

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“ALTERACIONES MORFOLÓGICAS SECUNDARIAS A LA
INHALACIÓN AGUDA, SUBCRÓNICA Y CRÓNICA DE
VANADIO EN MÉDULA ÓSEA, TIMO Y SANGRE
PERIFÉRICA. MODELO EN RATÓN”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ADRIANA ELIZABETH GONZÁLEZ VILLALVA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES.

MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

NOVIEMBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Adriana Elizabeth González Villalva**, con número de cuenta 93599571 con la tesis titulada: **"Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes**.

Presidente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Secretario:	Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
Suplente:	Dra. Ana María Salazar Martínez
Suplente:	Dr. Mario A. Altamirano Lozano

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 12 de octubre del 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a CONACYT, que me otorgó una beca con número de registro 172423 de septiembre/2002 a junio/2004 para realizar los estudios de maestría.

Este proyecto fue financiado parcialmente por la Facultad de Medicina de la UNAM, por UNAM DGAPA-PAPIIT Clave IN-201902 y EN-204304.

Agradezco infinitamente el apoyo, las correcciones y las valiosas contribuciones que hicieron a este trabajo los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Mario Altamirano Lozano

AGRADECIMIENTOS

A Paul, por enseñarme que todo el esfuerzo vale la pena cuando se lucha por lo que se quiere. Gracias por tu apoyo en todo momento. Gracias por ser el cómplice y compañero de todos mis sueños. Gracias por el amor. Gracias por existir.

A Marifer, eres la luz que ilumina mi vida. Eres mi alegría y mis ganas de vivir. Gracias por enseñarme a ser una mejor persona.

A mis papás, Esthela y Pablo, quienes con su ejemplo me han enseñado a valorar las cosas importantes de la vida y han sembrado en mí el deseo de superación. Gracias por toda la confianza y por todo su apoyo.

A mis hermanos y a todos los miembros de mi familia. Gracias por compartir conmigo la vida y por contribuir en mi formación como persona.

A Irma, Ivonne, Paty Bizarro, Paty Mussali, Sandy, Geraldine, Lauris, Rose, Gaby Piñón, Christian, Vianey, Gaby Martínez, Marcela, Margarita y a todos aquellos que me brindaron su amistad y su apoyo durante todo este tiempo. Gracias, porque todo lo bueno que me han dado, perdurará en mí para siempre.

Gracias a todos aquellos que contribuyeron en la parte técnica de este trabajo: M.C. Adrián Rondán Zárate, María Isabel Vega García, Verónica Rodríguez Mata. A Francisco Gerardo Pasos Nájera y Tomás Cruz, quienes realizaron un hermoso trabajo en el material fotográfico. A Efraín Sánchez Tovar por sus valiosas clases de estadística.

Gracias, porque sin su apoyo, este trabajo no hubiera sido posible.

INDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	
2.1 CONTAMINACION AMBIENTAL	6
2.2 CONTAMINACION POR METALES	7
2.3 VANADIO	
2.3.1 Propiedades químicas	10
2.3.2 Fuentes de contaminación	11
2.3.3 Usos del vanadio	11
2.3.4 Vías de exposición	12
2.3.5 Toxicocinética	12
2.3.6 Efectos biológicos a nivel celular	13
2.3.7 Efectos en organismos vivos	16
2.4 SISTEMA HEMATOPOYETICO Y SANGRE	
1.4.1 Sangre	19
1.4.2 Médula Ósea	20
1.4.3 Timo	20
2.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION	21
3. HIPOTESIS	22
4. OBJETIVOS	22
5. METODOLOGIA	22
6. RESULTADOS	
6.1 SANGRE PERIFERICA	
6.1.1 HEMOGRAMA	24
6.1.2 MORFOLOGIA DE SANGRE	27
6.2 TIMO	28
6.3 MEDULA OSEA	29
7. DISCUSION	31
8. CONCLUSIONES	39
9. BIBLIOGRAFIA	40
10. APÉNDICE	47

ALTERACIONES MORFOLOGICAS SECUNDARIAS A LA INHALACION AGUDA, SUBCRONICA Y CRONICA DE VANADIO EN MEDULA OSEA, TIMO Y SANGRE PERIFERICA. MODELO EN RATON.

INTRODUCCION. El Vanadio (V) es un metaloide que ha adquirido importancia debido a que sus concentraciones han aumentado en el ambiente y en tejido pulmonar de residentes de la ciudad de México. Entre las fuentes de contaminación por V la más importante es la combustión del petróleo, en particular del mexicano. El compuesto más abundante y tóxico es el V_2O_5 y su principal vía de absorción es la respiratoria. Debido a que su toxicidad hematológica e inmunológica no está claramente establecida, se realizó este estudio para determinar su efecto mediante hemograma y estudio morfológico de sangre, médula ósea y timo. **METODO.** Se utilizaron ratones CD1 que se expusieron a inhalación de V_2O_5 al 0.02M por una hora dos veces a la semana, durante 3 meses. Se tomaron muestras de sangre a las 24 horas y posteriormente cada semana, las cuales se utilizaron para realizar frotis de sangre con tinción de Wright y hemograma. También se tomaron muestras de médula ósea y timo para procesarlas para microscopía de luz y electrónica de transmisión. **RESULTADOS.** Los leucocitos totales tuvieron un aumento significativo en la sexta y octava semana de exposición. Los neutrófilos y monocitos aumentaron significativamente en la sexta semana de tratamiento. Las plaquetas tuvieron un aumento significativo en la séptima y octava semana. Desde el punto de vista morfológico, se encontraron alteraciones en tamaño y forma de los eritrocitos (anisocitosis y poiquilocitosis), micronúcleos, así como células eritroides inmaduras. Se encontraron linfocitos binucleados y algunos de ellos, con características atípicas. Se encontraron también plaquetas gigantes en el frotis. En timo se observó necrosis de linfocitos e infiltrado inflamatorio a partir de la primera semana de exposición, pérdida de la relación corteza-médula con nódulos linfoides con células plasmáticas, además de linfocitos binucleados y algunos linfocitos con invaginaciones nucleares, eucromatina abundante y nucleolos múltiples parecidos a células neoplásicas o muy activadas. En médula ósea se observaron megacariocitos gigantes, poliploides, lo que se correlaciona con el aumento plaquetario observado en sangre periférica. Además se encontró daño endotelial. **DISCUSION Y CONCLUSIONES.** Los cambios morfológicos en eritrocitos sugieren hemólisis, quizá relacionada con alteración en la Na-K ATPasa que induce desequilibrio osmótico. Este compuesto produce alteraciones en citoesqueleto y es genotóxico, lo que podría explicar los micronúcleos en eritrocitos, así como la binucleación de linfocitos. La leucocitosis, neutrofilia y monocitosis probablemente sean inespecíficas. La trombocitosis probablemente es de origen clonal, con presencia de plaquetas gigantes (que son más inmaduras y activas) y megacariocitos gigantes y poliploides. Esto, aunado al daño endotelial encontrado, puede ser un factor de riesgo para la presencia de fenómenos trombóticos como el infarto agudo al miocardio, tromboembolia pulmonar, etcétera, que aunque no se han observado en nuestro modelo pudieran observarse en una exposición a más largo plazo.

MORPHOLOGICAL CHANGES AFTER ACUTE, SUBCHRONIC AND CRONIC INHALATION OF VANADIUM IN BONE MARROW, THYMUS AND BLOOD. MICE MODEL.

INTRODUCTION. Vanadium (V) is an important element since its concentrations have been increased as a consequence of its increase in the atmosphere. The general population is exposed to vanadium via the respiratory route primarily from petroleum combustion. The most toxic and abundant compound of V is vanadium pentoxide (V_2O_5). Reports about V inhalation toxicity on the hematological or immunological system are limited, so we decided to evaluate the effects of this element on these systems using morphological methods. **METHOD.** CD-1 male mice inhaled V_2O_5 0.02M one hour, twice a week during three months. Blood samples were obtained by direct heart puncture. Wright stained smears were used for blood analysis. Tissue samples were collected to microscopic analysis. **RESULTS.** Total leucocytes count raised at 6th and 8th weeks after exposure. Neutrophiles and Monocytes raised at 6th week. Platelets raised at 7th and 8th weeks of treatment. Morphologically, changes in erythrocyte size and shape, micronucleous and immature erythroid cells were found, as well as binucleated and atypical lymphocytes. There were giant platelets in blood smears. We found necrosis and inflammation in thymus after 1st week of treatment and lost of cortex/medulla relation. Plasma cells, binucleated and atypical lymphocytes with nuclear invaginations and multiple nucleolous remaining neoplastic cells were evident. We found in bone marrow giant and poliploid megacariocytes related with thrombocytosis in blood smears. Endothelial damage was also observed. **DISCUSSION AND CONCLUSIONS.** Erythrocytes changes suggest hemolysis that might be related to an osmotic unbalance due the impaired function of Na-K ATPase. This compound is genotoxic and induces cytoskeletal changes that could explain the micronucleous and binucleated lymphocytes. Leucocytosis, neutrophilia and monocytosis probably are non-specific. Thrombocytosis is probably clonal because of giant platelets and giant and poliploid megacariocytes. The endothelial damage and clonal thrombocytosis could be a risk factor for hypercoagulability and thromboembolic diseases. We have not found thrombosis but probably we may found it in a larger exposure treatment.

2. INTRODUCCION

2.1 CONTAMINACION AMBIENTAL

Debido a que el Vanadio (V) es un contaminante ambiental, se iniciará esta introducción con algunos conceptos relacionados. Se entiende como contaminación, la presencia en el ambiente de sustancias o factores físicos, químicos o biológicos que perjudiquen o dañen la vida, la salud y el bienestar humano, la flora y la fauna, o degraden la calidad del aire, agua, suelo, de los bienes, de los recursos de la nación en general, o de los particulares. Un contaminante es toda materia o sustancia, que al incorporarse o adicionarse al ambiente pueda alterar o modificar sus características naturales; también se considera contaminante toda forma de energía, como calor, radiactividad y ruido que alteren el estado natural del ambiente (Gutiérrez *et al*, 1997).

El problema de los contaminantes en los países en desarrollo como el nuestro es potenciado porque no se tienen normas para regularlos, aunado a la desnutrición de la población más expuesta (aquellos dedicados a la agricultura y actividades industriales) y porque una gran parte de la población está infectada con parásitos que alteran sus mecanismos de defensa (Ostrosky-Wegman *et al*, 1996).

Las partículas suspendidas son uno de los más importantes contaminantes que se han demostrado como causantes de efectos adversos a la salud humana. Se miden como partículas gruesas PM_{10} (que miden entre 2.5 y 10 micras) y partículas finas $PM_{2.5}$ (que miden menos de 2.5 micras). Las partículas gruesas o PM_{10} proceden de la erosión de los caminos, la industria, la agricultura, construcción y demolición, combustibles fósiles y generalmente contienen aluminosilicatos y óxidos de otros elementos. Las partículas finas o $PM_{2.5}$ proceden fundamentalmente de los vehículos, de combustibles fósiles, de quema de vegetación y del procesamiento de metales (Holgate *et al*, 1999). La

importancia de las partículas se debe, entre otras cosas, a la tendencia de los vapores de los metales pesados a condensarse sobre su superficie, con lo que aumenta su penetración al sistema respiratorio y posteriormente a la circulación sanguínea.

Las partículas más pequeñas ($PM_{2.5}$) penetran hasta el espacio alveolar, de hecho se ha demostrado que los metales potencialmente tóxicos entran al organismo al ser volatilizados en la combustión, al estar a altas temperaturas, recondensándose nuevamente en este tipo de partículas y se ha determinado que el pulmón es la principal vía de entrada al flujo sanguíneo para estos elementos tóxicos (Rivero *et al*, 1993).

Los metales cuando son contaminantes, ocasionan graves daños a la salud, por lo que se les dedica un apartado especial en esta Introducción.

2.2 CONTAMINACION POR METALES.

Los metales se encuentran en la naturaleza, pero el hombre contribuye a su distribución en el ambiente y además altera su forma bioquímica. Los metales se redistribuyen en el ambiente por ciclos biológicos y geológicos. Las plantas y animales tienen concentraciones de estos metales y los incorporan a sus ciclos alimenticios. La mayoría de los metales se emiten como partículas, excepto el mercurio y selenio que pueden emitirse en forma de gases (Amdur *et al*, 1991).

Las fuentes antropogénicas son la mayor causa de emisión de metales pesados y la mayoría de las partículas emitidas son $PM_{2.5}$, generalmente por residuos de combustión de petróleo, fuentes de energía, incineradores, chimeneas y vehículos. Los metales de origen antropogénico se encuentran en la atmósfera como óxidos. El hierro es el metal que se encuentra en mayor

concentración, excepto en los residuos de combustión del petróleo, en donde hay mayor concentración de vanadio y níquel (Holgate *et al*, 1997).

Los metales con más de una valencia estable pueden participar en la transferencia de electrones y generan agentes oxidantes que son tóxicos para las células, además de que pueden acumularse en el organismo en diversas formas, tanto como compuestos inorgánicos como orgánicos, y permanecer en él por largos periodos, de ahí la importancia de estudiar los efectos derivados por su contaminación (Amdur *et al*, 1991).

Desde la antigüedad se sabe que los metales son capaces de afectar la salud humana y algunos metales como el arsénico, cromo, níquel y cadmio son carcinógenos comprobados (Rivero *et al*, 1993, Nriagu 1996).

Las partículas suspendidas con metales como el vanadio, níquel, cromo y cobre son responsables, en parte por el daño pulmonar ocasionado por niveles altos de contaminación. Prahalad y cols en 1999 realizaron un estudio *in vitro* utilizando partículas suspendidas totales en células humanas de epitelio respiratorio encontrando generación de radicales libres en macrófagos y neutrófilos lo que pudiera explicar que al inhalar dichas partículas, activan a éstas células ocasionando daño pulmonar que se refleja en enfermedades claramente relacionadas con contaminación como el asma, bronquitis, neumonía, bronquitis crónica, etcétera.

Desde el punto de vista hematológico, el metal más estudiado es el plomo, el cual ocasiona una anemia microcítica hipocrómica con aumento de reticulocitos por hemólisis, además de que interfiere la unión del hierro al anillo de protoporfirina para formar el grupo hemo (Amdur *et al*, 1991).

Por otro lado, los contaminantes ocasionan daño genotóxico, medido por la frecuencia de micronúcleos mediante el bloqueo de la citocinesis, como es

demostrado por Martelli, *et al* en el 2000, en el cual encontró un aumento de 1.42 más micronúcleos en linfocitos binucleados de residentes de una zona urbana cercana a fábricas y a una planta metalúrgica comparados con residentes de una zona urbana residencial.

Los residuos de la combustión del petróleo tienen enormes concentraciones de vanadio (V), encontrándose al vanadio fundamentalmente como vanadilsulfato. Debido a la importancia de éste metal y a que aún existen muchos aspectos que estudiar del mismo, se considera en un apartado especial, como propósito de esta investigación.

2.3 VANADIO (V)

Fue descubierto en México en 1801 por Andrés Manuel del Río. En 1830, Sefström y Berzelius lo llamaron Vanadium en honor a Vanadis, el dios griego de la belleza, inspirados por la gama de colores de este metal en solución. A lo largo del siglo XX, ha sido utilizado para el tratamiento de las anemias, tuberculosis y diabetes mellitus. Desde 1899 se demostró que disminuía la glucosuria en pacientes diabéticos, pero no fue hasta 1970 y principios de 1980s que se demostró que las soluciones de vanadato V^{5+} producían efectos parecidos a la insulina en ratas y adipocitos *in vitro* (Morinville *et al*, 1998).

El V es un metaloide de interés ambiental y científico, dado que tiene múltiples aplicaciones industriales y se emite de manera considerable al ambiente (71,000 toneladas por año), además de que posee estructura química compleja y aún no están claramente comprendidos el comportamiento y los efectos de la contaminación por éste en muchos ecosistemas (Nriagu, 1998; WHO, 2000).

La contaminación ambiental por este metal ha ido en aumento y es principalmente debida a la utilización de combustibles fósiles, así como a la

producción industrial principalmente secundaria a ciertos procesos metalúrgicos (Nriagu, 1998).

