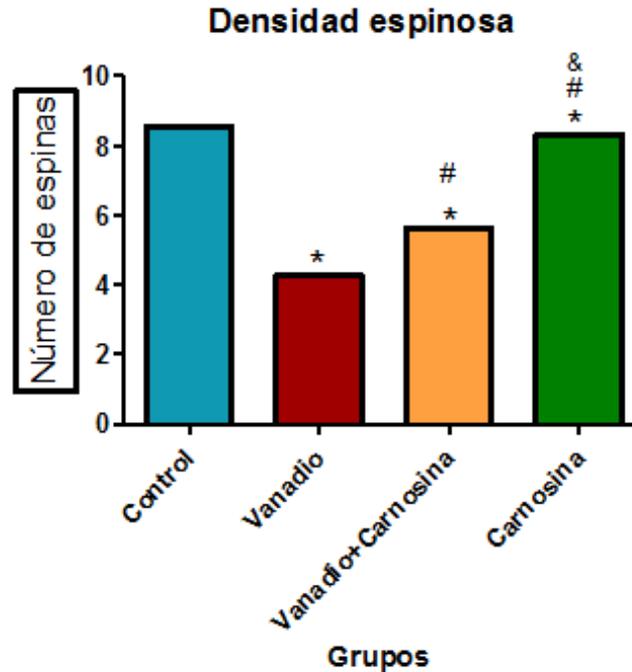


Figura 7. Fotomicrografía de espinas dendríticas de neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral; A) Control, B) Expuesto a V_2O_5 , C) Expuesto V_2O_5 y tratado con Carnosina, y D) Tratado con Carnosina. Se observa que el grupo expuesto a V posee menos espinas dendríticas a comparación de los demás grupos, mientras que el grupo expuesto a V y tratado con Carnosina presentan mayor densidad que el grupo V. Escala 5 μm .



Grafica 3. Número de espinas dendríticas de las dendritas secundarias de las neuronas piramidales de la capa V de corteza cerebral, tras la 4 semanas de exposición a V_2O_5 , se observa las diferencias entre grupos; (*) Control vs Grupos experimentales, (#) Vanadio vs Grupos experimentales y (&) Vanadio + Carnosina vs Carnosina. Las barras representan el promedio \pm error estándar. Significancia ANOVA Post-hoc Tukey $p \leq 0.05$.

VII. Discusión

▪ Grupo expuesto a V_2O_5

En estudios previos se ha observado que la inhalación de V_2O_5 produce pérdida de espinas dendríticas en neuronas medianas de cuerpo estriado, en neuronas piramidales de hipocampo y en neuronas granulosas de bulbo olfatorio (Avila-Costa et al., 2004, 2006, Colín-Barenque et al., 2015). Nuestros resultados mostraron que las NP de la capa V de la corteza cerebral del grupo de ratones expuestos a V poseen menor número de espinas dendríticas que el grupo control y los grupos tratados con carnosina con y sin inhalación de vanadio; tal pérdida se podría relacionar con el aumento en el tiempo de recorrido en los dos grosos de la viga (0.5 cm y 1 cm) conforme transcurren las semanas de exposición; estos resultados son similares a lo que se reportó en un estudio realizado en ratas expuestas a Mn^{2+} , mostraron que en la viga de 12 mm todas las ratas realizaron el recorrido llegando a su caja hogar; sin embargo en la viga de 3mm y 6mm no todas las ratas lograban recorrer con facilidad, demostrando que entre menor sea el grosor de la viga se requiere mayor esfuerzo y habilidad motora compleja (Almazán, 2008).

En nuestros resultados se observó que conforme transcurren las semanas de exposición a V_2O_5 , el tiempo de latencia aumenta en ambos grosos, lo cual resulta ser similar a lo observado en un modelo murino ante la inhalación de cloruro de manganeso 0.04 M ($MnCl_2$) y acetato de manganeso 0.02 M [$Mn(OAc)_3$] durante 5 meses, se les realizó la prueba de la viga a las 0, 2, 4, 6 y 8 inhalaciones (1 vez por semana), en cual se observó que conforme aumenta el tiempo de exposición, el tiempo de recorrido aumenta en la viga 3mm (Ordoñez et al., 2008).

Este aumento de latencia en la viga podría estar relacionada con la pérdida de espinas dendríticas, debido que las NP de la capa V se encuentran como neuronas motoras superiores, esenciales para la iniciación de los movimientos voluntarios y para las secuencias espaciotemporales complejas de los movimientos hábiles (Purves et al., 2008). Realizan sinapsis asimétricas empleando a glutamato como neurotransmisor excitatorio, donde la activación excesiva de sus receptores resulta ser neurotóxica, y se ha relacionado con procesos neurodegenerativos (Segura et al., 2003) como la excitotoxicidad, la cual podría presentarse ante el aumento en los niveles de ERO inducidos por el V; la neurona presináptica al liberar Glut es captado por el receptor NMDA en la neurona postsináptica, la entrada de glutamato junto con la presencia de ERO conlleva al aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} que activa a fosfolipasas, proteasas, y endonucleasas, así como a la óxido nítrico sintasa (NOS) (Dorado et al., 2003).

El aumento de los niveles de calcio y óxido nítrico (NO) en la mitocondria hace que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial (MTP), el déficit de ATP no permite el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP que se encuentran en la membrana citoplásmica, este hecho provoca una entrada masiva de agua (H_2O) y sodio (Na^+) y una salida de potasio (K^+) causando edema celular y muerte por necrosis (Dorado et al., 2003).

