

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL  
ENDOTELIO VASCULAR EN UN MODELO MURINO**

**Por**

**BERNARDO ALFONSO FERNÁNDEZ RODARTE**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**NOVIEMBRE DE 2021**

**EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENDOTELIO VASCULAR  
EN UN MODELO MURINO**

**Aprobación de la tesis:**

---

**Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña  
Director de la tesis**

---

**Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha  
Co-Director de la tesis**

---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna  
Miembro de la comisión**

---

**Dr. C. Adolfo Soto Domínguez  
Miembro de la comisión**

---

**Dr. med. Jesús Dante Guerra Leal  
Miembro de la comisión**

---

**Dr. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ  
Subdirector de Estudios de Posgrado**

**EFFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENDOTELIO VASCULAR EN UN  
MODELO MURINO**

**Presentado por:**

**Dr. Bernardo A. Fernández Rodarte**

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Anatomía Humana y Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña y la Co-dirección del Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha.**

---

**Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña**  
**Director de la tesis**

---

**Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha**  
**Co-Director de la tesis**

**Monterrey, N.L.**

**Noviembre de 2021**

## DEDICATORIA

A mis padres Alfonso Fernández Sánchez (+) y Francisca Palma Rodarte Ramón (+), quienes me brindaron la oportunidad con su ejemplo, tenacidad y entrega por el trabajo y familia, de crecer como persona y aprender a trabajar arduamente sin perder de vista a mis seres queridos.

A mis hijos fuente de energía en mi día a día, y quienes me motivaron con su alegría y sus detalles cotidianos a no cejar en mi intención de terminar mi proyecto.

A mi esposa Martha Ofelia Reyes Fernández: Mi esposa, amiga, colega y compañera de batallas. Siempre has estado no solo en las malas sino en las peores; has sido el aliento en todo momento, mi apoyo y mi motor para seguir avanzando aun cuando no creía en mí: TE AMO.

Finalmente, A DIOS: Gracias por siempre Señor por darme la oportunidad de brindarte en esta vida, este gesto de trabajo, esperando tu luz y bendición para lo que resta de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Santos Guzmán López. Hermano mayor durante mi periodo de becario en el Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la UANL; confiaste en mí aun antes de recibirme para hacerme cargo de tu consultorio cuando dábamos consulta en colonia del sistema Fomerrey cuyo número no recuerdo, siendo mi padrino en la “medicina privada” con el toque humanitario que siempre te ha caracterizado. Ahora en el ámbito profesional, continúas brindando tu mano para seguir adelante en mi especialidad y luego en mi doctorado. Gracias Santos por todo tu apoyo, de antes y de ahora.

Al Dr. Rodrigo Elizondo Omaña. Te conozco desde tu formación de Pregrado, tu apoyo desmedido cuando nos hacíamos cargo de la Coordinación de Pregrado y tu crecimiento profesional intachable que habla de la gran persona que eres. Tu apoyo en este proyecto ha sido pleno y no tengo palabras para agradecerte lo que has sacrificado en ocasiones para poder llevarlo a término.

Al Dr. Alejandro Quiroga: Me has enseñado que siempre puedes encontrar un área de oportunidad cuando consideras todo perdido. Gracias por el ánimo y la enseñanza durante las sesiones de los grupos de investigación y tu apoyo en el idioma inglés e invaluable colaboración científica.

El Dr. Humberto Rodríguez Rocha: El punto de vista crítico durante el desarrollo de un trabajo de investigación es crucial para un resultado favorable. No tengo palabras para agradecer la oportunidad de su valoración científica durante el proceso de este proyecto. Sus observaciones puntuales y perspectivas de aplicabilidad clínica de lo expresado en este estudio, me motivan a ver como un inicio, más que un final, esta culminación. Espero y sigan cosechando éxitos y publicaciones de interés científico, con esa calidad que los caracteriza siempre.

Al Dr. Adolfo Soto. Gracias primeramente por el invaluable apoyo durante este proceso y fascinante camino que lleva culminar un proyecto de Doctorado: Usted me animó a continuar aun y cuando creí que ya no había forma de hacerlo; por hacerme entender y observar estructuras donde mi vista inexperta solamente veía sombras de inicio. Su experiencia al microscopio, su dinamismo, optimismo, sacó a flote mi ánimo cuando el pesimismo me abordó en múltiples ocasiones. No tendré manera de agradecer todo su invaluable apoyo, estaré eternamente agradecido.

A los estudiantes Alejandro González, Max Mellado y Rodolfo Salazar: El interés científico que muestran en el trabajo que realizan les augura éxito rotundo en cualesquiera áreas que decidan aplicar. Estaré eternamente agradecido por el apoyo en la realización de este proyecto.

Al hoy especialista, exbecario del departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Dr. Rodolfo Morales: Gracias por darme el pie de inicio del proyecto que hoy culmina. Veo un camino de éxito y oportunidad de enseñanza en tu vida futura. Bendiciones siempre.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
RESÚMEN .....	1
Capítulo II	
2.1 MARCO TEÓRICO .....	2
2.2. SISTEMA DE DEFENSA ANTI-ROS .....	4
2.3 ANTECEDENTES .....	6
Capítulo III	
3.1 HIPÓTESIS .....	9
3.1.1 Hipótesis Alterna.....	9
3.1.2 Hipótesis Nula .....	9
3.2 JUSTIFICACION .....	10
3.3 ORIGINALIDAD .....	11
Capítulo IV	
OBJETIVOS .....	12
4.1 Objetivo General .....	12
4.1.1 Objetivos Particulares .....	12
Capítulo V	
MATERIAL Y MÉTODOS .....	13
5.1 Tipo de estudio .....	13
5.2 Diseño del estudio .....	13
5.3 Lugar de referencia .....	13
5.4 Características de la población y tamaño de la muestra .....	13
5.5 Distribución de los animales .....	14
5.6 Condiciones y manejo de los sujetos de estudio .....	14

5.7 Administración de cobre en los grupos experimentales .....	15
5.8 Obtención de la muestra .....	15
5.9 Preparación de las muestras para el análisis morfológico gral ...	15
5.10 Evaluación de estrés oxidativo .....	16
5.11 Evaluación de muerte celular .....	17
5.12 Análisis estadístico .....	17
5.13 Consideraciones éticas .....	17

## Capítulo VI

6. RESULTADOS .....	18
6.1 El tratamiento con cobre induce alteraciones en la pared de la aorta.	
6.2 La exposición a cobre induce aumento de la expresión de eNOS en aorta.....	19
6.3 La exposición crónica a cobre causa la expresión de Caspasa-3 activa el endotelio de aorta.....	20
6.4 La exposición crónica a cobre induce alteraciones morfológicas en pulmón .....	21
6.5 La exposición a cobre induce aumento de la expresión de eNOS en pulmón .....	22
6.6 La exposición crónica a cobre causa la expresión de Caspasa-3 activa el endotelio de aorta .....	23

## Capítulo VII

7. DISCUSIÓN .....	25
--------------------	----

## Capítulo VIII

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	28
8.1 Conclusiones .....	28
8.2 Perspectivas .....	28

## Capítulo IX

9. ANEXOS .....	29
-----------------	----



APENDICE A PROTOCOLOS .....	29
A.1 Técnica histológica para muestras embebidas en parafina .....	29
A.2 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E) .....	29
A-3. IHQ para detección de eNOS y Caspasa-3 activa .....	30
APENDICE B SOLUCIONES.....	31
B.1 Formaldehído 10 % .....	31
B. 2 PBS 10X .....	31
B. 3 PBS 1X .....	31
B. 4 Hematoxilina de Gill .....	31
B. 5 Eosina.....	32
B. 6 Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).....	32
B. 7 Solución de Agua Amoniacal (Virador).....	32

## Capítulo X

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	33
----------------------------------	----

## CAPÍTULO XI

PRODUCTOS OBTENIDOS DEL PRESENTE ESTUDIO .....	37
11. 1 MANUSCRITO ENVIADO Y ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN EN LA REVISTA INDEXADA EN JCR: INTERNATIONAL JOURNAL OF MORPHOLOGY.....	38

## Capítulo XII

11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	57
----------------------------------	----

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Grupos de estudio y tratamientos .....	14

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. La exposición crónica a cobre causa alteraciones histológicas en la pared de aorta .....	18
2. La exposición a cobre induce la sobreexpresión de eNOS en endotelio de aorta .....	19
3. La exposición a cobre induce la expresión de Caspasa-3 activa en endotelio de aorta .....	20
4. Daño inducido por la exposición a cobre en pulmón.....	21
5. Expresión de eNOS en pulmón .....	22
6. La exposición a cobre induce la expresión de Caspasa-3 activa en endotelio de los capilares pulmonares.....	23
7. Análisis cuantitativo de la expresión de eNOS y Caspasa-3 activa.	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**ppm:** Partes por millón

**NO:** Óxido nítrico

**O<sup>2</sup>:** Oxígeno

**O<sup>2-</sup> :** Anión superóxido.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**OH•:** Radical libre hidroxilo

**RO•:** Radical alcoxilo

**RO<sub>2</sub>•:** Radical peroxilo

**HO<sub>2</sub>•:** Radical hidroperoxilo

**1O<sub>2</sub>:** Oxígeno singulete (en su forma sigma [Σ]).

**ONOO•:** Peroxinitritos

**HOCl:** Ácido hipocloroso

**Fe<sup>+2</sup>:** Cation hierro (II)

**Cu<sup>+2</sup>:** Cation cobre (II)

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**SOD:** Superóxido dismutasa

**MnSOD:** Mn-Superóxido dismutasa

**CuZn-SOD:** CuZn Superóxido dismutasa

**SOD.Ec:** Superóxido-dismutasa extracelular

**GPX:** Glutati3n peroxidasa

**kDa:** Kilodaltones

**GSH:** Glutati3n reducido

**CML:** C3lulas de m3sculo liso

**CAM:** Mol3culas de adhesi3n

**GMP:** Guanidil monofosfato

**CE:** C3lulas endoteliales

**ADP:** Adenosin difosfato

**t-PA:** Activador tisular del plasmin3geno

**PAI-1:** Inhibidor del activador del plasmin3geno tipo 1

**vWF:** Factor de Von Willebrand

**g:** Gramos

**CuSO<sub>4</sub>:** Sulfato de cobre

**CO<sub>2</sub>:** Bi3xido de carbono

**TA:** Temperatura ambiente

**μm:** Micr3metro

**H y E:** Hematoxilina y Eosina

**IHQ:** Inmunohistoqu3mica

**HRP:** Peroxidasa del r3bano picante

**DAB:** 3, 3'diaminobenzidina

**CICUAL:** Comit3 Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

**RNA<sub>m</sub>:** 3cido ribonucleico mensajero

**IL-8:** Interleucina-8

**VCAM-1:** Mol3cula-1 de adhesi3n celular vascular

**ICAM-1:** Molécula-1 de adhesión intercelular

**Min:** Minutos

**Seg:** Segundos

**PBS:** Solución buffer de fosfatos

**TA:** Temperatura ambiente

**pH:** Potencial de hidrógeno

**μL:** Microlitro

**mL:** Mililitro



---

## CAPÍTULO I

### RESUMEN

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) forman parte del equilibrio funcional de varios sistemas, pueden generar daño celular por estrés oxidativo asociado a procesos patológicos como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, diabetes y envejecimiento. Algunos estudios informan que el cobre induce daños en el endotelio, lo que podría estar asociado a patologías cardiovasculares. Este estudio fue un ensayo clínico experimental, comparativo, prospectivo, longitudinal y controlado en un modelo murino. Se incluyeron 24 ratas Wistar macho y la distribución de los grupos (6) fue de acuerdo con la exposición crónica al cobre (180 y 300 ppm) en función del tiempo (180 y 300 días de exposición), se incluyeron también dos grupos control con solo agua de beber (uno para cada grupo expuesto a cobre). Los resultados muestran alteraciones graduales en los grupos tratados con cobre: áreas con pérdida del endotelio, signos de desorganización de las fibras musculares lisas en la túnica media, así como áreas con la fragmentación de las láminas elásticas. Se observó una diferencia estadística significativa en la expresión del análisis de Caspasa-3 activa en el endotelio aórtico y el endotelio de los capilares y arteriolas del pulmón entre el grupo de control frente a 300 ppm de cobre. Se detectó expresión de eNOS en el endotelio de la aorta y los vasos del pulmón. Nuestro estudio muestra cambios histológicos en las paredes de los grandes vasos de ratas intoxicadas con cobre, y el incremento de células inflamatorias en los alvéolos del modelo de estudio, principalmente a una alta dosis de exposición al cobre. Estos resultados serán útiles para comprender más sobre los mediadores involucrados en el efecto del cobre sobre el endotelio y las enfermedades cardiovasculares en la intoxicación crónica en humanos.