Indirectamente se sabe que ha aumentado en el ambiente de la ciudad de México debido a que Fortoul y cols en el 2002 reportan un aumento del 23% en las concentraciones de V en tejido pulmonar de necropsias de personas que vivieron en la década de los 90's comparados con la época de los 60's.

Por otro lado, en mediciones en la ciudad de México realizadas en 1997 se encontraron concentraciones atmosféricas de $23 \pm 12 \text{ ng/m}^3$, con mayores concentraciones en el área norte más industrializada de la Ciudad (Riveros-Rosas *et al*, 1997).

2.3.1 Propiedades químicas.

El vanadio es un elemento del grupo Va en la tabla periódica, número atómico 23, es un metaloide que tiene varios estados de oxidación: -1, 0, +2, +3, +4 y +5, ampliamente distribuido en la naturaleza, ya que se ha encontrado en todo tipo de ambientes, incluyendo rocas, suelo, agua, aire, plantas y tejidos animales (Barceloux, 1999).

La mayoría de sus compuestos tienen valencias +3, +4 (tetavalente) y +5 (pentavalente) (Nriagu, 1998; Barceloux, 1999). El compuesto más abundante es el V_2O_5 (pentóxido de vanadio). Su toxicidad aumenta conforme aumenta la valencia, por lo tanto, los compuestos pentavalentes son los más tóxicos (Barceloux, 1999). En el plasma se encuentra con valencia +5 pero en los tejidos con valencias +3 y +4 (debido a las condiciones reductoras) (WHO, 2000).

2.3.2 Fuentes de contaminación.

Hasta 75% procede de la combustión del petróleo, carbón y aceites utilizados en la generación de electricidad y calor, y también en pequeñas cantidades en el gas natural, y la mayoría del V es emitida en forma de óxidos de vanadio. El resto procede del polvo continental, aerosoles marinos y emisiones volcánicas. Las inversiones térmicas en las grandes ciudades aumentan considerablemente su concentración en aire (Barceloux, 1999; Nriagu, 1998). También es emitido en el proceso de extracción de otros minerales (principalmente el hierro), así como los depósitos de petróleo y limpieza de las calderas, y en el procesamiento de otros metales como el aluminio, titanio y uranio. En especial se ha reportado que el petróleo crudo mexicano y el venezolano tienen concentraciones elevadas de este elemento (Nriagu, 1998; WHO, 2000).

En el suelo también está presente y se ha demostrado que las rocas básicas tienen mayor cantidad de V comparadas con las rocas ácidas. El agua también puede tener este metal por las erosiones del suelo, fuentes antropogénicas, lo mismo que algunos alimentos, sobre todo se ha detectado en hongos, pimienta, crustáceos, espinacas, tabaco, etcétera. Los animales y plantas marinos tienen concentraciones más elevadas de V que los terrestres. (Barceloux, 1999; Nriagu, 1998).

2.3.3 Usos del Vanadio.

Se ha utilizado en la producción de herramientas, es catalítico para la producción de ácido sulfúrico, se utiliza en la industria del plástico, realización de semiconductores, industria fotográfica, colorantes amarillos y pinturas para cerámica.

2.3.4 Vías de exposición.

La vía enteral es la más expuesta al V, debido a que la mayoría de alimentos ingeridos por los humanos tienen ciertas concentraciones de este metal, pero a pesar de que es la mayor fuente de exposición, en el tracto gastrointestinal se absorbe muy poco, en rangos de 0.1 a 1% de la cantidad ingerida. Se ha reportado que un humano consume en la dieta promedio de 11-30 µg por día y en el agua la concentración puede ser de 20 a 70 µg/ litro (WHO, 2000).

La vía respiratoria es la principal vía de absorción y dependiendo del lugar y circunstancias, será el grado de exposición y absorción de V. Se ha calculado un promedio de 250 ng diarios que entran diariamente al tracto respiratorio en un ambiente con aproximadamente 50 ng/m³, pero durante la limpieza de calderas se han encontrado concentraciones de hasta 500 mg/m³, y en dichas condiciones, la cantidad inhalada debe ser muy superior (Nriagu, 1998).

2.3.5 Toxicocinética.

La mayor exposición en los trabajadores ocurre a través de la inhalación de polvos y humos. Su distribución en plasma dura aproximadamente de media hora a una hora y se encuentran posteriormente las mayores concentraciones en riñón, pulmón, hígado y bazo. El 90% se une a transferrina y albúmina. También se han encontrado concentraciones importantes en dientes y huesos, además de que cruza la barrera hemato-placentaria (Nriagu, 1998).

Su excreción es por heces (considerando que prácticamente no se absorbe en tracto digestivo) y por riñón, con una eliminación bifásica, la primera fase rápida en las primeras 10 a 20 horas y otra fase lenta entre los 40 y 50 días. Aproximadamente un 40 a 60% del V absorbido es excretado por riñón en los primeros 3 días (Barceloux, 1999, Nriagu, 1998).

2.3.6 Efectos biológicos a nivel celular.

Los compuestos de V entran a la célula a través de canales iónicos inespecíficos o incluso si son lo suficientemente pequeños e hidrofóbicos, mediante difusión pasiva. Generalmente entra en forma de vanadato (pentavalente) y ahí es reducido a vanadyl (tetavalente). (Nriagu, 1998; Xiagoai *et al*, 2003).

Este elemento puede inhibir una variedad de enzimas, pero también tiene capacidad de estimular otras y participa en la generación de radicales libres. Entre las enzimas fuertemente inhibidas por el vanadio se encuentran la Na-K-ATPasa y la H-K-ATPasa, aunque también inhibe otras enzimas ATPasas como la Ca-ATPasa y Ca-Mg ATPasa (Nriagu, 1998).

De hecho, el V interfiere con enzimas que contienen fosfato. Este es el caso de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), ya que actúa como análogo de fosfatos y oxida su dominio catalítico con lo que lleva a un aumento en la fosforilación celular. El complejo de peroxovanadio es 100 veces más efectivo para inhibir esta enzima que el ortovanadato. La inhibición de PTP es muy importante en el metabolismo de los carbohidratos ya que los receptores de insulina son activados aún en la ausencia de esta hormona, y esto explica parte del efecto insulinomimético del V. También la inhibición de las PTPs es importante en el ciclo celular y podría explicar algunos de los mecanismos de inducción de muerte celular por este metal (Morinville *et al*, 1999; Samet *et al*, 1999 Chen *et al*, 2001).

El vanadato de sodio en estudios *in vitro* (0.3 μM a 30 μM) utilizando células de linfoma de Burkitt estimuló la fosforilación de residuos tirosina de las proteínas p55 y p61 debido a la inhibición de una PTP además de la estimulación directa de la actividad de las cinasas (Earp *et al*, 1983). El grupo de Barat en el 2003 estudió el efecto del biperioxovanadio en células T de la línea Jurkat,

encontrando efectivamente la inhibición de una PTP con fosforilación de p56 y activación del gen de la ciclooxygenasa-2, de manera muy similar a la forma como sucede al activarse el receptor de linfocitos T (TCR) en presencia de un antígeno. Si sucede esto *in vivo* indicaría que aún en ausencia de antígeno, habría activación de estos linfocitos T.

En un estudio en ratones hembra utilizando concentraciones de 0, 5, 15 y 25mg/kg de vanadato se encontró que en los ovocitos hubo una activación prematura de anafase y un aumento de la ploidía y separación prematura del centrómero en las células de médula ósea, los cuales pueden deberse a que el vanadio inhibe PTPs que son indispensables para activar el factor promotor de maduración, para el ensamble del huso meiótico y mitótico entre otros eventos (Mailhes *et al*, 2003).

Se ha reportado que el V estimula a la enzima fosfolipasa C, produciendo un aumento en el inositol trifosfato IP₃, que se une al retículo endoplásmico y estimula la liberación de calcio al citosol, el cual puede ser importante para algunos procesos, pero en exceso provoca daño celular en adipocitos, hepatocitos, eritrocitos, granulocitos, miocitos y miocardiocitos (Nriagu, 1998). A este respecto, en un estudio realizado en cultivo de la línea Jurkat de leucemia de linfocitos T utilizando peróxido de vanadio (pervanadato) se determinó que la simple presencia de este metal era suficiente para activarlos (por fosforilación de la fosfolipasa C gamma 1 secundaria a la inhibición de PTP) y ésta activación se determinó por un aumento de la transcripción del gen c-fos y aumento en la síntesis de IL-2 (Imbert *et al*, 1994).

Otras enzimas que son estimuladas por V son la adenilato ciclasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, NADPH oxidasa, tirosina fosforilasa, glucógeno sintetasa, lipoproteinlipasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, tirosina cinasa C y citocromo oxidasa (Erdmann *et al*, 1984; Nechay, 1984; Nechay *et al*, 1986). Forma complejos con algunas proteínas como la hemoglobina, transferrina,

ferritina, lactoferrina, calcineurina y calmodulina y también se puede unir a carbohidratos, por ejemplo forma Glucosa 6 Vanadato debido a su estructura similar a los fosfatos (Nriagu, 1998).

Este metal aumenta la peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro*, además de que disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa en varios órganos, incluyendo hígado y riñón (Ruslanov *et al*, 1994). Gran parte de sus efectos tóxicos se han atribuido a su gran poder oxidante (Nriagu, 1998).

En algunos estudios se apoya que el V sea mutagénico o incluso carcinogénico y otros estudios lo postulan como un posible antineoplásico. Uno de los mecanismos de toxicidad celular propuesto es que el vanadato se reduce en las células a vanadyl por un proceso dependiente de NADPH. El vanadyl se combina con H₂O₂ y forma compuestos de peroxovanadio quizá en mayor proporción que los radicales OH producidos por la reacción de Fenton. Esto estimula la fosforilación de tirosina, inducción de la proteína Ras que finalmente llevaría a muerte celular. Este estudio fue hecho en cultivo de células de riñón por Capella, *et al* en el 2002.

Se ha demostrado genotoxicidad por diferentes compuestos de V tanto en estudios con linfocitos *in vitro* (Roldán y Altamirano-Lozano, 1990; Rojas *et al*, 1996; Altamirano-Lozano *et al*, 1993; Altamirano-Lozano *et al*, 1999; Rodríguez Mercado *et al*, 2003) y con linfocitos y fibroblastos de trabajadores con exposición ocupacional al vanadio (Ivancsits *et al*, 2002).

En estudios *in vitro* en eritrocitos de ratones y de humanos se ha demostrado una acción hemolítica del V (Nriagu, 1998), que correlaciona con los estudios *in vivo* que muestran una disminución en el número de eritrocitos, con aumento de eritrocitos inmaduros lo cual se podría explicar por la generación de radicales libres y peroxidación lipídica que ocasiona fragilidad osmótica además

de que al disminuir su deformabilidad, éstos se quedan en los capilares del sistema reticuloendotelial y son eliminados de la circulación prematuramente (Zaporowska and Slotwinska, 1996).

En un estudio realizado por Di Gioacchino y cols en el 2002 utilizando cultivo de células mononucleares de sangre periférica con concentraciones de 10^{-4} M (altas) y 10^{-7} (bajas) de metavanadato de sodio NaVO_3 se encontró que a las concentraciones altas hubo una disminución de 25% en la proliferación inducida con fitohemaglutinina (PHA), así como disminución en producción de IFN gamma e IL-5 y, por el contrario, a dosis bajas se observó aumento en la producción de IL-5 y FNT alfa por lo que se propone que el V ambiental podría ejercer efectos en el sistema inmunológico en organismos vivos.

2.3.7 Efectos en organismos vivos.

Los efectos respiratorios son los más ampliamente documentados sobre todo en humanos con exposición laboral aguda al vanadio, en particular en limpieza de calderas y sus manifestaciones se dividen en leves, moderadas y severas. Las manifestaciones leves incluyen rinitis, estornudos, epistaxis, conjuntivitis, tos, odinofagia y dolor torácico, pero pueden ser tan severas que condicionen bronquitis, neumonitis e inclusive hiperreactividad bronquial o crisis asmáticas. En estos mismos pacientes, se puede observar la lengua de color verde, refieren sabor metálico y pueden presentar dermatitis eczematosa (Barceloux 1998, Nriagu 1998).

El vanadio también ha demostrado efecto en el sistema cardiovascular en estudios experimentales demostrándose que disminuye la fuerza de contracción ventricular, vasoconstricción, hipertonia muscular y aumento de la tensión arterial, además de que se ha visto aumentada la excreción urinaria de potasio (Nriagu, 1998). En humanos, la intoxicación crónica por vanadio, según la OMS ocasiona arritmia sinusal, bradicardia, espasmo coronario y algunos cambios

electrocardiográficos como extrasístoles y disminución de la amplitud de la onda p y T (WHO, 2000).

En humanos con intoxicación por exposición laboral, la OMS ha reportado signos y síntomas neurológicos inespecíficos como cefalalgia, debilidad, náuseas, vómito y tinnitus, además de que presentan alteraciones en los reflejos y excitabilidad neuromuscular manifestada con temblor fino de los dedos y manos (Nriagu, 1998).

También ha sido ampliamente documentada la toxicidad al riñón, ya que en exposición crónica tiende a acumularse en forma de vanadyl, el cual es un potente inhibidor de las ATPasas, afectando la reabsorción de sodio y ocasionando acidosis tubular hipokalémica, siendo más tóxico en administración parenteral que en la enteral lo cual es comprensible debido a que se absorbe poco por vía intestinal. Los cambios histológicos que se han observado en el riñón son necrosis, proliferación celular y fibrosis.

El hígado, después de huesos y riñón es el sitio donde más se acumula este metal en exposición crónica, pero aún no hay estudios concluyentes de su efecto tóxico, aunque hay estudios en los cuales de manera indirecta se señala hepatotoxicidad al encontrar en sangre elevación de enzimas transaminasas (Nriagu, 1998). Se han visto alteraciones en la espermatogénesis y en la motilidad de los espermatozoides en ratones (WHO, 2000; Altamirano-Lozano *et al*, 1993; Aragón y Altamirano-Lozano, 2001).

En cuanto a la toxicidad linfohematopoyética existen controversias sobre los efectos del vanadio, puesto que hay estudios que muestran cambios en los índices hematológicos y otros en los cuales no existen tales cambios. En un estudio de 12 semanas administrando metavanadato de amonio y vanadyl sulfato por vía enteral a ratas, no se encontraron diferencias entre las tratadas y no tratadas en cuanto a hemoglobina, hematocrito, cuenta eritrocitaria, porcentaje de

reticulocitos, cuenta leucocitaria, cuenta plaquetaria o fragilidad osmótica de los eritrocitos (Dai y McNeill, 1994).

Zaporowska en 1992 realizó una revisión de los efectos en los índices hematológicos de diferentes compuestos y diferentes dosis de V encontrando que, aunque es difícil establecer comparaciones, se ha demostrado que reduce la deformabilidad de los eritrocitos y ocasiona peroxidación de la membrana haciéndolos más lábiles a la hemólisis, además de que puede afectar también la síntesis del grupo hemo. El grupo de la misma autora en 1992 utilizó ratas Wistar de dos meses de edad y las expuso a metavanadato de amonio oral 0.15 mg V/cm³ de agua, encontrando disminución de la hemoglobina y número de eritrocitos, con aumento de los reticulocitos y eritrocitos policromatófilos. Además hubo un aumento significativo de linfocitos y neutrófilos. Se estudió la capacidad fagocítica de los neutrófilos encontrándola disminuída.

En humanos se realizó un estudio administrando 100 mg de vanadyl sulfato diariamente por 3 semanas hubo una disminución significativa de los niveles de hemoglobina y hematocrito, pero la cuenta leucocitaria y plaquetaria permanecieron sin cambios (Cohen, 1995). En otro estudio no hubo cambios en índices hematológicos en humanos sanos (Fawcett *et al*, 1997).

Se ha demostrado necrosis linfoide en timo, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea de 1 a 4 días después de inyección subcutánea de metavanadato de amonio (15.5 mg/kg) (Al-Bayati *et al*, 1992).

En un estudio realizado en ratones, utilizando concentraciones de 4, 8, 16 y 32 mg/m³ de V₂O₅ inhalado 6 horas al día por 5 días a la semana por 16 días, se encontró hiperplasia linfoide en los ganglios mediastinales corroborada histológicamente. En ratas utilizando las mismas condiciones, se encontró en el estudio hematológico a los 3 meses de exposición un aumento en el número de eritrocitos pero con disminución en su tamaño (eritrocitosis microcítica) en

hembras y machos. Se realizó este mismo estudio a 2 años de exposición, utilizando concentraciones de 1, 2 y 4 mg/m³ de V₂O₅ en el cual se observó un aumento en la incidencia de neoplasias bronquiales y alveolares tanto en ratas como en ratones lo cual apoya que éste metal es potencialmente carcinogénico (National Toxicology Program, 2002).