El daño mitocondrial y el daño al DNA induce la activación de genes que llevan a la muerte por apoptosis (Fig.8), Jiménez, 2009 observó que tras la inhalación de V_2O_5 , este metal genera aumento de la marca de DAPI, la cual muestra la presencia de núcleos apoptóticos en plexo coroideo y corteza cerebral cuya presencia fue mayor a las 4 semanas de exposición. Además Colín-Barenque et al., 2015 observó que con el mismo modelo de inhalación en bulbo olfatorio este metal causa alteraciones en las células granulosas como muerte neuronal por apoptosis y necrosis.

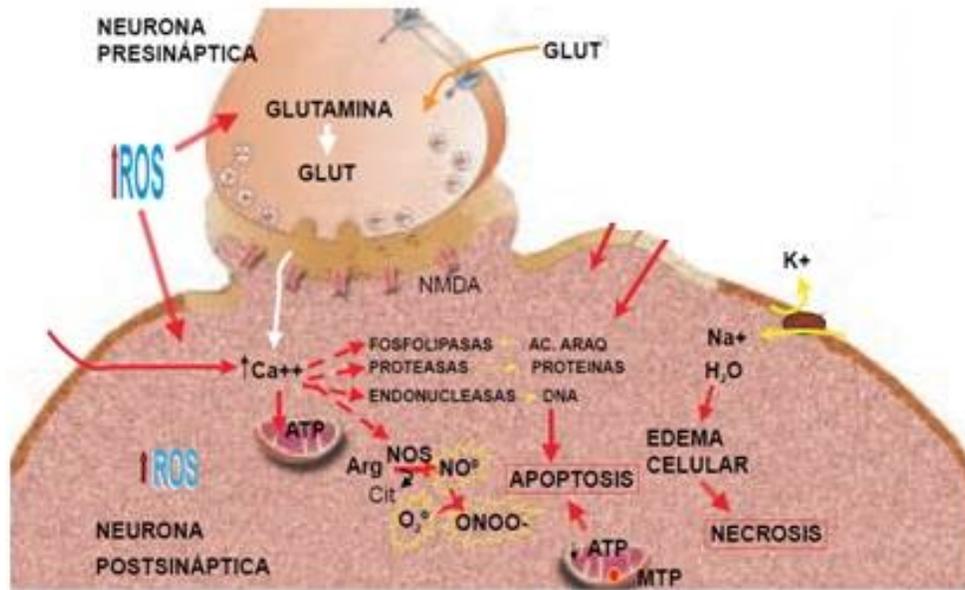


Fig.8 Esquema que muestra la secuencia de eventos que ocurren durante el daño que llevan a la muerte neuronal (Dorado et al., 2003).

La pérdida de espinas se podría explicar debido a la capacidad del V de inducir ERO, las cuales están implicadas en el estrés oxidante (García et al., 2005), provocando alteración en las enzimas antioxidantes de la célula como: SOD y CAT e incremento en la peroxidación lipídica causando rompimientos de la membrana celular (Soares et al., 2007), Jiménez en el 2009 observó que este metal genera estrés oxidante en las neuronas piramidales de corteza cerebral, con preferencia por los lípidos de membrana, sufriendo peroxidación y generando productos tóxicos como es el 4-HNE, el cual tiene la capacidad de inhibir proteínas que participan en la transmisión sináptica.

Además este aumento de ERO activa la vía NF-kappa B y a las MAPs, seguido por el incremento en la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMPs), MMP-9 (Colín-Barenque et al., 2008), las cuales se han relacionado con la modulación de la morfología de las espinas dendríticas (Michaluk et al., 2011), por lo que los cambios en la densidad espinosa podrían estar asociados con el aumento de las MMPs, y esto impide la regulación del medio ambiente pericelular de las espinas provocando su retracción, aunado a esto la exposición a V altera la expresión de citocinas y quimiocinas, quienes regulan positivamente la síntesis de las MMPs (Colín-Barenque et al., 2008).

A su vez esta pérdida de espinas dendríticas se podría asociar con la alteración de su citoesqueleto, ya que su citoplasma posee una red flexible de filamentos compuestos de actina (Ac) y las proteínas de unión como; calmodulina, miosina, espectrina cerebral (fodrina), proteína asociada a microtubulos (MAP)-2 (Bourne & Harris, 2007), cortactina, drebrina y neurabina

(Soria & Perez, 2012). Diversos estudios han demostrado que las proteínas de unión al citoesqueleto de Ac son fundamentales en la formación, retracción, estabilidad, tamaño y forma de las espinas dendríticas (Soria & Perez, 2012).

En estudios recientes se demostró que el V altera la Ac, ya que en el mismo modelo de inhalación se observó disminución de actina en células de testículo de ratón (Rodríguez et al., 2013), por lo que es probable que también altere al citoesqueleto de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales de corteza cerebral de la capa V. El reordenamiento de la Ac tiene efectos sobre la formación y/o la pérdida de espinas dendríticas, así como cambios morfológicos (forma y número de espinas) (Soria & Perez, 2012). A su vez la polimerización de la forma monomérica (G-actina) como polimérica (F-actina) y el grado de polimerización de Ac (y por lo tanto la relación G-actina/F-actina) influye en la morfología de las espinas dendríticas (Soria & Perez, 2012).

El V al tener una similitud estructural y electrónica con el fosfato (Fig. 9) (Mukherjee et al., 2013), podría interferir en la polimerización de los filamentos de Ac, la cual depende de la disponibilidad de los monómeros de Ac unidos con ATP (actina-ATP), cuando las subunidades se incorporan en filamentos, la hidrólisis lenta de actina-ATP a actina-ADP es catalizada, que estabiliza la forma filamentosa (Carlisle & Kennedy, 2005) (Fig. 10). Debido a que el V compite con los grupos fosfato (Mukherjee et al., 2013), éste podrían unirse a uno de los sitios de fosforilación de la espinofilina, proteína que tiene un dominio de unión a la actina en su extremo N-terminal, esta proteína interactúa con varias proteínas abundantes en las espinas, organiza el citoesqueleto de actina e interactúa con la proteína fosfatasa-1 (PP1), además modula la actividad de una variedad de canales iónicos, incluyendo los receptores de glutamato, por estas propiedades se evidencia que la espinofilina regula la dinámica morfológica y funcional de las espinas dendríticas (Feng et al., 2000).