## CAPÍTULO II

### 2.1 MARCO TEORICO

Los radicales libres son especies moleculares que poseen uno o más electrones de valencia sin aparear, sea por ganancia o pérdida de dicho electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula, y que no contribuyen a enlaces intramoleculares.<sup>1</sup> Se caracterizan por su elevada reactividad y capacidad para formar otros radicales libres al generar reacciones químicas en cadena.<sup>2</sup> En el ser humano adquieren relevancia las llamadas **Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)** que, aunque forman parte del balance funcional de diversos sistemas,<sup>2</sup> tienen capacidad para generar daño celular; y están asociadas a procesos de enfermedad (ateroesclerosis, enfermedad cardiovascular o diabetes) y envejecimiento. Las ROS se forman producto de la respiración celular, cuando existe una elevada concentración de oxígeno en el ambiente respirado por el individuo o a concentraciones normales bajo ciertas circunstancias (paradoja del oxígeno),<sup>1-3</sup> aunque para algunos autores el concepto de ROS como agente de enfermedad es un término inapropiado, ya que representa mecanismos no solo de daño sino de señalización de procesos celulares y adaptación y/o defensa, ya que algunos productos de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poli-insaturados y colesterol, inducen una respuesta de adaptación contra agentes oxidantes.<sup>3-4</sup>

Las ROS producto del paso celular del  $O^2$  molecular al agua son, entre otras, tres principalmente:

- $O^{2-}$ - anión superóxido.
- $H_2O_2$ : Peróxido de hidrógeno.
- $OH\cdot$ : Radical hidroxilo

También podemos mencionar:



- RO•: Radical alcoxilo
- RO<sub>2</sub>•: Radical peroxilo
- HO<sub>2</sub>•: Radical hidroperoxilo
- <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Oxígeno singulete (en su forma sigma [Σ]).<sup>1</sup>

Sin embargo, también se pueden desarrollar ERO no radicales:

- Peroxinitritos (ONOO•): Estos se forman al reaccionar el óxido nítrico (NO), con el -O<sub>2</sub>. Capaz de generar lipoperoxidación y daño celular.
- Radicales peróxidos lipídicos: Se forman por peroxidación de los lípidos celulares.
- Ácido hipocloroso (HOCl): Lo producen macrófagos y neutrófilos durante la fagocitosis, por efecto de la mieloperoxidasa sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generando HOCl y OH•.<sup>1,3,5</sup>

El OH• es la ROS más reactiva capaz de dañar las macromoléculas celulares. Su mecanismo de producción depende de varios procesos:

- Radiólisis del agua.<sup>3</sup>
- Reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el catión hierro II (Fe<sup>+2</sup>) o con el catión cobre II (Cu<sup>+2</sup>). En este caso, la interacción reactiva con la forma reducida del hierro o el cobre produce una disociación de los átomos de oxígeno, dando como resultado la formación del OH•.<sup>6</sup>
- Reacción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con -O<sub>2</sub> mediante la reacción de Haber-Weiss.<sup>1,3</sup>

El OH• promueve reacciones que generan daño a la estructura celular, tales como:

- Peroxidación lipídica: Que es capaz de dañar a la membrana celular.
- Degradación proteica.
- Azúcares: La reacción con este compuesto generan intermediarios activos, que a su vez modifican las proteínas para generar los llamados productos finales de la glicación avanzada.
- Alteración del DNA: Genera daño estructural que conduce bien sea a la mutación o la muerte celular.<sup>3,5</sup>





El **estrés oxidativo** se observa cuando la liberación o formación de las ROS exceden nuestra capacidad endógena antioxidante. Se reconocen algunos factores de riesgo cardiovascular que favorecen el estrés oxidativo de tejidos, como el endotelio o la célula miocárdica, en patologías como: Diabetes mellitus, obesidad, tabaquismo, contaminación, que finalmente pueden conducir a una alteración en el funcionamiento de la célula involucrada.<sup>7</sup> De igual manera, el estrés oxidativo, aunado a la disminución del NO, está asociado al desarrollo de aterosclerosis en injertos vasculares empleados para revascularización con injerto de vena.<sup>8</sup>

Por otra parte, está demostrado que el estrés no oxidativo por radicales libres también son precursores de enfermedad, tales como trombofilia inducida por metales como hierro o cobre.<sup>9</sup>

## **2.2. SISTEMA DE DEFENSA ANTI-ROS:**

Dentro de este sistema podemos mencionar elementos como:

Enzimas desintoxicantes:

- Superóxido dismutasa (SOD): Se considera como la principal defensa enzimática en el metabolismo del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), y por ende contra el estrés oxidativo. A la fecha, se han identificado tres tipos de esta enzima, denominadas como:
  - **Mn-Superóxido dismutasa (MnSOD)**: Esta enzima muestra su actividad principalmente en la mitocondria.
  - **CuZn Superóxido dismutasa (CuZn-SOD)**: Realiza su actividad en el citoplasma.
  - **Superóxido-dismutasa extracelular (SOD.Ec)**: Esta variedad es secretada por las células vasculares a la matriz extracelular.<sup>8</sup>



Esta enzima está relacionada en un mecanismo de defensa autólogo importante, y es la responsable de transformar el anión ( $O_2^-$ ) a  $H_2O_2$ ; mutaciones en la estructura de la SOD pueden estar relacionadas con una variante de la esclerosis lateral amiotrófica.<sup>10</sup> De igual forma se ha observado que la sobreexpresión de la Cu-Zn-SOD puede generar un ambiente de protección endotelial, observado en modelo murino con inducción de disfunción.<sup>11</sup>

- Catalasa: Convierte el  $H_2O_2$  evitando la formación de iones  $OH^\bullet$ .
- Glutación peroxidasa (GPX): Cataliza la reducción del  $H_2O_2$  de los peróxidos lipídicos tanto del citosol como de la mitocondria.<sup>3</sup>
- Tioredoxinas.: Se trata de un polipéptido con un peso molecular de 12 kDa, que se encuentra especialmente en el retículo endoplásmico. Posee en su estructura dos grupos tiol que pueden reaccionar con el  $H_2O_2$  con el resultado siguiente<sup>1</sup>:



De ahí que se le atribuye propiedad antioxidante, al tener capacidad aceptora de electrones.



## 2.3 ANTECEDENTES

Existen investigaciones que demuestran que el cobre podría inducir daño al endotelio, lo que podría estar asociado a las patologías cardiovasculares.<sup>12</sup> En cuanto al mecanismo que media el daño por cobre, se sabe que los iones de dicho metal generan ROS. Por otro lado, se ha demostrado que el peroxinitrito, es capaz de generar liberación de iones cobre de la ceruloplasmina, una proteína transportadora de cobre.<sup>13</sup> Esta liberación de iones cobre podría generar aún mayor daño por estrés oxidativo.

Se ha documentado también que el cobre causa una disminución en los niveles de glutatión y alteración en los niveles de tioles en cultivos celulares de endotelio.<sup>14</sup> Además, otro indicador de estrés oxidativo son los lípidos peroxidados, los cuales pueden ser eliminados mediante la vía de las glutatión peroxidasas, que requieren glutatión reducido (GSH) como cofactor.<sup>15</sup> De igual forma, en ciertas concentraciones, el cobre puede participar en la modificación proteica precursora de enfermedades como el Parkinson, relacionado con la formación de complejos con el  $\alpha$ -sinucleína.

También se han observado cambios en la expresión del gen de la NO sintasa endotelial (eNOS) en presencia de iones de cobre en el tejido endotelial de vena umbilical.<sup>16</sup> Esto podría llevar a mayor daño celular en el mismo. Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual sucede esto, aún está por determinarse.

En la hipertensión, el estrés oxidativo promueve la disfunción endotelial, el remodelado vascular y la inflamación, lo que conlleva a daño vascular.<sup>17</sup> La producción incrementada de ROS o la disminución de la capacidad de defensa de los mecanismos antioxidantes contribuyen a estrés oxidativo vascular, un factor importante en la patogénesis de la hipertensión.<sup>18,19</sup>



El cobre contribuye a la generación de ROS y estos generan daño celular. Como se mencionó en el marco teórico, el NO al reaccionar con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) genera peroxinitrito.<sup>20</sup> A su vez, el peroxinitrito actúa como retroalimentación positiva, ocasionando liberación de iones cobre, que genera aún mayor producción de ROS y daño celular. El daño termina por generar patologías tales como inflamación, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, aterosclerosis y enfermedades neurológicas.<sup>21</sup>

Badimon y Martínez-González (2006) mencionan que el NO es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales.<sup>22</sup> El NO se podría clasificar como una molécula ateroprotectora de origen endotelial: vasodilatador, antiagregante plaquetario, inhibidor de la proliferación de las células de músculo liso (CML), antioxidante e inhibidor de la expresión de moléculas de adhesión (CAM) y de la adhesión de monocitos.<sup>23</sup> Por tanto, a través de la alteración de la producción de NO endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.<sup>22</sup> La disminución de la dilatación dependiente de la disminución en la cantidad de NO, es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial, se observa en pacientes con diversos factores de riesgo, como hipercolesterolemia, diabetes o homocisteinuria.<sup>17 19</sup>

El NO inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria, en parte a través de un mecanismo dependiente del guanidil monofosfato (GMP). Además, el NO inhibe el cambio conformacional dependiente del calcio necesario para que el heterodímero de la glucoproteína IIb-IIIa se una al fibrinógeno.<sup>18,19</sup>

Además de NO, las células endoteliales (CE) producen trombomodulina, una molécula con actividad heparina, ADP-asa (hidroliza el adenosín difosfato [ADP]) y componentes del sistema fibrinolítico, como el activador tisular del plasminógeno (t-PA), la urocinasa y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Como agentes protrombóticos en situaciones de disfunción



---

endotelias es capaz de secretar moléculas de adhesión para las plaquetas, como el factor de Von Willebrand (vWF), fibronectina y trombospondina, y factores de coagulación como el factor V; asimismo, en respuesta a distintos factores fisiopatológicos expresa factor tisular. En un endotelio con una función normal predomina la actividad antitrombótica y anticoagulante, situación que se altera en un endotelio disfuncional, donde el balance de estas actividades puede inclinarse a favor de un estado protrombótico.<sup>18,19</sup> Plane et al., (1997) determinaron que el cobre actúa como un inductor de la actividad de las dos enzimas encargadas de la producción de NO.<sup>24</sup>

Cabe mencionar, que son escasos los estudios que analicen los mediadores involucrados en el daño al endotelio inducido por la intoxicación crónica a cobre en un modelo *in vivo*. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos del cobre en la generación de estrés oxidativo en la célula endotelial en un modelo murino.



---

## CAPITULO III

### 3.1. HIPOTESIS

#### **3.1.1 Hipótesis Alterna:**

La intoxicación crónica por cobre causa daño mediado por estrés oxidativo al endotelio vascular en un modelo murino y este puede ser evaluado mediante pruebas morfológicas e inmunohistoquímicas.

#### **3.1.2 Hipótesis Nula:**

La intoxicación crónica por cobre no causa daño mediado por estrés oxidativo al endotelio vascular en un modelo murino y este puede ser evaluado mediante pruebas morfológicas e inmunohistoquímicas.



### 3.2 JUSTIFICACION

La patología cardiovascular representa una de las causas más frecuentes de morbimortalidad en nuestro país. En las últimas décadas, se ha incrementado la investigación básica para el mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos, e investigación farmacológica para la mejor comprensión y tratamiento de estas enfermedades. Estudios recientes indican que el cobre podría jugar un papel importante en la regulación de reacciones químicas enzimáticas de relevancia dentro del mecanismo fisiopatológico de la disfunción endotelial, patología cuya prevalencia se encuentra aumentada.

Como se ha mencionado, varios de los mecanismos fisiopatológicos que están involucrados en la producción de la disfunción endotelial están relacionados de manera directa con una desregulación a la baja de las concentraciones de NO, como lo son: una disminución del tono vascular, un estado pro-trombótico y pro-coagulante. Estudios previos han determinado que el cobre actúa como un inductor de las enzimas encargadas de la producción de NO, por lo que el modelo animal establece, cuantifica y analiza de manera directa e indirecta los mecanismos morfo y fisiopatológicos involucrados, así como de las moléculas orquestadoras de las mismas sería de gran relevancia.

La caracterización morfológica de un modelo animal, que estudie el estrés oxidativo mediado por cobre y sus efectos enzimáticos, sentaría las bases para la realización de estudios posteriores básicos y clínicos, para probar la eficacia terapéutica de este elemento como posible regulador de la generación de radicales libres y la interacción de los mismos con el NO. Los resultados del presente estudio podrían aclarar el rol del cobre como factor inductor definitivo, para las fases temprana de la disfunción endotelial, alterando la homeostasis a largo plazo, los cuales se ven traducidos como un deterioro general de la función cardiovascular con repercusiones metabólicas, vasculares e inflamatorias severas.



---

### 3.3 ORIGINALIDAD

La originalidad de este estudio radica en dos cosas:

1. El presente estudio analiza de manera morfológica e inmunohistoquímica algunos de los mecanismos involucrados en la generación de estrés oxidativo vascular.

2. En la actualidad no existen ningún estudio previo que correlacionen en un mismo plano el daño morfológico, la generación de estrés oxidativo y la muerte celular endotelial inducida por la intoxicación crónica con cobre; esto permitirá un mayor conocimiento sobre los potenciales blancos terapéuticos en el tratamiento de la disfunción endotelial.





---

## **CAPITULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo General**

Analizar el efecto de la intoxicación crónica con cobre sobre la inducción de estrés oxidativo y daño al endotelio vascular en un modelo murino.

##### **4.1.1 Objetivos Particulares**

1. Establecer un modelo murino de intoxicación crónica por cobre capaz de inducir estrés oxidativo y daño endotelial vascular.
2. Determinar el efecto del estrés oxidativo sobre la morfología del tejido vascular.
3. Determinar la expresión de eNOS como indicador de estrés oxidativo en el modelo murino.
4. Determinar la expresión de Caspasa-3 activa como indicador de muerte celular en el modelo murino.



---

## **CAPITULO V**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **5.1 Tipo de estudio**

Ensayo clínico controlado experimental en un modelo animal

#### **5.2 Diseño del estudio**

Experimental, comparativo, prospectivo, longitudinal.

#### **5.3 Lugar de referencia**

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microcirugía del Departamento de Anatomía Humana y el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante del Departamento de Histología, ambos pertenecientes a la Facultad de Medicina de la UANL. El encargado del manejo de los animales de laboratorio fue el LBG. Alan de Anda Coronado y la supervisión fue por el Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña.

#### **5.4 Características de la población y tamaño de la muestra**

Se incluyeron 24 ratas cepa Wistar macho, adultos jóvenes (edad al inicio del protocolo entre 3-6 meses, peso entre 300 y 500 g), esqueléticamente maduros y clínicamente sanos. El tamaño de la muestra se determinó, acorde a la



literatura,<sup>25</sup> mediante una prueba de hipótesis y diferencia de dos medias o con la media de un valor de referencia, con un valor  $z\alpha$  de 1.96 con nivel de significancia del 95% para dos colas, y un valor  $z\beta$  de 0.84 con una potencia de 80%, se obtuvo una muestra de 8 unidades por grupo. El número de muestra se decidió también en función del número de pruebas experimentales a realizar.

### 5.5 Distribución de los animales

En base a la totalidad de animales de experimentación ( $n=24$ ) se generaron seis grupos de experimentación ( $n=4$ ), en los cuales los animales fueron distribuidos aleatoriamente. La distribución de los grupos se llevó a cabo en función del tiempo (180 y 300 días de exposición, así como su respectivo control negativo), distribuidos de la siguiente manera:

Tabla 1. Grupos de estudio y tratamientos

Grupo	180 días (n)	300 días (n)
Control negativo (solo agua de beber)	4	4
Expuesto a 100 ppm $\text{Cu}^{+2}$	4	4
Expuesto a 300 ppm $\text{Cu}^{+2}$	4	4

### 5.6 Condiciones y manejo de los sujetos de estudio

Las ratas fueron manejadas de acuerdo a las regulaciones internacionales vigentes y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para el manejo de animales de experimentación. Los animales se conservaron en jaulas con un ciclo constante de luz y oscuridad de 12 horas, con acceso a agua y alimento *ad libitum*. La temperatura y la humedad se mantuvieron en un nivel constante (22°C y 60%, respectivamente).



