



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE BAZO SECUNDARIAS A LA  
INHALACIÓN AGUDA, SUBAGUDA Y CRÓNICA DE PENTÓXIDO DE  
VANADIO. MODELO EN RATÓN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCIÓN ESCOLAR

m346898



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Gabriela Piñón Zárate

FECHA: 17 Agosto 2005  
FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Alteraciones morfológicas de bazo secundarias a la inhalación aguda, subaguda y crónica de pentóxido de vanadio. Modelo en ratón".

realizado por Piñón Zárate Gabriela

con número de cuenta 098330564 , quien cubrió los créditos de la carrera de:  
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director
- Propietario Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
- Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García
- Propietario Dra. Laura Colín Barenque
- Suplente Dra. María Rosa Avila Costa
- Suplente Biol. Patricia Mussali Galante

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávéz

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE BAZO SECUNDARIAS A LA INHALACIÓN  
AGUDA, SUBAGUDA Y CRÓNICA DE PENTÓXIDO DE VANADIO. MODELO EN  
RATON**

## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

---

**BEBECITO, MANITA (MADE), BICHO RARO, PRÍNCIPE Y FOSFOLÍPIDO** les dedico este trabajo con todo mi cariño, ustedes son todo en mi vida, los quiero muchísimo. Pero, sobre todo a **BEBÉ** y **MADE** porque ustedes estuvieron ahí ayudándome y apoyándome siempre, no se que haría sin ustedes. Este trabajo es suyo, ojalá les guste.

**TERE** ¡¡¡Tengo tanto que agradecerte!!! Gracias por acogerme, apoyarme, ayudarme en todo momento. Gracias por todos los bonitos momentos que hemos pasado en el laboratorio. Gracias por enseñarme tantas cosas, por corregir mis errores y sobre todo, gracias por la seguridad que siempre me has brindado. Te quiero mucho y te dedico este trabajo.

A mi **LULA (CITO C)**, ¡¡¡por fin se terminó todo **CITO**!!! Tú fuiste la persona que vivió más de cerca todo este proceso conmigo, muchísimas gracias. Te dedico con todo mi cariño este trabajo.

A las **CHICAS (MARS y GABITA)**: las quiero mucho mucho. Gracias por siempre estar conmigo, por todo su apoyo y sobre todo por todos los momentos que pasamos juntas.

**ADRIANA**: ojalá te guste como quedó lo que empezamos. Muchísimas gracias por enseñarme quienes eran los megacariocitos y por toda tu paciencia que tuviste conmigo. Gracias por todo tu apoyo, porque a pesar de la lejanía siempre te preocupaste por mí. Te quiero mucho.

**ROSE**, siempre me ayudaste en todo (desde las imágenes hasta la comida), ¡¡¡Gracias!!! Pero lo que más te agradezco es por estar ahí cuando más triste estaba, tú siempre me consolaste ¡¡Muchísimas gracias!! Te dedico este trabajo con todo mi cariño.

**PATITO** muchas gracias por todo, sobre todo por tu cariño y por aquellos momentos que pasamos haciendo dulces. Gracias.

**LAURA**, durante el tiempo que he estado en el laboratorio siempre has sido muy buena conmigo, además que siempre conté contigo. Muchas gracias.

También dedico este trabajo a mi **EQUIPO, MICHELITA, SERGIO, JOSE LUIS, ANITA Y FIDENCIO**. Muchas gracias por su amistad y apoyo.

Y por supuesto dedico este trabajo a **SANDRITA y GALAMONCITO**. Muchas gracias por los bonitos momentos que pasamos en la Facultad, nunca lo olvidaré.

Finalmente me gustaría dar las gracias a todas las personas que aportaron su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

---

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Un agradecimiento a:

M. en C. Patricia Bizarro Nevarez  
M.C. Silvia Antuna Bizarro.  
M.C. Adrián Roldan Zárate.  
Verónica Rodríguez  
Victor Delgado

Por su valiosa cooperación técnica en la realización de este proyecto.

---

## ÍNDICE

---

<b>Tema</b>	<b>Página</b>
1. Resumen	8
2. Introducción	9
2.1. Contaminación ambiental	9
2.2. Contaminación por metales pesados y sus consecuencias	11
2.3. Vanadio	12
2.3.1. Características Generales	12
2.3.2. Fuentes	13
2.3.3. Usos del vanadio	14
2.3.4. Vías de exposición	15
2.3.5. Niveles monitoreados de vanadio	15
2.3.6. Toxicocinética	15
2.3.7. Efectos en la salud	16
2.3.8. Mecanismos de acción	17
2.3.9. Efectos en el sistema linfo-hematopoyético	18
2.4. Bazo	19
2.5. Megacariocitos	21
2.5.1. Megacariopoyesis	22
2.5.2. Factores de crecimiento y proteínas implicadas en la megacariopoyesis	23
2.5.3. Ultraestructura y citoquímica de Megacariocitos	24
2.5.4. Formación de plaquetas	24
3. Justificación	25
4. Objetivos	25
5. Método	26
6. Resultados.	28
6.1. Microscopia de Luz	28
6.1.1. Análisis Cualitativo	28
6.1.2. Análisis Cuantitativo	32
6.2. Microscopía Electrónica de Transmisión	34
7. Discusión	38
7.1. Efectos del vanadio en la megacariopoyesis	38

