



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Medicina

**Efecto del vanadio sobre la proliferación
celular de la zona subventricular y el
tallo rostral migratorio del ratón adulto**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA:
LEONORA OLIVOS CISNEROS

Directores de tesis: Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina
Dra. Laura Colín Barenque

México, D. F.

Marzo 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero de:

Proyecto IMPULSA02

Proyecto CONACYT 38615N

Proyecto CONACYT 45872M

Proyecto DGAPA-PAPIIT-IN210105

Proyecto DGAPA-PAPIIT-IN200606

Proyecto DGAPA-PAPIIT-2006905

Beca para Asistente de Proyecto CONACYT 45872M

Agradecimientos

Al **DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA** por su dirección y enseñanzas, pero sobre todo por su apoyo y paciencia. Muchas gracias por la confianza.

A la **DRA. LAURA COLÍN BARENQUE** por haberme abierto las puertas al mundo del vanadio y propiciar mi participación en este proyecto.

A la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES** por recibirme cálidamente en su grupo de trabajo, por su asesoría constante y por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis.

A la **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE** por contribuir a mi formación académica desde el inicio de mi ciclo en la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica.

A la **DRA. CARMEN GÓMEZ EICHELMAN** por la oportunidad de aprender en su laboratorio, espero hacer un uso correcto de sus valiosas enseñanzas, gracias además por darme la oportunidad de conocer y trabajar con gente tan valiosa.

A la **DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ** y al **DR. ROMÁN VIDAL TAMAYO** por la revisión de este escrito y la pertinencia de sus observaciones.

A la **M. en C. PATRICIA PADILLA CORTÉS** por su apoyo técnico-administrativo y paciencia en el laboratorio.

Al personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas, María Petra Muñoz García, Alfonso Martínez Amud y Erasto Brito Brito, por su ayuda en la obtención del material bibliográfico.

A los grupos de trabajo de los laboratorios del Dr. Gutiérrez y de la Dra. Fortoul, valiosos compañeros que me apoyaron y acompañaron en la realización de este trabajo.

A todas las personas que con su cariño y enseñanzas han contribuido no sólo a mi formación académica sino también humana. Sé que no necesito mencionar a cada uno para expresarles mi gratitud y cariño. *Ma, Amiga*, no hay palabras para agradecer el origen y el motivo.

Índice

	Pág.
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	
Contaminación en la Ciudad de México	4
Vanadio	
A) Contaminante atmosférico	5
B) Fuentes y usos	7
C) Química	8
D) Efectos biológicos	9
E) Mecanismos de acción	11
F) Toxicocinética	14
G) Efectos sobre el sistema nervioso central	15
H) Efectos sobre el bulbo olfatorio	19
Neurogénesis en el cerebro adulto	20
Zona Subventricular	
A) Composición y estructura	21
B) Cambios en la tasa de proliferación	23
C) Migración celular	27
Justificación	29
Hipótesis	29
Objetivo	29
Objetivos particulares	30
Materiales y Métodos	
Animales	30
Protocolo de exposición a vanadio	30
Administración de BrdU	31
Obtención de tejido	32
Inmunohistoquímica	33
Cuantificación de células marcadas	34
Resultados	36
Discusión	40
Conclusión	44
Referencias	45

Abreviaturas frecuentes

V - Vanadio.

PST - Partículas Suspendidas Totales.

ppm - partículas por millón.

V₂O₅ - Pentóxido de Vanadio.

VOSO₄ - Vandil Sulfato.

NaVO₃ - Metavanadato de Sodio.

Na₃VO₄ - Ortovanadato de Sodio.

NSO - Neuronas Sensoriales Olfatorias.

BO - Bulbo Olfatorio.

TRM - Tallo Rostral Migratorio.

ZSV - Zona Subventricular.

BrdU - 5'-bromo-2'-desoxiuridina.

BrdU⁺ - inmunopositivas para BrdU.

V.In - Vía Inhalada.

V.Ip - Vía Intraperitoneal.

V.O - Vía Oral.

I1m - Grupo experimental de animales expuestos por vía inhalada a V₂O₅ 0.02 M durante 4 semanas.

I1mNoI1m - Grupo experimental de animales expuestos por vía inhalada a V₂O₅ 0.02 M durante 4 semanas y posteriormente mantenidos en un ambiente libre de dicho metal durante un mes.

PB - Solución amortiguadora de fosfatos.

PBT - Solución amortiguadora de fosfatos con Tritón-X100.

ON - Óxido Nítrico.

Resumen

La exposición subaguda y crónica por vía inhalada a pentóxido de vanadio genera múltiples anormalidades estructurales en las neuronas granulares del bulbo olfatorio. Dichas anormalidades se mantienen hasta por un mes después de suspender la exposición. Debido a que en el bulbo olfatorio existe un recambio neuronal extenso cada mes, se supondría que las anormalidades observadas en los animales inicialmente expuestos y posteriormente mantenidos en un ambiente libre de vanadio deberían revertirse debido a la sustitución neuronal. Esto nos llevó a pensar que la generación de nuevas neuronas pudiese estar alterada en los animales que inhalan vanadio. De esta forma, en la tesis inferimos la magnitud de la proliferación de la zona subventricular y el tallo rostral migratorio, mediante el conteo del número de células que incorporaron BrdU en animales control, en expuestos y en aquellos que tras la exposición fueron mantenidos en un ambiente libre de dicho metal durante un mes. Los resultados mostraron una tendencia a disminuir el número de células que incorporaron BrdU en la zona subventricular y en el tallo rostral migratorio en el grupo de animales que tras la exposición fue mantenido en un ambiente libre de vanadio por un mes. La diferencia alcanzó significancia estadística solamente en la región inicial del tallo rostral migratorio. Nuestros resultados apoyan la posibilidad de que la exposición a vanadio afecte la proliferación de precursores neuronales en el cerebro adulto y sugiere la existencia de compartimentos discretos con susceptibilidad diferencial a agentes citotóxicos en la vía ZSV-TRM.

Introducción

La quema de combustibles fósiles genera gran parte de los xenobióticos que se encuentran en el aire entre los cuales destacan algunos metales como el vanadio. La exposición laboral a este metal se ha asociado con diversos desórdenes mentales. En concordancia, la exposición a compuestos que contienen vanadio en modelos animales produce múltiples anormalidades en la estructura y función del cerebro que incluyen alteraciones en el metabolismo del fósforo, en la expresión de marcadores de daño oxidativo e inflamatorio, y en la estructura del epitelio ependimal, de la vía nigro-estriatal y del hipocampo.

Resultados recientes muestran que la inhalación subaguda y crónica de pentóxido de vanadio conduce a incrementos en la muerte celular necrótica, así como en las alteraciones ultraestructurales de las neuronas granulares del bulbo olfatorio entre las que destacan la aparición de invaginaciones nucleares, la dilatación del aparato de Golgi y la acumulación anormal de gránulos de lipofucsina. Así mismo, en estas células, se observó un menor número de espinas dendríticas y una disminución en el tamaño del cuerpo celular. Es interesante señalar que, estos cambios se mantienen hasta un mes después de haber suspendido la exposición a vanadio.

Debido a que en el bulbo olfatorio se incorporan nuevas neuronas a lo largo de toda la vida, la observación de que las alteraciones ultraestructurales no desaparecen sugiere

que el mecanismo de recambio neuronal pudiese estar afectado. En esta tesis se evaluó esta posibilidad, midiendo la proliferación, mediante el conteo del número de células que incorporaron BrdU, en la zona subventricular y el tallo rostral migratorio de ratones adultos tras la exposición a pentóxido de vanadio. Ambas estructuras son capaces de producir neuronas granulares a partir de precursores neurales que migran desde ellas hasta el bulbo olfatorio.

Antecedentes

CONTAMINACIÓN EN LA CIUDAD DE MÉXICO

La ciudad de México es una de las urbes con mayor contaminación atmosférica en el mundo. Esta situación se debe a distintos factores entre los que destacan que la ciudad de México se encuentra en una cuenca casi cerrada a 2,240 m sobre el nivel del mar. Las grandes cadenas montañosas que la rodean dificultan la circulación del viento e impiden el desalojo de los contaminantes generados, ambas situaciones favorecen las inversiones térmicas. Debido a la altura de la ciudad, la concentración de oxígeno es 23% menor que la que existe a nivel del mar. Esto promueve que los procesos de combustión interna de los motores sean menos eficientes y más contaminantes (Leal, *et al.*, 1997). Por otro lado, el acelerado incremento poblacional (de 2.9 millones en 1950 a 18.2 millones en el año 2000) ha generado la concentración de actividades industriales, comerciales y financieras en un área que apenas representa el 0.37% del territorio nacional. La industria y el transporte representan un gasto de energía muy importante y son dos de las principales fuentes de contaminación. Se estima que en la cuenca de México se encuentran 35 mil industrias y circulan 3.5 millones de vehículos (www.fimevic.df.gob.mx/problemas/problemasdemov.htm, 2002).

El aire que respiramos es una mezcla de distintos gases entre los que destacan el nitrógeno (78%) y el oxígeno (21%), así como pequeñas cantidades de argón, helio, xenón, ozono y radón (Leal, *et al.*, 1997). La contaminación atmosférica altera esta composición por la acumulación de partículas

suspendidas, metales, óxidos de carbono, azufre y nitrógeno, endotoxinas y otros compuestos de origen orgánico (Leal, et al., 1997. Calderón-Garcidueñas, et al., 2003).

Las partículas suspendidas totales (PST) son un componente de la contaminación atmosférica que tiene un fuerte impacto en la salud porque cuando se respiran en altas concentraciones son capaces de agravar afecciones respiratorias y cardiovasculares. La presencia de PST es el resultado de procesos tales como la erosión del suelo, la defecación al aire libre, la polinización y la dispersión de bacterias y esporas. Las PST también se generan como resultado de los procesos de combustión y la transformación de otros contaminantes (Leal, et al., 1997). Gutiérrez-Castillo y colaboradores (2006), compararon las PST obtenidas en cuatro regiones de la zona metropolitana del valle de México durante dos periodos climáticos y observaron que la concentración de PST es mayor en la zona noreste de la ciudad. El nivel de compuestos químicos, especialmente hidrocarburos y metales, es mayor en época de frío seco. La fracción de tamaño menor a 2.5 μm almacena los niveles más altos de aniones, metales y proteínas. Existen altas concentraciones de metales solubles en agua, como níquel (Ni), vanadio (V) y Zinc (Zn), especialmente en época de frío, en el sureste de la ciudad (Gutiérrez-Castillo, et al., 2006).

VANADIO

A) Contaminante atmosférico

El vanadio es considerado uno de los principales elementos traza de los combustibles fósiles como el carbón y el petróleo. El vanadio, junto con el níquel y el zinc, se

encuentran en muy altas concentraciones en la fracción residual más pesada del petróleo, la cual se utiliza en plantas generadoras de energía y calentadores comerciales. El vanadio es emitido a la atmósfera en las formas químicas de V_2O_5 , V_2O_4 , V_2O_3 , $2NiO.V_2O_5$, $Fe_2O_3.V_2O_5$ y $5Na_2O.V_2O_4.11V_2O_5$ (Vouk y Piver, 1983).