## **5.7 Administración de cobre en los grupos experimentales**

Los grupos tratados se expusieron a dos diferentes concentraciones de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ): 8 ratas a 100 ppm y 8 ratas a 300 ppm, estas concentraciones se disolvieron en agua destilada y se administraron con los bebedores. Las concentraciones fueron tomadas en base a lo descrito en la literatura.<sup>26</sup>

## **5.8 Obtención de la muestra**

Las ratas de los grupos experimentales y controles negativos, se eutanizaron mediante inhalación de  $\text{CO}_2$  en una cámara cerrada, este es el método recomendado para estas especies según la regulación nacional e internacional (NOM-062-ZOO-1999 y UFAW), por ser el más seguro para los animales y para los investigadores. La comprobación de muerte se realizó de manera triple al confirmar mediante observación la ausencia de respiración, pulso y ausencia de movimiento durante cinco minutos.

Posteriormente, se realizó una toracotomía accediendo al corazón, y se perfundió con formaldehído al 10% en PBS 1X (pH 7.2-7.4) para fijar los tejidos y órganos en general. En seguida, se obtuvieron muestras de aorta y pulmón que se conservaron en formaldehído al 10% a temperatura ambiente (TA) para su posterior procesamiento y análisis morfológico e inmunohistoquímico.

## **5.9 Preparación de las muestras para el análisis morfológico general**

La aorta se evaluó en las porciones de cayado, torácica y abdominal hasta antes de bifurcarse en las arterias ilíacas comunes. De la misma forma, se tomaron muestras del mismo lóbulo de pulmón.



Posterior a la fijación, se aplicó la técnica histológica convencional y las piezas se incluyeron en bloques de parafina, en seguida mediante el uso de un microtomo se obtuvieron cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de grosor y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H y E). Las laminillas se analizaron con un microscopio de luz de campo claro (Nikon Eclipse 50i) y un sistema de análisis de imagen Digital Sight dDS-2Mu. El análisis morfológico incluyó la presencia de células inflamatorias, hiperplasia de cualquiera de las tunicas del vaso sanguíneo, alteraciones tisulares generales, organización de las fibras elásticas, alteraciones celulares o de la matriz extracelular, alteraciones de la morfología de la pared vascular, análisis de las células endoteliales y daño tisular.

### **5.10 Evaluación de estrés oxidativo**

Con el fin de evaluar los niveles de estrés oxidativos generados por la administración crónica de cobre, se determinó la presencia de eNOS mediante inmunohistoquímica (IHQ) empleando como anticuerpo primario un anticuerpo de conejo Anti-eNOS (ab66127, Abcam, Cambridge, MA). Se empleó el sistema de detección Mouse and rabbit specific HRP/DAB (ABC) detection IHC kit (ab64264, Abcam). La positividad se identificó con 3, 3'diaminobenzidina (DAB), y los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Gill.

Las laminillas se analizaron con un microscopio de luz de campo claro (Nikon Eclipse 50i) y un sistema de análisis de imagen Digital Sight dDS-2Mu. Posteriormente se tomaron 32 campos/grupo (8 campos por laminilla, 1 laminilla por animal, 4 animales/grupo) y se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ v1.51.



### **5.11 Evaluación de muerte celular**

Para la evaluación de la muerte celular inducida por la intoxicación crónica con cobre, se identificó la presencia de Caspasa-3 activa mediante IHQ utilizando el anticuerpo anti-Caspasa-3 activa (ab66110, Abcam, Cambridge, MA). Se empleó el sistema de detección, contraste y cuantificación de la positividad utilizando el método mencionado previamente.

### **5.12 Análisis estadístico**

Se realizó mediante en el programa computacional SPSS (Versión 19.00) para Windows XP (SPSS, Chicago, IL). Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando pruebas para datos no paramétricos (prueba de Chi-cuadrada y prueba de Mann-Whitney) considerando como significativo un valor de  $p \leq 0.05$ .

### **5.13 Consideraciones éticas**

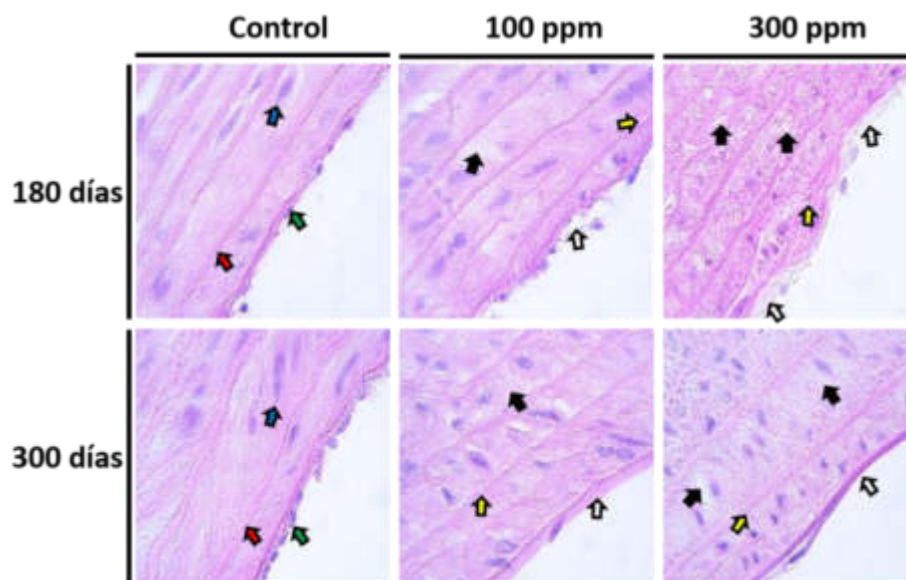
El presente protocolo de Investigación fue sometido y aprobado por el Comité de Ética, Comité de Investigación y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de aprobación AH15-019. El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y los protocolos de operaciones de los Laboratorios del Departamento de Anatomía Humana, los cuales llevan a cabo un manejo adecuado de animales según la literatura.<sup>27</sup>

## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS

#### **6.1 El tratamiento con cobre induce alteraciones en la pared de la aorta**

En este estudio, se observaron alteraciones graduales en los grupos tratados con cobre, destaca que en la exposición a 100 ppm a 180 días se observan zonas con pérdida del endotelio, signos de desorganización de las fibras musculares lisas en la túnica media, así como áreas de fragmentación de las láminas elásticas. Estas alteraciones se incrementaron en el grupo tratado a 100 ppm y fueron aún más acentuadas tiempo-dependiente en los grupos tratados con 300 ppm. En los grupos control se observaron características histológicas normales (fig. 1).

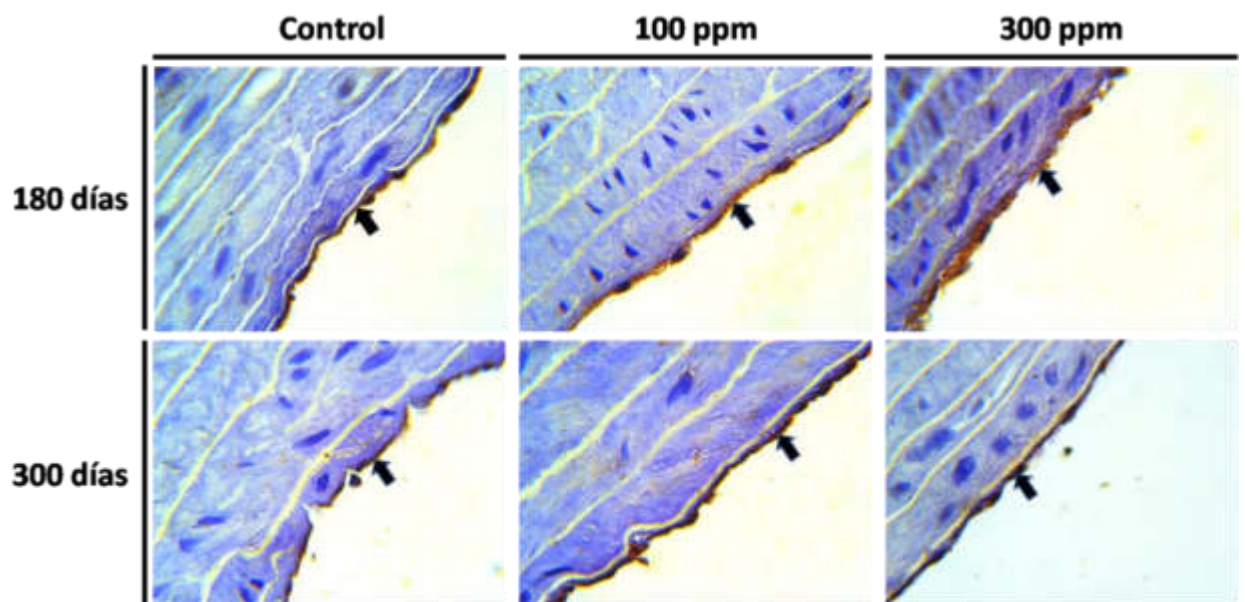


**Fig. 1. La exposición crónica a cobre causa alteraciones histológicas en la pared de aorta.**

Zonas con pérdida de la continuidad del endotelio (flechas blancas), desorganización de las fibras musculares (flechas negras), desorganización de las fibras elásticas (flechas amarillas). Endotelio (flechas verdes), fibras elásticas (flechas rojas), fibras musculares (fibras azules). (H y E, x100 magnificación).

## 6.2 La exposición a cobre induce aumento de la expresión de eNOS en aorta

En este estudio, también se realizó la detección de eNOS en endotelio de aorta en la exposición a cobre. En el análisis inmunohistoquímico se observó un incremento en la expresión de esta proteína en los grupos tratados a 100 ppm tiempo-dependiente comparados con los grupos control; sin embargo, esta expresión disminuyó en los grupos tratados a 300 ppm (Fig. 2). Estos resultados se confirmaron al realizar el análisis morfométrico y al comparar los grupos tratados entre sí no se observó diferencia estadística significativa (Fig. 7A).



**Fig. 2. La exposición a cobre induce la sobreexpresión de eNOS en endotelio de aorta.**

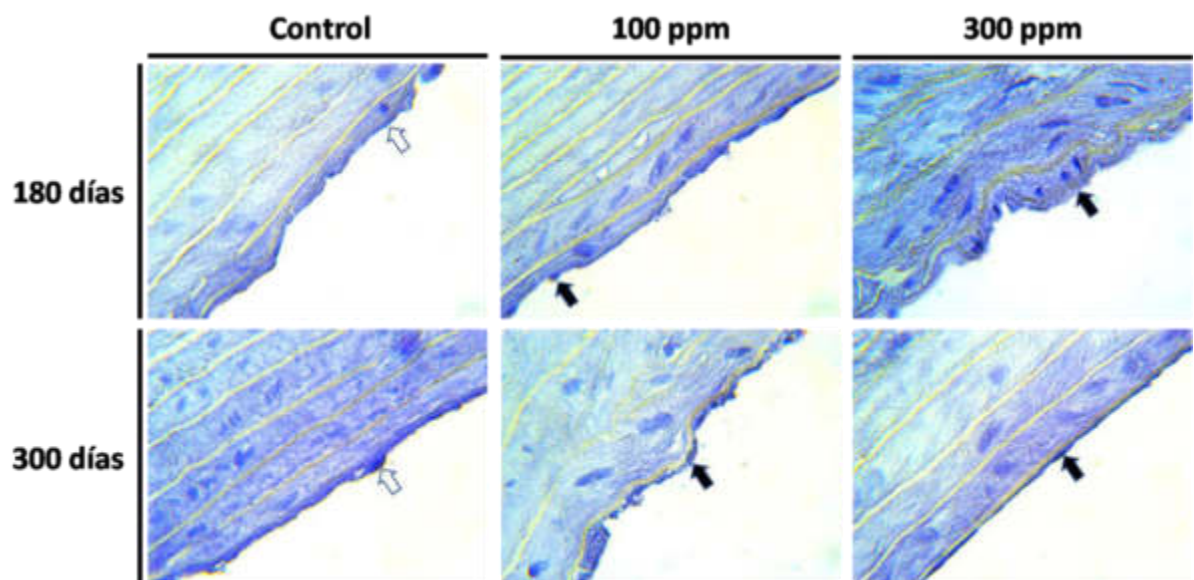
Observe la positividad en endotelio (flechas negras), IHQ, x100 magnificación.



### **6.3 La exposición crónica a cobre causa la expresión de Caspasa-3 activa el endotelio de aorta**

En el análisis de Caspasa-3 activa, se observó expresión en el endotelio de aorta, destacando una mayor positividad a 100 ppm a 180 que incrementó a esta concentración a 300 días, misma que disminuyó en los grupos de 300 ppm (Fig. 3).

Al comparar estadísticamente los grupos tratados, se observó diferencia estadística significativa entre el grupo control vs 300 ppm (Fig. 7B).

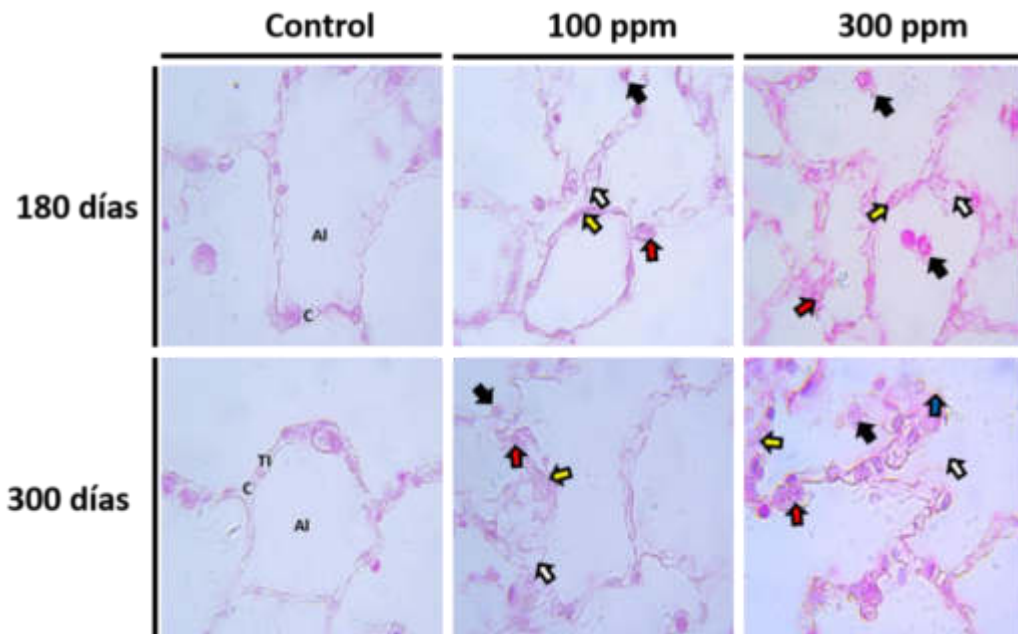


**Fig. 3. La exposición a cobre induce la expresión de Caspasa-3 activa en endotelio de aorta.**

Observe la positividad en el citoplasma de las células endoteliales (flechas negras), IHQ, x100 magnificación.