2.4 SISTEMA HEMATOPOYETICO Y SANGRE

2.4.1 SANGRE

La sangre es un tejido conectivo especializado el cual se encuentra formado tanto por elementos celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) como por un líquido llamado plasma el cual es rico en proteínas y electrolitos. Las principales funciones de la sangre son el transporte de oxígeno y dióxido de carbono a través de la hemoglobina, el transporte de nutrientes, hormonas y desechos celulares, interviene en la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral, participa en la hemostasia normal y mecanismo de coagulación, así como contribuye a regular la temperatura, al equilibrio osmótico y ácido básico del cuerpo.

Las células más abundantes de la sangre, de 3 a 5 millones por ml, son los eritrocitos o glóbulos rojos que contiene la hemoglobina esencial para el transporte de oxígeno y dióxido de carbono. Los leucocitos se encuentran de 5 a 10 mil por ml en sangre, su principal función es en la respuesta inmunitaria. Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados pequeños y en forma de discos cuya función principal es la vigilancia de la continuidad de los vasos sanguíneos y, en el caso de que exista ruptura del endotelio y la colágena del subendotelio quede expuesta, se activan adhiriéndose a ella y agregándose posteriormente para formar un tapón hemostático primario el cual será secundario o definitivo con

la formación de la fibrina activada por los factores de la coagulación plasmáticos (Beutler *et al*, 2001; Gartner *et al*, 2002).

2.4.2 MEDULA OSEA

La médula ósea es el tejido encargado de la formación de las células sanguíneas (hematopoyesis) y su descarga en el sistema circulatorio. Este es un tejido que se encuentra en actividad intensa por el reemplazo constantes de células. Se encuentra formada por:

- a) el estroma que contiene células adiposas, fibras reticulares y células reticulares
- b) el compartimiento vascular (venas, arterias, sinusoides) y
- c) el compartimiento hematopoyético (las células precursoras propiamente).

Las células madre pluripotenciales son las precursoras universales de todas las líneas, se dividen y forman células madre multipotenciales que a su vez dan origen a células morfológicamente distintas que maduran dentro de la médula ósea para posteriormente salir a la sangre.

Para que se lleve a cabo la hematopoyesis se necesitan factores de crecimiento que pueden producirse dentro o fuera de la médula ósea como son la IL-3, IL1, IL6, IL11, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, eritropoyetina y trombopoyetina. (Beutler *et al*, 2001; Gartner, 2002).

2.4.3 TIMO

El timo es un órgano linfoide capsulado, con lobulillos en los cuales se observa corteza y médula. Las células que se encuentran en su interior son linfocitos o timocitos, células reticulares (epiteliales) y algunos macrófagos. La corteza a la microscopía de luz se tiñe más basófilamente por la gran cantidad de

linfocitos y en la médula hay mayor cantidad de células reticulares, formando unas estructuras que son patognomónicas de timo llamadas corpúsculos de Hassall.

Su principal función es recibir a los linfocitos T procedentes de la médula ósea y participar en su maduración. En este órgano se lleva a cabo la regulación del reconocimiento de lo propio y lo no propio, con delección clonal por apoptosis de las células no funcionales o que pudieran ser causa de autoinmunidad. En humanos este órgano sufre una involución que inicia desde la infancia en la cual se adelgaza la corteza y el parénquima se sustituye por tejido adiposo. El estrés, radiaciones ionizantes, endotoxinas bacterianas y administración exógena de ciertas hormonas aceleran esta involución, lo cual puede repercutir en el desarrollo del sistema inmunológico del individuo. (Beutler *et al*, 2001; Gartner 2002).

2.5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.

Desde tiempos antiguos los metales se han asociado con alteraciones en la hematopoyesis y en el sistema inmunológico, sin embargo, aún no existen estudios suficientes que apoyen o descarten la toxicidad inmunológica y hematológica por este metal. Además, son muy pocos los estudios con pentóxido de vanadio administrado por vía respiratoria que es la vía a la que los humanos estamos más expuestos. Uno de los trabajos ha reportado que la concentración de vanadio aumentó en tejido pulmonar en residentes de la ciudad de México (Fortoul, 2002), por lo cual es importante realizar un modelo experimental crónico en ratones para determinar cambios en la sangre, en la hematopoyesis y en timo para contribuir al conocimiento de la toxicidad por este contaminante tan abundante por la utilización de combustibles fósiles, en particular del petróleo crudo y en especial, del mexicano.

3. HIPOTESIS

El vanadio inhalado es tóxico para el timo y la médula ósea induciendo cambios morfológicos identificados por microscopía de luz y electrónica en estos órganos, así como cambios en el frotis sanguíneo y en el hemograma.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar los cambios inducidos por la inhalación aguda y crónica de vanadio en sangre, médula ósea y timo, y las variaciones en el hemograma.

OBJETIVOS PARTICULARES

Relacionar con el tiempo de exposición, los cambios encontrados por microscopía de luz y electrónica en médula ósea y timo.

Evaluar y cuantificar los cambios en sangre periférica por microscopía de luz y mediante hemograma.

5. METODO

Se utilizaron ratones machos CD1 de 35g de peso, que se mantuvieron con ciclos luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Fueron expuestos 88 ratones a pentóxido de vanadio (V_2O_5) al 0.02M en una caja de acrílico cerrada conectada a un nebulizador en dos ocasiones por semana, cada una de una hora de duración, durante 3 meses. Se utilizaron también ratones para el grupo control en las mismas condiciones que los expuestos, pero solo se expusieron al nebulizador con solución salina. Un grupo de 8 ratones expuestos y controles se sacrificó después de la primera inhalación para ver los cambios agudos y posteriormente cada semana hasta completar tres meses. Se tomaron muestras de sangre en tubos con EDTA para posteriormente realizar frotis sanguíneo y biometría

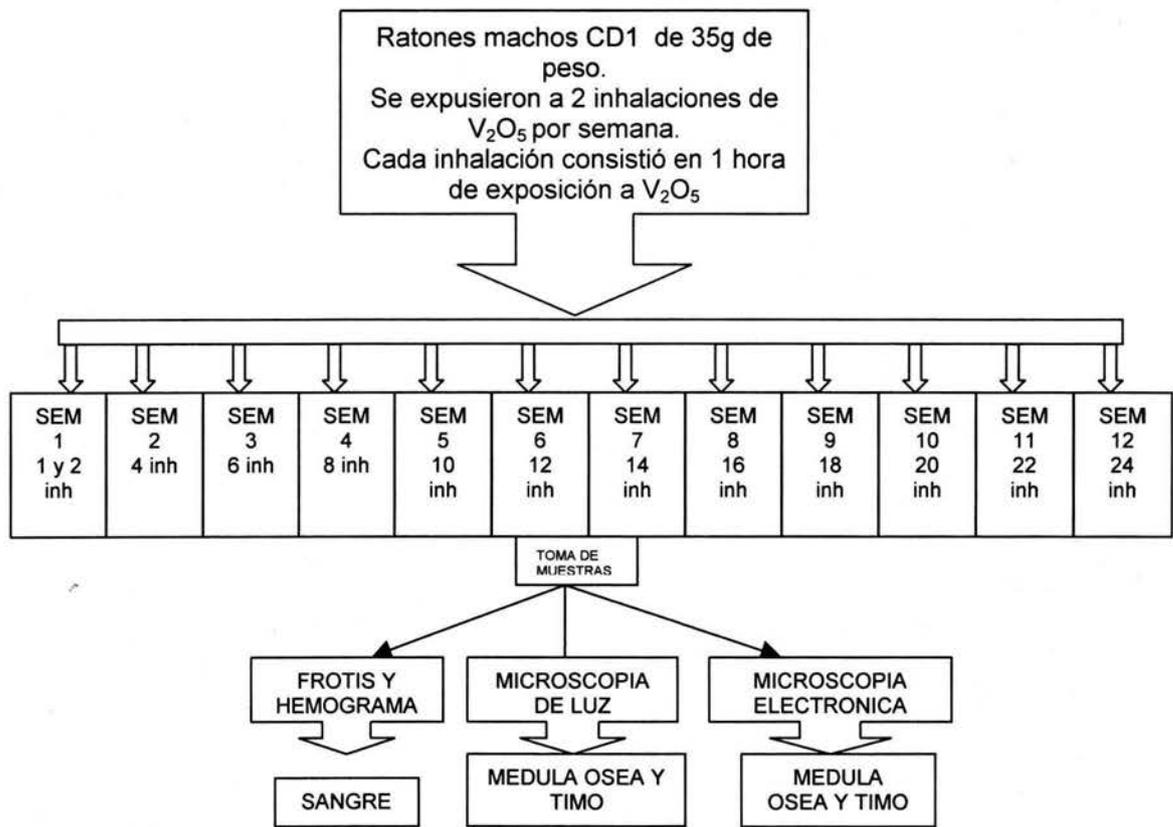
hemática (hemograma). Se tomaron muestras de médula ósea y timo para microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión.

Para microscopía de luz se tomaron fragmentos de timo para realizar técnica histológica: fijación, deshidratación, aclaración, inclusión, corte, tinción y montaje. Se realizaron frotis de sangre que se fijaron con metanol y se tiñeron con Wright.

Para microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron en glutaraldehído 0.1M durante 2 horas, posteriormente se postfijaron con tetraóxido de osmio al 1% por 2 horas. Posteriormente se procedió a deshidratar el tejido con alcoholes en concentraciones crecientes del 70 al 100% para finalmente incluir los fragmentos en Araldita 6005 (resina epóxica). Se hicieron cortes semifinos con ultramicrotomo Reichert-Jung, y posteriormente los cortes finos que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su posterior observación en un microscopio Zeiss EM-10.

Se realizó el hemograma y se contaron y midieron los megacariocitos en los cortes semifinos de médula ósea.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto de las inhalaciones de V_2O_5 sobre las diferentes variables (Tabla 1). Los datos de densidad fueron transformados como $\log x + 1$ debido a que no presentaron una distribución normal ni homoscedasticidad (Zar, 1999). Posteriormente los análisis de ANOVA que registraron diferencias significativas fueron sometidos a un análisis de Tukey para comparar entre tratamientos. Se realizaron gráficas de cajas (promedio \pm E.E.) para ilustrar diferencias entre tratamientos.



6. RESULTADOS

6.1 SANGRE PERIFERICA

6.1.1 HEMOGRAMA

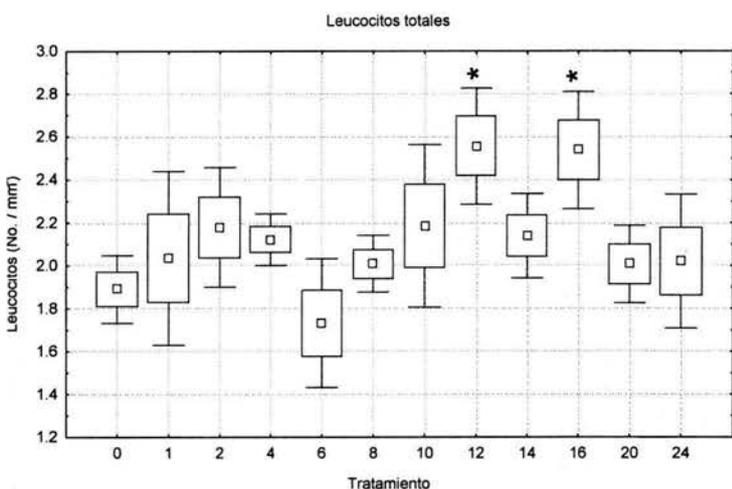
El hematocrito (Hcto), hemoglobina (Hb), volumen globular medio (VGM), concentración media de hemoglobina (CMHC), eritrocitos, linfocitos, basófilos y eosinófilos no tuvieron diferencia significativa. Los leucocitos, neutrófilos, monocitos y plaquetas tuvieron diferencia significativa, como se muestra en las tablas y gráficas 1, 2, 3, 4 y 5.

TABLA 1. ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA INHALACION DE V₂O₅ SOBRE LA DENSIDAD RELATIVA DE LAS SIGUIENTES VARIABLES.

Variable	gl	F	p
Leucocitos	7	3.41	***
Neutrófilos	7	4.12	***
Monocitos	7	2.34	*
Plaquetas	7	6.10	***

Tabla 2. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en los LEUCOCITOS.

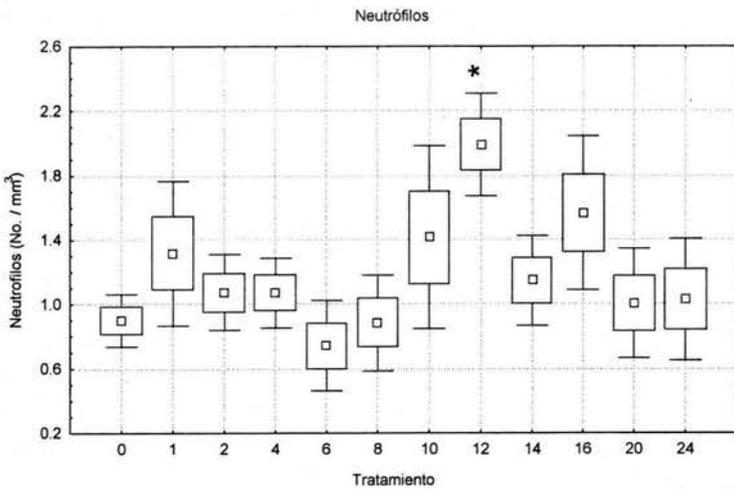
Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	5.87 ± 0.61	a
1 inh (24 horas)	7.63 ± 1.65	ab
2 inh (1 sem)	8.49 ± 1.39	ab
4 inh (2 sem)	7.44 ± 0.54	ab
6 inh (3 sem)	5.11 ± 0.89	a
8 inh (4 sem)	6.57 ± 0.51	ab
10 inh (5 sem)	9.01 ± 2.21	ab
12 inh (6 sem)	12.75 ± 1.83	b
14 inh (7 sem)	7.79 ± 0.87	ab
16 inh (8 sem)	12.47 ± 1.71	b
20 inh (10 sem)	6.66 ± 0.72	ab
24 inh (12 sem)	7.25 ± 1.35	ab



Los leucocitos totales tuvieron un aumento significativo en la sexta y octava semana (12 y 16 inhalaciones) con respecto al control. En la tabla, letras diferentes denotan diferencias significativas entre grupos.

Tabla 3. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en los NEUTROFILOS.

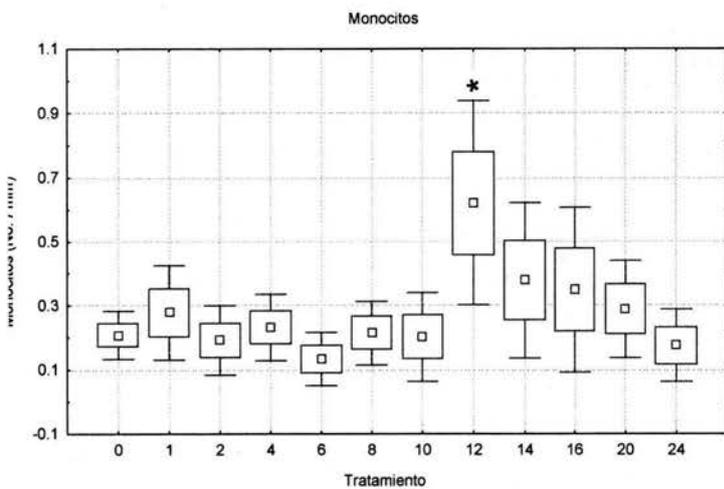
Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	1.55 ± 0.20	a
1 inh (24 horas)	3.40 ± 1.09	ab
2 inh (1 sem)	2.07 ± 0.36	a
4 inh (2 sem)	2.01 ± 0.29	a
6 inh (3 sem)	1.26 ± 0.32	a
8 inh (4 sem)	1.67 ± 0.57	a
10 inh (5 sem)	4.53 ± 2.04	ab
12 inh (6 sem)	7.01 ± 1.30	b
14 inh (7 sem)	2.37 ± 0.49	a
16 inh (8 sem)	4.76 ± 1.20	ab
20 inh (10 sem)	2.06 ± 0.61	a
24 inh (12 sem)	2.17 ± 0.59	a



Los neutrófilos tuvieron un aumento significativo con respecto al control en la sexta semana (12 inhalaciones).