Se estima que, a nivel mundial, cerca de 280 toneladas de vanadio son emitidas al ambiente cada año; 70 de éstas son originadas por fuentes naturales y el resto por fuentes antropogénicas. Los niveles de vanadio en la atmósfera pueden ir de 30 a 400 ng/m^3 y los niveles más altos se reportan en zonas urbanas (Leonard y Geber, 1994). Se sabe que la concentración de vanadio en el ambiente varía dependiendo de las condiciones geográficas y estacionales (Barceloux, 1999).

El estudio de PST realizado en la ciudad de México, que se mencionó con anterioridad, reportó que los niveles de vanadio más elevados se presentaron en la época de frío seco, especialmente en la región sureste de la ciudad. En la época de frío, la concentración de vanadio asociado a partículas menores a 2.5 μm fue de 15 a 93 ng/m^3 , mientras que en partículas menores a 10 μm fue de 22 a 114 ng/m^3 . En la época de mayor temperatura los niveles disminuyeron a valores menores a 10 ng/m^3 en ambos tipos de partículas (Gutiérrez-Castillo, *et al.*, 2006).

Aunque en 1992 la Conferencia Americana Gubernamental de Higiene Industrial recomendó una concentración máxima de 0.05 mg/m^3 de pentóxido de vanadio (V_2O_5) como concentración a la que un trabajador puede estar expuesto de forma constante sin mostrar efectos adversos, la Fundación Alemana para la Investigación estableció una concentración de hasta 35 mg/m^3 para este compuesto en lugares de trabajo (Leonard y Geber, 1994).

La exposición crónica a este contaminante atmosférico se refleja en la acumulación de vanadio en la población. Estudios histopatológicos de epitelio nasal y tejido cerebral de perros residentes de las ciudades de México y Tlaxcala, mostraron que las concentraciones de vanadio en ambos tejidos fueron mayores en aquellos perros residentes de la ciudad de México. La mayor concentración se observó en epitelio nasal seguido del bulbo olfatorio y finalmente en corteza frontal. (Calderón-Garcidueñas, *et al.*, 2003).

Medir la acumulación de este metal ha evidenciado que sus niveles en la ciudad de México han aumentado en las últimas décadas. Se observó un incremento significativo en la concentración de vanadio, de 0.3 µg/g de tejido seco, en tejido pulmonar de autopsias de habitantes de esta ciudad durante los años noventa respecto a los de los años sesenta. Esto puede ser consecuencia del incremento en el consumo de derivados del petróleo como la gasolina (Fortoul, *et al.*, 2002).

B) Fuentes y usos

El vanadio representa de 100 a 200 ppm de la corteza terrestre siendo el vigésimo segundo elemento más abundante (Leonard y Geber, 1994. Mukherjee, *et al.*, 2004). Aunque el vanadio es un metal ampliamente distribuido en la naturaleza, raramente se encuentra en su estado nativo, generalmente se extrae de minerales como la vanadinita, la patronita y la carnotita (Leonard y Geber, 1994). Se estima que hay una correlación entre el contenido de los elementos metálicos en la corteza terrestre y su contenido en el petróleo; el vanadio es muy abundante en éste, especialmente en el que proviene de regiones como Kuwait, Irán, Irak, Venezuela y el

golfo de México, así como en los productos de su refinación (Vouk y Piver, 1983. Fortoul, *et al.*, 2002).

Un tercio del vanadio atmosférico proviene de polvos continentales, aerosoles marinos y emisiones volcánicas. El resto es generado por fuentes antropogénicas pues se trata de un metal frecuentemente utilizado en la industria moderna para la producción de aleaciones de acero y no ferrosas, catálisis para la producción de ácido sulfúrico, manufactura de semiconductores, colorantes (e.g. pigmentos amarillos) y cerámica (Barceloux, 1999). Los principales países productores de vanadio son Sudáfrica, Rusia, Estados Unidos, Finlandia y China (Leonard y Geber, 1994).

Además de las fuentes inorgánicas de vanadio, de manera habitual lo podemos encontrar en algunos alimentos tales como cereales, pescado, fruta fresca y vegetales (Mukherjee, *et al.*, 2004). A este respecto se estima que los productos marinos tienen un mayor contenido de dicho metal que los obtenidos de animales terrestres (Barceloux, 1999).

C) Química

El vanadio (V) es el primer elemento del grupo V de la tabla periódica, su peso atómico es de 50.95 u.m., su número atómico es el 23, su punto de fusión es a 1950 °C y su punto de ebullición a 3600 °C (Leonard y Geber, 1994).

Es un metal de transición cuya configuración electrónica es $[Ar]3d^34s^2$. Sus estados de oxidación van del -1 al +5, siendo los tres últimos los más comunes y el +4 el más estable. La toxicidad del vanadio aumenta conforme incrementa la valencia (Leonard y Geber, 1994).

D) Efectos biológicos

Los efectos de los compuestos que contienen vanadio dependen de factores como la especie, la vía de administración, la dosis y la toxicidad inherente de cada compuesto (Barceloux, 1999).

Acciones benéficas

El vanadio es un elemento esencial para algunos organismos. Algunas bacterias, algas y líquenes poseen enzimas dependientes de este metal (Nielsen, 1991). También lo es para algunas plantas y especies marinas (Leonard y Geber, 1994. Mukherjee, *et al.*, 2004). En cabras, la administración de una dieta deficiente en vanadio (con un contenido de 10 ng de V/g comparada con una dieta control con 2 µg de V/g) tiene como consecuencias defectos en el desarrollo, deformaciones óseas y alteraciones en el metabolismo de hormonas tiroideas (Nielsen, 1991). En pollos y ratas las consecuencias de su deficiencia incluyen crecimiento retardado, defectos en el proceso de reproducción, alteraciones en el metabolismo lipídico e inhibición de la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ en el riñón, el cerebro y el corazón (Mukherjee, *et al.*, 2004). En humanos no se ha determinado que el vanadio realice alguna función esencial. Se estima que su cuerpo contiene normalmente entre 100 y 200 µg de este metal y su ingesta diaria oscila entre 6 y 20 µg (Nielsen, 1991). Las concentraciones más altas de vanadio se encuentran en los órganos parenquimatosos (Leonard y Geber, 1994).

Los compuestos que contienen vanadio también se utilizan como agentes terapéuticos. Los efectos de los compuestos de este metal en humanos incluyen disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos, disminución de la presión sanguínea, incremento de la afinidad del oxígeno por la

hemoglobina y la mioglobina y control en la progresión de la leishmaniasis (Mukherjee, et al., 2004). El vanadil sulfato (VOSO_4) es un compuesto comúnmente utilizado para mejorar el rendimiento de atletas durante sus entrenamientos (Barceloux, 1999). También se ha demostrado que compuestos de vanadio pueden interferir con la progresión neoplásica y disminuir el tamaño y la incidencia de tumores en distintos modelos carcinogénicos (Mukherjee, et al., 2004). Uno de los efectos terapéuticos de los compuestos de vanadio con mayor relevancia es el metabólico. A finales de los años setenta se mostró que el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), el metavanadato de sodio (NaVO_3) y el vanadil sulfato (VOSO_4) actúan de forma similar a la insulina en la incorporación de glucosa y el metabolismo del músculo esquelético y del tejido adiposo (Tsiani y Fantus, 1997). A partir del éxito obtenido en el tratamiento de roedores diabéticos, y/o resistentes a insulina, utilizando compuestos de vanadio, se han dilucidado algunos mecanismos de acción de éstos entre los que destacan la estimulación de fosforilación de tirosinas, cambios en la expresión génica e inhibición de fosfatasas (Fantus y Tsiani, 1998).

Acciones deletéreas

No obstante los beneficios que los sistemas biológicos obtienen del vanadio, la exposición a compuestos que contienen este metal en altas concentraciones puede tener efectos adversos. El vanadio puede ser citotóxico y mitogénico; sin embargo, no es clastogénico y sólo es parcialmente mutagénico; además, es poco teratogénico (Leonard y Geber, 1994). En roedores se ha visto que la administración en altas dosis disminuye la producción espermática, baja los niveles de hemoglobina y puede generar embriotoxicidad. También se han observado algunos efectos

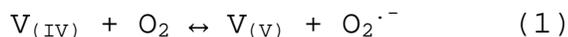
colaterales, que incluyen diarrea y disminución en la ingesta de líquidos y alimentos, a los que se han asociado incrementos en los índices de morbi-mortalidad (Tsiani y Fantus, 1997). La dosis letal media (LD₅₀) de vanadio depende de la especie, la edad y la dieta. Para ratones la LD₅₀ es de 0.2-0.3 mmoles de vanadio por kilogramo de peso cuando la administración es intraperitoneal (Mukherjee, et al., 2004). En humanos el VOSO₄ y el NaVO₃ pueden generar náusea, los tratamientos que contienen este metal promueven una pequeña caída en los niveles de hematocrito que pueden prevalecer incluso dos semanas después de suspender su administración (Tsiani y Fantus, 1997). Además, compuestos que contienen vanadio pueden ocasionar irritación local de ojos y del tracto respiratorio (Mukherjee, et al., 2004).

E) Mecanismos de acción

Debido a que existe similitud estructural entre los grupos fosfato y las especies pentavalentes de vanadio (vanadio V), es posible que el vanadio actúe a nivel molecular compitiendo con los grupos fosfato en los procesos que requieran de estos últimos (Tsiani y Fantus, 1997). La mayoría de los efectos del vanadio se han atribuido a su capacidad de interferir con la actividad de algunas enzimas, especialmente fosfatasas y ATPasas (tabla 1), así como a su habilidad para incrementar los niveles de expresión de diversas proteínas (tabla 2).

Otro de los mecanismos mediante el cual ejerce sus acciones es por su actividad oxidante (Barceloux, 1999). El vanadio IV puede auto-oxidarse al reaccionar con el oxígeno molecular (O₂), produciendo el anión superóxido (O₂^{·-}) y vanadio V (1). El O₂^{·-} puede dismutar espontáneamente o

enzimáticamente produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que, a su vez, puede reaccionar con el vanadio IV restante y producir el radical libre hidroxilo (HO·) (2) (Byczkowski y Kulkarni, 1998).



El vanadio puede inhibir la cadena respiratoria y generar especies reactivas de oxígeno en el interior celular. Además, el vanadio V puede bloquear la transferencia de electrones entre el citocromo c₁ y el citocromo c a nivel mitocondrial (Byczkowski y Kulkarni, 1998). Finalmente, se sabe que la exposición a compuestos de vanadio puede disminuir la poza celular de grupos tioles, los cuales funcionan como una defensa antioxidante (Byczkowski y Kulkarni, 1998).

Tabla 1. Enzimas afectadas por vanadio

Inhibición

ATPasas membranales tipo P

Fosfatasas ácidas y alcalinas

RNASas

ATPasa de dineína

Fosfatasa de Glucosa 6-fosfato y de fructosa 2,6 bisfosfato

Activación

Deshidrogenasa de Glucosa 6-fosfato

Epimerasa de ribulosa 5-fosfato

Isomerasa de fosfoglucosa

Fosfolipasa C_γ

Piruvato cinasa

Adenilato ciclasa

(Modificado de Tsiani y Fantus, 1997)

Tabla 2. Expresión de proteínas regulada por vanadio.