7.2. Otros efectos en el bazo	40
7.2.1. Proliferación de centros germinales, apoptosis y necrosis	40
7.2.2. Células binucleadas	43
8. Conclusiones	44
9. Referencias	46

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATPasa	Adenosin Tri Fosfatasa
BFU-Meg	Unidad bipotencial formadora de colonias de Megacariocitos
Ca- ATPasa	Adenosin Tri Fosfatasa de calcio
CFU- Meg	Unidad formadora de colonias de megacariocitos
c-Mpl	Receptor de Trombopoyetina
CO	Óxido de carbono
CSF- Meg	Factor estimulador específico de colonias de megacariocitos
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
ER $\beta$	Receptor de estrógenos beta
GM- CSF	Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>	Vanadato
IL- 1	Interleucina 1
IL- 11	Interleucina 11
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
JNK	Cinasa Junos
MAPK	Proteinas Cinasas activadas por mitogenes
NADH	Nicotina Adenina Dinucleotido

NF-E2	Factor Nuclear Eritroide 2
NF-kb	Factor Nuclear –kb
NIOSH	Instituto Nacional para la Seguridad y Salud ocupacional
NO <sub>2</sub>	Óxido Nítrico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PM	Partículas suspendidas
Ppm	Parte por millón
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SCF	Factor estimulador de Células Troncales
STAT5	Proteínas activadoras de señales de transcripción
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Tpo	Trombopoyetina
TSP	Partículas suspendidas totales
US- EPA	Environmental Protection Agency
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de vanadio
VO <sup>2+</sup>	Vanadil
WHO	Organización Mundial de la Salud

## 1. RESUMEN

---

El vanadio es uno de los elementos que han tomado mayor importancia como contaminante ambiental, dado que es el principal componente del petróleo (en especial del mexicano), gasolina y sus desechos, además que sus niveles han aumentado en el tejido pulmonar de los habitantes de la Ciudad de México. El compuesto más abundante y tóxico es el pentóxido de vanadio, cuya principal vía de absorción es la inhalada y es transportado por transferrina y albúmina hacia el resto del organismo. El pentóxido de vanadio provoca trombocitosis y daño en médula ósea, de manera que el estudio del bazo, al ser un órgano hematopoyético en roedores, es muy importante para conocer más a fondo el efecto del vanadio en los órganos linfo-hematopoyéticos. Se utilizaron 72 ratones CD1 que se expusieron a inhalación de  $V_2O_5$  al 0.02M una hora dos veces por semana durante 12 semanas. Se pesaron los bazos y se tomaron muestras para análisis con microscopía de luz y microscopía electrónica de transmisión. Posteriormente, se determinó el número y tamaño de megacariocitos. Nuestros resultados en Microscopía de luz mostraron un aumento en el número y tamaño de megacariocitos. Igualmente se encontró proliferación de tejido linfoide, tanto en nódulos linfoides como de manera difusa, además de presencia de linfocitos binucleados. Mientras que en microscopía electrónica, se observó mayor maduración en los megacariocitos (aumento en el número de gránulos, membranas de demarcación y mayor lobulación nuclear), aumento en el número de leucocitos, linfocitos activos, células binucleadas, apoptosis y necrosis. Estos hallazgos sugieren una respuesta inmune activa, liberación de interleucinas (IL 3, IL 6 e IL11) y Trombopoyetina que, al ser factores de crecimiento de megacariocitos, podrían ser la causa de esta proliferación, asimismo, el efecto del vanadio podría estar presente en las vías de señalización esenciales en la maduración y proliferación de megacariocitos. Se conoce que el vanadio provoca la liberación de especies reactivas del oxígeno, de manera que es posible que éstas estén involucradas en la activación y proliferación de linfocitos y en la presencia de apoptosis y necrosis. La existencia de un mayor número de células necróticas que apoptóticas sugiere un evento inflamatorio, lo cual ayudaría a explicar la proliferación de leucocitos y activación de linfocitos. Mientras que los linfocitos binucleados pueden ser el resultado de la interacción del vanadio con proteínas del citoesqueleto, cuerpo medio, centrosoma o con el DNA, puesto que cambios en estas proteínas y en el material genético provocan la formación de células binucleadas.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