A su vez se ha observado que el V causa alteraciones en las vías de señalización del Ca^{2+} (Mukherjee et al., 2004), lo cual podría alterar el funcionamiento de algunas proteínas, como de la gelsolina, proteína clave en el ensamblaje y desensamblaje ya que regula la longitud de F-actina (mediante corte de los filamentos) y su actividad incrementa por activación del receptor tipo NMDA (N-Metil-D-aspartato) y la consecuente entrada de iones Ca^{2+} (Soria & Perez, 2012).

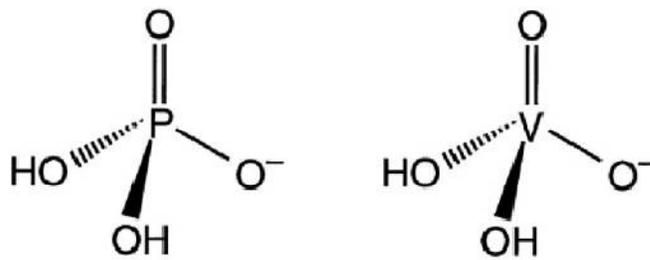
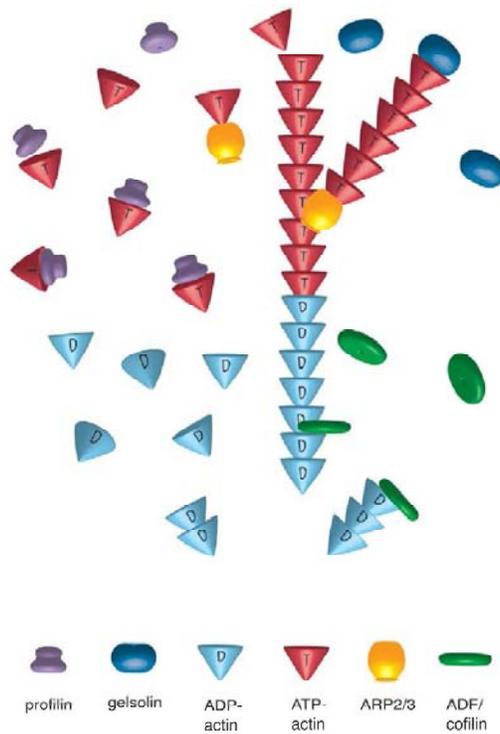


Figura 9. Esquema donde se muestra que el vanadato, V (5), es capaz de imitar algunas de las acciones biológicas de fosfato mediante la formación de una estructura tetraédrica (Louise & Stephen, 2009).



TRENDS in Neurosciences

Figura 10. Esquema que muestra el control durante el ensamblaje y desensamblaje. El crecimiento del filamento de actina mediante la adición de la actina-ATP a actina-ADP (Carlisle & Kennedy, 2005).

El aumento en la latencia de la viga podría estar relacionado con la pérdida de espinas de las neuronas piramidales, las cuales proyectan sus axones a núcleos externos a la corteza como los ganglios basales (Ibarra, 2004), en los cuales se ha observado que ante la inhalación de V_2O_5 se produce una significativa pérdida neuronal dopaminérgica en la sustancia nigra y pérdida de espinas dendríticas de neuronas medianas del cuerpo estriado (Avila-Costa et al., 2004), por lo que dicha alteración en la densidad espinosa podría causar alteraciones tanto en la actividad del sistema piramidal y extrapiramidal, debido a que la mayor entrada en el sistema de los ganglios basales proviene de las neuronas piramidales de la corteza cerebral, las cuales al recibir los estímulos de los órganos sensoriales, la corteza los transforma en impulsos que se dirigen a los ganglios basales, tallo cerebral o la medula espinal (Rosas, 2013).

▪ **Grupo expuesto a V_2O_5 y tratado con Carnosina**

En el grupo de ratones expuestos a V y tratados con Carnosina se observó que el tiempo de recorrido era menor a comparación del grupo de ratones expuestos a V, lo cual podría estar relacionado con su densidad espinosa de este grupo, ya que se observó una mayor densidad en comparación del grupo expuesto a V, lo cual demuestra que la inhalación de éste metal produce pérdida de espinas dendríticas, pero con el efecto neuroprotector de la carnosina se minimiza tal pérdida, ya que se ha reportado que la carnosina regula la concentración de iones metálicos de transición en los fluidos y tejidos, debido a su capacidad para formar complejos con estos iones; además de ser un potente barrador de ERO (Bertinaria et.al., 2011), por lo cual funciona como protección de las células ante el estrés oxidante (Cheng et. al., 2011). Esto se podría deber a que la carnosina es un dímero que posee tres grupos ionizables: el grupo carboxílico (pKa 2,76), el grupo amino del residuo de β -alanina (pKa 9,32), y los nitrógenos del anillo de imidazol (pKa 6.72). Este anillo de imidazol posee dos formas tautoméricas; en su forma neutra son el N^+ protonada (Tautómero I) y el N^π protonada (tautómero II), algunos estudios han mostrado que el equilibrio tautómero es afectada por quelación de metales (Boldyrev et.al., 2013), ya que este anillo reacciona directamente con el anión superóxido, uno de los radicales libres producidos por el V, formando un complejo de transferencia de carga con el radical superóxido cambiando la reactividad de O_2^- , por lo que también se le considera un desactivador eficaz de otros ERO tales como los radicales hidroxilo ($\cdot OH$) (Fig. 11)(Boldyrev et.al., 2013).