Proteína	Modelo	Tratamiento	Efecto	Ref.
Interleucina 8	Cultivo primario de células epiteliales bronquiales de humano	VOSO ₄ 0-50 μM	↑ producción de proteína	Jaspers, et al., 1999
Proteínas de la vía de señalización Ras/Erk (ras, c-raf-1, MAPK, p70 ^{s6k})	Células de ovario de hámster chino que sobrexpresan el receptor de insulina	VOSO ₄ 100 μM	↑ niveles de proteínas	Pandey, et al., 1999
Proteína activadora (AP)-1	Línea de células epidermales	NaVO ₃ 0-300 μM	↑ expresión de reportero en rango limitado (0-40 μM)	Ding, et al., 1999
Factor de necrosis tumoral (TNF)-α	Línea celular de macrófagos	NaVO ₃ 0-100 μM	↑ mRNA y proteína (dosis dependiente)	Ye, et al., 1999
Proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-2	Línea celular de macrófagos	NaVO ₃ 0.5-10 μg/ml	↑ mRNA y proteína (dosis dependiente)	Chong, et al., 2000
p53	Línea de células epidermales	NaVO ₃ 0-400 μM	↑ actividad relativa en rango limitado (0-200 μM)	Huang, C, 2000

F) Toxicocinética

Una característica de los elementos metálicos es que no pueden ser biodegradados en el organismo y una vez absorbidos son almacenados hasta su excreción. Sin embargo, su forma química y su estado de oxidación, y por lo tanto su toxicidad, sí pueden cambiar como resultado de transformaciones bioquímicas (Vouk y Piver, 1983).

La instilación pulmonar se considera la principal vía de absorción de compuestos de vanadio solubles; el tracto gastrointestinal representa una vía de entrada poco eficiente, mientras que la piel es la de menor relevancia (Barceloux, D.G., 1999). Una vez absorbido, el vanadio puede formar distintos complejos con proteínas en el torrente sanguíneo, especialmente con la transferrina y la albúmina sérica. El estado de oxidación del vanadio en la sangre oscila entre +4 y +5 (Opresko, 1991). Es la forma pentavalente la que predomina en los fluidos extracelulares y la tetravalente dentro de las células (Barceloux, 1999).

Después de la transportación plasmática, el vanadio se acumula en el corto plazo en el riñón, el hígado, el pulmón, el hueso y el bazo (Opresko, 1991). La concentración en cerebro es aproximadamente el 5% de la concentración en sangre (Barceloux, 1999).

El vanadio que alcanzó el torrente sanguíneo es excretado principalmente por vía renal, a través de un proceso bifásico, constituido por una etapa inicial rápida que dura entre 10 y 20 horas, y una fase terminal más larga cuya duración es de entre 40-50 días (Barceloux, 1999). En el largo plazo, los huesos funcionan como reservorio de vanadio (Leonard y Geber, 1994). En humanos, se ha visto que las partículas que contienen este metal permanecen en los pulmones varios años (Byczkowski y Kulkarni, 1998).

Además de la toxicidad inherente a cada compuesto, los efectos de los compuestos de vanadio varían según la vía de

administración, la valencia y la especie (Barceloux, 1999. Leonard y Geber, 1994). Bajas concentraciones de vanadio en las células permanecen unidas a moléculas hidrofóbicas sin producir toxicidad inmediata, lo cual, aunado a la duración del proceso de excreción, podría explicar los efectos a largo plazo que tienen los compuestos de vanadio, los cuales pueden observarse incluso semanas después de suspendida su administración (Mukherjee, *et al.*, 2004).

G) Efectos sobre el Sistema Nervioso Central

La exposición a compuestos que contienen vanadio se ha asociado a diversas alteraciones en la morfología y la fisiología neural que tienen consecuencias a nivel cognoscitivo y afectivo. La sobreexposición a vanadio en roedores y en humanos se ha asociado a enfermedades maniaco-depresivas, deficiencias en habilidades visuo-espaciales, en atención y en aprendizaje (Taylor, *et al.*, 1984. Sánchez, *et al.*, 1998. Barth, *et al.*, 2002). Además, se han podido observar múltiples alteraciones metabólicas en algunas áreas del cerebro (Marfaing-Jallat y Penicaud, 1993. Parsadonian, *et al.*, 1998). La expresión de marcadores de daño inflamatorio y oxidativo aumenta como consecuencia de la administración vía intraperitoneal (V.Ip) de NaVO_3 (García, *et al.*, 2004, 2005). Finalmente, en un modelo de exposición a V_2O_5 por vía inhalada se observó que la concentración de vanadio en el cerebro del ratón se estabiliza entre 0.1 y 0.15 $\mu\text{g/g}$ de tejido seco, después de la primera semana. Dicha concentración se mantiene durante el periodo de exposición y conduce a diversas alteraciones ultraestructurales en la vía nigro-estriatal, en el epitelio ependimario y en el hipocampo (Ávila-Costa, *et al.*, 2004, 2005, 2006)(para mayor detalle ver la tabla 3).

Tabla 3. Consecuencias de la exposición a vanadio en Sistema Nervioso Central

Efecto	Modelo	Protocolo	Efectos	Ref.
Maniaco-depresión	Pacientes maniacos y depresivos con y sin recuperación	Determinación de V en cabello, sangre total, suero y orina.	<p>↑ nivel de vanadio en cabello de pacientes maniacos en comparación con controles, no así en pacientes maniacos recuperados</p> <p>↑ nivel de vanadio en sangre total y suero de pacientes depresivos en comparación con controles, no así en pacientes depresivos recuperados</p>	Taylor, <i>et al.</i> , 1984
Deficiencia cognitivas	Trabajadores con exposición ocupacional a V ₂ O ₅	Determinación de V en orina y suero. Evaluación de habilidades cognitivas	<p>Deficiencias en prueba de diseño con bloques: habilidades visuo-espaciales</p> <p>Deficiencias en prueba de sustitución de dígitos por símbolos: atención y funcionamiento visuo-motor</p>	Barth, <i>et al.</i> , 2002
Deficiencias en aprendizaje	Rata Sprague-Dawley	NaVO ₃ 0, 4.1, 8.2, 16.4 mg/kg/día; V.O; 8 semanas	<p>↓ ganancia de peso corporal</p> <p>↓ movimientos horizontales y distancia total recorrida</p> <p>Deficiencias en prueba de condicionamiento aversivo:</p> <p>↓ respuesta ↑ periodo de latencia</p>	Sánchez, <i>et al.</i> , 1998

Alteración en metabolismo de fósforo

Extractos tisulares de ratas albinas para medición de actividad de fosfatasas proteicas.

Incubación con NaVO_3 1 nM- 1 mM

↑ actividad en médula espinal con bajas concentraciones de V
↓ actividad en médula espinal con altas concentraciones y en hemisferio cerebral y médula oblongada con bajas concentraciones
Fosfatasas alcalinas más sensibles a la inhibición con bajas concentraciones que fosfatasas ácidas

Parsadani an, et al., 1998

Incremento en la utilización de glucosa

Rata Wistar

NaVO_3 0.2 mg/ml; V.O; 3 días.

Reducción en la ingesta de fluidos, datos de glucosa difíciles de interpretar por efectos colaterales.

Marfaing-Jallat y Penicaud, 1993

Rata Wistar

VOSO_4 12.5 mg/kg; V.Ip; 3 días.

↑ utilización de glucosa en cerebro posterior, bulbo olfatorio e hipotálamo.

Alteraciones lipídicas

Rata

NaVO_3 3 mg/kg; V.Ip; 5 días.

↓ actividad locomotora
↓ densidad de fibras de mielina
↓ inmunomarcaje contra la proteína básica de mielina
↑ peroxidación lipídica

García, et al., 2004

Incremento en la expresión de marcadores de daño	Rata	NaVO ₃ 3 mg/kg; V.Ip; 5 días.	<p>↑ expresión de NADPH diaforasa (marcador indirecto de producción de óxido nítrico) en cerebelo, hipotálamo e hipocampo.</p> <p>↑ expresión de hsp70 (marcador de estrés) en hipocampo y cerebelo.</p> <p>↑ astrogliosis en hipocampo y cerebelo.</p>	García, <i>et al.</i> , 2005
Modificaciones Nigro-estriatales	Ratón CD-1	V ₂ O ₅ 0.02 M; V.In 1 hora, 2 veces por semana; 1-8 semanas.	Pérdida de células inmunopositivas a tirosina hidroxilasa en sustancia nigra. Pérdida de espinas dendríticas en células de estriado.	Ávila-Costa, <i>et al.</i> , 2004
Daño a epitelio ependimal	Ratón CD-1	V ₂ O ₅ 0.02 M; V.In 1 hora, 2 veces por semana; 1-8 semanas.	Pérdida de cilios en células ependimales que rodean el piso del cuarto ventrículo. Desprendimiento de capa ependimal de membrana basal.	Ávila-Costa, <i>et al.</i> , 2005
Alteraciones en hipocampo	Ratón CD-1	V ₂ O ₅ 0.02 M; V.In 1 hora, 2 veces por semana; 1-8 semanas.	Deficiencias en memoria espacial evaluada con el laberinto de agua de Morris. Pérdida de espinas dendríticas, evidencias de muerte celular tipo necrosis y alteraciones estructurales en neuropilo. Región hipocámpica CA1.	Ávila-Costa, <i>et al.</i> , 2006

H) Efectos sobre el bulbo olfatorio

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

Debido a que las dendritas de las NSO están en contacto directo con el ambiente, la pinocitosis y el transporte neuronal son posibles rutas de acceso para toxinas potenciales al sistema nervioso central (Calderón-Garcidueñas, *et al.*, 2002. Vyas, *et al.*, 2005).

Recientemente, en el modelo de exposición a vanadio por vía inhalada, mencionado con anterioridad, se observó que los ratones CD-1 expuestos a V_2O_5 por periodos de una a doce semanas presentaban un decremento significativo en el número de espinas dendríticas y en el tamaño del soma de las células de la capa granular del BO (Aguirre, *et al.*, 2002. Mondragón, *et al.*, 2003). Además, a partir de la segunda semana de exposición, estas células presentaron invaginaciones nucleares, un aparato de Golgi y retículo endoplásmico dilatados, mitocondrias electrón-densas, gránulos de lipofucsina y muerte celular necrótica (Colín-Barenque, *et al.*, 2003, 2004).

Dichos cambios permanecieron hasta por un mes después de finalizada la fase de exposición (Colín-Barenque, *et*

al., 2005). Este resultado es sorprendente debido a que, como parte del proceso de neurogénesis en el cerebro adulto, en roedores, el BO incorpora nuevas células provenientes de la zona subventricular a lo largo de toda la vida. La falta de restauración haría suponer que la neurogénesis podría estar afectada en los animales expuestos a vanadio, por lo que en el presente trabajo se examinó esta posibilidad.

NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

En los años cincuenta, con el desarrollo de la técnica de incorporación de timidina tritiada, fue posible identificar células que sintetizan ADN con potencial para dividirse. Haciendo uso de esta técnica, Altman y colaboradores reportaron, a mediados de los años sesenta, la existencia de nuevas neuronas en el cerebro de ratas adultas, hecho que contradecía el concepto de que las neuronas se generaban exclusivamente durante la fase prenatal del desarrollo (revisado en Ming y Song, 2005).

Aunque, en su momento, a estos estudios se les dio poca relevancia funcional, investigaciones posteriores confirmaron la existencia de neurogénesis en dos áreas del cerebro adulto denominadas la región subgranular (ZSG) del giro dentado hipocampal y la zona subventricular (ZSV) localizada en la región antero-lateral de los ventrículos laterales (revisado en Ming y Song, 2005).