Tabla 4. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en los MONOCITOS.

Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	0.24 ± 0.04	a
1 inh (24 horas)	0.34 ± 0.10	ab
2 inh (1 sem)	0.22 ± 0.07	a
4 inh (2 sem)	0.27 ± 0.06	ab
6 inh (3 sem)	0.15 ± 0.05	a
8 inh (4 sem)	0.25 ± 0.06	ab
10 inh (5 sem)	0.24 ± 0.09	ab
12 inh (6 sem)	1.05 ± 0.37	b
14 inh (7 sem)	0.55 ± 0.22	ab
16 inh (8 sem)	0.51 ± 0.22	ab
20 inh (10 sem)	0.36 ± 0.10	ab
24 inh (12 sem)	0.20 ± 0.07	a



Los monocitos tuvieron un aumento significativo en la sexta semana de exposición (12 inhalaciones).

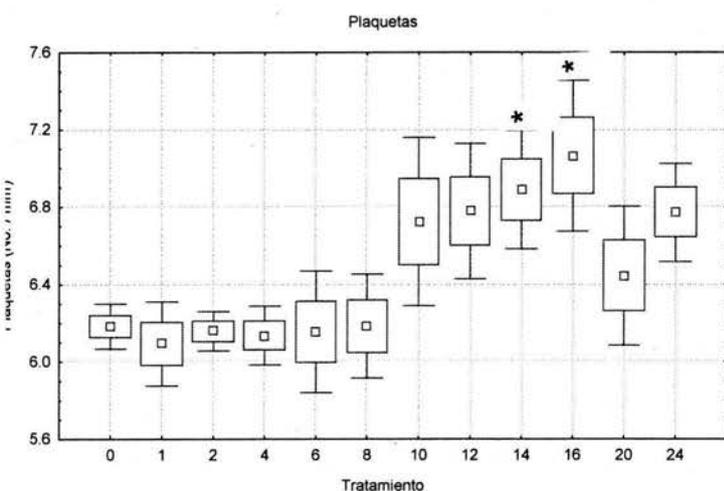


Tabla 5. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en las PLAQUETAS.

Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	493.50 ± 31.13	a
1 inh (24 horas)	460.85 ± 61.96	a
2 inh (1 sem)	476.00 ± 24.76	a
4 inh (2 sem)	469.43 ± 36.83	a
6 inh (3 sem)	517.50 ± 92.23	a
8 inh (4 sem)	519.50 ± 82.45	a
10 inh (5 sem)	930.28 ± 145.25	ab
12 inh (6 sem)	959.00 ± 127.99	ab
14 inh (7 sem)	1056.62 ± 141.84	b
16 inh (8 sem)	1337.00 ± 259.96	b
20 inh (10 sem)	697.75 ± 114.58	ab
24 inh (12 sem)	918.00 ± 104.37	ab

Las plaquetas tuvieron un aumento significativo en la séptima y octava semana de exposición (14 y 16 inhalaciones).

6.1.2 MORFOLOGIA DE SANGRE.

ERITROCITOS.

Comparados con el control (figura 1), desde la primera inhalación se observaron variaciones en la forma (poiquilocitosis), coloración (policromasia) y en el tamaño (anisocitosis) de los eritrocitos. Se encontraron formas inmaduras como eritroblastos policromatófilos que normalmente no se encuentran presentes en sangre periférica y que son comunes en hemólisis (figura 2). Además se observaron micronúcleos en los eritrocitos de los animales expuestos (figura 3).

LINFOCITOS

Los cambios morfológicos en los linfocitos se observaron desde la primera inhalación de V₂O₅ encontrándose linfocitos atípicos: linfocitos binucleados,

linfocitos con gran cantidad de citoplasma, núcleo con cromatina laxa y nucleolos evidentes que podrían ser linfocitos activados o linfoblastos (figuras 5 y 6).

PLAQUETAS

El cambio más llamativo en sangre fue el aumento significativo de la cantidad de plaquetas en la séptima y octava semana. Además se encontraron plaquetas gigantes en sangre periférica (figura 4).

6.2 TIMO

MICROSCOPIA DE LUZ

En el grupo control el timo se encontró con una relación corteza/médula muy bien definida, con una relación 1:3 aproximadamente, con escasos corpúsculos de Hassall (figura 7).

En la primera inhalación se encontró una disminución importante de la corteza, con una relación aproximada de 1:6 y con un aumento en los corpúsculos de Hassall.

A partir de la segunda inhalación y en todas las inhalaciones subsecuentes fue progresiva la pérdida de la relación corteza/médula (figura 8) con aparición de estructuras similares a nódulos linfoides que normalmente no se encuentran en este órgano (figura 9). La presencia de células plasmáticas y nódulos linfoides apoya el hecho de que probablemente existen linfocitos B en el timo (figuras 10 y 11). En algunos de estos nódulos se encontraron escasos linfocitos binucleados como aquellos encontrados en la sangre periférica (figura 12).

ULTRAESTRUCTURA

En las figuras 13 y 14 se observan imágenes de apoptosis y mitosis en los animales control, las cuales son normales en este órgano. Se encontraron cambios progresivos de necrosis de linfocitos, con edema de organelos (mitocondrias, retículos, aparato de Golgi) (figuras 15 y 16). Por otro lado, se

observó un cambio en la distribución de cromatina en sus núcleos, con cromatina muy laxa y nucleolos muy evidentes (figura 18). Se encontraron linfocitos binucleados como los encontrados en microscopía de luz (figura 17). A partir de la quinta semana de exposición se encontró, además de la presencia de necrosis, un infiltrado inflamatorio con macrófagos y neutrófilos y en las semanas 10 y 12 se observó que la mayor parte de este infiltrado estaba formado por eosinófilos (figuras 19, 20 y 21). También se encontraron irregularidades en los núcleos de los linfocitos como seudoinclusiones nucleares (figura 22).

Además, algunos núcleos de linfocitos adquirieron características diferentes, como irregularidades muy marcadas e invaginaciones muy pronunciadas, cromatina laxa y nucleolos cerca de estas invaginaciones que semejan a las células neoplásicas (figura 23).

6.3 MEDULA OSEA

En el análisis de microscopía de luz se observó aumento en el número de megacariocitos, así como aumento en el tamaño y en la lobulación nuclear de los mismos (mayor poliploidía) lo que se puede correlacionar con el aumento en el número de plaquetas circulantes en sangre (figuras de la 24 a la 29).

En la figura 30 se observa una imagen de un animal control. El análisis ultraestructural corroboró los datos obtenidos en microscopía de luz de aumento en el número y tamaño de los megacariocitos, núcleos más irregulares, con más lóbulos e incluso megacariocitos residuales (figuras de la 33 a la 36). Además se encontró daño en el endotelio de los vasos sanguíneos de este órgano (figura 31).

El diámetro mayor y menor de los megacariocitos, así como el número de los mismos tuvieron un aumento estadísticamente significativo a las 24 horas y en las semanas 4, 8 y 12, como se observa en las gráficas y tablas 7, 8, 9 y 10.

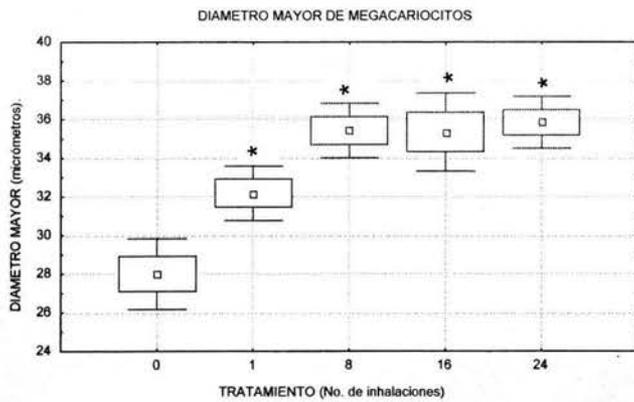


Tabla 7. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en el diámetro mayor de los megacariocitos.

Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	3.30 ± 0.23	a
1 inh (24 horas)	4.47 ± 0.19	a
8 inh (4 sem)	9.50 ± 0.49	b
16 inh (8 sem)	8.30 ± 0.25	bc
24 inh (12 sem)	7.30 ± 0.46	c

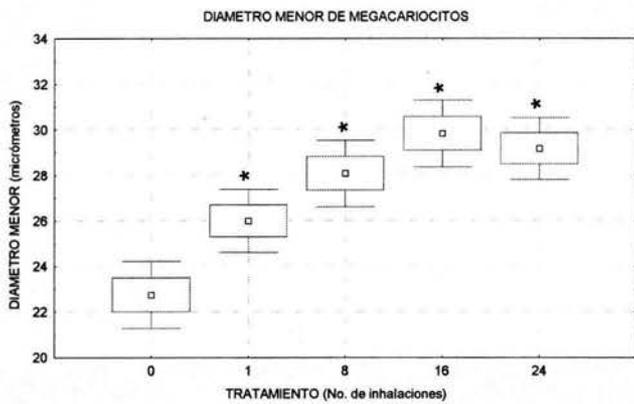


Tabla 8. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en el diámetro menor de los megacariocitos.

Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	28.00 ± 0.93	a
1 inh (24 horas)	32.16 ± 0.72	b
8 inh (4 sem)	35.42 ± 0.72	bc
16 inh (8 sem)	35.33 ± 1.02	b
24 inh (12 sem)	35.83 ± 0.68	bc

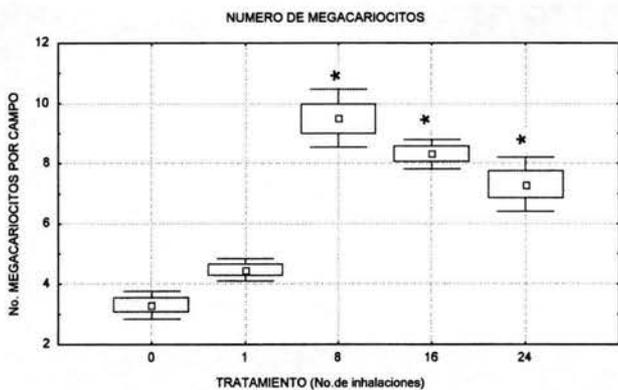


Tabla 9. Efecto del tratamiento con V₂O₅ en el número de megacariocitos por campo.

Tratamiento	Media ± e.e	P<0.05
Control	22.75 ± 0.75	a
1 inh (24 horas)	26.00 ± 0.70	b
8 inh (4 sem)	28.08 ± 0.75	b
16 inh (8 sem)	29.83 ± 0.75	bc
24 inh (12 sem)	29.17 ± 0.69	bc

7. DISCUSION

El hematocrito, hemoglobina, volumen globular medio, concentración media de hemoglobina, eritrocitos, linfocitos y eosinófilos no tuvieron diferencias significativas, lo cual concuerda con estudios previos realizados por Dai y Mcneill en 1994 en ratas, por Cohen en 1995 en humanos voluntarios, lo mismo que Fawcett y cols en 1997 en atletas humanos a quienes se les administró V con fines anabólicos, aprovechando su efecto insulinomimético.

Se encontraron datos de hemólisis (presencia de eritroblastos en el frotis de sangre) debido a que, al estar posiblemente destruyéndose los eritrocitos, la médula ósea responde sacando formas inmaduras a la periferia (Beutler *et al*, 2001). Esto ha sido postulado previamente por Zaporowska y cols en 1992 y 1996 en modelos en ratas y también utilizando compuestos de V *in vitro* en donde se ha observado mayor fragilidad osmótica atribuida a la inhibición de la Na/K ATPasa. También aumenta la fragilidad porque se une a proteínas de membrana y hace a ésta mucho más frágil (Xiagoai *et al*, 2003).

Los leucocitos, neutrófilos, monocitos y plaquetas tuvieron un comportamiento similar, con un aumento significativo entre la sexta y octava semana de tratamiento, pero con tendencia a la disminución en las siguientes semanas, lo que probablemente se deba a que el V ejerce una toxicidad máxima a dicha concentración y posteriormente el organismo desarrolle algún sistema para adaptarse al daño. La leucocitosis y neutrofilia ya había sido demostrada previamente en los estudios de Zaporowska en 1992. Estos parámetros son inespecíficos, puesto que pueden estar aumentados en muchas situaciones como en las infecciones agudas y crónicas, inflamación crónica pero incluso se han relacionado con intoxicaciones por metales como el mercurio (Hg) (Beutler *et al*, 2001). Se ha reportado que posterior a la inhalación de partículas contaminantes hay leucocitosis secundaria a la inflamación pulmonar (Clarke *et al*, 2000).

El aumento plaquetario o trombocitosis es un hallazgo que no se ha reportado previamente con ningún metal y se discute posteriormente.

La presencia de linfocitos binucleados tanto en sangre periférica como en timo, sugiere una alteración en citoesqueleto ocasionada por V, como ha sido estudiado por Ramírez y cols en 1997 utilizando V_2O_5 (0.001 a 0.1 μM) en cultivos de linfocitos demostrando la inhibición de la polimerización de la tubulina, la despolimerización de la misma y la alteración en la formación del huso mitótico lo que ocasiona células aneuploides o poliploides. Aunque no ocasionado por V, se han estudiado en las células de Clara deficientes de p53 las causas de multinucleación celular ya que dichas células muestran un mayor índice de binucleación al exponerse a daño a ADN. Con ello se trata de explicar el papel de p53 en la formación del huso mitótico, regulación del centrosoma y regulación del crecimiento celular (Armit *et al*, 2002), lo cual en un futuro podría investigarse en estos linfocitos para determinar si existe relación de daño a p53 con la binucleación.

Existe un trastorno hematológico aparentemente benigno en humanos en donde se encuentran linfocitos binucleados en la sangre circulante y aumento en la IgM sérica, llamada Linfocitosis Policlonal Persistente de células B, la cual se presenta con mayor frecuencia en mujeres, sobre todo en las fumadoras y que, aparentemente es un trastorno policlonal de células B de memoria IgD CD27. Se ha visto una predisposición genética y se cree que una exposición antigénica crónica, el hábito de fumar o una probable infección por el virus de Epstein Barr pudiera ser la etiología de esta enfermedad (Trousard and Flandrin, 1996; Mossafa *et al*, 1999; Tonelli *et al*, 2000; Delage *et al*, 2001; Himmelmann *et al*, 2001; Loembé *et al*, 2001). A este respecto Vignes y cols. en el 2001, hicieron un estudio prospectivo en cual determinaron que los pacientes con esta enfermedad no solo tenían aumento de IgM, sino una deficiencia de IgA e IgG por lo que proponen que es acompañada por un grado de inmunodeficiencia y, además hicieron notar que todos sus pacientes eran fumadores y, que los que dejaron de

fumar tuvieron una disminución tanto en la leucocitosis como en los niveles de IgM. Estos serían los reportes de los trastornos que existen de linfocitos binucleados en sangre periférica *in vivo* y que pudieran ser una de las causas del hallazgo encontrado por nosotros, considerando que nuestro modelo consiste en la inhalación crónica de un metal, comparable hasta cierto punto con el hábito de fumar.

Por otro lado, varios grupos han reportado poliploidías, aneuploidías, formación de micronúcleos y otros tipos de daño genotóxico inducidos por varios compuestos de V en linfocitos *in vitro* (Roldán *et al*, 1990; Altamirano-Lozano *et al*, 1993 y 1999; Ciranni *et al*, 1995; Rojas *et al*, 1996; Migliore *et al*, 1999; Rodríguez Mercado *et al*, 2003). Esto podría explicar los micronúcleos observados en eritrocitos y el daño observado en los linfocitos.

En timo se observó necrosis coexistiendo con apoptosis. Este último es un proceso que es encontrado normalmente en este órgano. La necrosis en linfocitos del timo ha sido previamente reportado por Al-bayati y *cols* en 1992 en ratones utilizando metavanadato de sodio por vía subcutánea a una dosis de 15.5mg/kg.