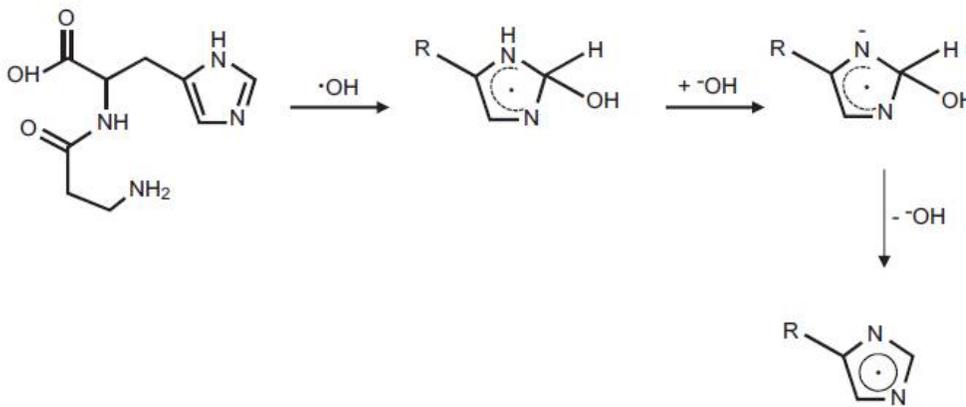


Figura 11. Representación esquemática de la interacción del anillo de imidazol de la carnosina con los radicales hidroxilos (OH) (Boldyrev et al., 2013).

En un estudio realizado en neurofilamentos (NF-L) se observó que la carnosina actúa como antioxidante ya que inhibe significativamente la agregación de NF-L inducida por el sistema Citocromo C- H₂O₂ (Kim & Kang, 2007), donde el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) es uno de los compuestos con el que V^{IV} interactúa, provocando el aumento en los radicales hidroxilo por medio de la reacción tipo Fenton (Fig. 12) y producir estrés oxidante (Rodríguez& Altamirano, 2006), para lo cual se ha observado que la carnosina a baja concentración (100 mg) incrementa la expresión de CAT en sangre (Huin-Seung al.,2014), enzima antioxidante que actúa sobre los peróxidos para metabolizarlos hasta la obtención de agua (H₂O) y oxígeno (O₂) (Dorado et al., 2003) (Fig. 13).

Los neurofilamentos son el mayor elemento en el citoesqueleto neuronal (Kim & Kang, 2007), siendo más abundante en el axón, formando parte de la terminal presináptica (Escobar & Pimienta, 2006), sitio fundamental en la sinapsis, ya que El aumento en la latencia de la viga podría estar relacionado con la pérdida de espinas, ya que las NP proyectan sus axones a los ganglios basales (Ibarra, 2004).



Figura 12. Reacción tipo Fenton



Figura 13. Representación esquemática de la interacción de la catalasa sobre el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al reducirlo para la obtención de agua (H₂O) y oxígeno (O₂).

En la actividad motora se observó que el tiempo de latencia es menor que el grupo expuesto a V, lo cual se podría deber a que la carnosina funciona como neuroprotector ya que se ha observado que este dipéptido al ser implementado junto con el tratamiento L-DOPA en pacientes con enfermedad de Parkinson, se presentan cambios positivos en los síntomas neurológicos como; movimiento rápidos y alternos de manos, agilidad de piernas, disminución en la rigidez de piernas y manos, mejoramiento de actividades cotidianas y motoras (Boldyrev, et al., 2008); donde una de los ganglios que se ve involucrado es la sustancia nigra, presentando pérdida de neuronas dopaminérgicas a causa de la acumulación de ERO producidos por el V (Avila-Costa et al., 2004), alterando el sistema antioxidante como el de: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Boldyrev et al., 2008).

▪ **Grupo tratado con Carnosina**

En este grupo se observó mayor número de espinas que los grupos expuestos a V con y sin tratamiento de Carnosina; y presentó menor número de espinas que el grupo Control, sin embargo esta disminución no se ve reflejada en su actividad motora ya que su tiempo de recorrido es menor en los grupos antes mencionados, lo cual podría ser explicado debido a que la corteza cerebral no es la única estructura implicada, ya que las eferencias de la corteza cerebral se dirigen también a varias regiones de la corteza, encéfalo, ganglios basales y médula espinal.

La menor latencia en la actividad motora en este grupo en comparación del grupo control podría deberse a que se ha observado que en pollos la carnosina causa hiperactividad, ya que al inyectarse carnosina (3.4 y 6.4 μmol) presentaron aumento en las vocalizaciones y altos niveles de corticoesterona en plasma, tales resultados podrían indicar que la carnosina actúa sobre el factor liberador de corticotropina (FLC) aunque aún no se ha aclarado su relación (Tomonaga et al., 2004).

En otro estudio se ha reportado que la carnosina acelera el metabolismo de la noradrenalina y cortisol en el suero en ratas (Nagai et al., 1990). A su vez Alaghband-Zadeh et al., 2001 sugieren que la hiperactividad provocada por la carnosina puede relacionarse con la generación de óxido nítrico (NO) por la vía óxido nítrico sintasa (NOS) en el cerebro, ya que se observó que al emplear el inhibidor NOS (L-N^{G} -nitro- L -arginina metil ester HCl) disminuía la actividad espontánea, por lo que se podría suponer que la carnosina produce NO por vía NOS (Tomonaga et al., 2004) se ha hipotetizado que la carnosina que ha sido implementada es capturada por los astrocitos, desde que existe cNOS (Óxido nítrico sintasa constitutiva), la carnosina estimula la producción de NO via cNOS (Tomonaga et al., 2005), la liberación de NO aumenta la vasodilatación en todos los niveles celulares permite la recuperación del músculo y el aumento de su capacidad de crecimiento (Díaz et al., 2009).