En particular, los neuroblastos generados en la ZSV migran a través del tallo rostral migratorio (TRM) hasta llegar al bulbo olfatorio (BO). En éste se diferencian en interneuronas de las capas granular y periglomerular (Mackowiak, et al., 2004).

La integración y remoción de interneuronas en el bulbo olfatorio es un proceso dinámico. Se estima que el 1% del total son añadidas diariamente, de éstas la mitad muere

entre los primeros 15 y 45 días, mientras que las que sobrevivieron pueden persistir hasta por un año. Se ha sugerido que la integración de interneuronas nuevas a los circuitos ya establecidos permite la adaptación a ambientes complejos y cambiantes, y que la alta tasa de muerte permite efectuar cambios rápidos (Doetsch y Hen, 2005). Por otro lado, con el objeto de evaluar el recambio neuronal, se han hecho estudios en los que, además de la generación de nuevas neuronas, se estima el número de células que muere en las áreas que integran células nuevas. Se piensa que los mecanismos apoptóticos controlan el recambio celular de forma que las áreas donde se integran neuronas no modifican su tamaño (Biebl, *et al.*, 2000).

ZONA SUBVENTRICULAR

A) Composición y estructura

La zona subventricular (ZSV) se forma durante el desarrollo embrionario en una posición adyacente a la zona ventricular telencefálica, siendo prominente en las eminencias ganglionares. Las células que ahí se generan son destinadas a los ganglios basales, el diencéfalo, la corteza cerebral y el bulbo olfatorio (García-Verdugo, *et al.*, 1998). La proliferación en esta zona continúa hasta la edad adulta tanto en aves como en roedores y primates; la ZSV adulta es pues producto de la embrionaria.

La ZSV adulta es una capa discontinua de células claras y oscuras, muy evidente en la pared lateral de los ventrículos laterales, de cara al estriado. La organización de la ZSV consiste en cadenas de neuroblastos que se extienden tangencialmente sobre las paredes del ventrículo lateral. Estas cadenas están aisladas de las células endodimales y del estriado por dos tipos de células gliales (Doetsch, *et al.*, 1997). La ZSV está constituida por diversos tipos celulares:

- Células Tipo A: Se trata de los precursores neuronales migratorios. Éstas se encuentran formando grupos de 1 a 4 células y están presentes en toda la pared lateral de la ZSV y en el TRM. Son inmunopositivas para PSA-NCAM, TuJ1 y nestina^{*} (Doetsch, *et al.*, 1997).
- Células tipo B: Se trata de astrocitos que, al formar trabéculas, aíslan y dan soporte a las cadenas de células tipo A. Se encuentran en todos los niveles de la pared lateral de la ZSV y en el TRM. Presentan inmunorreactividad a GFAP, vimentina y nestina^{*}. Por sus características morfológicas, se distinguen 2 tipos de éstas, las tipo B1 separan a las tipo A de las células endodimales, las tipo B2 se encuentran entre las tipo A y el estriado (Doetsch, *et al.*, 1997).
- Células tipo C: Son la población que tiene la tasa de proliferación más alta. Se encuentran en pequeños grupos celulares contactando a las células tipo A. Están presentes en la ZSV pero no en el TRM. Son positivas al marcaje con nestina^{*} (Doetsch, *et al.*, 1997).
- Células tipo D: Son los también llamados tanicitos. Estas células son poco frecuentes en la ZSV y no se encuentran en el TRM. Están intercaladas entre las células endodimales, en contacto directo con la cavidad ventricular y poseen microvellosidades (Doetsch, *et al.*, 1997).

* PSA-NCAM: proteína expresada en sitios de plasticidad neural y por neuroblastos migratorios en la ZSV y el TRM. TuJ1: marcador para β -tubulina neuronal. Nestina: marcador de células troncales neuroepiteliales. GFAP: marcador de astrocitos. Vimentina: filamento intermedio expresado por precursores celulares, glia y algunas neuronas. (Doetsch, *et al.*, 1997).

- Células tipo E: Son las células ependimales que forman la lámina continua de epitelio cúbico ciliado que recubre los ventrículos. Presentan inmunorreactividad a GFAP, vimentina y nestina* (Doetsch, et al., 1997).

Además de las células tipo C, las células tipo A y B son capaces de dividirse e incorporar timidina tritiada (Doetsch, et al., 1997). Se ha propuesto que las células tipo B son las células troncales de la ZSV, las cuales dan origen a las células tipo C, que corresponderían a la población intermediaria amplificadora, las que a su vez generan a los neuroblastos que migran hacia el BO (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002)

B) Cambios en la tasa de proliferación

El proceso de neurogénesis es extremadamente dinámico. Diversos estudios han mostrado cómo, tanto factores intrínsecos como extrínsecos, afectan la tasa de neurogénesis adulta en sus distintas etapas. La proliferación en la ZSV se incrementa durante el embarazo y por la administración de factores de crecimiento o neurotransmisores como la dopamina. En contraste, disminuye con la edad o por efectos del óxido nítrico (Ming y Song, 2005). Además, bajo distintas condiciones experimentales, es posible observar un incremento en la proliferación de progenitores residentes en la zona subventricular, en especial en modelos animales en condiciones patológicas (véase la tabla 4).

* GFAP: marcador de astrocitos. Vimentina: filamento intermedio expresado por precursores celulares, glia y algunas neuronas. Nestina: marcador de células troncales neuro-epiteliales (Doetsch, et al., 1997).

Tabla 4. Condiciones en las que se han observado cambios en la proliferación de ZSV y TRM

Condición Patológica	Modelo	Marcador de proliferación	Efectos	Ref.
Isquemia Focal Cerebral	Oclusión de la arteria cerebral media en rata por 90 minutos.	BrdU 50 mg/kg de peso; V.Ip; 2 dosis al día en intervalos de 8 hrs, 2 días seguidos; 1, 2 ó 3 semanas después de la isquemia.	Incremento en el número de células BrdU ⁺ , tanto en ZSG como en ZSV. En ZSV el incremento fue de 8 veces, simétricamente bilateral y con un pico máximo a las 2 semanas.	Jin, et al., 2001
Enfermedad de Alzheimer	Modelo de ratones transgénicos con mutación en la proteína precursora de amiloide, que en humanos produce aparición temprana de Alzheimer autosómica dominante. En roedores los síntomas aparecen entre los 6 y 9 meses de edad.	BrdU 50 mg/kg de peso; V.Ip; 2 dosis al día en intervalos de 8 hrs, 3 días seguidos; 1 semana antes del sacrificio. Edades usadas: 3 meses y 1 año.	Incremento del 50 % en el número de células BrdU ⁺ en ZSV de animales transgénicos comparados con silvestres.	Jin, et al., 2004

Convulsiones prolongadas	Inducción de estado epiléptico (EE) en ratas, por administración sistémica de atropina y pilocarpina (convulsivos químicos), controlado 2 horas después de iniciada la actividad epiléptica	BrdU 50 mg/kg de peso; V.Ip; 2 dosis al día en intervalos de 1 hr, los días 1, 4, 7, 14, 21 ó 35 después del EE. Sacrificados 1 hr después de la 2ª dosis	Incremento en el número de células BrdU ⁺ en la ZSV, con un pico máximo al día 7 después del EE, recuperando los niveles normales para el día 21.	Parent, et al., 2002
		BrdU 50 mg/kg de peso; V.Ip; 3 dosis al día en intervalos de 2 hrs, el día 7 después del EE. Sacrificados 2, 4, 7 ó 14 después de la administración de BrdU.	Incremento en el número de células BrdU ⁺ en el TRM con un pico máximo a las 2 semanas después del EE.	Parent, et al., 2002
Enfermedad de Parkinson	Denervación dopaminérgica transitoria en ratones utilizando MPTP	IHQ contra PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)	Disminución significativa en el número de células PCNA ⁺ tras la denervación y recuperación paralela a la reinervación dopaminérgica en ZSV.	Hoglinger, et al., 2004
	Depleción unilateral de neuronas dopaminérgicas en	IHQ contra PCNA	Disminución en el número de células PCNA ⁺ ipsilateral a la lesión.	Hoglinger, et al., 2004

<p>ratas utilizando 6-OHDA. Tratamiento farmacológico con levodopa (precursor de catecolaminas) o ropinirole (agonista de receptores tipo D2)</p> <p>Cultivo de precursores neurales de ratón (neuroesferas) tratamiento con agonistas y antagonistas dopaminérgicos</p>	<p>Incubación con BrdU 5 μM durante 12 horas</p>	<p>Restauración ipsilateral de células PCNA⁺ por tratamiento con levodopa. Incremento bilateral de células PCNA⁺ por tratamiento con ropinirole.</p> <p>Sin cambios en la incorporación de BrdU con agonista de receptor tipo D1. Incrementa incorporación con agonista de receptor tipo D2. Antagonista de receptor tipo D2 no genera cambios pero previene incremento observado con agonista.</p>	<p>Hoglinger, <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>Pacientes humanos diagnosticados con Parkinson</p>	<p>IHQ contra PCNA</p>	<p>Disminución de células PCNA⁺ en individuos enfermos comparados con controles que fallecieron sin desórdenes neurológicos.</p>	<p>Hoglinger, <i>et al.</i>, 2004</p>

C) Migración celular

Durante el desarrollo temprano la glia radial provee de guías físicas para la migración de los neuroblastos. Aunque se ha mostrado que la glia radial persiste hasta la vida adulta en aves, ésta desaparece del cerebro de los mamíferos en los primeros días después del nacimiento (Álvarez-Buylla, *et al.*, 2001). Tampoco existe glia radial en el TRM, la vía que conecta la ZSV con el BO. ¿Cómo es entonces que los neuroblastos migran desde las ZSV hasta el BO? Se ha visto que las células tipo A hacen uso de la migración en cadena para alcanzar su destino. En este tipo de migración los neuroblastos utilizan interacciones homotípicas en las que el sustrato de migración no es un proceso glial o axonal sino los neuroblastos mismos (García-Verdugo, *et al.*, 1998).

Además del tipo de sustrato, la migración a través del TRM difiere de la migración radial en que la primera es más rápida, abarca una mayor distancia y no se limita a neuronas posmitóticas. Por la orientación del movimiento celular con relación a la superficie pial, la migración a través del TRM se define como tangencial, y se vuelve radial una vez que las células llegan al BO y se distribuyen en él (Menezes, *et al.*, 2002).

Se han descrito algunas de las moléculas que regulan el proceso de migración. Entre éstas se encuentran factores solubles y moléculas mediadoras del contacto célula-célula. Los primeros pueden ser atrayentes como las netrinas, (parecen ser secretadas por el BO) o repelentes como las moléculas Slit 1 y 2, (producidas en el septum y en los plexos coroideos). Entre las moléculas mediadoras de contacto tenemos a PSA-NCAM, el gangliosido 9-O-acetilado GD3 así como

las efrinas y sus receptores. El ambiente extracelular de la vía de migración está enriquecido con moléculas de matriz como tenascina-C, proteoglicanos, lamininas e integrinas (revisado en Menezes, *et al.*, 2002).

La velocidad de migración en el TRM se ha estimado de 30 a 50 $\mu\text{m}/\text{hora}$ (Menezes, *et al.*, 2002). Si se realiza una microinyección de timidina tritiada en la pared lateral de los ventrículos laterales es posible observar la distribución de las nuevas células. Seis horas después de la microinyección la marca se restringe a la ZSV; en las primeras veinticuatro horas no hay marca en el BO. Dos días después ya se observan células marcadas en el núcleo del BO pero la mayoría se distribuye a lo largo del TRM. Quince días después de la inyección, casi todas las células con marca se encuentran en la capa granular y periglomerular del BO (Lois y Álvarez-Buylla, 1994).