No ha sido previamente reportada la alteración en la relación corteza/médula del timo, con presencia de nódulos linfoides con células plasmáticas sugiriendo la presencia de linfocitos B que normalmente no se encuentran en este órgano y que podrían indicar una desregulación inmunológica. Este hallazgo puede ser grave, puesto que indicaría una ruptura de la barrera hemato-tímica y producción de anticuerpos en un sitio en el que normalmente se reconoce lo propio de lo extraño. De hecho en humanos, la presencia de nódulos linfoides en timo se puede observar en la hiperplasia tímica asociada a enfermedades autoinmunes, pero en nuestro modelo no hemos encontrado datos de autoinmunidad (Robbins *et al*, 1992).

La acción del V es diferente para los linfocitos T y B como ha sido demostrado por Ramanadham y Kern en 1983, utilizando ortovanadato de sodio encontrando que en timocitos de ratón en cultivo disminuyó su respuesta mitótica a la concanavalina A (50% a una dosis 10microM), en cambio en esplenocitos no hubo cambio en su respuesta a lipopolisacáridos (LPS). Lo que llamó la atención a los autores es que, en ausencia de mitógenos, el ortovanadato aumentó la mitosis en una subpoblación de timocitos, pero no en los esplenocitos o en linfocitos T en ambiente enriquecido con esplenocitos. Existe controversia acerca de si el V tiene o no propiedades mitogénicas y aparentemente depende tanto del compuesto, dosis empleada como del tipo celular y en nuestro modelo sería interesante ver la acción diferencial del V en ambos tipos de linfocitos.

En el timo se encontraron células con características neoplásicas (invaginaciones nucleares, múltiples nucleolos, eucromatina abundante) lo que pudiera ser el inicio de una neoplasia o probablemente la activación excesiva de estas células como ha sido demostrado por diversos autores previamente mencionados. Está bien estudiada la inhibición de la enzima PTP por V en muchos tipos celulares, entre ellos diferentes líneas de linfocitos, los cuales se activan por el aumento en la fosforilación proteica de manera similar a si estuvieran en contacto con un antígeno (Earp *et al*, 1983; Imbert *et al*; 1994; Krejsa *et al*, 1997; Barat y Tremblay, 2003).

Se ha estudiado la causa de las invaginaciones nucleares y se han encontrado cambios en la disposición de actina, observándose en estas invaginaciones principalmente monomérica o actina G lo que se ha correlacionado con un estado de desdiferenciación celular o células cancerosas y con un estado de mucha actividad nuclear (Jhonson *et al*, 2003).

La presencia de trombocitosis que correlaciona con el aumento en el número y tamaño de los megacariocitos en médula ósea se comenta con más detalle a continuación.

La proliferación y maduración de los megacariocitos depende de la acción sinérgica de varios factores de crecimiento como: el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), la IL-3, IL-6, IL-11 y eritropoyetina (EPO), pero el más importante de todos ellos es la Trombopoyetina (TPO) (Gewirtz, 1990; Metcalf *et al*, 2002). Esta proliferación requiere de la coactivación de la proteína cinasa C (PKC) con la consecuente movilización de calcio y además de la activación de la adenilato ciclasa (AC) (Long, 1990).

Para regular la cantidad de plaquetas circulando, el número de plaquetas puede inducir cambios compensatorios en el tamaño de los megacariocitos, es decir, si hay pocas plaquetas en sangre, generalmente la ploidía y tamaño de los megacariocitos aumenta para compensar la trombocitopenia. En el caso de trombocitosis reactiva, el tamaño y ploidía de los megacariocitos compensatoriamente disminuye, no así en las trombocitosis clonales en donde los megacariocitos se vuelven gigantes, poliploides y displásicos (Ebbe, 1990). También se sabe que tanto los megacariocitos como las plaquetas tienen el receptor c-mpl en su superficie y éste une a la TPO, así en condiciones normales, habrá una concentración de TPO determinada, la cual aumentará si hay trombocitopenia y disminuirá si hay trombocitosis (Schafer, 2004).

La trombocitosis puede ser ocasionada por: a) trombocitosis reactiva, b) mutaciones familiares y c) trombocitemia esencial o algún otro trastorno mieloproliferativo. El problema con estos trastornos es el riesgo de hemorragia y trombosis quizá también involucrados con patología endotelial. Además es importante hacer el diagnóstico diferencial, porque los trastornos mieloproliferativos se asocian mucho más a complicaciones trombóticas o hemorrágicas (Schafer AI, 2001; Schafer AI, 2002).

Se sabe que en las trombocitosis reactivas el problema es que en la enfermedad subyacente (inflamación, infección o neoplasia) hay una gran actividad del sistema inmunológico con producción excesiva de interleucinas,

entre ellas la IL-6 que aumenta la expresión genética de la TPO. Hay un aumento de la TPO circulante y por lo tanto aumenta la producción de megacariocitos (Kaser *et al*, 2001; Alexandrakis *et al*, 2003; Schafer, 2004).

En la inflamación crónica las plaquetas juegan un papel importante debido a que pueden internalizar a ciertos microorganismos y contienen algunas sustancias que dañan bacterias y hongos, generalmente en sus gránulos alfa, además de interleucinas que estimulan la activación del sistema inmunológico (Klinger y Jelkmann, 2002).

En algunos estudios que involucran presencia de V se ha visto aumento de interleucinas como en el de Carter y *cols* en 1997 en el cual se expusieron células de tejido bronquial humano normal a ROFA (*residual oil fly ash*) que contenía vanadio, níquel y hierro en concentraciones de 0, 5, 50, o 200 µg/ml por 2h y 24h encontrando aumentadas la IL-6, IL-8 y TNF α medidas por ELISA y también RNAm de las mismas citocinas medidas con RT-PCR. Posteriormente en 1998 Quay y *cols* utilizaron el mismo modelo para identificar mediante qué vía se estimulaba la producción de IL-6 y encontró que es por activación de NF-kappaB.

La trombocitosis clonal es un trastorno mieloproliferativo asociado con mutaciones y aberraciones cromosómicas en donde hay un problema en el receptor c-mpl que disminuye su afinidad por la TPO y por lo tanto, también hay más TPO circulante, con lo que aumenta la producción de megacariocitos (Schafer, 2004). Se encuentran niveles de TPO más elevados en comparación con aquellos con trombocitosis reactiva, por lo cual cuantificar TPO puede ser útil en el diagnóstico diferencial que suele ser muy difícil (Wang *et al*, 1998).

	CLONAL	REACTIVA
Enfermedad sistémica	No	Sí
Riesgo de trombosis	Sí	No
Riesgo de hemorragia	Sí	No
Esplenomegalia	Sí	No
Frotis sanguíneo	Plaquetas gigantes	Plaquetas normales
Función plaquetaria	Puede ser anormal	Normal
Número de megacariocitos en M.O.	Aumentados	Aumentados
Morfología de megacariocitos	Gigantes, poliploides, displásicos	Normales

Tabla 6. Parámetros enunciados por Schafer para el diagnóstico diferencial de las trombocitosis.

Con base en estos parámetros, la trombocitosis encontrada en nuestro modelo posiblemente se debe a un trastorno mieloproliferativo de los megacariocitos y probablemente el V ocasionó alguna alteración genética o está estimulando directamente la proliferación de esta línea celular.

Se sabe que ciertos contaminantes son hematotóxicos y a este respecto, West y cols en el 2000 realizaron un estudio retrospectivo para determinar el efecto de los contaminantes y la aparición de síndromes mielodisplásicos en la médula ósea y encontraron que, además del benceno y los agentes alquilantes ya claramente establecidos como leucemógenos, los metales como el arsénico, cobre, níquel y aleaciones de aceros, así como polvos inorgánicos como el asbesto y sílice se asociaron a aberraciones en los cromosomas 5 y 7 de estos pacientes.

Aunque en los tres meses de exposición de nuestro modelo no hemos encontrado complicaciones trombóticas, existen reportes de que las plaquetas gigantes, es decir el aumento de volumen plaquetario se relaciona con el riesgo de este tipo de complicaciones (Osselaer, 1997), quizá porque estas plaquetas gigantes son plaquetas más inmaduras y por lo tanto son más activas (Rinder, 1998).

También encontramos daño endotelial en la médula ósea que puede atribuirse a la inhalación de este metal y que pudiera aumentar el riesgo de trombosis. Es un hecho conocido que en lugares con altos índices de contaminación, las personas tienen mayor riesgo de enfermedades trombóticas. A este respecto, hay autores que investigan el papel que juegan las partículas contaminantes en la inducción de enfermedades vasculares como Moyer y cols que en el 2002 realizaron un estudio de 90 días y otro de 2 años de duración exponiendo ratones a 9 compuestos de partículas, entre ellos, uno de V_2O_5 , encontrando arteritis coronaria y renal en la exposición crónica a 2 años. También Nemmar y cols en el 2003 utilizaron hámsteres expuestos a instilación traqueal de partículas derivadas del diesel (5 a 500 μ g) y observaron inflamación pulmonar y aumento en la activación plaquetaria, lo que concuerda con el riesgo de trombosis debido a la contaminación.

En un estudio realizado en Inglaterra, se estimó la concentración de partículas suspendidas (PM_{10} y menores) a las que están expuestas las personas y se trató de correlacionar con parámetros hematológicos, encontrando una correlación negativa con la hemoglobina, número de eritrocitos, plaquetas y factor VII. Esto quizá es debido a que las partículas en los pulmones ocasionan inflamación o en las mismas células sanguíneas ocasionan una mayor adhesividad y probablemente secuestro en la circulación que puede llevar al gran aumento de enfermedades trombóticas en los lugares contaminados (Seaton, 1999).

En un estudio en médula ósea de pacientes con Trombocitemia Esencial se encontró que a menor expresión del receptor de TPO c-Mpl determinada mediante inmunohistoquímica, el riesgo de complicaciones trombóticas era mayor (Teofilli *et al*, 2002). En nuestro modelo se podría utilizar una técnica de inmunohistoquímica para identificar este receptor y determinar con mayor precisión la causa de la trombocitosis y el riesgo de una probable trombosis.

8. CONCLUSIONES

En nuestro modelo, a las dosis empleadas de V_2O_5 inhalado encontramos:

- Cambios en eritrocitos debidos probablemente a hemólisis.
- Eritrocitos con presencia de micronúcleos que pueden estar reflejando genotoxicidad por este compuesto.
- Linfocitos binucleados en sangre periférica y en timo que pudieran estar asociados a daño en el citoesqueleto.
- Leucocitosis, neutrofilia y monocitosis entre la sexta y octava semana de exposición probablemente inespecíficas o quizá relacionadas con la inflamación pulmonar debida a la inhalación de V.
- Necrosis de linfocitos e infiltrado inflamatorio en timo.
- Pérdida de la relación corteza-médula tímica con nódulos linfoides que pudieran hablar de una desregulación inmunológica.
- Presencia de linfocitos muy activados e incluso con características de células neoplásicas con invaginaciones nucleares, múltiples nucleolos y abundante eucromatina.
- Trombocitosis probablemente secundaria a un trastorno mieloproliferativo o clonal debido a las características morfológicas de las plaquetas (plaquetas gigantes) y de los megacariocitos (gigantes, poliploides) lo que aumentaría el riesgo de complicaciones trombohemorrágicas en estos ratones, aunque hasta el tiempo de exposición estudiado, no se observaron éstas.
- Daño endotelial en médula ósea que pudiera aumentar el riesgo de estos ratones a tener complicaciones trombóticas.

9. BIBLIGRAFIA

Al-Bayati M, Cultbertson MR, Schreider JP, Rosenblatt LS and Raabe OG. The lymphotoxic action of vanadate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1992; 11(2): 19-27.

Alexandrakis MG, Passam FH, Moschandrea IA, Christophoridou AV, Pappa CA, Coulocheri SA, Kyriakou DS. Levels of serum cytokines and acute phase proteins in patients with essential and cancer-related thrombocytosis. *Am J Clin Oncology* 2003; 26(2): 135-40.

Altamirano-Lozano M., Alvarez-Barrera L and Roldán-Reyes E. Cytogenic and teratogenic effects of Vanadium pentoxide on mice. *Med Sci Res* 1993; 21: 711-713.

Altamirano-Lozano M. Valverde M., Alvarez-Barrera L, Molina B and Rojas E. Genotoxic studies of Vanadium Pentoxide (V_2O_5) in male mice II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinog Mutagen* 1999; 19: 243-255.

Amdur, Doull, Klaasen. *Toxicology. The basic science of poisons.* Fourth edition. Pergamon Press. USA 1991.

Armitt CJ, O'Dea S, Clarke AR and Harrison D. Absence of p53 in Clara cells favours multinucleation and loss of cell cycle arrest. *BMC Cell Biology* 2002; 3: 27-36.

Barat C. Tremblay MJ. Treatment of human T cells with bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphatase inhibitors leads to activation of cyclooxygenase-2 gene. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 6992-7000.

Barceloux DG. Vanadium. *Clin Toxicol* 1999; 37(2): 265-278.

Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. *Williams Hematology.* 6th edition. International edition. Mc-Graw-Hill companies. USA, 2001.

Capella L, Gefé MR, Silva EF, Affonso-Mitidieri O, Lopes AG, Rumjanek VM. and Capella Marcia A.M. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch Biochem Biophysics* 2002; 406: 65-72.

Carter JD, Ghio AJ, Samet JM, Devil RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Tox App Pharm* 1997; 146(2):180-8.

Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalana P, Killingsworth CR, Koutrakis P, Kavouras I, Murthy GG, Lawrence J, Lovett E, Wolfson JM, Verrier RL, Godleski JJ. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and

brochoalveolar changes in canines. *Environ Health Perspect* 2000; 108 (12): 1179-8.

Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamoon H and Rossetti L. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995; 95: 2501-09.

Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 183-188.

Dai S and McNeill JH. One year treatment of non-diabetic and STZ-diabetic rats with vanadyl sulfate did not alter blood pressure or haematological indices. *Pharmacol Toxicol* 1994; 74: 110-115.

Delage R, Jacques L, Massinga-Loembe M, Poulin J, Bilodeau D, Mignault C, Leblond P. F., Darveau A. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: further evidence for a genetic disorder associated with B-cell abnormalities. *Br J Haematol* 2001; 114(3): 666-670.

Di Gioacchino M, Sabbioni E, Di Giampaolo L, Schiavone C, Di Sciascio MB, Reale M, Nicola V, Qiao N, Paganelli R, Conti P, Boscolo P. In vitro effects of vanadate on human immune functions. *Ann of Clin Lab Science* 2002; 32(2): 148-54.

Earp Shelton, Rubin R, Austin A, Dy R. Vanadate stimulates tyrosine phosphorylation of two proteins in Raji human lymphoblastoid cell membranes. *FEBS letters* 1983; 161 (2):180-184.

Ebbe S. Megakaryocyte size and ploidy in thrombocytopenic or megakaryocytopenic mice. *The Biology of Hematopoiesis*, Wiley-Liss, Inc. 1990.

Erdmann, E. Werdam K, Krawietz W, Schmitz W and Scholz H. Vanadate and its significance biochemistry and pharmacology. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 (7): 945-950.

Fawcett J, Farquhar S, Walker R, Thou T, Shand B. Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80:202-206.

Fortoul T.I. Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health* 2002; 57(5): 446-49.

Gartner L, Hiatt J. *Texto Atlas de Histología*. 2a. Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores. México, 2002.

Gewirtz AM. In vitro regulation of human megakaryocyte maturation. The Biology of Hematopoiesis. Wiley-Liss, Inc. 1990.

Gutiérrez JH, Romieu I, Corey G y Fortoul TI. Contaminación del aire. Riesgos para la salud. Editorial El Manual Moderno. Mexico 1997.

Himmelman A, Gautschi O, Nawrath M, Bolliger U, Fehr J, Stahel Rolf A. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD⁺CD27⁺ memory B cells. Br J Haematol 2001; 114 (2): 400-405.

Holgate S, Samet J, Koren H and Maynard R. Air pollution and health. Academic Press. USA 1999.

Imbert V, Peyron JF, Farahi Far D, Mari B, Auburger P, Rossi B. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. Biochem. J 1994; 297: 163-173.

Ivancsits Sabine, Pilger Alexander, Diem Elisabeth, Schaffer Andreas, Rüdiger Hugo. Vanadate induces DNA strand breaks in cultured human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Mutation Research* 2002; 519: 25-35.