#### **6.4 La exposición crónica a cobre induce alteraciones morfológicas en pulmón**

Por otra parte, en este estudio también se analizaron los posibles cambios morfológicos, inducidos por la exposición crónica a cobre en las muestras de pulmón de los grupos de estudio. El grupo expuesto a 100 ppm mostró infiltrado celular intersticial y neumonitis, dilatación de los capilares interalveolares y engrosamiento de los tabiques con signos leves de fibrosis. Estas alteraciones se incrementaron en el grupo expuesto a 300 ppm tiempo-dependiente, destaca que en estos grupos se observa mayor cantidad de macrófagos interalveolares. Los grupos control mostraron las características histológicas normales para este órgano (Fig. 4).

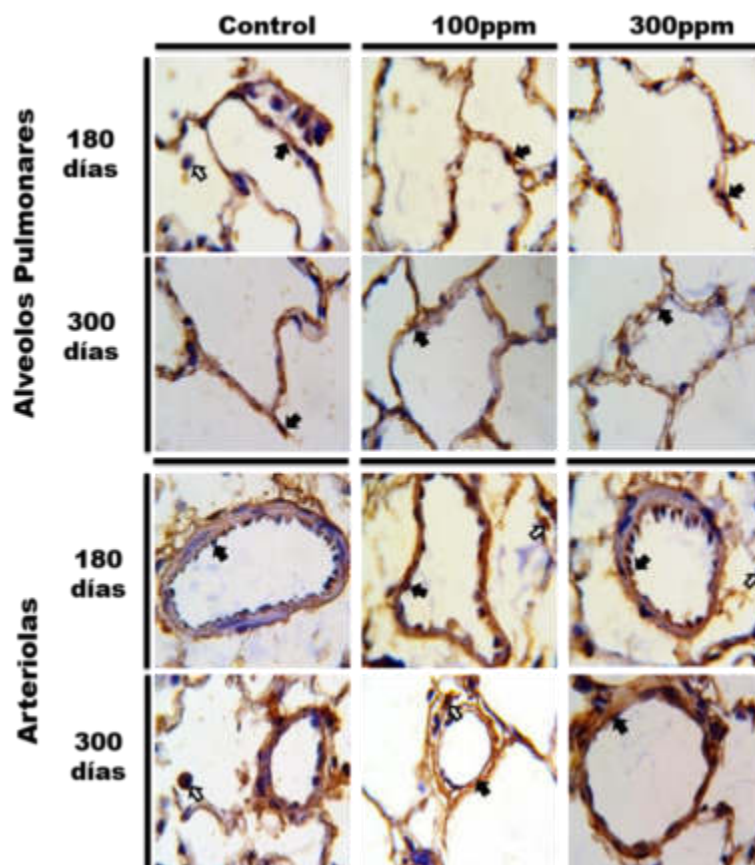


**Fig. 4. Daño inducido por la exposición a cobre en pulmón.** Infiltrado intersticial (flechas rojas), dilatación de los capilares (flechas blancas), signos de fibrosis (flechas amarillas), macrófagos interalveolares (flechas negras). Alveolos (Al), tabiques interalveolares (TI), capilares (C). (H y E, x100 magnificación).

### **6.5 La exposición a cobre induce aumento de la expresión de eNOS en pulmón**

En este estudio, también se realizó la detección de eNOS en endotelio de los capilares interalveolares y arteriolas, así como en los macrófagos de pulmón de los grupos expuestos crónicamente a cobre. En el análisis inmunohistoquímico se observó un ligero incremento en la expresión de esta proteína en los grupos tratados a 100 ppm comparados con los grupos control, esta positividad posteriormente disminuyó en los grupos tratados con 300 ppm (Fig. 5).

Al realizar el análisis morfométrico y la contrastación de los resultados, no se observó diferencia estadística significativa (Fig. 7C).

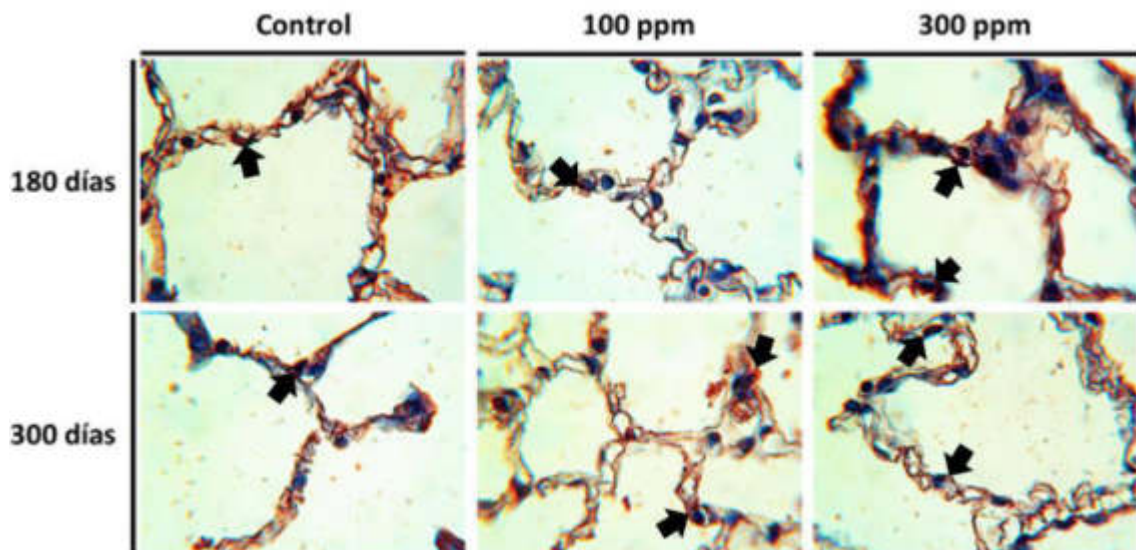


**Fig. 5. Expresión de eNOS en Pulmón.** Positividad en el citoplasma de endotelio de los capilares alveolares y arteriolas (flechas negras), además de macrófagos (flechas blancas). IHQ, x100 magnificación.

### **6.6 La exposición crónica a cobre causa la expresión de Caspasa-3 activa el endotelio de aorta**

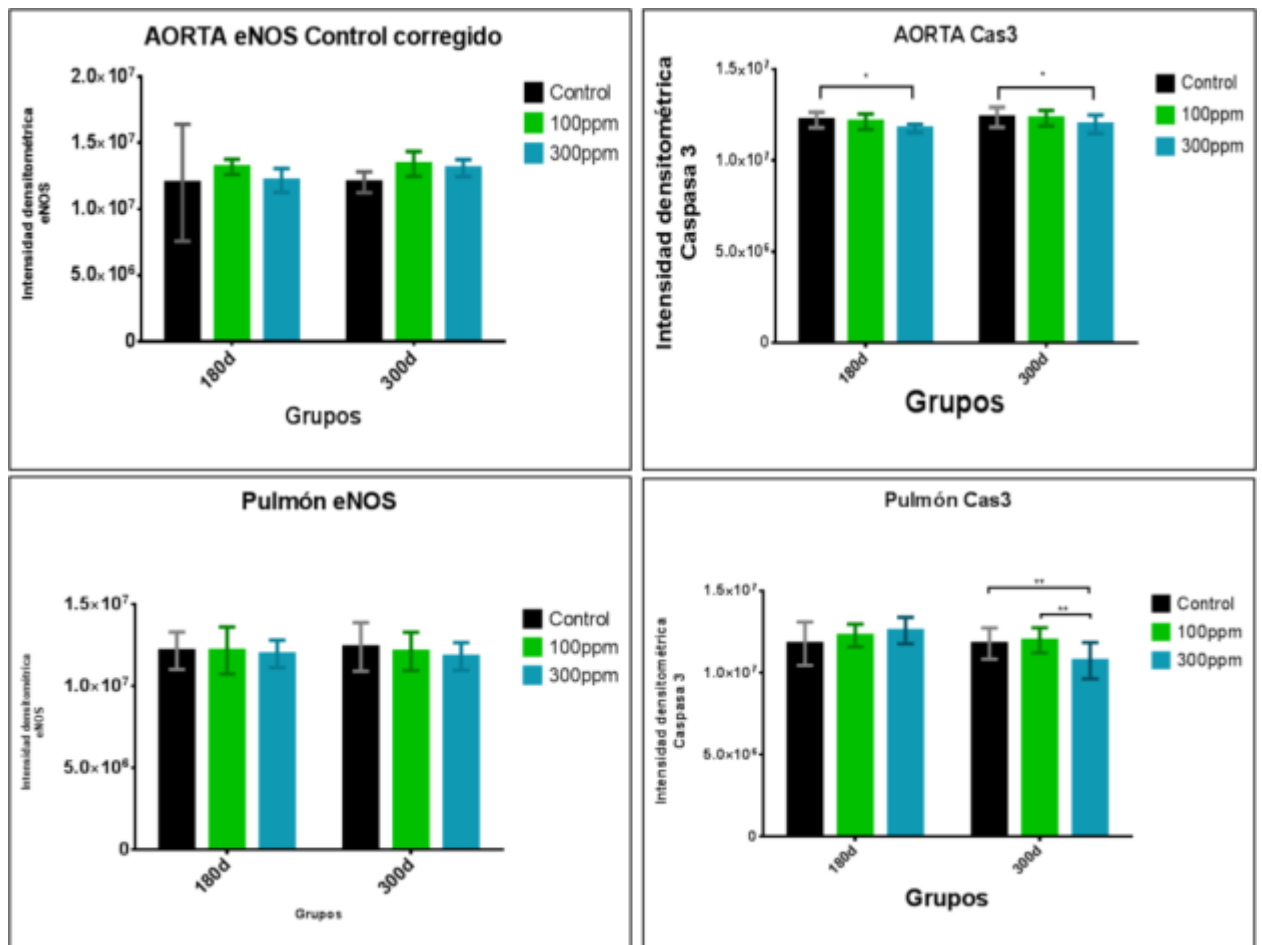
En el análisis de Caspasa-3 activa, se observó expresión en el endotelio de los capilares y arteriolas de pulmón, destacando una mayor positividad a 100 ppm a 180 y aún mayor en el grupo tratado a 300 ppm. La positividad disminuyó en el grupo de 300 ppm a 300 días de exposición (Fig. 3).

Al comparar estadísticamente los grupos tratados, se observó diferencia estadística significativa entre el grupo control vs 300 ppm (Fig. 6B).



**Fig. 6. La exposición a cobre induce la expresión de Caspasa-3 activa en endotelio de los capilares pulmonares.** Observe la positividad en el citoplasma de las células endoteliales (flechas negras), IHQ, x100 magnificación.

Como ya se mencionó previamente, los parámetros evaluados para cada uno de los grupos de estudio se compararon estadísticamente y se analizó si había diferencia estadística significativa con los resultados ya descritos (fig. 7).



**Fig. 7. Análisis cuantitativo de la expresión de eNOS y Caspasa-3 activa.** En el análisis cuantitativo solo se observó diferencia significativa en la expresión de Caspasa-3 activa en aorta a 180 y 300 días en 300 ppm (B), mientras que en pulmón solo se observó diferencia en el grupo expuesto a 300 días con ambas concentraciones (D). \*  $p < 0.05$ .



## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

La disfunción endotelial es uno de los primeros trastornos precursores como la aterosclerosis, así como los trastornos metabólicos que comienzan en la resistencia a la insulina y conducen a la diabetes mellitus. También se le conoce como precursor de la pérdida de relajación del tono vascular y precursor de la hipertensión arterial; esto por medio de la alteración de la morfología y funciones del endotelio debido a un estado pro-inflamatorio inducido por un desequilibrio en presencia de radicales libres.<sup>28</sup> Se ha descrito que la toxicidad del cobre se asocia con daño tisular, expresándose como una enfermedad por daño oxidativo a través de radicales libres. Los iones de cobre tienden a formar ROS, capaces de modificar la estructura o función de biomoléculas esenciales, lo que genera toxicidad.<sup>29</sup> Nuestro estudio muestra cambios histológicos en las paredes de los grandes vasos de ratas intoxicadas con cobre. Estas diferencias corresponden a signos de desorganización y fragmentación del colágeno, fibras elásticas y musculares dentro de la túnica media de la aorta. Los cambios observados pueden ser consecuencia del proceso oxidativo que alteran la estructura tisular y celular, además las alteraciones en la estructura de las fibras elásticas pueden culminar con la rigidez de las paredes, como consecuencia de la disfunción endotelial. De igual forma, se ha observado que las nanopartículas de metales oxidados pueden generar inflamación en las células endoteliales vasculares.<sup>30</sup> Aunque este estudio no evaluó el papel del cobre en la inflamación de los vasos, es importante considerarlo porque estos metales pueden ser altamente reactivos en el cuerpo.<sup>31</sup>

Un estudio con nanopartículas de cobre demuestra el efecto de los iones de cobre en las células endoteliales, que es proporcional a la dosis, observó un aumento en los niveles de ROS, daño del ADN y apoptosis de las células endoteliales.<sup>32</sup>





En nuestro estudio observamos la presencia de eNOS y Caspasa-3 activa en las células endoteliales de la aorta de los grupos de estudio.