Las células que migran a través del TRM continúan dividiéndose, aunque su tasa de proliferación disminuye conforme se acercan al BO. Además, se ha visto que, en el periodo posnatal, la duración del ciclo celular en el TRM es mayor (17.3 horas) que en la ZSV (14 horas) (Smith y Luskin, 1998).

Además de diferir en la duración del ciclo celular, se ha reportado que existen diferencias regionales en el destino laminar de los progenitores resultantes. Las células originadas en el TRM se diferencian preferencialmente en células de la capa periglomerular del BO, mientras que las generadas en la porción anterior de la ZSV en células de la capa granular (Smith y Luskin, 1998).

Justificación

La exposición a pentóxido de vanadio produce alteraciones ultraestructurales en las células de la capa granular del bulbo olfatorio. Tras suspender la exposición a dicho compuesto durante un mes, estas alteraciones parecen mantenerse. La neurogénesis en la zona subventricular es una fuente de neuronas que se incorporan al bulbo olfatorio durante toda la vida, pero, al parecer, no es suficiente para revertir el daño generado por vanadio; una posibilidad es que también esté alterada como consecuencia de la exposición al metal.

Hipótesis

Los animales expuestos a pentóxido de vanadio por vía inhalada durante cuatro semanas mostrarán una disminución en la proliferación de precursores neuronales en la zona subventricular y/o en el tallo rostral migratorio, la cual se mantendrá al menos un mes después de suspendida la exposición.

Objetivo

Evaluar la proliferación celular en la zona subventricular y el tallo rostral migratorio de ratones adultos, tras la exposición subcrónica por vía inhalada a pentóxido de vanadio.

Objetivos particulares

1. Determinar si hay diferencias en la proliferación de progenitores neurales, mediante la incorporación de BrdU, entre ratones adultos control, ratones expuestos a pentóxido de vanadio por cuatro semanas y aquellos que, tras el protocolo de exposición a vanadio, se mantienen en un ambiente libre de dicho metal durante un mes.
2. Determinar si las diferencias de proliferación celular se presentan con la misma magnitud en la zona subventricular y/o en el tallo rostral migratorio

Materiales y métodos

ANIMALES

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD-1 de la colonia de la Facultad de Medicina, con un peso de 35 gramos. Éstos se mantuvieron en cuartos con temperatura, iluminación y ventilación controladas y con libre acceso a alimento y a agua.

PROTOCOLO DE EXPOSICIÓN A VANADIO

Las exposiciones se llevaron a cabo en una caja de acrílico cerrada conectada a un ultranebulizador, que emite vapor de agua o de la solución de V_2O_5 0.02 M con un flujo continuo de 10 L/minuto. Las exposiciones se realizaron en sesiones de una hora, dos veces por semana a lo largo de un mes. En la caja de acrílico se alcanza una concentración de

vanadio de $1436 \mu\text{g}/\text{m}^3$, dicha concentración puede presentarse en algunas condiciones laborales (Ávila-Costa, *et al.*, 2005. Leonard y Geber, 1994)

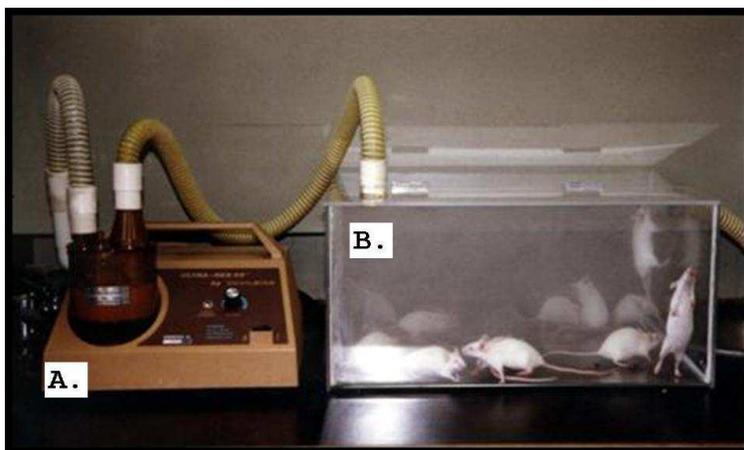


Figura 1. Fotografía del equipo utilizado para la exposición a V_2O_5 . A. Ultranebulizador
B. Caja de acrílico

Los ratones se dividieron aleatoriamente en 3 grupos:

Grupo Control: Los animales inhalan vapor de agua desionizada durante 4 semanas, al final de éstas fueron sacrificados ($n=5$).

Grupo Expuesto A (I1m): Los animales inhalan vapor de V_2O_5 0.02M durante 4 semanas, al final de éstas fueron sacrificados ($n=6$).

Grupo Expuesto B (I1mNoI1m): Los animales inhalan vapor de V_2O_5 0.02M durante 4 semanas y fueron sacrificados un mes después del término de las exposiciones ($n=6$).

ADMINISTRACIÓN DE BrdU

Los animales se inyectaron, por vía intraperitoneal, con una solución de 5'-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) disuelta en solución salina, a una dosis de 50 mg/kg de peso, 2 horas, 24 horas y 15 días antes de ser sacrificados.

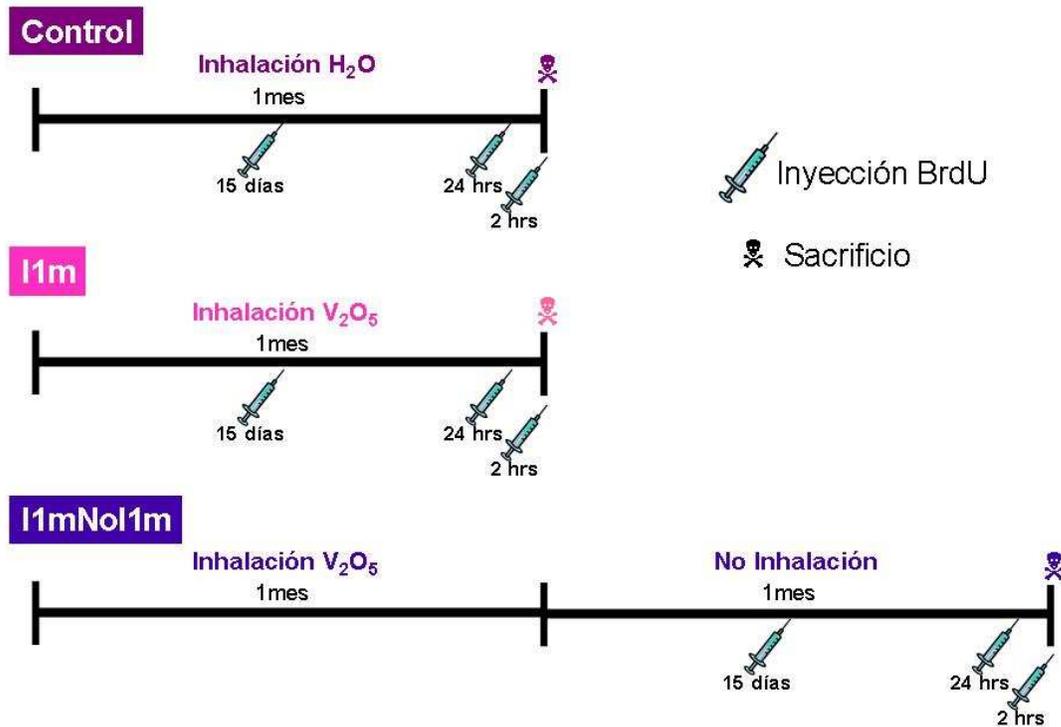


Figura 2. Esquema que ilustra el diseño experimental (para los detalles ver el texto)

OBTENCIÓN DE TEJIDO

Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso), se perfundieron por vía intracardiaca con NaCl 0.9%, seguido de una solución de paraformaldehído al 4% disuelto en el amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.4; PB). Los cerebros fueron removidos y posfijados en paraformaldehído por 24 horas a 4°C. Después, para su crioprotección, se colocaron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. Cuando las muestras decantaron, se congelaron en metilbutano, previamente enfriado en hielo seco y se almacenaron a -45°C hasta ser procesadas.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se obtuvieron cortes sagitales con un grosor de 40 μm en un criostato a -20°C . Éstos se colectaron en cajas de cultivo de 24 pozos con PB. Después de hacer un lavado con PB + Tritón X-100 al 0.3% (PBT), se incubaron 15 minutos en H_2O_2 al 3% en PBT. Al término de este periodo se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBT. Posteriormente se incubaron 2 horas en formamida al 50% a 65°C y se realizó un lavado de 10 minutos a temperatura ambiente con solución de citratos (NaCl 17.5 g/L, citrato de sodio 8.8 g/L). Después los cortes se incubaron 30 minutos en HCl 1 N a 37°C . A esta incubación le siguió un lavado de 10 minutos en borato de sodio 0.1 M a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados más de 10 minutos con PBT. Las muestras se incubaron con solución de bloqueo (albúmina de suero bovino 3%, Tritón X-100 0.1%, acida de sodio 0.025% en PB) durante 30 minutos, y posteriormente se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal contra BrdU (Roche), diluido 1:500 en solución de bloqueo. En los cortes utilizados como controles se omitió la incubación con el anticuerpo primario. Al día siguiente se realizaron tres lavados más de 10 minutos con PBT, y se incubó con el anticuerpo secundario generado en cabra contra inmunoglobulinas de ratón acoplado a biotina (1:500 en solución de bloqueo; Chemicon), durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados más de 10 minutos con PBT. Se incubó con el complejo avidina-peroxidasa por 90 minutos (Kit Elite ABC, Vector) y se hicieron 3 lavados de 10 min con PBT a temperatura ambiente. La actividad de peroxidasa se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno de acuerdo al protocolo recomendado por el proveedor (Vector). Posteriormente los cortes se montaron en laminillas, se dejaron secar y se cubrieron con cyto seal.