VIII. Conclusión

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que la inhalación de vanadio produce pérdida de espinas dendríticas

en las neuronas piramidales de la capa V de la corteza cerebral, debido a la capacidad del vanadio de inducir especies reactivas de oxígeno, las cuales están implicadas en el estrés oxidante; se ha demostrado la capacidad neuroprotectora de la carnosina ya que atenúa la pérdida de espinas. Se observó que esta neuroprotección influye en la mejora de la actividad motora, debido que el grupo expuesto a vanadio y tratado con carnosina presentó menor tiempo de latencia que el grupo vanadio. Sin embargo en los resultados se observó que la carnosina por sí sola causa hiperactividad ya que el tiempo de latencia era menor en comparación con el grupo control.

La relevancia de este estudio está enfocada en mostrar el efecto neuroprotector que tiene la carnosina ante la exposición al vanadio, metal que es capaz de generar ERO capaces de producir estrés oxidante, el cual es un factor causante de la generación de enfermedades neurodegenerativas, principalmente en las ciudades con altos índices de contaminación.

IX. Anexos

- Solución de Golgi (Ósmico dicrómica)

300 ml de agua destilada con 8 g de Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y 1g de Tetraóxido de osmio (OsO_4).

Se mantiene a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) por una hora, después se refrigera.

- Solución de Nitrato de plata (Solución argéntica)

100 ml de agua destilada con 0.75 g de nitrato de plata ($AgNO_3$) 0.75% 24 horas.

X. Referencias

Afshin-Majd, Siamak; Khalili, Mohsen; Roghani, Mehrdad; Mehranmehr, Narges & Baluchnejadmojarad, Tourandokht. (2015). Carnosine exerts neuroprotective effect against 6-hydroxydopamine toxicity in hemiparkinsonian rat. *Mol Neurobiol*, 51:1064–1070.

Allen, Joshua L.; Liu, Xiufang; Conrad, Katherine; Oberdörster, Günter & Cory-Slechta, Deborah. (2014). Consequences of developmental exposure to concentrated ambient ultrafine particle air pollution combined with the adult paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype in male mice. *Neurotoxicology*. 41: 80–88.

Alaghband-Zadeh, J.; Mehdizadeh, S.; Khan, N.S.; O'Farrell, A.; Bitensky, L.; Chayen, J. (2001). The natural substrate for nitric oxide synthase activity. *Cell Biochem. Funct*, 19: 277–280.

Almazán, Tejada Martha Patricia (2008). Efecto del manganeso (Mn) sobre las funciones motoras y mnémicas en un modelo de daño hepático crónico en ratas. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Anderson, JO; Thundiyil, J.G. & Stolbach A. (2012). Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medical Toxicology*, 8:166-75.

Avila-Costa, M.R.; Montiel, Flores E.; Colín-Barenque L.; Ordoñez, J.L.; Gutiérrez, A.L.; Niño-Cabrera H.G.; Mussali-Galante P. & Fortoul T. I. (2004) Nigrostriatal modifications after vanadium Inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. *Neurochemical Research*, 29: 1365–1369.

Avila-Costa María Rosa; Colín-Barenque Laura.; Zepeda-Rodríguez Armando; Antuna, Silvia B.; Saldívar, Liliana O.; Espejel-Maya Guadalupe; Mussali-Galante Patricia; Avila-Casado María del Carmen; Reyes-Olivera Alfonso; Anaya-Martínez Veronica & Fortoul, Teresa I. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neuroscience Letters*, 381: 21–25.

Avila-Costa Maria Rosa; Fortoul, Teresa .I.; Niño-Cabrera Geraldine; Colín-Barenque Laura; Bizarro-Nevarés Patricia; Gutiérrez-Valdez Ana Luisa; Ordoñez-Librado José Luis; Rodríguez-Lara Vianey; Mussali-Galante Patricia; Díaz-Bech Patricia & Anaya-Martínez Veronica. (2006). Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V2O5) promote memory deterioration. *NeuroToxicology*, 27: 1007–1012.

Baran, Enrique J. (2008). Vanadium detoxification: chemical and biochemical aspects. *Chemistry & Biodiversity*, 5: 1477-1484.

Bellia, Francesco; Vecchio, Graziella; Cuzzocrea Salvatore; Calabrese, Vittorio & Rizzarelli Enrico. (2011). Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 32: 258–266.

Bertinaria, Massimo; Rolando, Barbara; Giorgis, Marta; Montanaro Gabriele; Guglielmo, Stefano; Buonsanti, M. Federica; Carabelli, Valentina; Gavello, Daniela; Giuseppe, Pier Daniele; Fruttero, Roberta & Gasco, Alberto. (2011). Synthesis, physicochemical characterization, and biological activities of new carnosine derivatives stable in human serum as potential neuroprotective agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54: 611–621.

Boldyrev, Alexander; Fedorova, Tatiana; Stepanova, Maria; Dobrotvorskaya, Iriana; Kozlova, Eugenia; Boldanova, Natalia; Bagyeva, Gulbakhar; Ivanova-Smolenskaya, Iriana & Illarioshkin, Serguey. (2008). Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: A Pilot Study. *Rejuvenation Research*, 11: 1-8

Boldyrev, Alexander A.; Aldini, Giancarlo & Derave, Wim. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol Rev*, 93: 1803–1845.

Bourne, N. Jennifer & Harris, M. Kristen. (2007). Dendritic spines. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-17.

Calderón, Hidalgo Paola del Carmen. (2007). Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias químicas y farmacia. Guatemala.