---

Se denomina contaminación a la presencia de humos, gases, vapores tóxicos, organismos y energía (e.i. ruido, radiación, calor) en la atmósfera, agua o suelo, potencialmente dañinos para el ambiente y la salud procedentes de los residuos de la actividad humana (Freeman. 1998; Briggs. 2003). La contaminación ambiental es un problema mundial, sin embargo, las zonas en las que se concentra el problema son las megaciudades, las cuales se caracterizan por albergar más de 10 millones de habitantes (Molina y Molina. 2004), quienes diariamente liberan toneladas de residuos contaminantes al ambiente (Ezcurra, *et al.* 1996) debido a sus actividades diarias (domésticas, agricultura, recreación, transporte) (Briggs, 2003).

Inicialmente los principales contaminantes estudiados fueron los compuestos de sulfato, puesto que éstos son liberados de la combustión de aceites. Hoy en día, los compuestos que se encuentran en los residuos liberados por los automóviles, principalmente partículas liberadas de la combustión de Diesel y gasolina (Nadal, *et al.* 2004); actividades industriales, incineración de basura (Briggs. 2003), generación de energía y solventes se han convertido en la principal causa de contaminación en las grandes ciudades (Molina y Molina. 2004; Hannigan, *et al.* 2005). De manera que diariamente las personas que habitan las megaciudades se encuentran expuestas a compuestos que se caracterizan por ser muy tóxicos y volátiles como: el ozono, óxido nítrico (NO<sub>2</sub>), óxido de carbono (CO) (Katsouyanni. 2003), benceno, metano, solventes, compuestos orgánicos y otros, los cuales pueden provocar alteraciones en la salud (Briggs. 2003), como lo demostró un estudio realizado en niños que habitan la Ciudad de México, la cual es una de las ciudades con mayores índices de contaminación. Se indicó que las personas que estaban expuestas a concentraciones muy altas de partículas contaminantes (0.48ppm) presentaban epistaxis, nariz seca, tos, insuficiencia respiratoria y dolor de pecho, mientras que los niños que habitaban una zona con bajos índices de contaminación (0.08ppm) no presentaron lo anterior (Calderón, *et al.* 2000).

A pesar que las emisiones contaminantes generadas por emisiones antropogénicas (Newman y McIntosh. 1991) se caracterizan por ser la principal fuente de contaminación

ambiental, las fuentes naturales también pueden ser significativas, como son la contaminación por radón (se encuentra principalmente en minas y es considerado carcinógeno) (Boffetta y Nyberg. 2003) las emisiones de arsénico liberadas en lagos y lagunas de las rocas cercanas a éstos (Briggs. 2003), la acumulación de metales pesados en los suelos y las partículas contaminantes formadas en las erupciones volcánicas, incendios forestales y la erosión eólica, las cuales pueden contener zinc, mercurio, vanadio, hierro, cobalto, níquel, cobre, arsénico, cadmio y antimonio (Freeman. 1998).

Debido a los múltiples problemas que la contaminación provoca, en las últimas décadas se han estudiado las partículas en las cuales se pueden encontrar los compuestos contaminantes (Churg y Braver. 2000). Éstos son liberados a la atmósfera, en su mayoría, en forma de partículas suspendidas totales (TSP), las cuales se han clasificado de acuerdo a su tamaño, i.e, PM10 o con un tamaño menor o igual a  $10\mu\text{m}$  y  $\text{PM}_{2.5}$ ; su origen antropogénico o geológico; por fuente, productos de la combustión o desechos de automóviles; o propiedades fisicoquímicas como la solubilidad (Englert. 2004)

Tanto las PM10 como las PM2.5 son liberadas por la combustión de todo tipo, por ejemplo en los incendios, erosión eólica, erupciones volcánicas, combustión de gasolinas, aceites, incineración de basura, etc (INE. 1996) y se encuentran en altas concentraciones principalmente en las grandes urbes (por ejemplo, en la Ciudad de México sus índices son de 260 y el máximo nivel permitido es de  $150\mu\text{m}^3$ ) (Mugica, *et al.* 2001). Éstas pueden contener en su superficie tanto compuestos inorgánicos (silicatos, aluminatos y metales pesados) como orgánicos asociados a partículas de carbono (hollín) (Ghio y Samet, 1999), pero los compuestos que se encuentran en mayor concentración son los metales y metaloides, así como los hidrocarburos aromáticos, los cuales se generan a partir de la combustión de aceites, gasolinas y petróleo (Fernandez, *et al.* 2003).