Los trastornos del metabolismo del cobre como la enfermedad de Wilson incluyen daños mediados por radicales de oxígeno inducidos por el cobre. La enfermedad es una consecuencia de la peroxidación de lípidos en el hígado y se encuentran niveles reducidos de vitamina E en la sangre.<sup>33</sup> En el presente estudio analizamos las alteraciones observadas a nivel endotelial tanto en la aorta como en el tejido pulmonar *in vivo*.

Estudios recientes han demostrado que la exposición al cobre como contaminación ambiental, puede promover el estrés oxidativo y generar enfermedades degenerativas por fenómenos de apoptosis celular.<sup>31</sup> Asimismo, el efecto de los factores ambientales al ser inhalados también puede generar alteraciones celulares por estrés oxidativo en el pulmón;<sup>7</sup> el desequilibrio a favor de los oxidantes es el generador de una variedad de respuestas que van desde el daño directo hasta un aumento en la producción de ROS, teniendo como factor común una respuesta inflamatoria.<sup>34</sup> Nuestros resultados muestran un aumento de la celularidad de las células inflamatorias en los alvéolos del modelo de estudio, principalmente a una alta dosis de exposición al cobre. Además, el aumento de macrófagos alveolares podría estar relacionado con un proceso de activación dependiente del tiempo; se ha descrito en individuos expuestos al cobre un impacto del tiempo-dosis principalmente en el nivel de RNAm de las proteínas mediadoras de la inflamación (interleucina-8 [IL-8], las proteínas de adhesión celular: molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), la molécula-1 de adhesión celular intercelular (ICAM-1) y el péptido catiónico de macrófagos-1.<sup>35</sup>

Además, la exposición crónica al cobre puede generar apoptosis y autofagia en órganos como el tejido renal en grupos controlados dependientes del tiempo / dosis.<sup>36</sup> En nuestro estudio, observamos la inducción de apoptosis por intoxicación crónica por cobre a través de la positividad a la Caspasa-3 activa en



---

el pulmón. Actualmente, estamos evaluando si la intoxicación crónica con cobre induce cambios en los niveles de malondialdehído u otros productos derivados de la peroxidación lipídica, o sobre mecanismos de daño celular que pueden culminar en fenómenos de apoptosis. Además de estos hallazgos en aorta y pulmón resultantes de la exposición crónica al cobre, estamos evaluando si pueden ocurrir otras alteraciones en la homeostasis que determinen un deterioro progresivo en el funcionamiento a nivel celular o metabólico en otros órganos como el sistema nervioso central.





## **CAPÍTULO VIII**

### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.**

#### **8.1 CONCLUSIONES.**

1. La exposición de la célula endotelial al cobre produce estrés oxidativo y daño endotelial dosis/tiempo- dependiente.
2. La intoxicación crónica con cobre induce muerte celular por apoptosis en endotelio y células de la túnica muscular y es dosis/tiempo-dependiente.
3. Los niveles de expresión de eNOS y Caspasa-3 activa no fueron significativos para los grupos evaluados en tiempo y concentración de cobre.

#### **8.2 PERSPECTIVAS.**

Como perspectivas del presente estudio se propone:

1. Seguimiento en tiempo y dosis con evaluación de factores a nivel endotelial e impacto orgánico extravascular.
2. Seguimiento en mayor tiempo de intoxicación con cobre, evaluando las mismas variables de nuestro estudio para determinar cambios en ellas.
3. Análisis de agentes como probióticos, ante la evidencia de factor protector del daño orgánico secundario a la exposición de metales.
4. Determinación de marcadores de peroxidación lipídica como expresión de daño por oxidación celular/endotelial en el modelo murino.



## CAPÍTULO IX ANEXOS

### APENDICE A

#### **A.1 Técnica histológica para muestras embebidas en parafina**

- 1.- Obtención de la muestra.
- 2.- Fijación con formaldehído al 4 %.
- 3.- Lavado en agua corriente.
- 4.- Deshidratación en alcoholes graduales 60 – 100 %.
- 5.- Aclaración con xilol.
- 6.- Pre-inclusión (impregnación en parafina).
- 7.- Inclusión definitiva para la formación del bloque.
- 8.- Microtomía.
- 9.- Adhesión de los cortes en baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Coloración o Tinción.
- 12.- Deshidratación y aclaración.
- 13.- Montaje con resina sintética.

#### **A.2 Tinción con Hematoxilina y eosina (H y E).**

- 1.- Desparafinar con xilol 5 min.
- 2.- Etanol-Xilol 5 min.
- 3.- Etanol absoluto 2 min.
- 4.- Alcohol etílico 96° 2 min.
- 5.- Agua destilada, enjuague lento.
- 6.- Hematoxilina de Gill, 2 min.
- 7.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 8.- Alcohol Ácido, 1 inmersión rápida.
- 9.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 10.- Agua amoniacal 2 inmersiones rápidas.
- 11.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 12.- Agua destilada, enjuague lento.
- 13.- Eosina 6 inmersiones.
- 14.- Alcohol etílico 96° enjuague breve.
- 15.- Alcohol etílico 96° 1 min.
- 16.- Etanol absoluto (2 cambios) 2 min.
- 17.- Etanol-Xilol 3 min.
- 18.- Xilol 2 min.
- 19.- Xilol 3 min.
- 20.- Montaje con resina sintética o Entellan.



### **A-3. IHQ para detección de eNOS y Caspasa-3 activa**

#### **Pasos precedentes:**

1. Montar los cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor en portaobjetos silanizados.
2. Llevar a la estufa a 60°C por al menos 2-3 horas y dejar enfriar.
3. Preparar una cámara húmeda (30-40°C).

#### **Protocolo:**

1. Desparafinar en dos cambios de xilol puro por 5 min.
2. Rehidratar en alcoholes graduales (100°, 96°, 70°) por 5 min en cada uno.
3. Sumergir en agua destilada por 3 min.
4. Lavado en PBS 1X por 3-5 minutos.
5. Colocar las laminillas en buffer de citratos (pH 5) a 80°C por 80 min.
6. Dejar enfriar.
7. Lavar en PBS 1X por 3-5 min.
8. Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 30 min a TA en cámara húmeda.
9. Lavar en PBS por 3-5 min.
10. Bloquear los sitios de unión inespecífica con suero de caballo al 10% por 45 min a TA en cámara húmeda.
11. Escurrir el exceso de suero sin lavar la laminilla.
12. Agregar el anticuerpo primario.
13. Incubar en cámara húmeda a 4°C durante toda una noche.
14. Lavar en PBS 1X por 3-5 minutos.
15. Agregar el anticuerpo secundario biotinilado (dilución indicada por el fabricante).
16. Incubar en cámara húmeda a TA por 30 min.
17. Lavar en PBS 1X por 3-5 min.
18. Incubar con el complejo HRP-biotina-estreptavidina por 30 min a TA.
19. Lavar en PBS 1X por 3-5 min.
20. Agregar 20  $\mu\text{L}$  de sustrato-cromógeno.
21. Monitorear la reacción por 2-10 min.
22. Hacer tres enjuagues con agua destilada de 2 min cada uno.
23. Contrateñir con hematoxilina de Gill por 20 seg.
24. Enjuagar en agua corriente.
25. Enjuagar brevemente en agua destilada.
26. Deshidratar en alcoholes graduales (70°, 96°, 100°) por 5 min cada uno.
27. Aclarar en dos cambios de xilol por 5 min cada uno.
28. Montar con resina sintética.
29. Observar al microscopio de luz.



## APENDICE B

### SOLUCIONES:

#### **B.1. Formaldehído 10 %**

Para preparar 500 mL

Formaldehído 37%	136 mL
PBS 1X	364 mL

#### **B. 2 PBS 10 X**

\* Para preparar 100 mL

NaCl	8 grs.
KCl	0.2 grs.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 grs.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 grs.

Ajustar pH a 7.2  
Almacenar a 4 °C.

#### **B. 3 PBS 1X**

\* Para preparar 500 mL

PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL
Ajustar pH a 7.2	
Almacenar a 4 °C.	

#### **B. 4 Hematoxilina de Gill.**

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 grs.
* Si está en cristales pesar	2.36 grs.
Yodato de Sodio	0.2 grs.
Sulfato de aluminio	17.6 grs.
Ácido acético glacial	2.0 mL



\* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

### **B. 5 Eosina.**

#### Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 grs.
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

#### Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres partes de alcohol de 80°C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

### **B. 6 Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante).**

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

### **B. 7 Solución de Agua Amoniaca (Virador).**

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL



## CAPITULO X

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cárdenas RN, Pedraza CJ. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. *Educ Química*. 2005;12(2):164-173.
2. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. AJ. *Revista Cubana de Salud Pública*. Vol 37. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Ministerio de Salud Pública; 1988.
3. Strayer DS (David S 1949-, Rubin E 1928-, Saffitz JE, Schiller AL. *Rubin's Pathology : Clinicopathologic Foundations of Medicine / Editor, David S. Strayer ; Founder and Contributing Editor, Emanuel Rubin ; Associate Editors, Jeffrey E. Saffitz, Alan L. Schiller*. 7th ed. Wolters Kluwer Health; 2015. <http://hdl.handle.net/2324/1001637936>. Accessed August 26, 2019.
4. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch Biochem Biophys*. 2016;595:19-24. doi:10.1016/j.abb.2015.11.017
5. Schoen FJ, Mitchell RN. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. *Elsevier Inc*. 2015.
6. Joe M. 15.Hernández-Saavedra y McCord 2007. 2007.
7. Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC. Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):230-251. doi:10.1016/j.jacc.2017.05.043
8. Guzik TJ, Olszanecki R, Sadowski J, et al. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56(2):313-323.
9. Lipinski B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:1-9. doi:10.1155/2011/809696
10. Sahawneh MA, Ricart KC, Roberts BR, et al. Cu,Zn-superoxide dismutase increases toxicity of mutant and zinc-deficient superoxide dismutase by



- enhancing protein stability. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33885-33897. doi:10.1074/jbc.M110.118901
11. Davies KM, Hare DJ, Cottam V, et al. Localization of copper and copper transporters in the human brain. *Metallomics.* 2012;5(1):43-51. doi:10.1039/c2mt20151h
  12. Kishimoto T, Fukuzawa Y, Abe M, Hashimoto M, Ohno M, Tada M. Injury to Cultured Human Vascular Endothelial Cells by Copper (CuSO<sub>4</sub>). *Nippon Eiseigaku Zasshi (Japanese J Hyg.* 1992;47(5):965-970. doi:10.1265/jjh.47.965
  13. Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* 2014;88(11):1929-1938. doi:10.1007/s00204-014-1355-y
  14. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology.* 1997;123(1-2):33-40. doi:10.1016/S0300-483X(97)00105-4
  15. Furman C, Martin-Nizard F, Fruchart J -C., Duriez P, Teissier E. Differential toxicities of air (mO-LDL) or copper-oxidized LDLs (Cu-LDL) toward endothelial cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 1999;13(6):316-323. doi:10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<316::aid-jbt5>3.3.co;2-f
  16. Luo K, Fan Z, Feng Z, Li S, Chen X, Xie H. Effect of copper-ion on proliferation and differentiation of vascular endothelial cells. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi= Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi= Chinese J reparative Reconstr Surg.* 2009;23(7):832-835.
  17. Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Can J Cardiol.* 2015;31(5):631-641. doi:10.1016/J.CJCA.2015.02.008
  18. Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants Redox Signal.* 2013;19(10):1110-1120. doi:10.1089/ars.2012.4641
  19. Gray SP, Di Marco E, Okabe J, et al. NADPH Oxidase 1 plays a key role in



- diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(18):1888-1902. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.132159
20. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87(4):1620 LP - 1624. doi:10.1073/pnas.87.4.1620
  21. Chow CK. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nutr*. 1979;32(5):1066-1091.
  22. Badimón L. A C T U A L I Z A C I Ó N Disfunción endotelial. 2006:21-30.
  23. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol*. 2006;6:21-30.
  24. Plane F, Wigmore S, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of copper on nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. 1997;121(2):345-350. doi:10.1038/sj.bjp.0701144
  25. Charan J, Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian J Psychol Med*. 2013. doi:10.4103/0253-7176.116232
  26. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, et al. Chronic exposure to high levels of zinc or copper has little effect on brain metal homeostasis or A $\beta$  accumulation in transgenic APP-C100 mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2009. doi:10.1007/s10571-009-9401-7
  27. Jar AM. Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. Animal welfare and the use of laboratory animals in scientific research. *Rev Argentina Micrología*. 2014. doi:10.1016/S0325-7541(14)70051-3
  28. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004. doi:10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA
  29. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol*. 2016. doi:10.1007/s00204-015-1579-5
  30. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: Effect of





- particle composition. *Environ Health Perspect.* 2007. doi:10.1289/ehp.8497
31. Shi Y, Pillozzi AR, Huang X. Exposure of CuO Nanoparticles Contributes to Cellular Apoptosis, Redox Stress, and Alzheimer's A $\beta$  Amyloidosis. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(3):1005. doi:10.3390/ijerph17031005
  32. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L, Mo L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes-*Chemical Research in Toxicology (ACS Publications).*; 2008.
  33. Song M, Zhou Z, Chen T, Zhang J, McClain CJ. Copper deficiency exacerbates bile duct ligation-induced liver injury and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011. doi:10.1124/jpet.111.184325
  34. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 2001. doi:10.1016/S0014-2999(01)01320-6
  35. Sun J, Wang S, Zhao D, Hun FH, Weng L, Liu H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles. *Cell Biol Toxicol.* 2011. doi:10.1007/s10565-011-9191-9
  36. Wan F, Zhong G, Ning Z, et al. Long-term exposure to copper induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in rat kidneys. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110158



## CAPÍTULO XI

### PRODUCTOS OBTENIDOS DEL PRESENTE ESTUDIO

----- Mensaje reenviado -----

**De:** MARIANO GUILLERMO ARMANDO DEL SOL CALDERON <[mariano.delsol@ufrontera.cl](mailto:mariano.delsol@ufrontera.cl)>

**Para:** Rodrigo Elizondo <[rod\\_omana@yahoo.com](mailto:rod_omana@yahoo.com)>

**Enviado:** martes, 12 de octubre de 2021 01:31:02 p. m. CDT

**Asunto:** IJM 517-21

Dear Dr. Elizondo

I am very pleased to inform you that the paper: "Copper Induces Damage, Oxidative Stress and Cell Death in Endothelium of Chronic Intoxicated Wistar Rats", has been accepted by the Scientific Board for publication in *International Journal of Morphology*.