Johnson N, Krebs M, Boudreau R, Giorgi G, LeGros M, Larabell C. Actin-filled nuclear invaginations indicate degree of cell de-differentiation. *Differentiation* 2003; 71(7): 414-424.

Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser W, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins M, Mier JW, and Herbert Tilg. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-25.

Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. [Review]. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(9): 913-22.

Krejsa CM, Nadler SG, Esselstyn JM, Kavanagh TJ, Ledbetter JA, Schieven GL. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 1997; 272 (17): 11541-9.

Loembé M, Lamoureux J, Deslauriers N, Darveau A, Delage R. Lack of CD40-dependent B-cell proliferation in B lymphocytes isolated from patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2001; 113 (3-1): 699-705.

Long M. Synergistic interactions between two signal transduction pathways during megakaryocyte proliferation. The Biology of Hematopoiesis. Wiley-Liss, Inc. 1990.

Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW, London SN. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 2003; 538(1-2): 101-7.

Martelli A, Robiano L, Cosso M, Perrone C, Tagliazzuchi A, Giuliano L, Aresca G.F., Brambilla G. Comparison of micronuclei frequencies in mono- bi- and polynucleated lymphocytes in subjects of a residential suburb and subjects living near a metallurgical plant. *Mutat Res* 2000; 470: 211-19.

Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S. Synergistic and Inhibitory Interactions in the In Vitro Control of Murine Megakaryocyte Colony Formation. *Stem Cells* 2002; 20:552-560

Migliore L, Zotti-Martelli L, Scarpato R. Detection of chromosome loss and gain induced by griseofulvin, estramustine, and vanadate in binucleated lymphocytes using FISH analysis. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(1): 64-8.

Morinville Anne, Maysinger Dusica and Shaver Alan. Review. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *TiPS* 1998; 19: 452-59.

Mossafa H, Malaure H, Maynadie M, Valensi F, Schillinger F, Garand R, Jung G, Flandrin G, Troussard X. Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. *Br J Haematol* 1999; 104(3-1): 486-493.

Moyer CF, Kodavanti UP, Haseman JK, Costa DL, Nyska A. Systemic vascular disease in male B6C3F1 mice exposed to particulate matter by inhalation: studies conducted by the National Toxicology Program. *Toxicologic Pathology* 2002; 30(4) 427-34.

National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). National Toxicology Program Technical Report Series 2002; (507):1-343.

Nechay BR, Nanninga LB, Nechay PSE, Post RL, GranthamJJ, Macara IG, Kubena LF, Tymothy DP, and Nielson FH. Role of vanadium in biology. *Fed Proc* 1986;45: 123-132.

Nechay, BR. Mechanisms of action of vanadium. *Ann Rev. Pharmacol Toxicol* 1984; 24: 508-524.

Nemmar A, Hoet P, Dinsdale D, Vermeylen J, Hoylaerts M, Nemery B. Diesel Exhaust Particles in Lung Acutely Enhance Experimental Peripheral Thrombosis. *Circulation* 2003; 107(8):1202-1208.

Nriagu, Jerome O. A History of Global Metal Pollution (Perspectives). Science 1996; 272(5259): 223-224.

Nriagu, J O. Vanadium in the environment. A Wiley Interscience Publication. USA 1998.

Osselaer JC, Jamart J, Scheiff JM. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. Clin Chem 1997; 43(6): 1072-1076.

Ostrosky-Wegman P, Gonsebat ME. Environmental toxicants in developing countries. Environ Health Perspect 1996; 104(Suppl 3):599-602.

Prahalad AK, Soukup JM, Inmon J, Willis R, Ghio A, Becker S, Gallaher J. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. Tox App Pharm 1999; 158: 81-91.

Quay JL, Reed W, Samet J, Devlin RB. Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19(1):98-106.

Ramanadham M, Kern M. Differential effect of vanadate on DNA synthesis induced by mitogens in T and B lymphocytes. Mol Cell Biochem 1983; 51(1): 67-71.

Ramírez P, Eastmond DA, Lacleite JP, Ostrosky-Wegman. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. Mutat Res 1997; 386: 291-98.

Rinder Henry, Judith E. Schuster, Christine S. Rinder, ChaoWang, Helen J. Schweidler, and Brian R. Smith. Correlation of Thrombosis With Increased Platelet Turnover in Thrombocytosis. Blood 1998; 91: 1288-94.

Rivero Serrano O, Ponciano Rodríguez G y Fortoul TI. Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria. Fondo de Cultura Económica. México 1993.

Riveros-Rosas H, Pfeifer G, Lynam D, Pedroza JL, Julián-Sánchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in Mexico City air. The Science of the Total Environment 1997; 198: 79-96.

Robbins , Cotran, Kumar. Pathologic basis of disease. 5th edition. Published by W.B. Saunders. 1992.

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

Rojas E, Valverde M., Herrera LA, Altamirano-Lozano M. Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of Vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 359: 77-84.

Roldan RE, Altamirano-Lozano M. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to Vanadium pentoxide. *Mutat Res* 1990; 245: 61-65.

Russanov E, Zaporowska H, Ivancheva E, Kirkova M and Konstantinova S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadote-treated rats. *Comp Biochem Physiol* 1994; 107(3): 415-421.

Samet JM, Silbajoris R, Weidong W and Lee MG. Tyrosine Phosphatases as targets in Metal-induced Signaling in Human Airway Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Moll Biol* 1999; 21: 357-364.

Schafer AI. Thrombocytosis: too much of a good thing?. Review. *Trans Am Clin Climatological Association* 2002; 113:68-76.

Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Reviews* 2001; 15 (4):159-166.

Schafer AI. Thrombocytosis. Current concepts. *N Engl J Med* 2004; 350:1211-9.

Seaton A, Soltar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius M, Stout R. Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 1999; 54: 1027-1032.

Teofili L, Pierconti F, Di Febo A, Maggiano N, Vianelli N, Ascani S, Rossi E, Pileri S, Leone G, Larocca LM, and De Stefano V. The expression pattern of *c-mpl* in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 100(2): 714-717.

Tonelli S, Vanzanelli P, Sacchi S, Fiorani C, Castelli I, Temperani P and Bonacorsi G. Persistent polyclonal B lymphocytosis: morphological, immunological, cytogenetic and molecular analysis of an Italian case. *Leukemia Research* 2000; 24(10): 877-879.

Troussard X, Flandrin G. Chronic B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (LWBL): a review of 38 cases. *Leuk Lymphoma* 1996; 20(3-4): 275-9.

Vignes S, Oksenhendler E, Quint L, Daniel MT, Mariette X and Clauvel JP. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: immunodeficiency and/or benign lymphoproliferative disorder associated with cigarette smoking? *Rev Med Interne* 2000; 21(3): 236-41.

Wang Jen C, Chi Chen, MD, Allan D. Novetsky, Stephen M. Lichter, Fakhiuddin Ahmed, Neal M. Friedberg. Blood Thrombopoietin Levels in Clonal Thrombocytosis and Reactive Thrombocytosis. *Am J Med* 1998; 104:451– 455.

West RR, Stafford DA, White AD, Bowen DT, and Padua RA. Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood* 2000; 95:2093-2097.

World Health Organization. International Programme on chemical safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. 2000.

Xiaogai Y, Wang K, Lu J, Crans D. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coord Chem Reviews*, in press, 2003.

Zaporowska H, Wasilewski W. Some selected peripheral blood and haemopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication. *Comp Biochem Physiol C*. 1989; 93(1): 175-80.

Zaporowska H, Wasilewski W. Haematological results of vanadium intoxication in Wistar rats. *Comp Biochem Physiol C* 1992; 101(1): 57-61.

Zaporowska H, Wasilewski W. Haematological effects of vanadium on living organisms. *Biochem Physiol C* 1992; 102(2): 223-31.

Zaporowska H, Slotwinska M. Effect of vanadium on rat erythrocytes in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; 34 Suppl 1: 99-100.

APÉNDICE

SANGRE

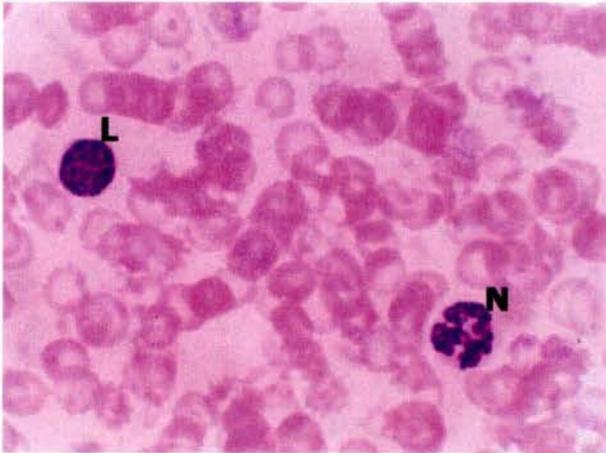


Fig. 1. Un neutrófilo (N) y un linfocito(L) en un control. 1000x.

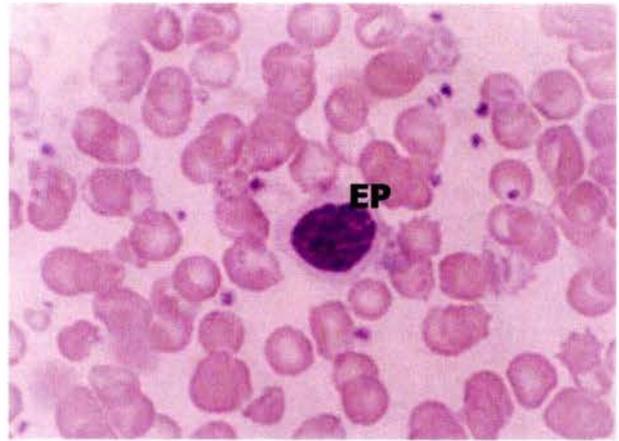


Fig. 2. Eritroblasto policromatófilo(EP) y gran cantidad de plaquetas en un expuesto. 1000x



Fig. 3.Eritrocito con un micronúcleo (Mn). 1000x.

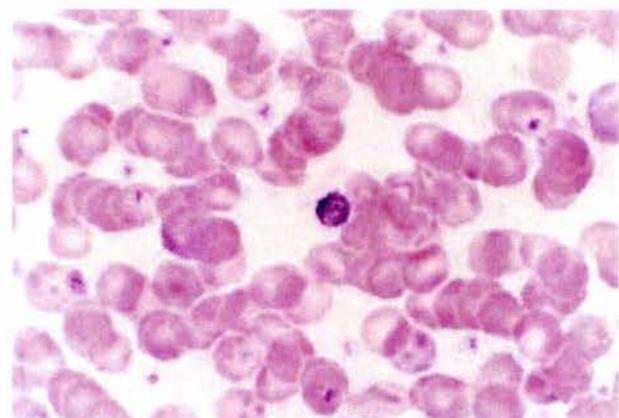


Fig. 4.Gran cantidad de plaquetas. Plaqueta gigante en el centro del campo. 1000x.

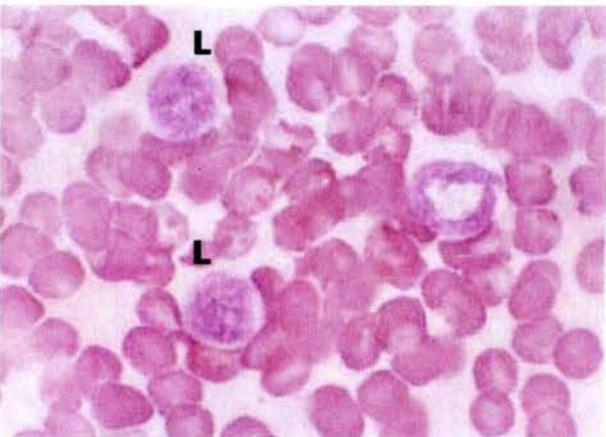


Fig. 5. Linfocitos activados parecidos a linfoblastos (L). 1000x

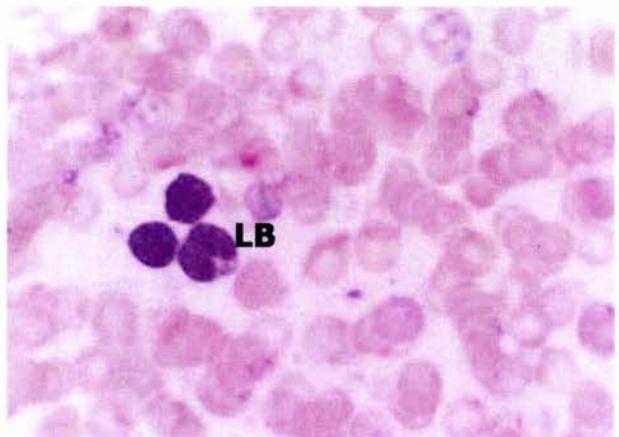


Fig. 6. Linfocito binucleado (LB). 1000x

TIMO

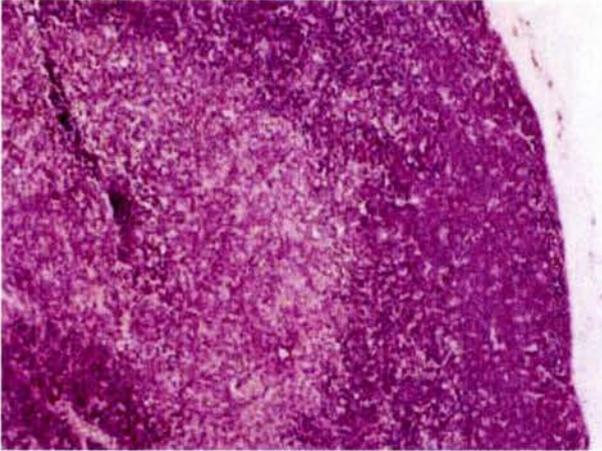


Fig. 7. Relación corteza/médula conservadas en un control. 100x.

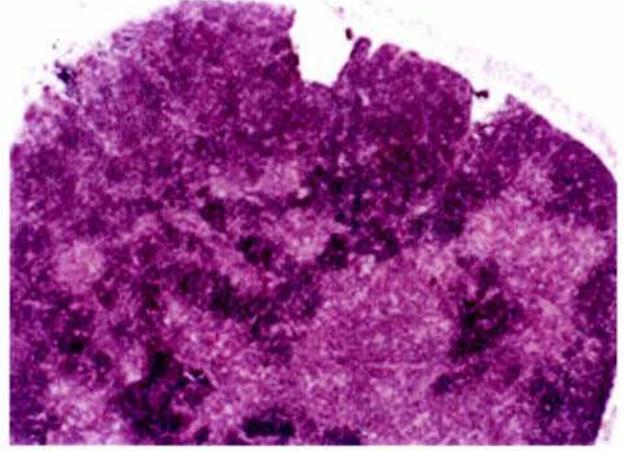


Fig. 8. Pérdida de la relación corteza/médula. 1 semana (2 inhalaciones). 100x

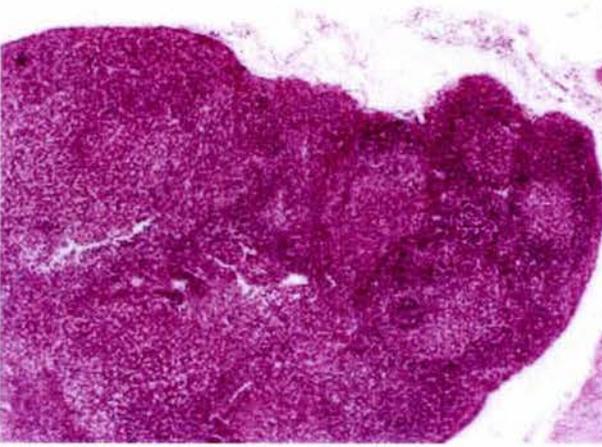


Fig. 9. Se observan nódulos linfoides. 8 semanas (16 inhalaciones). 100x.