Dado la cantidad de compuestos tóxicos que se pueden encontrar en las TSP, se les ha proporcionado gran atención, principalmente a las partículas más pequeñas, las PM2.5, debido a que pueden ser inhaladas con facilidad y penetrar al sistema respiratorio, lo cual provocaría que los contaminantes alcanzaran la circulación sanguínea e indujeran efectos adversos en los organismos (Freeman, 1998; Ghio y Samet, 1999), como la generación de radicales libres, daño en el ADN, liberación de citocinas inflamatorias (Fernández, *et al.*

2003) y enfermedades respiratorias crónicas, cardíacas e inclusive cáncer (Rosales-Castillo, *et al.* 2001; Englert. 2004).

## **2.2. CONTAMINACIÓN POR METALES Y SUS CONSECUENCIAS**

---

La mayoría de los metales provienen de los minerales, los cuales son sustancias de origen natural, con una composición química característica (Chang, 1999). La mayoría de los metales de transición son insolubles en agua y se encuentran en el ambiente en forma de óxidos (Ghio y Samet, 1999), y los más abundantes en la corteza terrestre son aluminio, hierro, calcio, magnesio, sodio, potasio, titanio y manganeso (Chang, 1999), aunque en ciertas condiciones estos elementos pueden acumularse hasta alcanzar concentraciones tóxicas (Newman y McIntosh. 1991).

De todos los elementos que se encuentran en la naturaleza, aquellos que tienen una mayor toxicidad son los metales pesados tales como: plata, cadmio, cromo, cobalto, cobre, hierro, mercurio, molibdeno, níquel, plomo, zinc, aluminio y selenio, y son potencialmente tóxicos dependiendo de la dosis a la que sean expuestos los organismos (Thomson y McNeill. 1998), al rango de tolerancia de las especies a los compuestos (Newman y McIntosh. 1991), vía de administración además de la toxicocinética del compuesto (Briggs. 2003; Järup. 2003), aunque plomo, cadmio, mercurio, zinc, cobre, arsénico son los metales que han sido más estudiados por sus efectos en la salud de personas ocupacionalmente expuestas, dado que estos metales se liberan principalmente en emisiones industriales (mercurio, cadmio y plomo) y desechos formados en las minas (cadmio, zinc, plomo y cobre) (Järup. 2003).

Los metales son conocidos por causar efectos adversos en la salud. Estudios epidemiológicos, han indicado que metales como el cadmio pueden provocar disfunción tubular en los riñones, provocando la aparición de proteínas en la orina; osteoporosis y cáncer. Mientras que el arsénico induce hepatomegalia, hemólisis y cáncer de pulmón, riñón y vejiga (Järup. 2003; Nadal, *et al.* 2004) y el plomo, uno de los contaminantes con gran impacto en la Ciudad de México en los 90's, puede producir dolor de cabeza, irritabilidad, dolor de estómago, dificultad en la concentración en niños, psicosis, confusión, pérdida de la conciencia y anemia microcítica (Vallejo, *et al.* 2002; Järup. 2003).

Además, se han estudiado los mecanismos de acción que presentan los metales, uno de ellos es el daño en los sistemas enzimáticos, que ocurre cuando los iones metálicos se unen a las enzimas causando un cambio en su configuración tridimensional, que resulta en el cambio o pérdida de su función catalítica específica. Otro mecanismo común es el daño al ADN, que sucede cuando el metal se une a él, lo que provoca daños genéticos por alteraciones en la transcripción (Newman y McIntosh. 1991). Asimismo, los metales pueden causar lesiones o activación de factores de transcripción por estrés oxidativo (Ghio y Samet, 1999), peroxidación de lípidos (Ohba, *et al.* 1994), apoptosis y necrosis (Thomson y McNeill. 1998).

En la Ciudad de México ha aumentado el nivel de enfermedades relacionadas con la exposición a partículas suspendidas que contienen metales (Rosales -Castillo, *et al.* 2001; Calderón, *et al.* 2000; Vallejo, *et al.* 2002), asimismo la concentración de metales en la atmósfera de la Ciudad de México ha aumentado, como lo demostró de forma indirecta Fortoul y cols. en el 2002 al comparar la concentración de metales en tejido pulmonar de personas que vivieron en los 60's con los que vivieron en los 90's. En este estudio observaron aumento en la concentración de varios metales entre ellos el vanadio, el cual ha adquirido cada vez más importancia desde el punto de vista ambiental (Mugica, *et al.* 2001) y que será el motivo de éste trabajo.

## **2.3. VANADIO**

### **2.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES**

---

En 1801 Andrés Manuel del Río descubrió al vanadio en México y lo llamó pancronium (García- Guevara, 1996). Mas adelante, inspirados por la variedad de colores generados por este metaloide en solución, Sefstrôm y Berzelius llamaron a este nuevo elemento vanadio, en honor a la diosa Vanadis en 1830 (Morinville, *et al.* 1998).