Your article will be published in issue 6, volume 39, 2021.

Very truly yours

Dr. Mariano del Sol  
Editor  
Int. J. Morphol.



---

**MANUSCRITO ENVIADO Y ACEPTADO PARA SU PUBLICACIÓN EN LA  
REVISTA INDEXADA EN JCR**

**INTERNATIONAL JOURNAL OF MORPHOLOGY**

**Copper Induces Damage, Oxidative Stress and Cell Death in Endothelium  
of Chronic Intoxicated Wistar Rats**

**El cobre induce daño, estrés oxidativo y muerte celular en el endotelio de  
ratas Wistar intoxicadas de forma crónica**

Bernardo A. Fernández-Rodarte<sup>1</sup>, Adolfo Soto-Domínguez<sup>2</sup>, Alejandro  
González-Navarro<sup>1</sup>, Maximiliano Mellado-Ayala<sup>1</sup>, Edgar I. Piña-Mendoza<sup>2</sup>,  
Humberto Rodríguez-Rocha<sup>2</sup>, Roberto Montes-de-Oca-Luna<sup>2</sup>, Jesús D. Guerra-  
Leal<sup>1</sup>, Santos Guzmán-López<sup>1</sup>, and Rodrigo E. Elizondo-Omaña<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N. L.,  
C.P. 64460, México

<sup>2</sup>Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N. L.,  
C.P. 64460, México

**Corresponding Author:**

**Rodrigo E. Elizondo-Omaña. Ph. D**

Departamento de Anatomía Humana, Fac. de Medicina, UANL,

Monterrey, N. L., México C.P. 64460.

*E-mail address:* rod\_omana@yahoo.com



---

## **Abstract**

Reactive Oxygen Species (ROS) are part of the functional balance of various systems, they can generate cellular damage by oxidative stress associated with disease processes such as atherosclerosis, cardiovascular disease, diabetes, and aging. Some studies report that copper induces damage to the endothelium, which could be associated with cardiovascular pathologies. This study was an experimental comparative, prospective, longitudinal, and controlled clinical trial in a murine animal model. Twenty-four male Wistar rats were included, the distribution of the groups was time-depending chronic exposition to copper, and a control group. Results show gradual alterations in the groups treated with copper: areas with loss of the endothelium, signs of disorganization of smooth muscle fibers in the tunica media, as well as areas with the fragmentation of the elastic sheets. A significant statistical difference was observed in the active-Caspase-3 analysis expression in the aortic endothelium and endothelium of the capillaries and arterioles of the lung between the control group vs 300 ppm of copper. Expression of eNOS was detected in the endothelium of the aorta and vessels of the lung. Our study shows histological changes in the walls of the great vessels of intoxicated rats with copper, and the increment of inflammatory cells in the alveoli of the study model, mainly at a high dose of copper exposition. These results will be useful to understand more about the mediators involved in the effect of copper over endothelium and cardiovascular diseases in chronic intoxication in humans.

**Keywords:** Oxidative stress, copper, chronic intoxication, damage, eNOS, cell death.



## 1. INTRODUCTION

Reactive Oxygen Species (ROS) are part of the functional balance of various systems (Carvajal Carvajal, 2019), they can generate cellular damage, and are associated with disease processes such as atherosclerosis, cardiovascular disease, diabetes, and aging (Lushchak, 2014). In the same way, oxidative stress, together with the decrease in nitric oxide (NO), are associated with the development of atherosclerosis in vascular grafts used for revascularization with a vein graft (Guzik et al., 2005).

It has been shown that non-oxidative stress by free radicals is also a precursor of diseases such as thrombophilia induced by metals like iron or copper (Niemman et al., 2017). Some studies report that copper induces damage to the endothelium, which could be associated with cardiovascular pathologies (Gaetke et al., 2014). Regarding the mechanism of damage, it is known that copper ions generate ROS, which are partially responsible for cell damage. Furthermore, copper causes a decrease in glutathione levels and an alteration in thiol levels in endothelial cell cultures (Hultberg et al., 1997). Changes in the expression of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene have been observed in the presence of copper ions in endothelial tissue of the umbilical vein (Hultberg et al., 1997).

The cupric ion ( $\text{Cu}^{2+}$ ) is a powerful catalyst in the NO oxidation reaction. In hypertension, oxidative stress promotes endothelial dysfunction, vascular remodeling, and inflammation, leading to vascular damage (Furman et al., 1999). Increased ROS production or decreased defense capacity of antioxidant mechanisms contribute to vascular oxidative stress, an important factor in the pathogenesis of hypertension (Montezano et al., 2015). Copper, also contributes to the generation of ROS and these generate cell damage; NO when reacting with the superoxide ion ( $\text{O}_2^-$ ) generates peroxynitrite (Nguyen et al., 2013). In turn, peroxynitrite acts as positive feedback, causing the release of ions copper, which generates even greater ROS release and greater cellular damage. The damage



ends up generating pathologies such as inflammation, cancer, cardiovascular diseases, diabetes, atherosclerosis, and neurological diseases (Gray et al., 2013).

Furthermore, NO is one of the molecules synthesized by the endothelium that regulates a greater number of local homeostatic processes (Bradimon and Martínez, 2006). NO could be classified as an atheroprotective molecule of endothelial origin: vasodilator, platelet anti-aggregant, an inhibitor of the proliferation of CML, antioxidant and inhibitor of expression of Cell Adhesion Molecules (CAM), and monocyte adhesion (Beckman et al., 1990). Therefore, through the alteration of endothelial NO production, vascular homeostasis is deeply disturbed and the development of atherosclerotic lesions is enhanced. The decrease in NO-dependent dilation is the most common manifestation, early endothelial dysfunction is observed in patients with various risk factors, such as hypercholesterolemia, diabetes, or homocystinuria (Furman et al., 1999). The alteration of endothelium-dependent dilation due to hypercholesterolemia may also be due to a decrease in the bioavailability of NO (Montezano et al., 2015). Plane et al. (1997) determined that copper acts as an inducer of the production of NO (Plane et al., 1997). To date, few studies have analyzed the mediators involved in endothelial damage induced by chronic copper intoxication *in vivo*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of chronic exposition to copper on the generation of oxidative stress, cell damage, and apoptosis induction in endothelium in an *in vivo* murine model.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 Study type and design*

This study was an experimental comparative, prospective, longitudinal, and controlled clinical trial in a murine animal model. This work was developed in the Departments of Human Anatomy, and Histology, both in the Faculty of Medicine,



UANL. The research protocol was approved by the Ethics Committee and the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL) in the Faculty of Medicine, UANL with approval number AH15-019. The handling of the experimental animals was performed according to NOM-062-ZOO-1999.

### *2.2 Characteristics of the population and sample size*

Twenty-four male Wistar rats were included, young adults (age at the beginning of the study between 5-6 months, weight 400-500 g), skeletally mature, and clinically healthy. The sample size was determined according to Charan and Biswas (2013), employing a hypothesis test and difference of two means or with the mean of a reference value, with a  $z\alpha$  value of 1.96 with a significance level of 95% for two tails, and a  $z\beta$  value of 0.84 with a power of 80%, a sample of 8 units per group was obtained.

### *2.3 Distribution of the animals*

All the experimental animals ( $n = 24$ ) were randomly distributed into six experimental groups ( $n = 4$ , each). Negative control groups receive just water for 180 or 300 days, experimental groups received copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) in drink water at concentrations of 100 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  or 300 ppm  $\text{Cu}^{2+}$  during 180 or 300 days. The concentrations were according with Maynard et al. (2009). All the animals were kept in cages with constant 12-hour light and dark cycles, with access to water and food *ad libitum*. Temperature and humidity were kept at a constant level (22°C and 60%, respectively).

### *2.4 Sample collect*



The rats of the experimental and control groups were euthanized by inhalation of CO<sub>2</sub> in a closed chamber according to recommendations of the National and International Regulations (NOM-062-ZOO-1999 and UFAW). Verification of death was performed in a triple manner: confirming the absence of respiration by observation, absence of pulse, and absence of movement for five minutes. Subsequently, a thoracotomy was performed accessing the heart, and it was perfused with 4% formaldehyde to fix the tissues and organs. Next, aorta and lung samples were obtained and preserved in 4% formaldehyde at room temperature (RT) for further processing, and morphological and immunohistochemical analysis.

### *2.5 Morphological analysis*

The aorta was evaluated in the arch, and samples of lung were taken from the same lobe. After fixation, the conventional histological technique was applied and the pieces were included in paraffin blocks, then by using a microtome, histological sections of 5- $\mu$ m thickness were obtained and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). The slides were analyzed with a brightfield light microscope (Nikon Eclipse 50i) and a Digital Sight dDS-2Mu image analysis system. The morphological analysis included the presence of inflammatory cells, hyperplasia of any of the blood vessel tunics, general tissue alterations, organization of the elastic fibers, cellular or extracellular matrix alterations, alterations in the morphology of the vascular wall, analysis of the endothelial cells, and tissue damage.

### *2.6 Evaluation of oxidative stress*

To evaluate the oxidative stress levels generated by chronic copper administration, the presence of eNOS was determined by immunohistochemistry





(IHC) using a rabbit anti-eNOS antibody (ab66127, Abcam, Cambridge, MA) as the primary antibody. The Mouse and rabbit specific HRP/DAB (ABC) detection IHC kit (ab64264, Abcam) detection system was used. Positivity was identified with 3,3'diaminobenzidine (DAB), and the nuclei were contrasted with Gill's hematoxylin. The slides were analyzed with a brightfield light microscope (Nikon Eclipse 50i) and a Digital Sight dDS-2Mu image analysis system. Subsequently, 32 fields/group were taken (8 fields per slide, 1 slide per animal, 4 animals/group), and densitometric analysis was performed using the ImageJ v1.51 program according to the methodology already described (Soto-Domínguez et al., 2018).

### *2.7 Assessment of cell death*

For the evaluation of cell death induced by chronic copper intoxication, the presence of active-Caspase-3 was identified by IHC using the active anti-Caspase-3 antibody (ab66110, Abcam, Cambridge, MA). The positivity detection, contrast, and quantification system were using the previously mentioned method.

### *2.8 Statistical Analysis*

It was performed using the SPSS computer program (Version 19.00) for Windows XP (SPSS, Chicago, IL). The results were statistically analyzed using tests for non-parametric data (Chi-square test and Mann-Whitney test) considering a value of  $p \leq 0.05$  as significant.

## **3. RESULTS**

### *3.1 Treatment with copper induces alterations in the wall of the aorta*



In this study, gradual alterations were observed in the groups treated with copper, it stands out that in the exposure to 100 ppm at 180 days, areas with loss of the endothelium, signs of disorganization of smooth muscle fibers in the tunica media, as well as areas with the fragmentation of the elastic sheets. These alterations increased in the group treated at 100 ppm and were even more pronounced time-dependent in the groups treated with 300 ppm during 300 days. In the control groups, normal histological characteristics were observed (Fig. 1).

### *3.2 Exposure to copper induces increased expression of eNOS in the aorta*

In this study, eNOS detection was also performed in aortic endothelium on exposure to copper. In the immunohistochemical analysis, an increase in the expression of this protein was observed in the groups treated at 100 ppm time-dependent compared with the control groups; however, this expression decreased in the groups treated at 300 ppm (Fig. 2). These results were confirmed by performing the morphometric analysis, and when comparing the treated groups with each other no statistically significant difference was observed (Fig. 2).

### *3.3 Chronic exposure to copper causes Caspase-3 expression to activate the aortic endothelium*

In the active Caspase-3 analysis, expression was observed in the aortic endothelium, highlighting a greater positivity at 100 ppm to 180 that increased at this concentration at 300 days, which decreased in the 300 ppm groups (Fig. 2). When statistically comparing the treated groups, a significant statistical difference was observed between the control group vs 300 ppm (Fig. 2).

### *3.4 Chronic exposure to copper induces morphological changes in the lung*



On the other hand, we also analyzed the morphological changes induced by chronic exposure to copper in the lung. The group exposed to 100 ppm showed interstitial cellular infiltrate and pneumonitis, dilatation of the interalveolar capillaries, and thickening of the septa with slight signs of fibrosis. These alterations were increased in the group exposed to 300 ppm time-dependent, it is noteworthy that in these groups a greater amount of interalveolar macrophages is observed. The control groups showed normal histological characteristics for this organ (Fig. 3).

### *3.5 Exposure to copper induces increased expression of eNOS in the lung*

In this study, eNOS was also detected in the endothelium of the interalveolar capillaries and arterioles, as well as in the lung macrophages of the groups chronically exposed to copper. In the immunohistochemical analysis, a slight increase in the expression of this protein was observed in the groups treated at 100 ppm compared to the control groups, this positivity subsequently decreased in the groups treated with 300 ppm (Fig. 4). When performing the morphometric analysis and the contrasting of the results, no statistically significant difference was observed (Fig. 4).

### *3.6 Chronic exposure to copper causes Caspase-3 expression in the endothelium of the capillaries and arterioles of the lung*

In the analysis of active Caspase-3, expression was observed in the endothelium of the capillaries and arterioles of the lung, highlighting a greater positivity at 100 ppm at 180 and even higher in the group treated at 300 ppm. Positivity decreased in the 300 ppm group at 300 exposure days (Fig. 3). When statistically comparing the treated groups, a statistically significant difference was observed between the control group vs 300 ppm (Fig. 4).



### *3.7 Statistical analysis*

As we previously mentioned, the parameters evaluated for each of the study groups were statistically compared, and it was analyzed whether there was a significant statistical difference with the results already described (Fig. 4).

## **4. DISCUSSION**

Endothelial dysfunction is one of the first precursor disorders such as atherosclerosis, as well as metabolic disorders that start in insulin resistance and leads to diabetes mellitus. It is also known as a precursor for the loss of relaxation of the vascular tone and precursor of arterial hypertension; this by mean of altered morphology and functions of the endothelium due to a proinflammatory state induced by an imbalance in the presence of free radicals (Endemann and Schiffrin, 2004). It has been described that copper toxicity is associated with tissue damage, expressing itself as a disease by oxidative damage through free radicals. Copper ions tend to form ROS, capable of modifying the structure or function of essential biomolecules, leading to toxicity (Valko et al., 2016). Our study shows histological changes in the walls of the great vessels of intoxicated rats with copper. These differences correspond to disorganization signs and fragmentation of collagen, elastic and muscular fibers within the tunica media of the aorta. The changes observed may be a result of the oxidative process that alter the tissue and cellular structure, also alterations in the structure of the elastic fibers can culminate with the stiffness of the walls, as a consequence of endothelial dysfunction. Similarly, it has been observed that nanoparticles of oxidate metals can generate inflammation in vascular endothelial cells (Gojova et al., 2007). Although this study did not evaluate the role of copper in inflammation of the vessels, it is important to consider because these metals can be highly reactive in the body (Shi et al., 2020).