Capella, S. Luiz; Gefé, R. Maria; Silva, F. Edson; Affonso-Mitidieri, Ottilia; Lopes, G. Anibal; Rumjanek, M. Vivian; & Capella, A.M. Márcia. (2002). Mechanism of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406: 65–72.

Carlisle, Holly J. & Kennedy, Mary B. (2005). Spine architecture and synaptic plasticity. *Review. Trends in Neurosciences*, 28: 182-187.

Castellanos, Ballesteros Juan Jiménez; Catalina, Herrera Carlos Javier & Carmona, Bono Amparo. (2002). *Anatomía humana general. Segunda reimpresión. Universidad de Sevilla*. 195-196.

Cheng, Jin; Wang, Fang; Yu, Da-Fang; Wu, Peng-Fei & Chen, Jian-Guo. (2011). The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*, 650: 84–194.

Colín-Barenque L.; Martínez, Hernández G.; Baiza, Gutman L.A.; Avila, Costa M.R.; Ordóñez, Librado, J.L.; Bizarro, Nevares P.; Rodríguez, Lara V.; Piñón, Zarate G.; Rojas, Lemus M.; Mussali, Galante P. & Fortoul, T.I. (2008). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation. *Journal of Applied Toxicology*, 28: 718–723.

Colín-Barenque L; Bizarro-Nevares P.; González-Villalva A.; Zepeda A., Pasos F; Reséndiz, Avendaño S.; Rojas-Lemus M; Pedraza-Chaverri J.; Medina-Campos ON.; Aley P., Espinosa-Villanueva J. & Fortoul T. (2014). Carnosine neuroprotection of the cerebral cortex in mice

exposed to vanadium inhalation. An ultrastructural analysis. (Datos no publicados). En: 18 th International Microscopy Congress. Praga, Republica Checa.

Colín-Barenque Laura; Pedraza-Chaverri Jose; Medina-Campos Omar; Jiménez-Martínez Rúben; Bizarro-Nevarés Patricia; González Villalva Adriana; Rojas-Lemus Marcela & Teresesa I. Fortoul. (2015). Functional and morphological olfactory bulb modifications in mice after vanadium inhalation. *Toxicologic Pathology*, 43: 282-291.

Crans, DC; Smee, J.J; Gaidamauskas, E. & Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Reviews*, 104: 849-902.

Curtis, Helena; Schenk, Adriana; Massarini, Alicia. (2008). *Biología*. Séptima edición. Medica panamericana. Chile. 655-656.

Daigle; Christopher C.; Chalupa, David C.; Gibb, F. Raymond & Morrow, Paul E. (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhalation Toxicology*, 15:539–552.

Díaz, Díaz Rosario Marcia; Mejía, Medrano Sandra Jimena; Huerta, de Mora Octavio Julio & Huerta, Acha Edwin Adolfo. (2009). Óxido nítrico: la diversidad de sus efectos sistémicos. *Revista Científica Ciencia Médica*, 12: 35-38.

Dorado, Martínez Claudia; Rugerio, Vargas Concepcion & Rivas, Arancibia Selva. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46: 229-235.

Elinder C. G.; Gerhardsson L. & Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. En: *Biological monitoring of toxic metals* (W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg y R. Sanger, Eds.)Plenum Press, Nueva York. 1-71.

Environmental Protection Agency (2011). *Toxicological review of vanadium pentóxido V₂O₅* EPA/635/R-11/004A

Escobar, I. Martha & Pimienta, J. Hernan. (2006). *Sistema nervioso. Segunda reimpresión*. Editorial Universidad del Valle. Colombia.37, 79-82.

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

Feng, Jian; Yan, Zhen; Ferreira, Adriana; Tomizawa,Kazuhito; Liauw, Jason A.; Zhuo, Min; Allen, Patrick B.;Ouimet, Charles C. & Greengard, Paul. (2000). Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 9287-9292.

Fiala, John C.; Spacek, Josef & Harris, Kristen M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?. *Brain Research Reviews*, 39:29–54.

Fina, Brenda. (2006). *Estrés oxidativo. Laboratorio de Biología ósea y metabolismo mineral. Facultad Ciencias Médicas. UNR-Rosario. Argentina. 2-4.*

Fortoul T.I.; Quan-Torres A.; Sánchez I.; López I.E.; Bizarro P.; Mendoza M.L.; Osorio L.S.; Espejel-Maya G.; Avila-Casado M. del C.; Avila-Costa M.R.; Colín- Barenque L.; Villanueva D.N. & Olaiz-Fernández G. (2002). Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health*, 57: 446-449.

Fortoul, T.I.; Rodríguez-Lara V.; González-Villalva A.; Rojas-Lemus M.; Cano-Gutiérrez G.; Ustarroz-Cano M.; Colín- Barenque L.; Bizarro-Nevarés P.; García- Pealez I.; Montaña L.F.; Jiménez-Martínez R.S.; Lopez-Valdez N.; Ruiz-Guerrero M.L.; Meléndez-García N.A.; García-Ibarra F.A.; Martínez-Baez V.; Zapata, Alfaro D.; Muñiz-Rivera-Cambas A.; López-Zepeda L.S.; Quezada-Maldonado E.M. & Cervantes-Yépez S.(2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chimica Acta*, 420: 8-15.

Fortoul T.I; Rodriguez-Lara .; Gonzalez-Villalva A.; Rojas-Lemus M.; Colin-Barenque L.; Bizarro-Nevarés P.; García-Peláez I.; Ustarroz-Cano M.; López-Zepeda S.; Cervantes-Yepéz S.;López-Valdez N.; Meléndez-García N.; Espinosa-Zurutuza N.; Cano-Gutiérrez G. & Cano Rodríguez M.C. (2015). Chapter health effects of metals in particulate matter. Farhad Nejadkoorki. INTECH. 1-38.