El vanadio es el producto principal de la combustión de gasolina y petróleo, dado que es su elemento más abundante (WHO, 2000; Mugica, *et al.* 2002). Por lo tanto se encuentra en altas concentraciones en las TSP y se le ha relacionado con varios trastornos en la salud (Chen, *et al.* 2001)

Por sus características químicas, se identifica por ser el primer elemento del quinto grupo de la tabla periódica de los elementos. Presenta diferentes estados de oxidación que van desde el -1 a +5, pero se encuentran con mayor frecuencia +3, +4 (vanadil) y +5 (vanadato) (Byczkowski y Kulkarni. 1998; Thomson y McNeill. 1998; WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002,). El compuesto de vanadio más abundante, más utilizado (por ejemplo, en la formación de aleaciones) (WHO, 2000) y más tóxico es el pentóxido de vanadio (Morinville, *et al.* 1998), también conocido como anhídrido vanádico ó pentóxido de divanadio y existe en un estado pentavalente como cristales amarillos, rojos e inclusive verdes (WHO, 2000)

Debajo de un pH de 3.5, el vanadio existe como vanadil ( $VO^{2+}$ ), mientras que en soluciones alcalinas el orto- vanadato es la forma prominente. En soluciones neutras, el vanadio se comporta de forma pentavalente ( $H_2VO_4$ ) (García- Guevara, 1996), el cual es el compuesto más tóxico, ya que puede entrar con facilidad a la célula donde es reducido a vanadil. Posteriormente el vanadil interactúa con las moléculas celulares, para más tarde involucrarse en la generación de radicales libres (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002). La conversión de vanadato a vanadil *in vivo* no es instantánea, el proceso puede tomar de 15 a 30 minutos después de la exposición (Thomson y McNeill. 1998).

### 2.3.2 FUENTES

---

Una de las fuentes de vanadio es el petróleo, siendo el venezolano (80% de especies de vanadio) y el mexicano los que contienen las más altas concentraciones (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002). Por lo general, el petróleo crudo contiene impurezas metálicas y es en ellas en donde podemos encontrar al vanadio en forma de un complejo organo-metal (US. EPA, 1991a,b). Igualmente, durante la combustión de aceites, carbón y gasolinas (los cuales pueden contener 0.3 a 1180 ppm de vanadio) (Ress, *et al.* 2003); en calderas, calentadores de agua y hornos (Byczkowski y Kulkarni. 1998; Ivancsits, *et al.* 2002), el vanadio se desprende en forma de pentóxido de vanadio sobre los residuos sólidos (hollín y ceniza), los cuales pueden contener de 1 al 60% de pentóxido de vanadio (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000). Asimismo, se libera durante las erupciones volcánicas, la erosión eólica y en los aerosoles marinos

(Fortoul *et al.* 2002; WHO 2000; Mugica, *et al.* 2001; Baran. 2003). Es importante señalar que estas fuentes son consideradas como las principales generadoras de vanadio (García Guevara. 1996; WHO. 2000;) y para el personal ocupacionalmente expuesto (Al-Bayati, *et al.* 1992; Byczkowki y Kalkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002). Dado lo anterior, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomendó que el límite de exposición a vapores y polvos de  $V_2O_5$  sea  $0.05\text{mg}/\text{m}^3$  por un tiempo de 15 minutos (U.S. EPA. 1991b), no obstante, la World Health Organization dio a conocer que existen personas ocupacionalmente expuestas a concentraciones que van desde 0.05 a  $5.58\text{mg}/\text{m}^3$  (WHO, 2000).

Por otro lado, el vanadio no es un elemento esencial para los seres humanos, no obstante, se consume una relativa cantidad de éste al día (aproximadamente  $10\mu\text{g}$  por día), puesto que los alimentos son una de las principales fuentes de vanadio (los mariscos, la pimienta y los hongos contienen altas concentraciones de este elemento) (U.S.EPA, 1991b; WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002).

### **2.3.3. USOS DEL VANADIO**

---

Son muy variados los usos que tiene el vanadio, uno de ellos son los fines terapéuticos, ya que los componentes de vanadio (por ejemplo, el metavanadato de sodio) han sido administrados como tratamiento contra la anemia, tuberculosis, diabetes, sífilis (Morinville, *et al.* 1998; Thomson y McNeill. 1998; Ivancsits, *et al.* 2002), así como para la disminución de los niveles de colesterol (Fortoul, *et al.* 2002) y triglicéridos en sangre (Morinville, *et al.* 1998; Thomson y McNeill. 1998; Mukherjee, *et al.* 2004)

Por otro lado, se utiliza para fabricar herramientas e implantes ortopédicos, como revelador de fotos, semiconductor, pigmento en cerámicas, producción de ácido sulfúrico o como filtro contra los rayos UV en algunos anteojos (WHO, 2000; Ivancsits, *et al.* 2002).