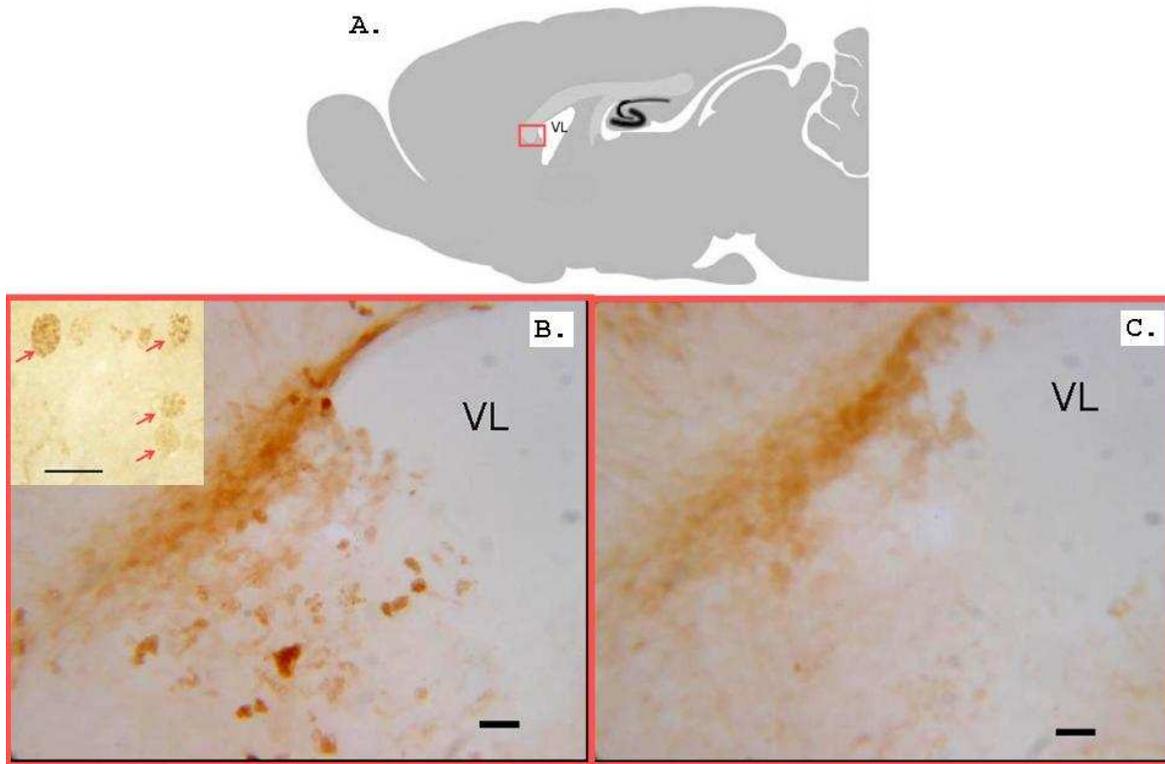


Figura 3. A. Dibujo de un corte sagital del cerebro de ratón que ilustra la posición relativa de la zona subventricular que se muestra en B y en C. **B.** Fotomicrografía de un corte sagital del cerebro de un animal intacto que muestra células inmunopositivas para BrdU (flechas; también ver inserto) **C.** Fotomicrografía de un corte sagital del cerebro de un animal intacto que muestra un control negativo de la inmunohistoquímica (mismo que en B. sin incubar con el anticuerpo primario). VL-ventrículo lateral. Escala 20 μ m

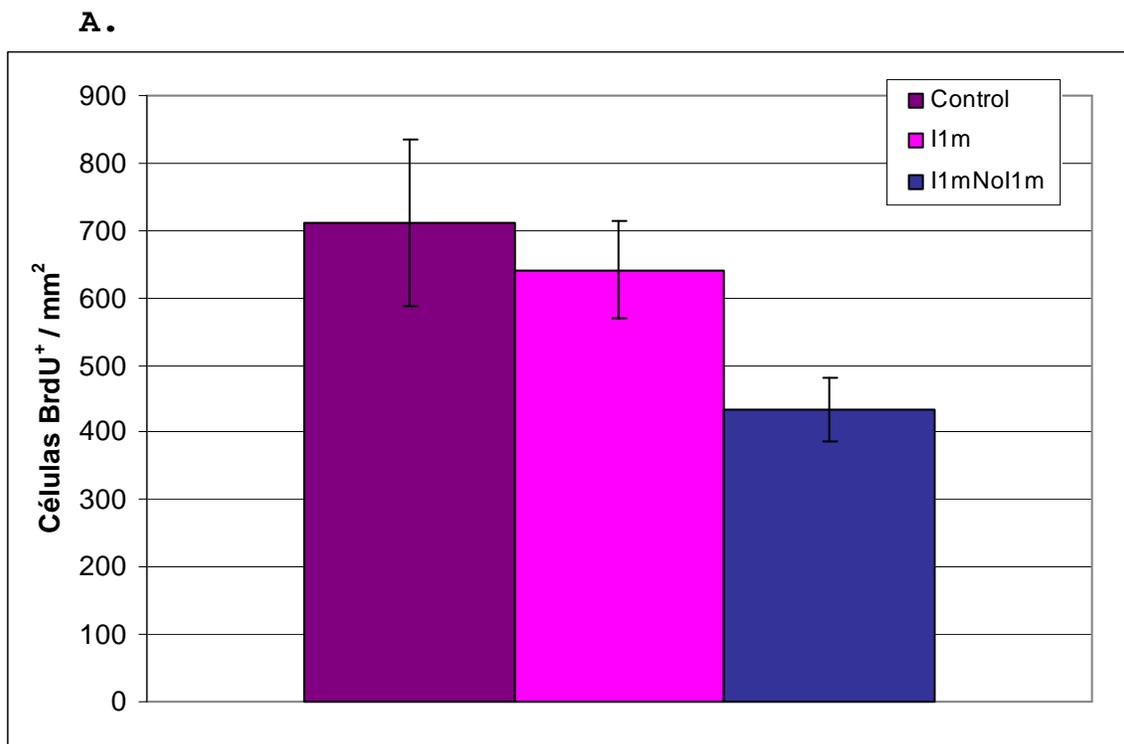
CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MARCADAS

Los cortes teñidos para BrdU fueron utilizados para realizar dibujos bidimensionales (aumento 4x) de la zona subventricular y del tallo rostral migratorio con la guía de una cámara lúcida. Estos dibujos se utilizaron para determinar los campos en los que se contarían las células marcadas a lo largo de la estructura. Éstos fueron en número de nueve por corte (i.e., por dibujo), cuatro en la zona

subventricular y cinco en el tallo rostral migratorio, y tuvieron una separación de 300 μm . Nuevamente con ayuda del tubo de dibujo, utilizando un objetivo de 40x, se marcaron sobre una hoja de papel todos los núcleos celulares que fueron inmunopositivos para BrdU dentro de cada campo. Posteriormente los dibujos se digitalizaron y se cuantificó el número de células marcadas utilizando el programa Image J. Después se dividió el número de células por unidad de área, para obtener la densidad de células marcadas. La densidad se promedió campo, por animal y por grupo de animales. Estos promedios fueron comparados entre grupos mediante la prueba estadística t de Student, considerando significativos los valores de $p \leq 0.05$.

Resultados

La densidad promedio de células que incorporaron BrdU en la zona subventricular y a lo largo del tallo rostral migratorio en su conjunto, fue similar entre los animales control (promedio \pm error estándar: 712 ± 124 células/mm²) y aquellos expuestos a pentóxido de vanadio durante cuatro semanas (641 ± 72 células/mm²). En contraste, al evaluar el grupo que tras la exposición se mantuvo durante un mes en un ambiente libre de vanadio (11mNo11m), se observó una clara tendencia a la reducción de la densidad de células inmunopositivas para BrdU (434 ± 48 células/mm²) respecto al grupo control (721 ± 124 células/mm²). Sin embargo, esta tendencia no alcanzó significancia estadística ($p = 0.053$) (figura 4).



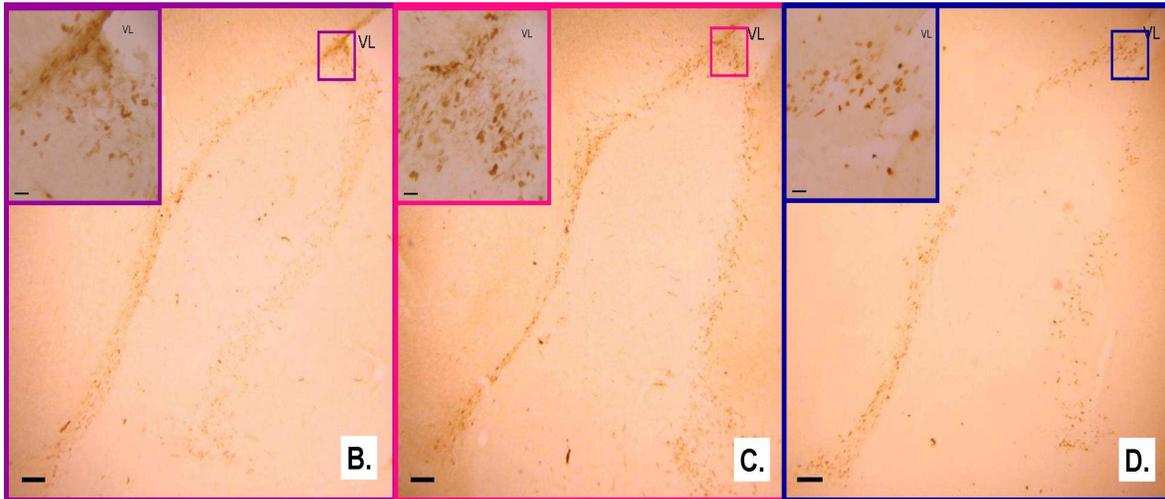


Figura 4. **A.** Gráfica que muestra el total de células inmunopositivas a BrdU por unidad de área en los tres grupos estudiados (promedio \pm error estándar). **B.** Fotomicrografía de un corte sagital del cerebro de un animal control; en el inserto, acercamiento de la zona señalada. **C.** Fotomicrografía de un corte sagital del cerebro de un animal expuesto (I1m); en el inserto, acercamiento de la zona señalada. **D.** Fotomicrografía de un corte sagital del cerebro de un animal que, tras el protocolo de exposición, fue mantenido un mes en un ambiente libre de vanadio (I1mNoI1m); en el inserto, acercamiento de la zona señalada (Escala para B. C. y D. 100 μ m; escala insertos 20 μ m. VL-ventrículo lateral).

Con el objetivo de evaluar si la tendencia observada se presenta tanto en la ZSV como en el TRM o si existen diferencias entre dichas estructuras, se compararon los promedios obtenidos por grupo en cada zona por separado. Este análisis permitió documentar una reducción significativa ($p=0.047$), del 38.75 %, en la densidad de células que incorporaron BrdU en el tallo rostral migratorio del grupo I1mNoI1m (406 ± 40 células/ mm^2), respecto a la del grupo control (663 ± 114 células/ mm^2) (Figura 5). Esto no se observó en la zona subventricular (no se muestra).

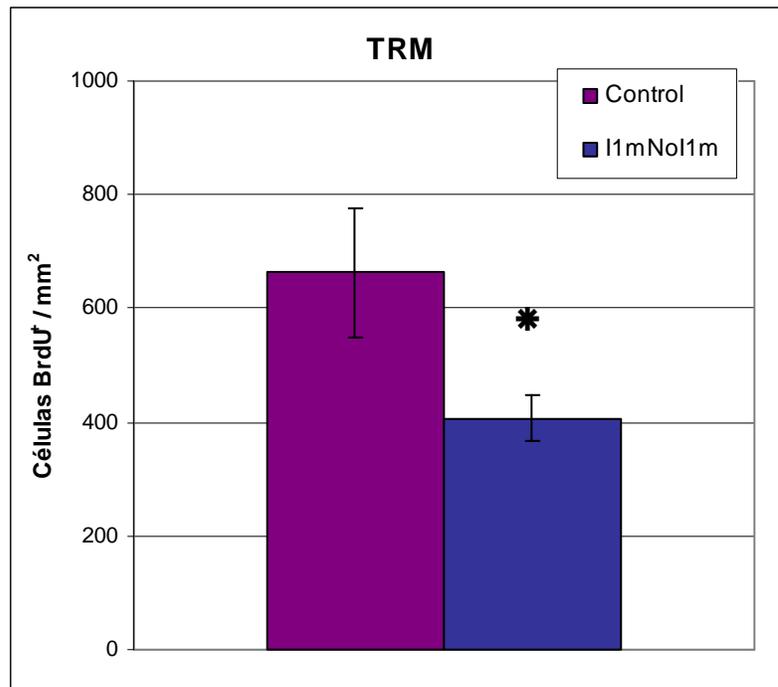


Figura 5. Número de células inmunopositivas a BrdU por unidad de área en el TRM del grupo control y del grupo que, tras el periodo de exposición a vanadio, fue mantenido durante un mes en un ambiente libre de dicho metal (I1mNoI1m). * $p = 0.047$.