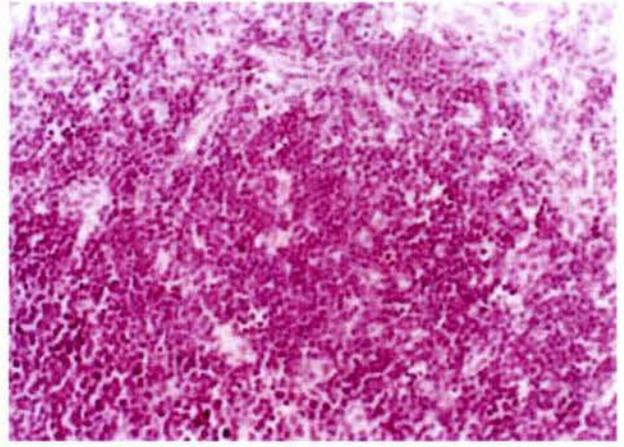


Fig. 10. Nódulo linfoide. 8 semanas (16 inhalaciones). 400x.

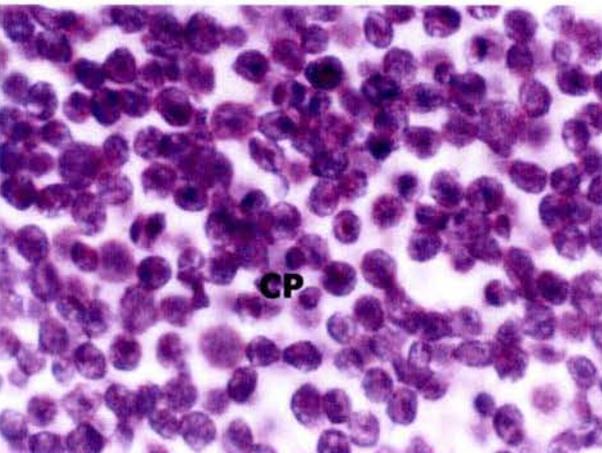


Fig. 11. Células plasmáticas (CP). 1000x.

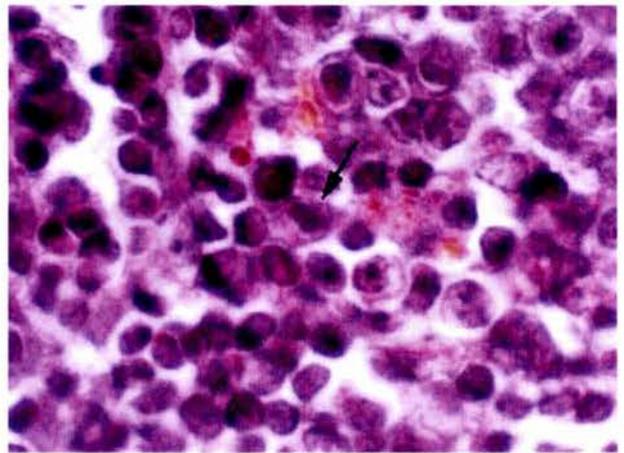


Fig. 12. Linfocito binucleado (flecha). 1000x.

TIMO

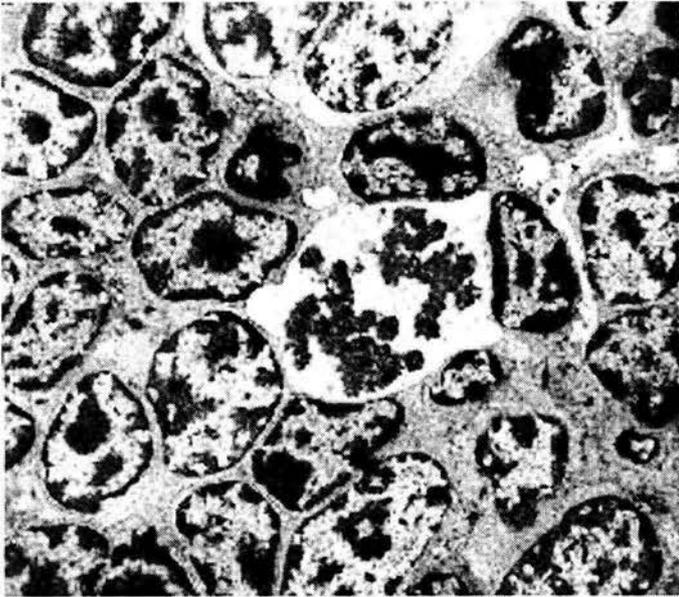


Fig. 13. Ultraestructura conservada y una imagen de mitosis en un control. 5000x.

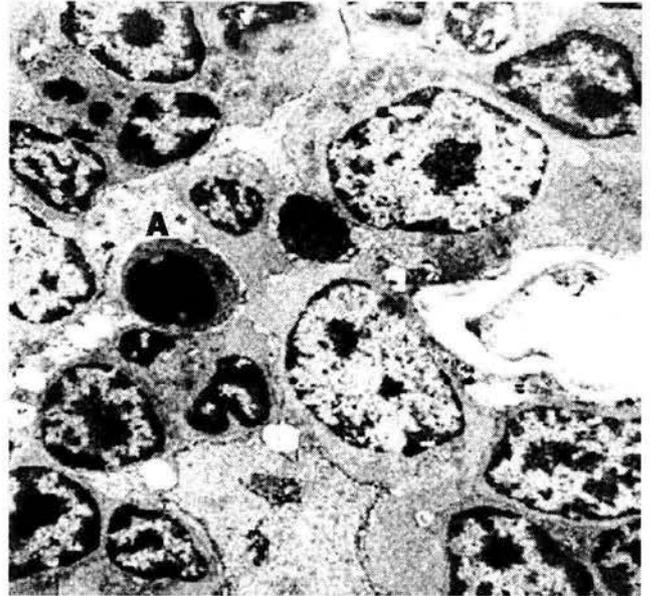


Fig. 14. Apoptosis, la cual es normal en este órgano (A). 5000x.

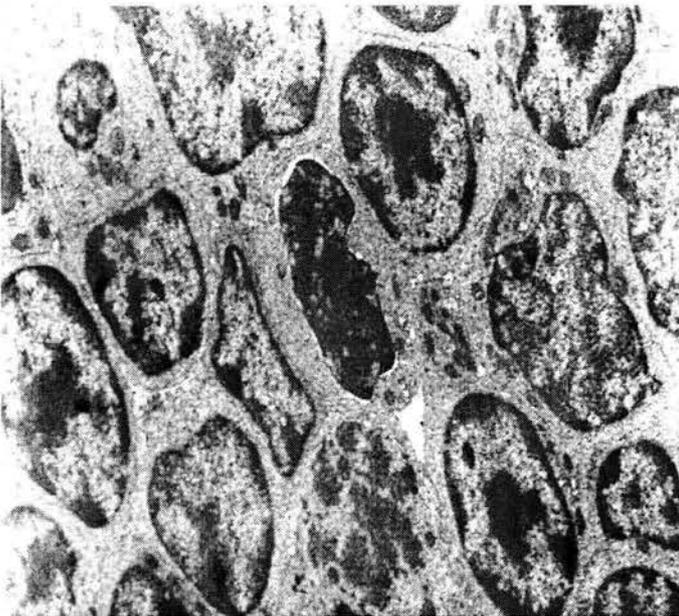


Fig. 15. Necrosis en el centro e imagen de mitosis en la parte inferior. 4 semanas (8 inhalaciones). 5000x.

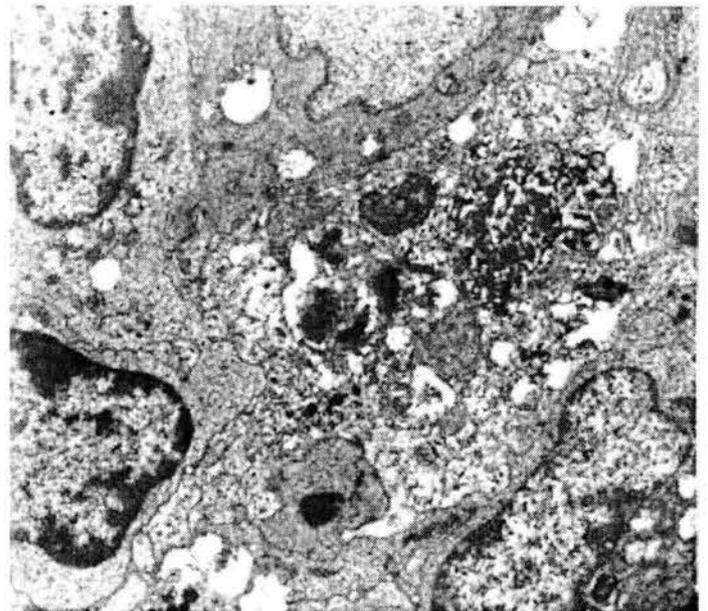


Fig. 16. Necrosis y edema de organelos. 4 semana: (8 inhalaciones). 5000x.

TIMO

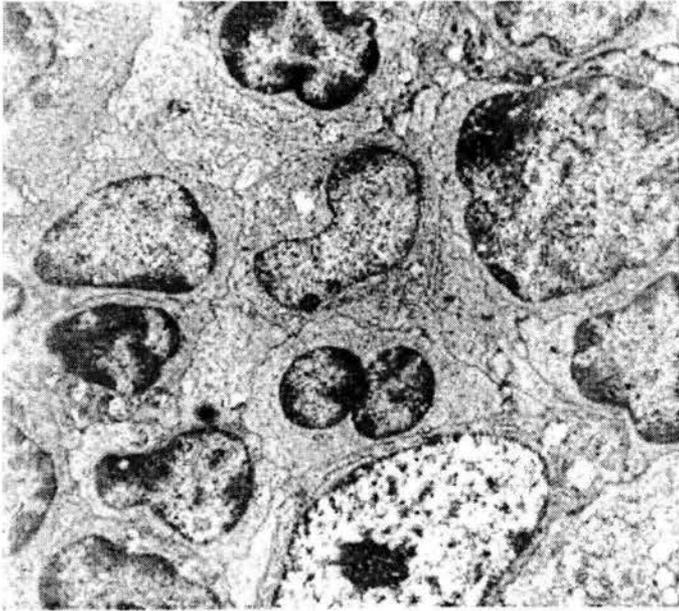


Fig. 17. Linfocito binucleado. 4 semanas (8 inhalaciones). 5000x.

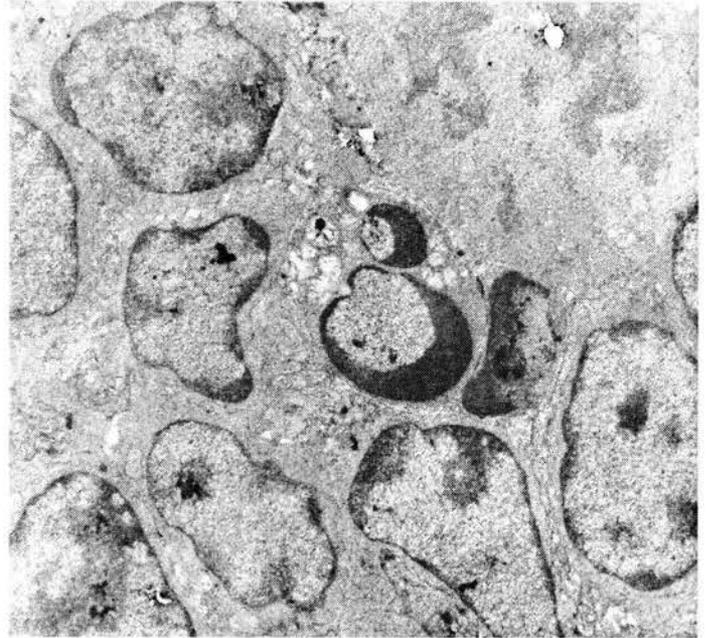


Fig. 18. Apoptosis y linfocitos con cromatina laxa. 8 semanas (16 inhalaciones). 5000x.

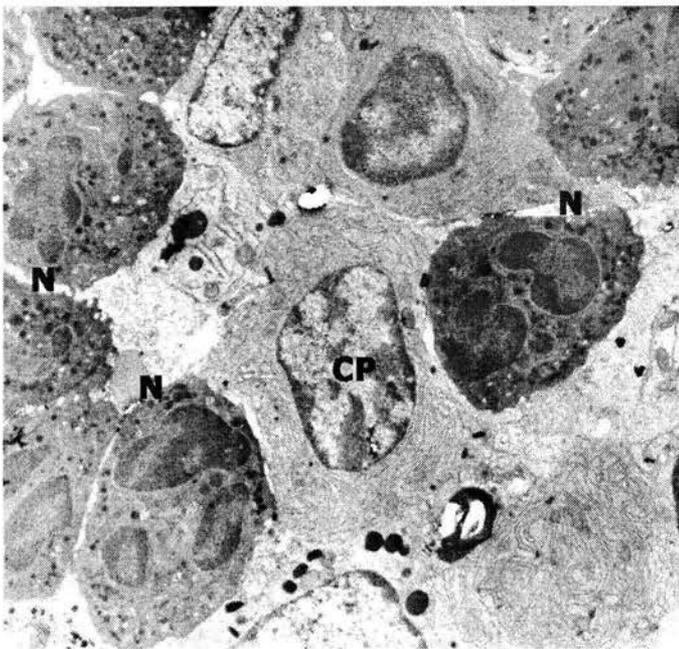


Fig. 19. Infiltrado inflamatorio principalmente por neutrófilos (N). Se observan células plasmáticas (CP). 8 semanas (16 inhalaciones). 5000x.

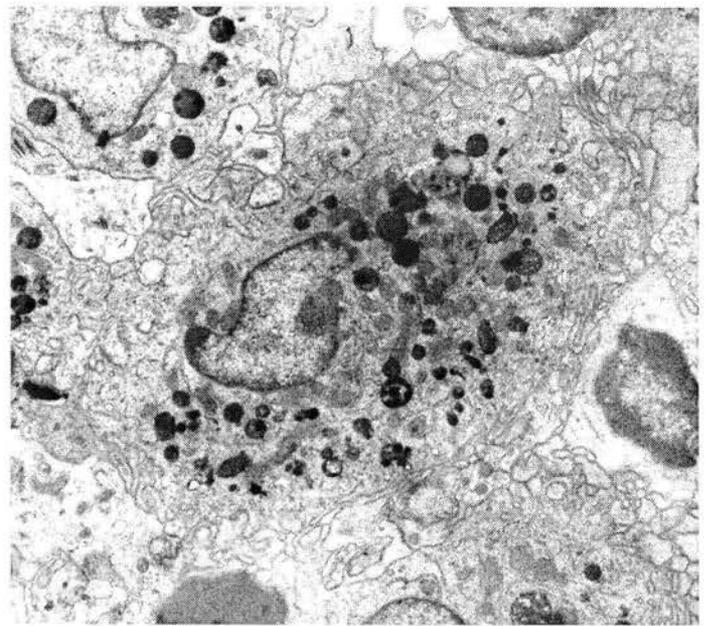


Fig. 20. Macrófago en el infiltrado inflamatorio. 12 semanas (24 inhalaciones). 5000x.

TIMO

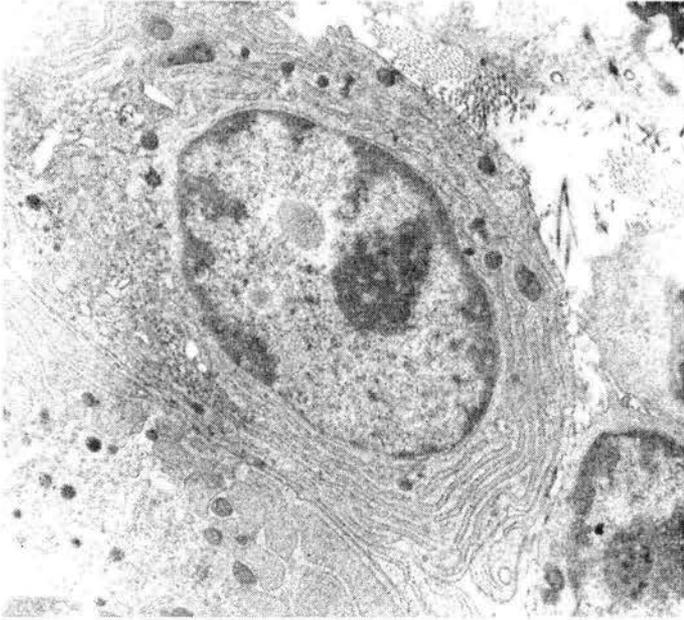


Fig. 21. Célula plasmática. 8 semanas (16 inhalaciones). 5000x.