#### **2.3.4. VIAS DE EXPOSICIÓN**

---

La vía de absorción más importante es la inhalada, dado que se puede absorber hasta el 35% de la dosis inhalada (U.S. EPA. 1987), lo cual es muy importante puesto que el vanadio se ha convertido en uno de los principales contaminantes del aire en las grandes urbes (Al-Bayati, *et al.* 1992; Byczowski y Kulkarni. 1998). Mientras que la vía de exposición más importante es la enteral, sin embargo, la absorción del vanadio en el tracto intestinal es muy escasa (solo se absorbe del 0.5 al 2% de la cantidad ingerida) (WHO, 2000), además, no hay que olvidar que la absorción del vanadio en el tracto digestivo, también depende de la dieta (ingestión de carbohidratos, fibras, proteínas, elementos traza, agentes quelantes y electrolitos) (Thomson, *et al.* 1998). Además, el vanadio también es absorbido por la piel cuando se encuentra en forma de sales en solución acuosa, no obstante, la absorción es muy pobre (U.S. EPA. 1987)

#### **2.3.5. NIVELES MONITOREADOS DE VANADIO**

---

En el caso de México, solamente se han hecho estudios en el D.F. Mugica, *et al.* reportaron que la concentración de vanadio ha aumentado con el paso del tiempo, además señalan que las concentraciones de vanadio en las diferentes zonas del Distrito Federal son de  $0.13\mu\text{g}/\text{m}^3$  a  $0.24\mu\text{g}/\text{m}^3$  (Riveros- Rosas, *et al.* 1997).

De la misma forma se conoce de forma indirecta, que la concentración de vanadio en la Ciudad de México aumentó de forma significativa gracias a un estudio realizado por Fortoul y cols en el 2002.

#### **2.3.6. TOXICOCINÉTICA**

---

Los efectos tóxicos del vanadio dependen del compuesto, la dosis y la ruta de administración (Evangelou. 2002). Los óxidos de vanadio pueden ser absorbidos con facilidad en los pulmones y con mayor dificultad en los intestinos (Thomson y Kulkarni. 1998; Byczowski y McNeill. 1998; WHO, 2000). Su distribución en la circulación es rápida (1- 11/2) (WHO. 2000) y puede experimentar autooxidación en presencia de oxígeno (Baran. 2003), provocando un aumento en los niveles de vanadato en el plasma (García-Guevara. 1996; Byczowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000), aunque también se puede

encontrar vanadil en concentraciones menores (Baran. 2003). El vanadio en el plasma se puede unir a albúmina, transferrina y hemoglobina (Thomson y McNeill. 1998), las cuales lo transportarán a todo el organismo; sin embargo, existen órganos en los que se acumulan altas cantidades de este metal como son los huesos (Baran. 2003), riñones, hígado, pulmones (Thomson y McNeill. 1998) y bazo (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Mukherjee, *et al.* 2004) .

Cuando el vanadio ya se encuentra en los órganos generalmente se introduce en la célula gracias al mecanismo de transporte de fosfatos (Baran. 2003), posteriormente es reducido por glutathione, ascorbato y cisteína, lo que provoca un alto nivel de vanadilo en los órganos (García- Guevara, 1996; Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000) y que éste se una a catecolaminas u otros péptidos (Thomson y McNeill. 1998; Mukherjee, *et al.* 2004)

Sin embargo el vanadio que no es absorbido se elimina principalmente en la orina y en menor grado en heces, con una cinética de eliminación bifásica compuesta de una fase rápida (15 a 40 horas) y una fase lenta terminal (40 a 50 días), que generalmente se utiliza como monitor biológico en los trabajadores que están expuestos a vanadio (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Mukherjee, *et al.* 2004).

### **2.3.7. EFECTOS EN LA SALUD**

---

La inhalación aguda de polvo con altas concentraciones de vanadio puede causar en los humanos daños en el tracto respiratorio, irritación de pulmones, congestión, estornudos, dolor de pecho y garganta (Byczkowski y Kulkarni. 1998); así como incidencia de cáncer en residentes de ciertas áreas metropolitanas (Ramírez, *et al.* 1997)

También se han llevado a cabo estudios en personas ocupacionalmente expuestas a pentóxido de vanadio, en donde se reportan alteraciones como: necrosis en hígado, lengua verde, pérdida de peso (Al Bayati, *et al.* 1992), irritación de la piel, del tracto respiratorio, cambios en el número de células inflamatorias (Carter, *et al.* 1997; Woodin, *et al.* 1998; Ivancsits, *et al.* 2002) e irritación de los ojos (Chen, *et al.* 2001), aunque no se mostraron cambios en el conteo hemático (Ivancsits, *et al.* 2002).