Finalmente, la ZSV parece estar organizada en áreas discretas (Doetsch, et al., 1997) que favorecen preponderantemente la generación de linajes específicos. Además, existen evidencias de que el tallo rostral migratorio también podría estarlo. Con el objetivo de evaluar si el efecto de la exposición a vanadio sobre la densidad de células inmunopositivas a BrdU, observado en el TRM del grupo I1mNoI1m respecto al control, podría reflejar cierta compartamentalización, se compararon los promedios de densidad por campo en ambos grupos (Figura 7A). Aunque en la mayoría de los campos hay una tendencia a encontrar menos células marcadas por unidad de área en los animales del grupo I1mNoI1m, solamente se encontró una diferencia significativa de dicha reducción en el campo R4 ($p=0.017$) (Figura 7B).

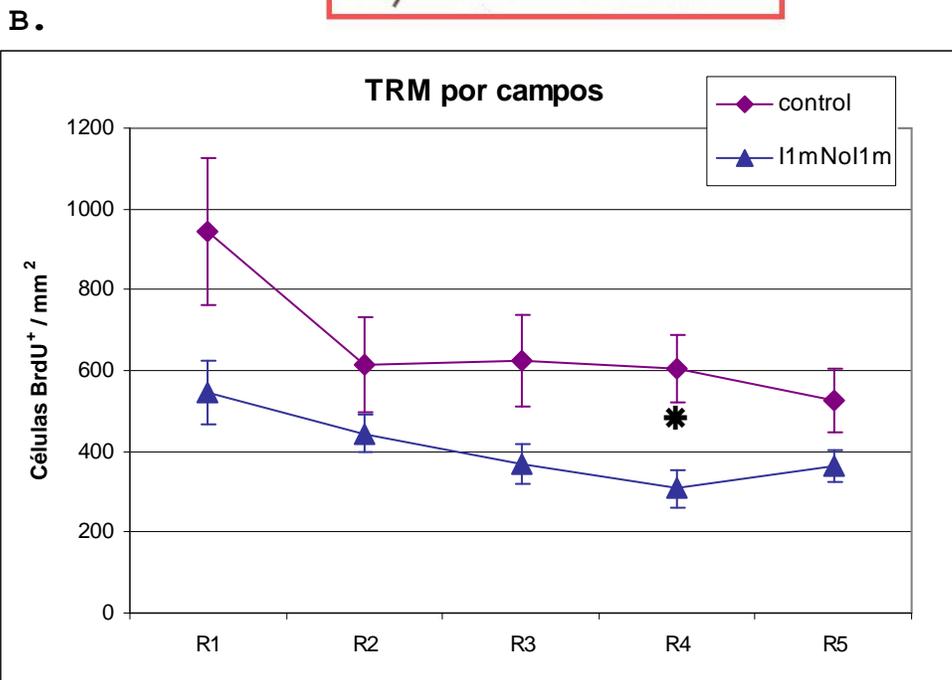
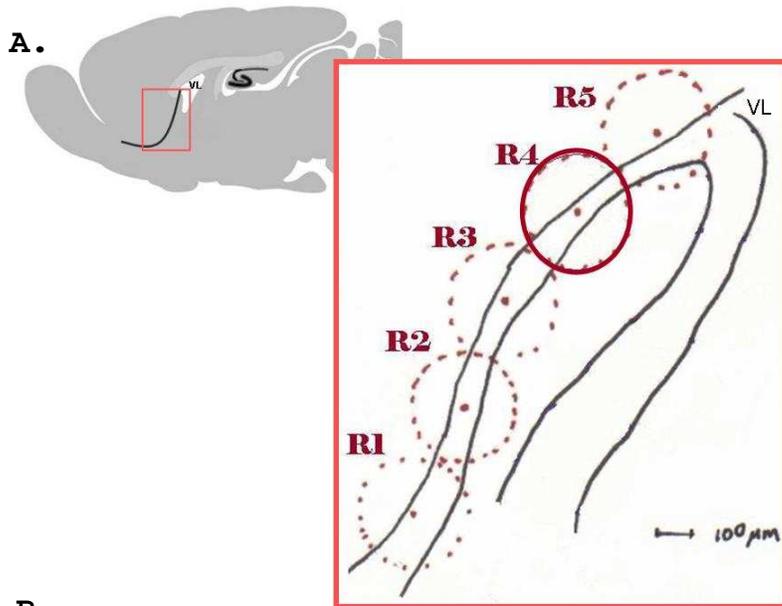


Figura 7. A. Esquema que ilustra la posición relativa y la nomenclatura de los campos evaluados a lo largo del TRM en los distintos grupos de animales (VL ventrículo lateral). **B.** Gráfica que muestra la densidad de células inmunopositivas a BrdU de los campos evaluados en el TRM de ratones control y ratones que, tras el periodo de exposición a vanadio, fueron mantenidos durante un mes en un ambiente libre de dicho metal (11mNo11m). Promedio \pm error estándar; * p = 0.017.

Discusión

La sobrexposición a vanadio conduce a trastornos neurológicos que se acompañan de alteraciones morfofuncionales en el sistema nervioso central. Un ejemplo de esto fue reportado recientemente en el bulbo olfatorio de ratones expuestos por vía inhalada a pentóxido de vanadio durante una a seis semanas. Las células granulares de esta región cerebral mostraron alteraciones ultraestructurales compatibles con citotoxicidad. Es interesante señalar que estos cambios no parecen revertirse después de transcurrido un mes de terminado el periodo de exposición. Debido a que el BO recambia la población de neuronas granulares regularmente, uno esperaría que al mes de finalizada la exposición el BO recuperase su morfología normal. El hecho de que esto no ocurra en los animales expuestos a vanadio sugiere que el recambio neuronal pudiese estar alterado. Los resultados obtenidos en este trabajo, son compatibles con esta última idea. La densidad celular en la zona subventricular y el tallo rostral migratorio en conjunto disminuyó, si bien no significativamente, en el grupo de ratones que tras la exposición fue mantenido en un ambiente libre de vanadio durante un mes, respecto al grupo control y al grupo expuesto por cuatro semanas. El análisis más detallado de las muestras reveló que el efecto más profundo se presenta sobre la proliferación de las células del TRM, en particular en la región inicial de éste, en donde dicho decremento alcanza significancia estadística. De esta forma nuestros resultados apoyan la idea de que la exposición a vanadio tiende a reducir la generación de células nuevas en el cerebro adulto.

Finalmente, si el líquido cerebro-espinal sirve como medio de transporte para que el vanadio entre al parénquima cerebral, como se ha sugerido (Ávila-Costa, *et al.*, 2005), es entendible que el efecto observado se presente en un área próxima a la cavidad ventricular.

Una pregunta que surge con respecto a los resultados obtenidos se relaciona con los posibles mecanismos a través de los que el vanadio pudiese afectar la generación de neuronas nuevas en la ZSV y en el TRM de los ratones adultos. Si bien desconocemos dichos mecanismos, se ha observado que:

1) La regulación de la proliferación y la diferenciación de las células troncales neurales provenientes de la ZSV es mediada por reguladores del ciclo celular como p19 (Coskum y Luskin, 2002), el cual actúa a través de MDM2 y p53 para inducir la expresión de p21 (Park, *et al.*, 2004), y así, inhibir la proliferación conforme las células se aproximan al BO. *In vitro* se ha demostrado que compuestos que contienen vanadio son capaces de detener la progresión del ciclo celular mediante la activación de reguladores como p21 y la cinasa Chk1 (Zhang, *et al.*, 2001, 2003). Una posibilidad es que estos mecanismos sean desencadenados en nuestro modelo de exposición a vanadio y que el efecto observado se deba a una expresión anticipada de reguladores del ciclo celular.

2) Recientemente, estudios *in vivo* e *in vitro* han permitido definir al óxido nítrico (ON) como un inhibidor fisiológico de la neurogénesis adulta (Matarredona, *et al.*, 2005). En modelos animales y en cultivos celulares, la exposición a compuestos que contienen vanadio incrementa la actividad de la óxido nítrico sintasa, la enzima responsable de la síntesis de este mensajero intercelular (García, *et al.*, 2005. Cortizo, *et al.*, 2000). Es posible pensar que en

nuestro modelo de estudio exista un aumento en la síntesis de ON que promueva la inhibición de la proliferación.

3) Una tercera posibilidad es que la disminución en la proliferación observada sea consecuencia de una disminución en la inervación dopaminérgica. *In vivo* e *in vitro* se ha demostrado que una deficiencia de dopamina disminuye la proliferación de células de la ZSV (Hoglinger, *et al.*, 2004). Además, en el modelo de exposición a pentóxido de vanadio por vía inhalada, que se utilizó en este trabajo, previamente se mostró una disminución en el número de células inmunopositivas a tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, en sustancia nigra (Ávila-Costa, *et al.*, 2004).

4) Por último, en el modelo de exposición utilizado en esta tesis también se ha demostrado que la inhalación crónica de pentóxido de vanadio disminuye el porcentaje de células positivas a γ -tubulina en células de testículo (Mussali-Galante, *et al.*, 2005). *In vitro* se ha observado que compuestos pentavalentes de vanadio afectan componentes del citoesqueleto como la proteína β -tubulina, la ATPasa de dineína y la ATPasa de miosina (Ramírez, *et al.*, 1997. Goodno, 1979. Shimizu y Jonson, 1983). Dado que la estructura del citoesqueleto es fundamental para los procesos de división celular y migración, es posible suponer que el efecto observado sea consecuencia de alteraciones en el citoesqueleto promovidas por la exposición a vanadio.

Una de las observaciones interesantes realizadas en este trabajo se relaciona con el efecto deletéreo, relativamente selectivo, de la inhalación de vanadio sobre densidad de las células que incorporan BrdU en la región inicial del TRM. Esta observación sugiere que a lo largo del TRM existen compartimentos discretos cuya sensibilidad a agentes

citotóxico difiere. Además, esta observación apoya la idea de que estos compartimentos también pudieran representar subdivisiones morfo-funcionales en condiciones normales. En apoyo a esta posibilidad se ha mostrado que existen agrupaciones de células troncales al inicio del TRM que dan origen a neuronas granulares (Smith y Luskin, 1998; Mendoza-Torreblanca, *et al.*, comunicación personal), mientras que aquellas presentes en los dos tercios anteriores de la misma estructura generan predominantemente neuronas periglomerulares. También se ha observado que las neuroesferas derivadas del tercio anterior del TRM originan una proporción mayor de oligodendrocitos, en comparación con los dos tercios posteriores. Adicionalmente a lo ya discutido, la generación de compartimentos a lo largo del TRM se puede explicar por la heterogeneidad estructural que se presenta a lo largo de esta estructura. Además de diferencias en la composición celular, existen gradientes de factores solubles que guían la migración de los neuroblastos a lo largo de la vía ZSV-TRM (Jankovski y Sotelo, 1996. Menezes, *et al.*, 2002). Estos factores podrían repercutir en la sensibilidad de las células que ocupan cada región, o bien inducir una distribución heterogénea del vanadio.