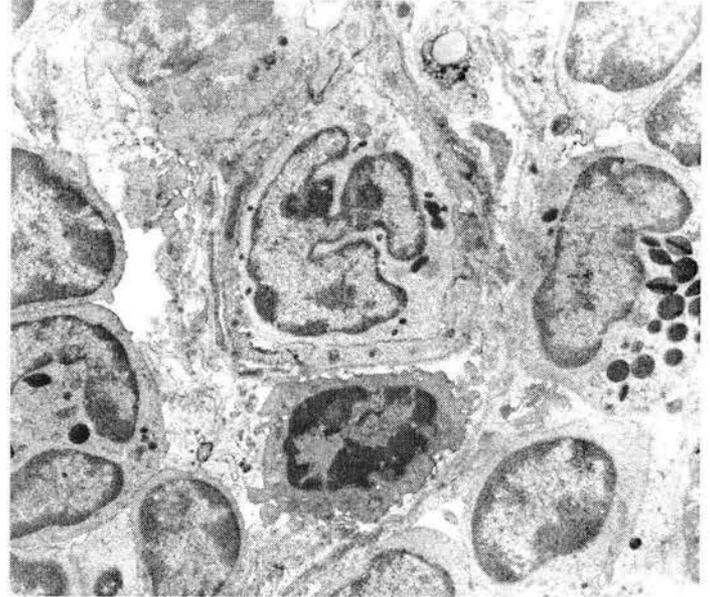


Fig. 22. Necrosis, eosinófilos (E) y en el centro, una célula de características neoplásicas. 8 semanas (16 inhalaciones). 5000x.



Fig. 23. Seudoinclusión nuclear. 8 semanas (16 inhalaciones). 8000x.

MEDULA OSEA

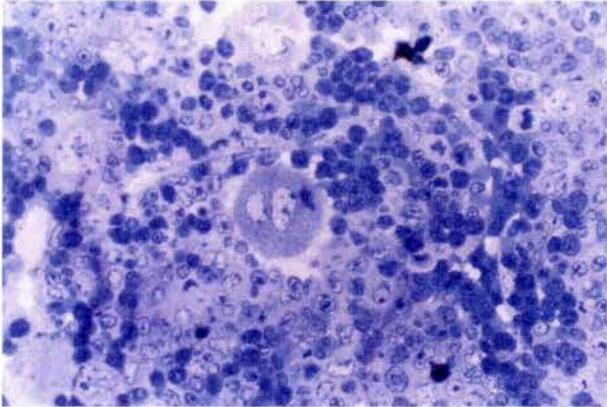


Fig. 24. Megacariocito en el centro del campo en un control. 400x.

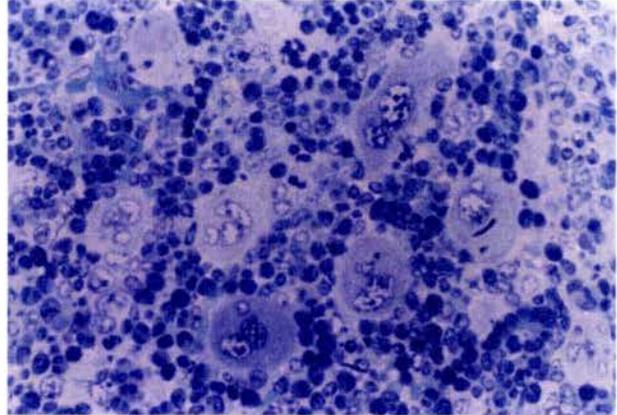


Fig. 25. Se observan 6 megacariocitos, algunos de mayor tamaño y más poliploides. 8 semanas (16 inhalaciones). 400x.

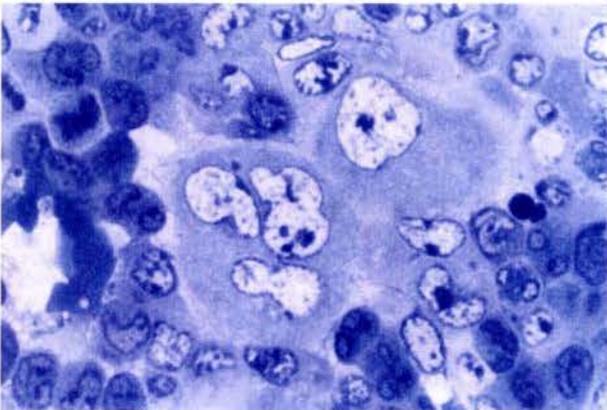


Fig. 26. Megacariocitos en un control. 1000x.

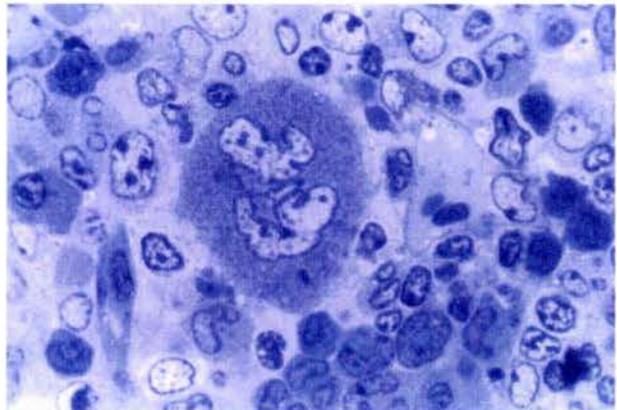


Fig. 27. Megacariocito con núcleo más lobulado (mayor ploidía). 4 semanas (8 inhalaciones). 1000x.

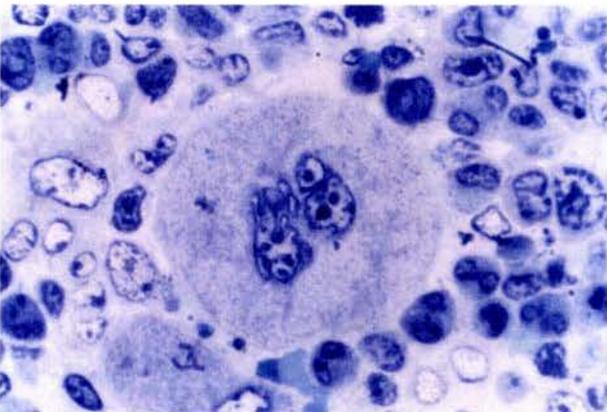


Fig. 28. Megacariocito de mayor tamaño. 8 semanas (16 inhalaciones). 1000x.

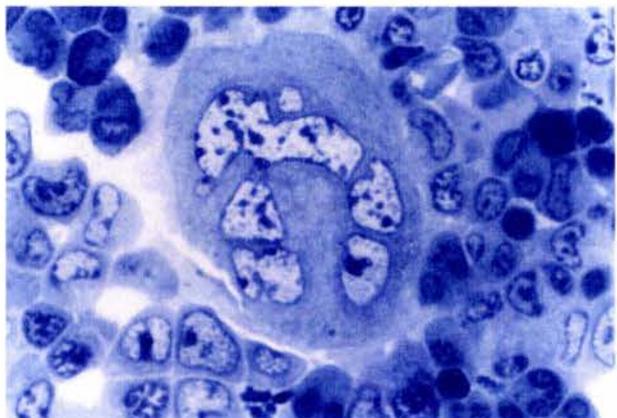


Fig. 29. Megacariocito grande y poliploide. 12 semanas (24 inhalaciones). 1000x.

MEDULA OSEA

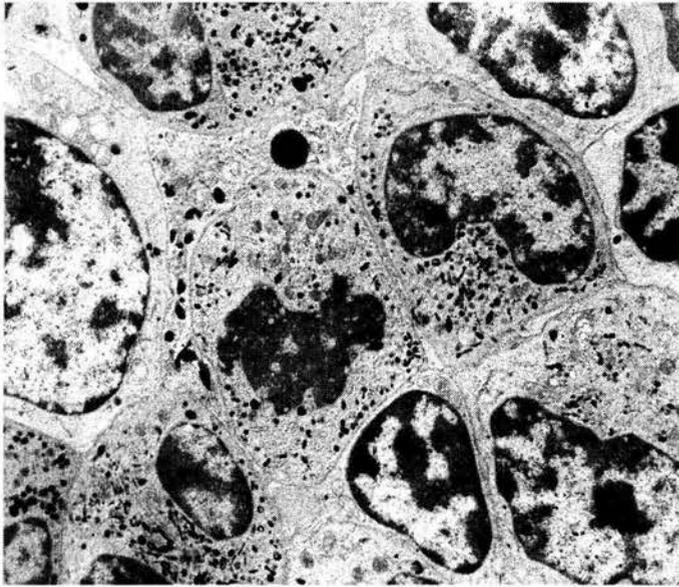


Fig. 30. Se observa una imagen de mitosis en el centro y varias células de la serie granulocítica en un control. 5000x.



Fig. 31. Vaso sanguíneo con células endoteliales dañadas y en el centro, una plaqueta (P). 4 semanas (8 inhalaciones). 5000x.

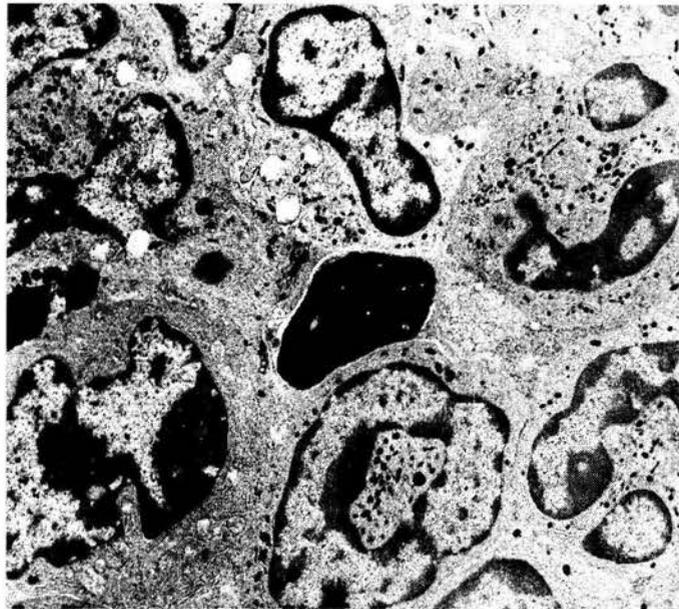


Fig. 32. En el centro se observa una zona hiperdensa que corresponde a necrosis. 4 semanas (8 inhalaciones). 5000x.

MEDULA OSEA

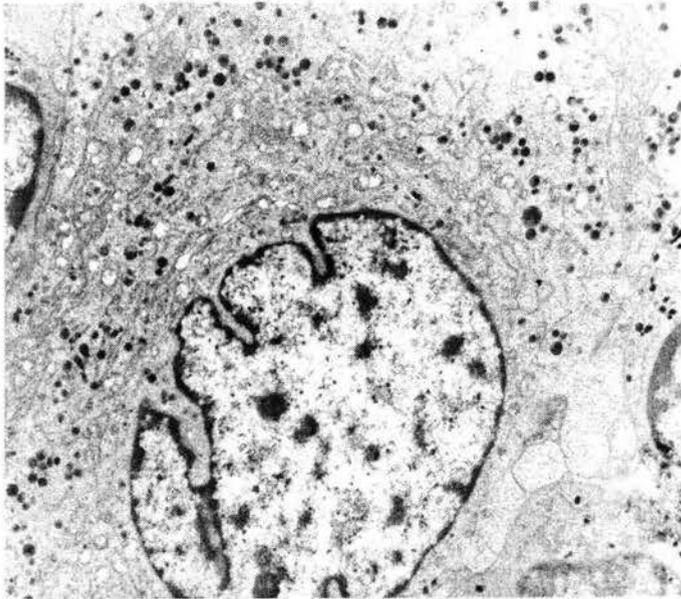


Fig. 33. Megacariocito normal. 5000x.

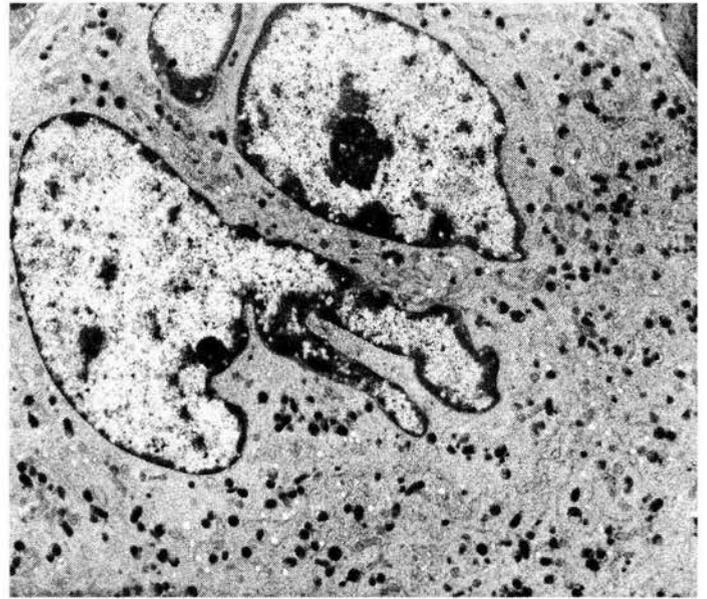


Fig. 34. Megacariocito de mayor tamaño y más lobulación nuclear. 4 semanas (8 inhalaciones). 5000x.

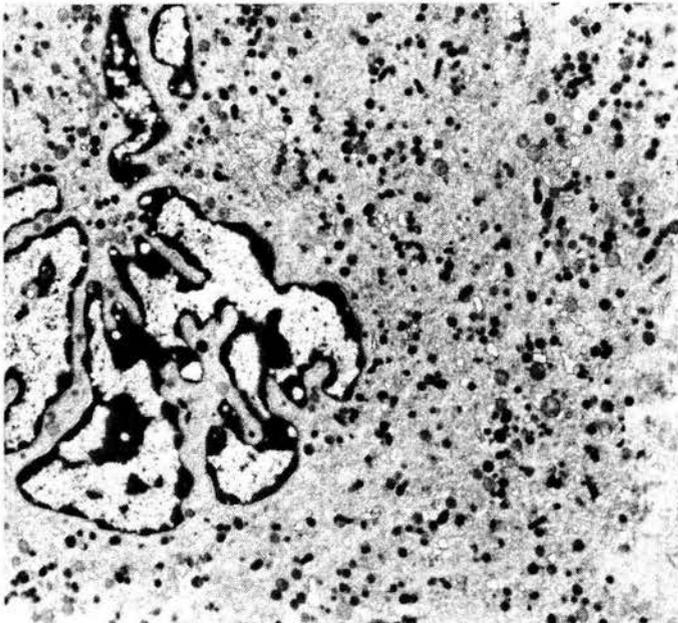


Fig. 35. Megacariocito grande y poliploide. 8 semanas (16 inhalaciones). 5000x.

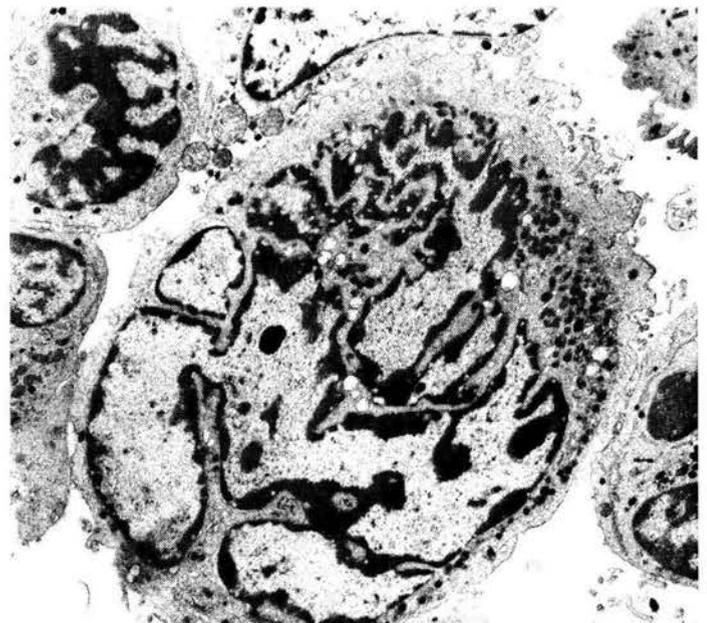


Fig. 36. Megacariocito residual. Se observa el núcleo grande y multilobulado. 12 semanas (24 inhalaciones). 5000x.