### 2.3.8. MECANISMOS DE ACCIÓN

---

En el campo de las acciones toxicológicas, el vanadio juega un importante papel, ya que toma parte en la fosforilación y activación de ERK, JNK y p38, también denominadas MAP cinasas y están relacionadas con las vías de señalización que culminan con la activación de factores de transcripción como NF-kb, c-Jun o ATF-2, los cuales regulan la expresión de la transcripción de una gran variedad de genes (Ej. IL-8, IL-6 y TNF $\alpha$ ) que pueden estar involucrados en la regulación de la respuesta inmune (Byczkowski y Kulkarni. 1998; Huang, *et al.* 2000).

El vanadio, de igual forma, puede causar efectos genotóxicos puesto que se han observado células con micronúcleos en médula ósea, linfocitos (Leonard y Gerber. 1998) y fibroblastos (Ivancsits, *et al.* 2002), además de aberraciones cromosómicas y un aumento en la frecuencia de células poliploides y binucleadas en linfocitos humanos tratados con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Roldan y Altamirano, 1990; Ramírez, *et al.* 1997; Rodríguez Mercado, *et al.* 2003), metavanadato de sodio y metavanadato de amonio (WHO, 2000). Lo cual posiblemente sea resultado de la interacción del vanadio con la polimerización de tubulinas, lo que resultaría en alteraciones en la formación y función del uso mitótico (Ramírez, *et al.* 1997; Ivancsits, *et al.* 2002) y la acumulación de células en fase G2 lo que impide que se lleve a cabo la mitosis (Morinville, *et al.* 1998; Zhang, *et al.* 2001)

En lo que se refiere a las transformaciones neoplásicas se demostró que éstas aparecen después de una larga exposición a vanadio, como lo demostraron estudios en los que se expusieron ratones machos y hembras a pentóxido de vanadio (2 y 4mg/m<sup>3</sup>) durante 1 y 2 años. Como resultado se mostraron adenomas, papilomas (WHO, 2000; Chen, *et al.* 2001) y carcinomas (Ress, *et al.* 2003).

De la misma forma, el vanadio puede provocar fibrosis, proliferación celular (Morinville, *et al.* 1998; Ress, *et al.* 2003) y efectos antiapoptóticos (Chen, *et al.* 2001). Sin embargo, se ha observado que este elemento también puede inducir apoptosis y necrosis (Thomson y McNeill. 1998; Ye, *et al.* 1999; D'Cruz y Uckun. 2000; Chen, *et al.* 2001; D'Cruz y Uckun. 2002; Huang, *et al.* 2003; Aragón, *et al.* 2005), las cuales pueden ser desencadenadas por la liberación de radicales libres y peroxidación lipídica; o por las propiedades miméticas con el grupo fosfato que tiene este metal (Morinville, *et al.* 1998).

En el aspecto bioquímico, se ha estudiado que el vanadato se acumula en el espacio intermembranal de las mitocondrias y bloquea la transmisión de electrones a través de la cadena respiratoria, lo que causa la inhibición de la primera unión de NADH y sus sustratos (Byczkowski y Kulkarni. 1998), también provoca cambios en la actividad de  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -ATPasa, Ca-ATPasa, adenilato cinasa, ribonucleasas, fosfofructocinasas y Glucosa-6-fosfato; y la reducción en los niveles de coenzima A en el hígado y de coenzima Q en la mitocondria (WHO, 2000).

Es muy importante señalar que todos los estudios mencionados no tuvieron una administración vía inhalada, es entonces muy importante la realización de estudios en los cuales se utilice esta vía, dado que la principal vía de absorción de este elemento es la inhalada (WHO. 2000).

### **2.3.9. EFECTOS EN EL SISTEMA LINFO-HEMATOPOYÉTICO**

---

Los estudios llevados a cabo en el sistema linfo-hematopoyético de organismos expuestos a vanadio son muy escasos y algunos son contradictorios, por ejemplo: la exposición a metavanadato de amonio, sulfato de vanadil y bisovanadio en ratas no mostraron diferencias en hematocrito, nivel de hemoglobina, cuenta de eritrocitos, linfocitos y plaquetas; porcentaje de reticulocitos y fragilidad osmótica de eritrocitos (Thomson y McNeill. 1998), mientras que otro estudio, con los compuestos antes mencionados, reportó un decremento en la cuenta de eritrocitos y nivel de hemoglobina; y un aumento en el número de reticulocitos (Hogan. 2000), lo cual se deba posiblemente a la dosis utilizada en cada estudio.