El hecho de que la exposición a pentóxido de vanadio se asocie a efectos tardíos en los animales que, tras el periodo de exposición, fueron mantenidos en un ambiente libre de este metal durante un mes es difícil de explicar. Se sabe, sin embargo, que concentraciones bajas de vanadio en las células permanecen unidas a moléculas hidrofóbicas sin producir una toxicidad inmediata, pero sí en el largo plazo (Mukherjee, *et al.*, 2004). En el modelo de estudio utilizado, la concentración de vanadio en cerebro durante el periodo de exposición se estabiliza entre 0.1 y 0.15 µg por gramo de

tejido seco (Ávila-Costa, et al., 2005). Desafortunadamente, se desconoce qué pasa con la concentración del metal una vez suspendidas las exposiciones. De mantenerse elevada, es posible que el vanadio siga ejerciendo alguno de los efectos sugeridos, ya sea la acumulación de reguladores del ciclo celular, la síntesis de ON o la depleción dopaminérgica, y que sea hasta después de suspendidas las exposiciones a vanadio que se alcanza una concentración umbral de éstos, suficiente para desencadenar la inhibición de la proliferación.

Conclusión

La exposición a pentóxido de vanadio por vía inhalada tiene como consecuencia una disminución en la proliferación de precursores neuronales en el cerebro adulto. Sin embargo los efectos se presentan en el largo plazo y, de manera particular, en la región caudal del tallo rostral migratorio. Esta última observación es importante debido a que sugiere la existencia de compartimentos discretos a lo largo de la vía ZSV-TRM.

Referencias

Aguirre C, Mondragón A, Meza P, Fortoul TI, Avila-Costa MR, Sanchez I, López I, Niño-Cabrera G, Pasos F, Acevedo S, Espinosa J, Aley P y Colín-Barenque L. *Efecto del vanadio sobre la citología del bulbo olfatorio de ratón. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Colima, Col. 2002.

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin, AD. *A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Neurosci*. 2001; 2:287-93

Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. *Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci*. 2002; 22:629-34.

Avila-Costa MR, Montiel Flores E, Colin-Barenque L, Ordonez JL, Gutierrez AL, Nino-Cabrera HG, Mussali-Galante P, Fortoul TI. *Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: an immunocytochemical and cytological approach. Neurochem Res*. 2004; 29:1365-9.

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

Avila-Costa MR, Fortoul TI, Nino-Cabrera G, Colin-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Gutierrez-Valdez AL, Ordonez-Librado JL, Rodriguez-Lara V, Mussali-Galante P, Diaz-Bech P, Anaya-Martinez V. *Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) promote memory deterioration. Neurotoxicology*. 2006; 27: 1007-1012

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

Barth A, Schaffer AW, Konnaris C, Blauensteiner R, Winker R, Osterode W, Rudiger HW. *Neurobehavioral effects of vanadium. J Toxicol Environ Health A*. 2002; 65:677-83.

Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. *Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-*

renewing capacity in the adult rat brain. **Neurosci Lett.** 2000; 291:17-20.

Byczkowski, JZ, Kulkarni, AP. *Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium.* En **Vanadium in the environmental.** Nriagu J. Ed. Vol 31. John Wiley and Sons. New York. 1998. pp 235-263.

Calderon-Garciduenas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, DEL Tizapantzi MR, Carson JL, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B. *Air pollution and brain damage.* **Toxicol Pathol.** 2002;30:373-89.

Calderon-Garciduenas L, Maronpot RR, Torres-Jardon R, Henriquez-Roldan C, Schoonhoven R, Acuna-Ayala H, Villarreal-Calderon A, Nakamura J, Fernando R, Reed W, Azzarelli B, Swenberg JA. *DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration.* **Toxicol Pathol.** 2003;31:524-38.

Chong IW, Lin SR, Hwang JJ, Huang MS, Wang TH, Tsai MS, Hou JJ, Paulauskis JD. *Expression and regulation of macrophage inflammatory protein-2 gene by vanadium in mouse macrophages.* **Inflammation.** 2000; 24:127-39.

Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Sanchez I, López I, Niño G, Pasos F, Delgado V, Fortoul TI. *Muerte neuronal en el bulbo olfatorio de ratón inducida por exposición subaguda y crónica de vanadio.* **XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.** Aguascalientes. 2003.

Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Delgado V, López, Sánchez I, Pasos F, Fortoul TI. *Mice olfactory bulb neuronal death after V205 inhalation.* **43 rd Annual Meeting of the Society of Toxicology.** Baltimore, Maryland. 2004.

Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Mussali Galante P, Reyes A, Ordoñez JL, Bizarro Nevares P, Pasos F, Aley P, Espinosa Villanueva J, Fortoul TI. *Recuperación del daño citológico inducido por V205 en bulbo olfatorio de ratón.* **XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.** Guadalajara, Jal. 2005.

Cortizo AM, Caporossi M, Lettieri G, Etcheverry SB. *Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast*

growth and differentiation. **Eur J Pharmacol.** 2000; 400:279-85.

Coskun V, Luskin MB. *Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream.* **J Neurosci Res.** 2002; 69:795-802.

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

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.* **J Neurosci.** 1997; 17:5046-61.

Doetsch F, Hen R. *Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain.* **Curr Opin Neurobiol.** 2005; 15:121-8.

Fantus IG, Tsiani E. *Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways: evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects.* **Mol Cell Biochem.** 1998; 182:109-19.

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

Garcia GB, Quiroga AD, Sturtz N, Martinez AI, Biancardi ME. *Morphological alterations of central nervous system (CNS) myelin in vanadium (V)-exposed adult rats.* **Drug Chem Toxicol.** 2004; 27:281-93.

Garcia GB, Biancardi ME, Quiroga AD. *Vanadium (V)-induced neurotoxicity in the rat central nervous system: a histo-immunohistochemical study.* **Drug Chem Toxicol.** 2005; 28:329-44.

Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. *Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells.* **J Neurobiol.** 1998; 36:234-48.

Goodno CC. *Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1979; 76:2620-4.

Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, Galli R, Verdugo JM, Herrera DG, Vescovi AL. *Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents.* **J Neurosci.** 2002; 22:437-45.

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

Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. *Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease.* **Nat Neurosci.** 2004; 7:726-35.

Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, Shen HM, Butterworth L, Lu Y, Costa M, Rojanasakul Y, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. *Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis.* **J Biol Chem.** 2000; 275:32516-22

Jankovski A, Sotelo C. *Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation.* **J Comp Neurol.** 1996; 371:376-96.

Jaspers I, Samet JM, Reed W. *Arsenite exposure of cultured airway epithelial cells activates kappaB-dependent interleukin-8 gene expression in the absence of nuclear factor-kappaB nuclear translocation.* **J Biol Chem.** 1999; 274:31025-33.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. *Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98:4710-5.

Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. *Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw},Ind) mice.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004; 101:13363-7.

Leal, M., Chávez, V., Larralde, L., TEMAS AMBIENTALES, ZMCM, Programa Universitario del Medio Ambiente, Fideicomiso Ambiental del Valle de México, edición a cargo del Departamento del Distrito Federal, Gobierno del Estado de México, Secretaria del Medio Ambiente, UNAM, México, 1997. pp. 39-75

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

Lois C, Alvarez-Buylla A. *Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain*. **Science**. 1994; 264:1145-8.

Mackowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, Wedzony K. *Neurogenesis in the adult*. **Pol J Pharmacol**. 2004; 56:673-87.

Marfaing-Jallat P, Penicaud L. *Effect of vanadium on regional brain glucose utilization in rats*. **Physiol Behav**. 1993; 54:407-9.

Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C. *Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis*. **Brain Res Rev**. 2005; 49:355-66.

Menezes JR, Marins M, Alves JA, Froes MM, Hedin-Pereira C. *Cell migration in the postnatal subventricular zone*. **Braz J Med Biol Res**. 2002; 35:1411-21.

Ming GL, Song H. *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. **Annu Rev Neurosci**. 2005; 28:223-50.

Mondragon A, Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Sánchez CI, López I, Niño CG, Pasos F, Delgado V, Ordoñez J, Gutierrez A, Aley P y Fortoul TI. *Efecto de la inhalación crónica de vanadio sobre la la citología del bulbo olfatorio de ratón*. **XLVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas**. Aguascalientes. 2003.

Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. *Vanadium--an element of atypical biological significance*. **Toxicol Lett**. 2004; 150:135-43.

Mussali-Galante P, Rodriguez-Lara V, Hernandez-Tellez B, Avila-Costa MR, Colin-Barenque L, Bizarro-Nevarez P,

Martinez-Levy G, Rojas-Lemus M, Pinon-Zarate G, Saldivar-Osorio L, Diaz-Beck P, Herrera-Enriquez MA, Tovar-Sanchez E, Fortoul TI. *Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times.* **Toxicol Ind Health.** 2005; 21:215-22.

Naylor GJ, Smith AH, Bryce-Smith D, Ward NI. *Tissue vanadium levels in manic-depressive psychosis.* **Psychol Med.** 1984; 14:767-72.

Nielsen FH. *Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation.* **FASEB J.** 1991; 5:2661-7.

Opresko, DM, TOXICITY SUMMARY FOR VANADIUM AND VANADIUM COMPOUNDS. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, Tennessee, 1991.

Pandey SK, Theberge JF, Bernier M, Srivastava AK. *Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70(s6k) signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate.* **Biochemistry.** 1999; 38:14667-75.

Parent JM, Valentin VV, Lowenstein DH. *Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway.* **J Neurosci.** 2002; 22:3174-3188.

Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. *Bmi1, stem cells, and senescence regulation.* **J Clin Invest.** 2004; 113:175-9.

Parsadonian HK, Marchenko SN, Parsadonian KH, Barilyak IR. *Vanadium as a factor that disturbs phosphorus metabolism in nervous tissue.* **Neurotoxicology.** 1998; 19:561-4.

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

Ramirez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman P. *Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide.* **Mutat Res.** 1997; 386:291-8.

Sanchez DJ, Colomina MT, Domingo JL. *Effects of vanadium on activity and learning in rats.* **Physiol Behav.** 1998; 63:345-50.

Shimizu T, Johnson KA. *Presteady state kinetic analysis of vanadate-induced inhibition of the dynein ATPase.* **J Biol Chem.** 1983; 258:13833-40.

Smith CM, Luskin MB. *Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream.* **Develop Dynam.** 1998; 213:220-27

Tsiani E., Fantus IG. *Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents.* **Trends Endocrinol Metab.** 1997; 8:51-58

Vouk VB, Piver WT. *Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity.* **Environ Health Perspect.** 1983; 47:201-25.

Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, Misra A. *Intranasal drug delivery for brain targeting.* **Curr Drug Deliv.** 2005; 2:165-75.

www.fimevic.df.gob.mx/problemas/problemasdemov.htm

"Fideicomiso para el Mejoramiento de las Vías de Comunicación del Distrito Federal" (FIMEVIC). **Problemas de Movilidad en la Ciudad de México.** 2002

Ye J, Ding M, Zhang X, Rojanasakul Y, Nedospasov S, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. *Induction of TNF α in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF- κ B and free radical reactions.* **Mol Cell Biochem.** 1999; 198:193-200.

Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard SS, Lanciotti R, Butterworth L, Shi X. *Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species.* **Arch Biochem Biophys.** 2001; 392:311-20.

Zhang Z, Leonard SS, Huang C, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. *Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest.* **Free Radic Biol Med.** 2003; 34:1333-42