A study with copper nanoparticles demonstrates the effect of copper ions on endothelial cells, which is dose-proportional, observed an increase in ROS levels, DNA damage, and apoptosis of endothelial cells (Karlsson et al., 2008). In our study we observed the presence of eNOS and active Caspase- 3 in endothelial cells of the aorta of the study groups.

Disorders of copper metabolism like the Wilson disease include damage-mediated by copper-induced oxygen radicals. The disease is a consequence of lipid peroxidation in the liver and decreased levels of vitamin E are found in the blood (Song et al., 2011). In the present study, we analyzed the alterations observed at the endothelial level both in the aorta and lung tissue *in vivo*.

Recent studies have shown that exposure to copper as environmental pollution, can promote oxidative stress and generate degenerative diseases due to cellular apoptosis phenomena (Shi et al., 2020). Also, the effect of environmental factors when are inhaled can also generate cellular alterations by oxidative stress in the lung (Niemann et al., 2017); the imbalance in favor of oxidants is the generator of a variety of responses ranging from direct damage to an increase in ROS production, having an inflammatory response as a common factor (McNee, 2001). Our results show increase cellularity of inflammatory cells in the alveoli of the study model, mainly at a high dose of copper exposition. Moreover, the increasing of alveolar macrophage could be related to a time-dependent activation process; it has been described in individuals exposed to copper an impact of the time-dose mainly in mRNA level of inflammation mediating proteins (interleukin-8, the cell adhesion proteins VCAM-1 and ICAM- 1 and macrophage cationic peptide-1) (Sun et al., 2011).

Furthermore, chronic exposure to copper can generate apoptosis and autophagy in organs like the kidney tissue in time/dose-dependent controlled groups (Wan et al., 2020). In our study, we observed induction of apoptosis by chronic copper intoxication through the positivity to active Caspase-3 in the lung. Currently, we are evaluating if chronic intoxication with copper induces changes in levels of



---

malondialdehyde or other products derived from lipid peroxidation, or over mechanisms of cell damage that can culminate in apoptosis phenomena. Besides these findings in the aorta and lung resulting from chronic copper exposure, we are evaluating if other alterations in homeostasis may occur that determine a progressive impairment in the functioning at cellular or metabolic level in other organs like the central nervous system.

## **6. DECLARATION OF COMPETING INTEREST**

The author declared no potential conflicts of interest concerning the research, authorship, and/or publication of this article.

## **7. FOUNDS**

This study was supported by a grant from PAICYT- UANL. SA227-15 and with internal resources of Departamento de Anatomía Humana, Fac. Medicina. UANL.

## **8. ACKNOWLEDGMENT**

We acknowledge the work of Luis I. Botello Soto and Iván A. Mesta R. for technical assistance involved in processing the samples for morphological analysis. Thanks to Dr. med. Alejandro Quiroga for the English review and correction of the manuscript.

## **REFERENCES**



Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol.* 2006; 6:21-30.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(4):1620 LP - 1624. doi:10.1073/pnas.87.4.1620

Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med. leg. Costa Rica [Internet].* 2019 Mar [cited 2021 Aug 07]; 36(1): 91-100. Available from: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S140900152019000100091&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S140900152019000100091&lng=en).

Charan J, Biswas T. How to calculate sample size for different study designs in medical research? *Indian J Psychol Med.* 2013. doi:10.4103/0253-7176.116232

Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2004. doi:10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA

Furman C, Martin-Nizard F, Fruchart J -C., Duriez P, Teissier E. Differential toxicities of air (mO-LDL) or copper-oxidized LDLs (Cu-LDL) toward endothelial cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 1999;13(6):316-323. doi:10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<316::aid-jbt5>3.3.co;2-f

Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* 2014;88(11):1929-1938. doi:10.1007/s00204-014-1355-y

Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: Effect of particle composition. *Environ Health Perspect.* 2007. doi:10.1289/ehp.8497



Gray SP, Di Marco E, Okabe J, et al. NADPH Oxidase 1 plays a key role in diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Circulation*. 2013;127(18):1888-1902. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.132159

Guzik TJ, Olszanecki R, Sadowski J, et al. Superoxide dismutase activity and expression in human venous and arterial bypass graft vessels. *J Physiol Pharmacol*. 2005;56(2):313-323.

Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology*. 1997;123(1-2):33-40. doi:10.1016/S0300-483X(97)00105-4

Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L, Mo L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes-Chemical Research in Toxicology (ACS Publications).; 2008.

Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016

MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001. doi:10.1016/S0014-2999(01)01320-6

Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, et al. Chronic exposure to high levels of zinc or copper has little effect on brain metal homeostasis or A $\beta$  accumulation in transgenic APP-C100 mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2009. doi:10.1007/s10571-009-9401-7

Montezano AC, Dulak-Lis M, Tsiropoulou S, Harvey A, Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Can J Cardiol*. 2015;31(5):631-641. doi:10.1016/J.CJCA.2015.02.008





Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, Touyz RM. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants Redox Signal*. 2013;19(10):1110-1120. doi:10.1089/ars.2012.4641

Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC. Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution: Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(2):230-251. doi:10.1016/j.jacc.2017.05.043

Plane F, Wigmore S, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of copper on nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in the rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*. 1997;121(2):345-350. doi:10.1038/sj.bjp.0701144

Shi Y, Pillozzi AR, Huang X. Exposure of CuO Nanoparticles Contributes to Cellular Apoptosis, Redox Stress, and Alzheimer's A $\beta$  Amyloidosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(3):1005. doi:10.3390/ijerph17031005

Song M, Zhou Z, Chen T, Zhang J, McClain CJ. Copper deficiency exacerbates bile duct ligation-induced liver injury and fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011. doi:10.1124/jpet.111.184325

Soto-Domínguez A, Ballesteros-Elizondo RG, Santoyo-Pérez ME, Rodríguez-Rocha H, García-Garza R, Nava-Hernández MP, Villa-Cedillo SA, Montes-de-Oca-Luna R, Saucedo-Cárdenas O. Peroxisomicine A1 (toxin T-514) induces cell death of hepatocytes in vivo by triggering the intrinsic apoptotic pathway. *Toxicon*. 2018 Nov; 154:79-89. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.09.010.

Sun J, Wang S, Zhao D, Hun FH, Weng L, Liu H. Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles in human cardiac microvascular endothelial cells: Cytotoxicity, permeability, and inflammation of metal oxide nanoparticles. *Cell Biol Toxicol*. 2011. doi:10.1007/s10565-011-9191-9

Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016. doi:10.1007/s00204-015-1579-5

Wan F, Zhong G, Ning Z, et al. Long-term exposure to copper induces autophagy and apoptosis through oxidative stress in rat kidneys. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110158

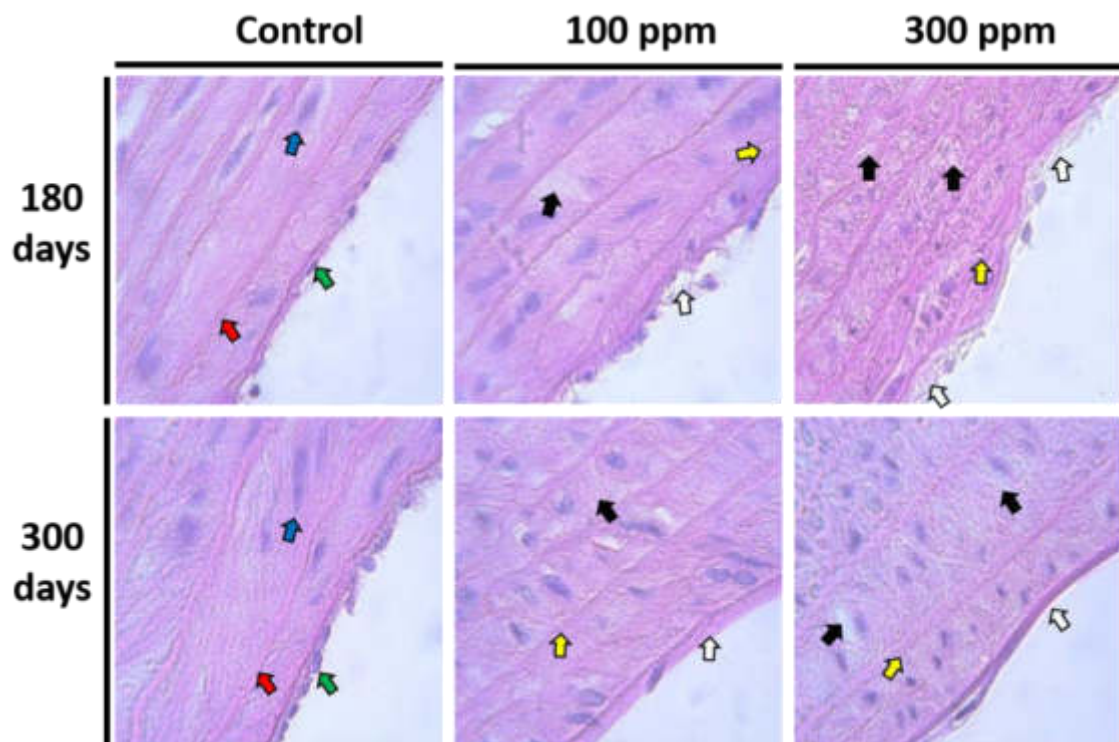


Fig. 1. **Chronic exposure to copper causes histological alterations in the wall of the aorta.** Areas with loss of continuity of the endothelium (white arrows), disorganization of muscle fibers (black arrows), disorganization of elastic fibers (yellow arrows). Endothelium (green arrows), elastic fibers (red arrows), muscle fibers (blue fibers). H&E, 100X magnification.

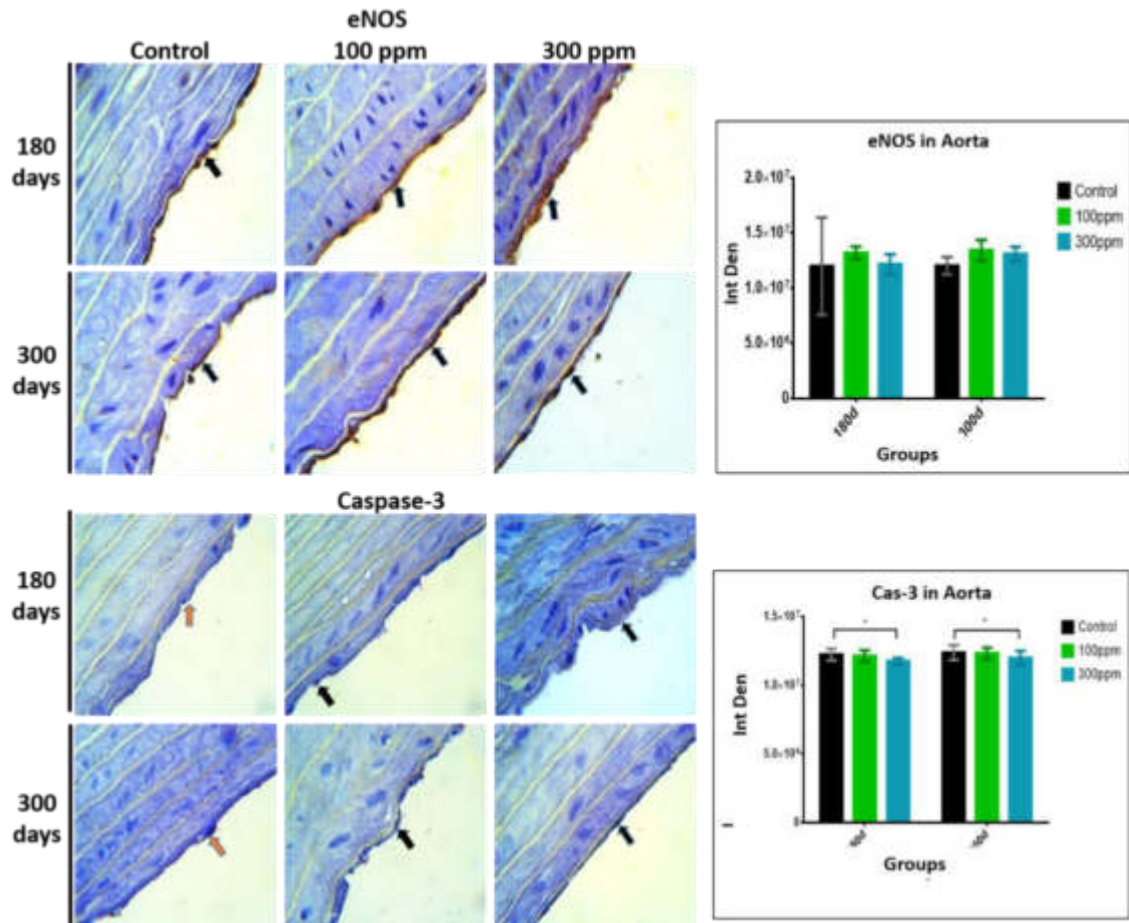


Fig. 2. **Exposure to copper induces overexpression of eNOS in aortic endothelium.** Observe endothelium positivity (black arrows), IHC, 100X magnification. **Exposure to copper induces the expression of active Caspase-3 in the aortic endothelium.** Note positivity in the endothelial cell cytoplasm (black arrows), IHC, 100X magnification. **Quantitative analysis of the expression of eNOS and active Caspase-3 in the aorta.** In the quantitative analysis, a significant difference was only observed in the expression of active Caspase-3 in the aorta at 180 and 300 days at 300 ppm. \*  $p < 0.05$ .