Frick, A. Zieglgänsberger W & Dodt, H-U. (2001). Glutamate receptors form hot spots on apical dendrites of neocortical pyramidal neurons. *Journal Neurophysiology*, 86: 1412-21.

Gal, Iglesias Beatriz; López, Gallardo Meritxell; Martin, Velazco Ana Isabel & Montalvo Prieto Julio. (2007). *Bases de la fisiología. Segunda edición. Tébar. Madrid. 581-582.*

García, Graciela Beatriz; Biancardi, Maria Eugenia & Dario, Quiroga Ariel (2005). Vanadium (V)-induced neurotoxicity in the rat central nervous system: A histo-immunohistochemical study. *Drug and Chemical Toxicology*, 28:329–344.

García, Graciela Beatriz. (2006). El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent.*, 14: 32-36.

Giles, Luisa V. & Koehle, Michael S.(2014). The health effects of exercising in air pollution. *Sports Med.*, 44:223–249.

Guiotto, Andrea; Calderan, Andrea; Ruzza, Paolo & Borin, Gianfranco (2005). Carnosine and carnosine –related antioxidants: A review. *Current Medicinal Chemistry*, 12: 2293-2315.

Hipkiss, R. Alan. (2007). Could carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 11: 229–240.

Hsieh, Wilson C. Linda; Benfenati, Fabio; Snyder, L. Gretchen; Allen, B. Patrick; Nairn, C. Angus & Greengard, Paul. (2003). Phosphorylation of spinophilin modulates its interaction with actin filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 278:1186–1194.

Hui-Seun, Park; Kyung-Hoon, Han; Jeoung-A, Shin; Joo-Hyun, Park; Kwan-Young, Song & Doh-Hee, Kim. (2014). The neuroprotective effects of carnosine in early stage of focal ischemia rodent model. *J Korean Neurosurg Soc* 55: 125-130.

Ibarra, Villa María Dolores. (2004). Interacción de receptores GABAérgicos y Serotoninérgicos en la modulación presináptica de la excitabilidad eléctrica en la corteza sensorio-motora de la rata. Tesis para obtener el título de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Jiménez, Martínez Rubén Salvador (2009). Daño oxidante en corteza cerebral y plexo coroideo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Jiménez, Martínez Rubén Salvador (2012). Neurogénesis en bulbo olfatorio en un modelo de exposición a vanadio por vía inhalada. Diferencias por sexo. Tesis para obtener la maestría en ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Kaidanovich, Beilin Oksana; Lipina, Tatiana; Vukobradovic, Igor; Roder John & Woodgett, James R. (2011). Assessment of social interaction behaviors. *J. Vis. Exp. Toronto*, 48.

Kim, Hoon Nam & Kang, Hoon Jung. (2007). Protective Effects of Histidine Dipeptides on the Modification of Neurofilament-L by the Cytochrome c/Hydrogen Peroxide System. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40: 125-129.

Kohen, Ron; Yamamoto, Yorihiro; Cuny, Kenneth C. & Ames, Bruce N. (1998). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Medical Sciences*, 85: 3175-3179.

Lagerkvist G., Nordberg G.F. & Vouk, V. (1986). Vanadium. En: *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 2: 638-663.

Léonard A. & Gerber GB. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research*, 317:81-87.

Li Hong; Zhou, Dinglun; Zhang, Qin; Feng, Chengyong; Zheng, Wei; He, Keping & Lan, Yajia. (2013). Vanadium exposure-induced neurobehavioral alterations among Chinese workers. *NeuroToxicology*, 36: 49-54.

Loomis, D; Grosse, Y; Lauby-Secretan B; El Ghissassi F; Bouvard V & Benbrahim-Tallaa et al. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol.*, 14: 1262-1263.

López, L. Argelia; Fernando, A. Carlos; Lazarova, Zelmira; Bañuelos, R. Rómulo & Sánchez, R. Sergio Hugo. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista Anacem*. 6: 48-53.

López, D. Santiago. & Arancibia, S. Rivas. (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med. UNAM*, 51: 104-107.

López, Muñoz Antonio. (2006). *Histología especial humana. Manual de prácticas. Universidad de Cádiz.* 15-17.

Louise, Assem Farida & Stephen, Levy Leonard. (2009). A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 12:289–306

Morinville, A; Maysinger, D & Shaver, A. (1998). From vanadis to atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS*, 19:452-460.

Mayor, Oxilia Rosa. (2010). Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5:23-29.

Michaluk, Piotr; Wawrzyniak, Marcin; Alot, Przemyslaw; Szczot, Marcin; Wyrembek, Paulina; Mercik, Katarzyna; Medvedev, Nikolay; Wilczek, Ewa; De Roo, Mathias; Zuschratter, Werner; Muller, Dominique; Wilczynski, Grzegorz M.; Mozrzymas, Jerzy W.; Stewart, Michael G.; Kaczmarek, Leszek & Wlodarczyk, Jakub. (2011). Influence of matrix metalloproteinase MMP-9 on dendritic spine morphology. *Journal of Cell Science*, 124: 3369–3380.

Montiel, Xiomara; Carruyo, Ingrid; Fernández, Yusmary; Marcano, Letty & Torrealba, Zaida. (2007). Valoración del efecto toxico de pentóxido de vanadio en meristemos de cebolla (*Allium cepa* L.). *Ciencia*, 15: 13-20.

Mukherjee, Biswajit; Patra, Balaram; Mahapatra, Sushmita; Banerjee, Pratik; Tiwari, Amit & Chatterjee, Malay. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150: 135–143.

Mukerjee, B; Halder, S.; Gosh, M.K. & Manasadeepa,R. (2013). Vanadium Ions and Proteins, Distribution, Metabolism, and Biological Significance. Pp. 2306-2316, en: Kreitsinger, R.; Permyakov, R. & Uversky, V. N. (eds). *Encyclopedia of metalloproteins*. Springer Editions, E.U.A.