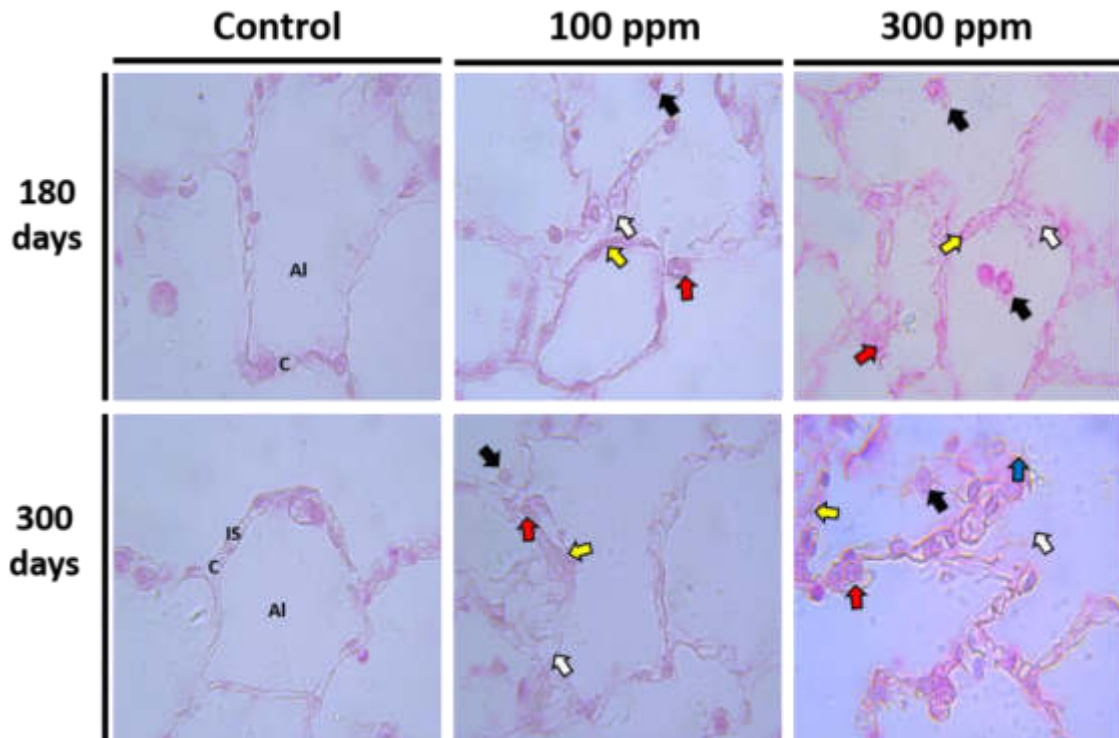


Fig. 3. ***Damage induced by exposure to copper in the lung.*** Interstitial infiltrates (red arrows), capillary dilation (white arrows), signs of fibrosis (yellow arrows), interalveolar macrophages (black arrows). Alveoli (Al), interalveolar septum (IS), capillaries (C). H&E, 100X magnification.

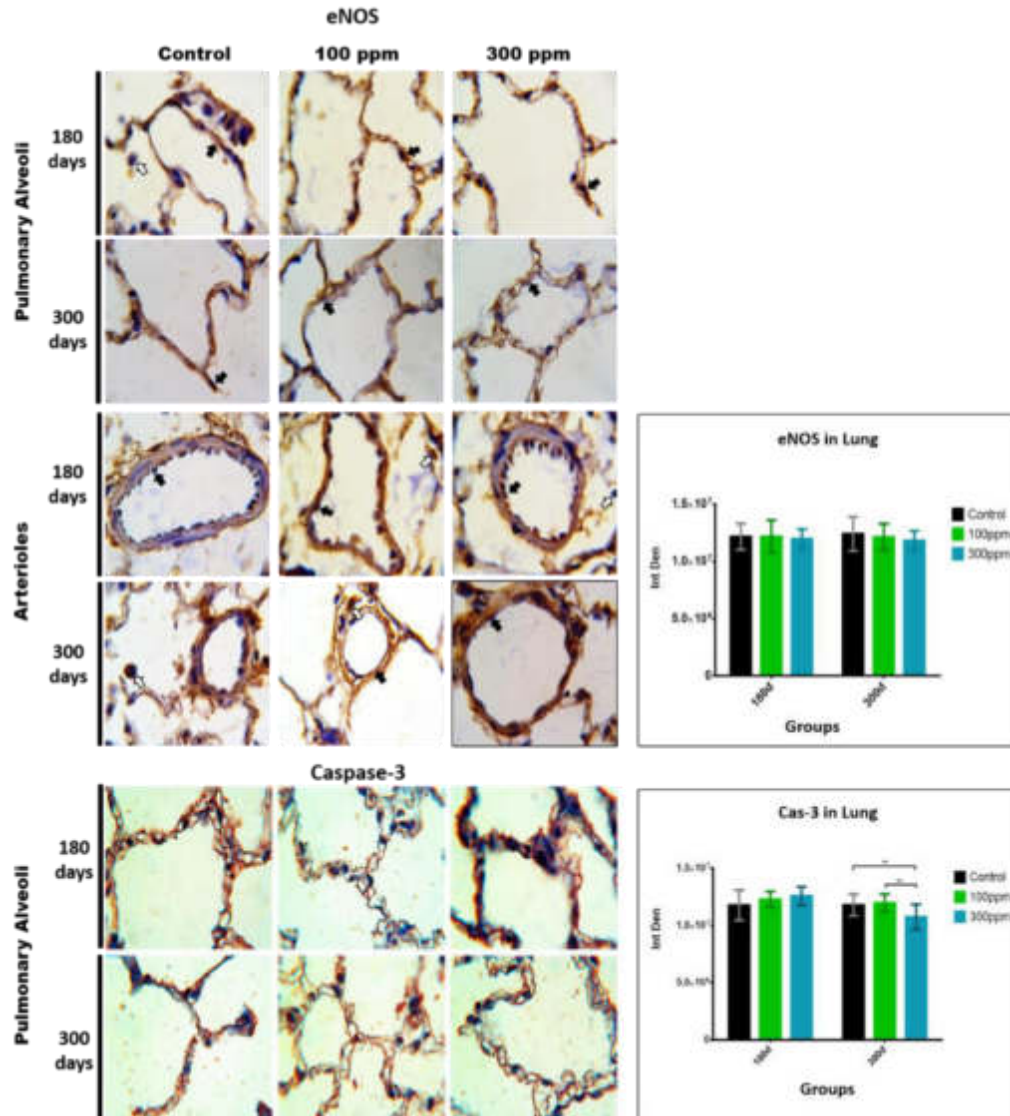


Fig. 4. **Expression of eNOS in the lung by copper exposition.** Positivity in the endothelial cytoplasm of the alveolar capillaries and arterioles (black arrows), in addition to macrophages (white arrows). IHC, 100X magnification. **Exposure to copper induces the expression of active Caspase-3 in the endothelium of the lung.** Note positivity in the endothelial cell cytoplasm (black arrows), IHC, 100X magnification. **Quantitative analysis of the expression of eNOS and active Caspase-3.** In the quantitative analysis in the lung, a difference was only observed in the group exposed to 300 days with both concentrations. \* p <0.05.





## CAPÍTULO XII

### RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Nombre:** Bernardo Alfonso Fernández Rodarte  
**Fecha de Nacimiento:** 6 de marzo de 1966  
**Ciudad Natal:** Ciudad Castaños, Coahuila  
**Nacionalidad:** Mexicano.  
**Estado Civil:** Casado. Esposa: Martha Ofelia Reyes Fernández.  
**Dos hijos:** Anaíd Yamilé y Bernardo Alfonso Fernández Reyes.

### ESTUDIOS

**Profesional:** Médico Cirujano y Partero  
Facultad de Medicina, U.AN.L.  
De septiembre de 1983 a julio de 1989  
Monterrey, N.L.

**Examen Profesional:** 21 de marzo de 1990

**Especialidad:** Residencia en Cirugía General  
Hospital Universitario “Dr. José E. González”  
De marzo de 1991 a febrero de 1995  
Monterrey, N.L.

**Servicio Social de especialidad:** Hospital General de Galeana, N.L.  
De marzo de 1993 a mayo de 1993.

### DISTINCIONES:

Premio al Mérito Académico, en la carrera de Médico Cirujano y Partero,  
Octubre de 1985.

Jefe de Residentes de Cirugía General del Hospital Universitario,  
“Dr. José E. González”, febrero de 1994 a febrero de 1995.

Reconocimiento al Desempeño Académico Clínico en la residencia de  
Cirugía General, Octubre de 1994.



## **ACTIVIDADES DOCENTES**

Becario de las Cátedras de Anatomía y Neuroanatomía de pregrado.  
De septiembre de 1985 a julio de 1989.  
Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N.L.

Catedrático de Anatomía de pregrado  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.  
De septiembre de 1996 a la fecha.  
Monterrey, N.L.

## **ACTIVIDADES DOCENTES EN CURSOS Y CONGRESOS**

Profesor en el 8° Curso de Capacitación para el Examen Nacional de Residencias.  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.  
Agosto 9 al 31 de 1994.  
Monterrey, N.L.

Conferencista en el Curso Post-Básico de Técnicas en Instrumentación Quirúrgica.  
Facultad de Enfermería, U.A.N.L.  
Semestre Febrero- Junio 1995.  
Módulos de Cirugía General y Cirugía Pediátrica.  
Monterrey, N.L.

Profesor con el tema: “Huesos y articulaciones del pie y tobillo. Músculos, tendones, ligamentos, arterias, venas y nervios. En el curso: “Conocimientos Básicos en la patología del Pié”.  
Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”  
1 de abril al 30 de julio de 2004  
Monterrey, N.L.

Profesor con el tema: “Anatomía y fisiología del tracto Digestivo. Revisión breve”.  
Diplomado en Nutrición Clínica.  
1 septiembre 2003 a 30 de junio de 2004  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.  
Monterrey, N.L.

Profesor Módulo II de Anatomía Clínica  
Programa General para Especialistas en Ginecología y Obstetricia  
Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”  
7 de junio al 17 de julio de 2004  
Monterrey, N.L.



Profesor en el XXIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica  
27 al 29 de octubre de 2005  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.  
Monterrey, N.L.

Profesor con el tema: “Anatomía y fisiología del tracto Digestivo. Revisión breve”.  
Diplomado en Nutrición Clínica.  
1 noviembre de 2004 a 30 de junio de 2005  
Facultad de Medicina, U.A.N.L.  
Monterrey, N.L.

Profesor con el tema “Metodología Diagnóstica del Pie Diabético”  
3 de agosto 2013  
4to. Curso Multidisciplinario de Diabetes en Monterrey N.L.  
Resultados Médicos Desarrollo e Investigación, S.C. REMEDI  
American College of Physicians Mexico Chapter

Profesor en el “Curso-Taller Nacional de Anatomía Cardiovascular Aplicada”  
24 de agosto 2013  
Sala de seminarios Colegio de Médicos Cirujanos del Estado de Nuevo león, A.C.  
Facultad de Medicina de la UANL

Profesor con el tema “Identificación del paciente con abdomen agudo: de la anatomía a la clínica”  
26 de agosto 2013  
XXVII Curso de Capacitación para el Examen Nacional de Aspirantes a Residencias Médicas, ENARM UANL 2013

Moderador en el área de Anatomía  
XXVII Congreso Nacional de Investigación en Medicina  
“Translational Medicine, from Bench to Bedside”  
10 al 12 de octubre 2013  
En Monterrey N.L. México

Profesor con el tema “Visión Práctica del Pie Diabético”  
19ª. Reunión Anual de la Asociación de Educadores en Diabetes de la UANL, AC  
11 y 12 de julio 2014  
Facultad de Medicina de la UANL

Profesor con el tema “Principios de heridas y suturas”  
XXVIII Curso Avanzado para el Examen Nacional de Aspirantes a Residencias Médicas, ENARM UANL 2014 25 de agosto 2014

Profesor con el tema “Identificación del paciente con abdomen agudo: de la anatomía a la clínica”  
XXVIII Curso Avanzado para el Examen Nacional de Aspirantes a Residencias Médicas, ENARM UANL 2014 25 de agosto 2014





---

Jurado en la segunda fase de Certificación de la Especialidad de Cirugía General para el Consejo Mexicano de Cirugía General, A.C.  
25 de junio de 2016

### **ACTIVIDADES ADMINISTRATIVAS:**

Coordinación Médica Axa Comercial América, División Norte de México  
Diciembre 1998 – Mayo 2003

Director Médico Hospital Sierra Madre 2011-2014

Coordinación académica de pregrado, Departamento de Anatomía Humana  
Enero 2000 - Septiembre 2003.

Diplomado en Habilidades Administrativas en Servicios de Salud  
Instituto de Desarrollo Empresarial Anahuac  
Agosto 2019 – Marzo 2020

Presidente del Colegio de Especialistas en Cirugía General del Estado de Nuevo León de Dic 2019 a Diciembre 2021.

### **CERTIFICADOS**

Certificado del Consejo Mexicano de Cirugía General  
14 de mayo 1994.

Recertificación por el Consejo Mexicano de Cirugía General, A.C.  
19 de febrero 2001.

Recertificación por el Consejo Mexicano de Cirugía General, A.C.  
1 de julio 2009

Recertificación por el Consejo Mexicano de Cirugía General, A.C.  
1 de julio de 2014

Recertificación por el Consejo Mexicano de Cirugía General, A.C.  
15 de febrero 2019

### **MEMBRESIAS**

Miembro del Colegio de Médicos Cirujanos de N.L., A.C.



---

1995 a la fecha

Miembro de la Sociedad de Cirujanos del Noreste A.C.  
1995 a 1998

Miembro de la Sociedad Mexicana de Cirugía Endoscópica, A.C.  
Mayo de 2003 a la fecha.

Miembro de la Sociedad de Médicos Especialistas en Cirugía General  
Del Estado de N.L., A.C.  
1998 a la fecha

Miembro de la Sociedad Mexicana de Cirugía General, A.C.  
2005 a la fecha

Miembro de la Sociedad Mexicana de Anatomía, A.C.  
Noviembre de 2003 a la fecha.

Miembro de la Academia Mexicana de Flebología y Linfología  
Categoría: Médico Especialista Quirúrgico  
Periodo 2013 a la fecha

## **PUBLICACIONES**

Cáncer Hepático Primario. Características Epidemiológicas,  
Clínicas y Bioquímicas.  
Rev Gastroenterol Mex 1994; 59(1):17-22

Neuroanatomía Humana para estudiantes  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

“Epidemiología de la infección y detección de tipos oncogénicos del VPH por  
captura de híbridos en mujeres sin factores de riesgo aparentes”  
Edición #10 julio a diciembre 2013  
Revista Facultad de Salud Universidad Surcolombiana