Nagai, K.; Suda, T.; Kawasaki, K.; Yamaguchi, Y. (1990). Acceleration of metabolism of stress-related substances by L-carnosine in Japanese, *Nippon Seirigaku Zasshi*, 52: 221-228.

Ngwa, Afeseh Hilary; Kanthasamy, Arthi; Jin, Huajun; Anantharam, Vellareddy & Kanthasamy, G. Anumantha. (2014). Vanadium exposure induces olfactory dysfunction in an animal model of metal neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 1-9.

Ordoñez, Librado J.L.; Gutiérrez, Valdez A.L.; Colín, Barenque L.; Anaya, Martínez V.; Díaz, Pech P. & Avila, Costa M.R. (2008). Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*, 155: 7–16.

Paxinos, George & Franklin, Keith B. J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates. Segunda edición.* Academic Press.

Prieto, L. (2010). *Romper el proceso del envejecimiento cutáneo: activos dermocosméticos*. *Med Cutan Iber Lat Am*; 38 :95-100.

Puelles, López L.; Martínez, Pérez M. & Martínez, De la Torre M. (2008). *Neuroanatomía. Medica panamericana* .España. 202-203.

Purves, Dale; Augustine, George J.; Fitzpatrick, David; Lamantia, Anthony-Samuel; Mcnamara, James O. & Williams, Mark S. (2008). *Neurociencia. Tercera edición. Médica Panamericana*. Madrid. 408

Ramón y Cajal S. (1893). *Neue Darstellung vom histologischen Bau des Centralnerevensystem*. *Arch Anat Physiol*. 319-428.

Redolar, Ripoll Diego. (2008). *Cerebro y adicción*. UOC. Barcelona. 157-158.

Reséndiz, Avendaño S. A. (2014). *Neuroprotección de la carnosina en la citología del bulbo olfatorio en un modelo murino expuesto a la inhalación de vanadio. Diferencia por sexo*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rodríguez-Mercado JJ; Roldán-Reyes, E; Altamirano-Lozano M. (2003). *Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells*. *Toxicology Letters*, 144: 359-369.

Rodríguez-Mercado Juan José & Altamirano-Lozano Mario Agustín. (2006). *Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 22: 173-189.

Rosas, Núñez Alejandra. (2013). *Efecto de la Melatonina en la actividad motora y citología de la corteza, hipocampo, cuerpo estriado y sustancia nigra compacta de ratas envejecidas*. Tesis para obtener el título en psicología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rosales, Castillo J.A.; Torres-Meza V.M.; Olaiz-Fernández G. & Borja-Aburto H. (2001). *Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos*. *Salud Pública de México*, 43: 544-555.

Ross, Michael H. & Pawlina, Wojciech. (2006). *Histología: Texto y atlas de color con biología celular y molecular*. Quinta edición. Segunda reimpresión. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires. 380.

Segura, T.; Galindo, M.F.; Rallo-Gutiérrez, B.; Ceña, V. & Jordán, J. (2003). *Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas*. *Rev. Neurol.*, 36: 1047-1057.

Snell, S. Richard. (2007). *Neuroanatomía clínica*. Sexta edición. Medica panamericana. España.304-314.

Soares, S.S; Martins, H.; Duarte, R.O; Moura, J.J.G.; Coucelo, J.; Gutiérrez, Merino C.; Aureliano M. (2007). *Vanadium distribution, lipid peroxidation and oxidative stress markers upon decavanadate in vivo administration*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101: 80–88.

Soria, Fregozo C. & Perez, Vega M.I. (2012). Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurología*, 27:421—431.

Szepesi, Zsuzanna; Bijata, Monika; Ruszczycki, Blazej; Kaczmarek, Leszek; Wlodarczyk, Jakub. (2013). Matrix metalloproteinases regulate the formation of dendritic spine head protrusions during chemically induced long-term potentiation. *PLoS ONE* 8(5): e63314. doi:10.1371/journal.pone.0063314.

Tomonaga, Shozo; Tachibana, Tetsuya; Takagi, Tomo; Saito, Ei-Suke; Zhang, Rong; Denbow, Michael D. & Furuse, Mitsuhiro. (2004). Effect of central administration of carnosina and its constituents on behaviors in chicks. *Brain Research Bulletin*, 63: 75–82.

Tomonaga, Shozo; Tachibana, Tetsuya; Takahashi, Hirokazu; Sato, Momoka; Denbow, Michael Donald & Furuse, Mitsuhiro. (2005). Nitric oxide involves in carnosine-induced hyperactivity in chicks. *European Journal of Pharmacology*, 524: 84–88.

Torres, Fernández Orlando. (2006). La técnica de impregnación argéntica de Golgi. *Commemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. Reseña histórica. Biomédica*, 26:498-508.

Tzintzun, Cervantes María Guadalupe; Rojas, Bracho Leoneras & Fernández, Bremauntz Adrián. (2005). Las partículas suspendidas en tres grandes ciudades de mexicanas. *Gaceta ecológica. Instituto nacional de Ecología. ISSN 1405-2849*. 15-28.

Vallejo, Maite; Jáuregui, Renaud Katherine; Hermsillo, G. Antonio; Márquez, F. Manlio & Cárdenas, Manuel. (2003). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*, 139: 57-63.

Valverde, Facundo. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocórtex. *Rev Neurol.*, 34: 758-780.

Vargas, Marcos Francisco. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Rev Esp Salud Pública*, 79: 117-127.

Venereo, Gutiérrez Justo R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31:126-33.

Welsh, Urich. (2008). *Histología. Segunda edición. Medica Panamericana. Madrid, España*. 631-632.