Por otro lado, se ha estudiado la respuesta del sistema inmune de los trabajadores expuestos a vanadio, observando que este metal provoca la elevación en los niveles de leucocitos y linfocitos; además de interleucinas (IL-6 e IL-8) y factores de crecimiento ( $\text{TNF}\alpha$ ) (Woodin, *et al.* 1998; Vandenplas, *et al.* 2002). Mientras que estudios con animales expuestos a inhalación de pentóxido de vanadio mostraron los mismos resultados (WHO. 2000) e incluso se demostró que el vanadio podía provocar la activación de linfocitos T  $\text{CD8}^+$  y  $\text{CD4}^+$ ; células B y macrófagos (Qureshi, *et al.* 1999), es entonces que este metal provoca la misma respuesta en personas y animales expuestos, lo cual es muy importante, puesto que se pueden realizar estudios en la respuesta del

sistema inmune de animales después de la exposición vanadio y tratar de correlacionarlos con la respuesta que tendrían las personas expuestas a este elemento.

También el vanadio induce cambios en otras células pertenecientes al sistema inmune. En macrófagos, este metal redujo la habilidad de éstos para interactuar con interferón  $\gamma$  e IL-2, pero incrementó la liberación espontánea de  $O_2$ ,  $H_2O_2$  (Byczkowski y McNeill. 1998), E2, IL-1, IL-6 y  $TNF\alpha$  (Haynes, *et al.* 1993), además este elemento interfirió en la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y en la síntesis de proteínas de estas células (Schuster y Caughman. 2004).

Aun son más escasos los trabajos que se han llevado a cabo en el bazo de organismos expuestos a vanadio. En los cuales se observó necrosis y elevación de la actividad hematopoyética en bazo después de la exposición a metavanadato de amonio (Al- Bayati, *et al.* 1992; Wei, *et al.* 1986). No existen otros proyectos que indiquen los efectos de los distintos compuestos de vanadio en el bazo, por lo tanto es muy importante estudiar los cambios que el pentóxido de vanadio induce en este órgano.

#### 2.4. BAZO

---

El bazo es un órgano linfoide localizado en la parte superior del abdomen bajo la cúpula diafragmática izquierda. Al igual que los ganglios linfáticos, el bazo tiene características de filtro complejo pero a diferencia de ellos está insertado en el torrente sanguíneo. El bazo limpia la sangre eliminando células sanguíneas dañadas, partículas extrañas, es sede de reacciones inmunes ante antígenos arrastrados por la sangre y en algunas especies (ratón) tiene función hematopoyética (Geneser. 1996; Abbas, *et al.* 2004).

Está rodeado por una cápsula de tejido conectivo rico en colágeno, donde se extienden numerosas trabéculas ramificadas de tejido conectivo denso hacia el parénquima, que se subdivide así en gran cantidad de segmentos comunicados entre sí. El parénquima se denomina pulpa del bazo o roja, y se caracteriza por ser una masa blanda, rojo oscura, compuesta por grandes vasos sanguíneos de paredes finas denominados sinusoides esplénicos, que pueden considerarse una forma modificada de capilares de gran tamaño (fig. 1). Están formados por células endoteliales que están en contacto por sus superficies laterales pero carecen totalmente de complejos de unión, de manera que las células sanguíneas pueden pasar fácilmente entre el endotelio (Cormack, *et al.* 1988; Géneser.

1996). Los sinusoides del bazo están a su vez separadas por placas de tejido llamados cordones del bazo o de Billroth que se componen de fibras y células reticulares en cuya trama se albergan diversos tipos celulares como: eritrocitos, plaquetas, megacariocitos, macrófagos, linfocitos y leucocitos, puesto que los vasos arteriales se vacían en los cordones (fig. 1) (Geneser. 1996; Boya. 1996; Abbas, *et al.* 2004).



Figura. 1. Pulpa Roja del Bazo y sus componentes: a arteria, b arteriola, c linfocito, d macrófagos, e capilar arterial, f células endoteliales, g células reticulares, h monocito, i neutrófilo, j eritrocitos, k cordón esplénico, l células endoteliales, m membrana basal, n sinusoides esplénicos (Boya. 1996).

Dispersas en la pulpa roja se observan pequeñas zonas ovales o redondeadas de color blanco grisáceo denominada pulpa blanca ó corpúsculos esplénicos de Malpighi, la cual se compone de tejido linfoide, en su mayoría macrófagos y linfocitos T, que forma vainas periarteriales, de manera que éstas estructuras representan la zona timo dependiente en el bazo, igualmente, en estas zonas se pueden encontrar centros germinativos. Mientras que existen otras estructuras denominadas nodos esplénicos que contienen en su mayoría linfocitos B (fig. 2) (Cormack, *et al.* 1988; Geneser. 1996; Boya. 1996; Abbas, *et al.* 2004)

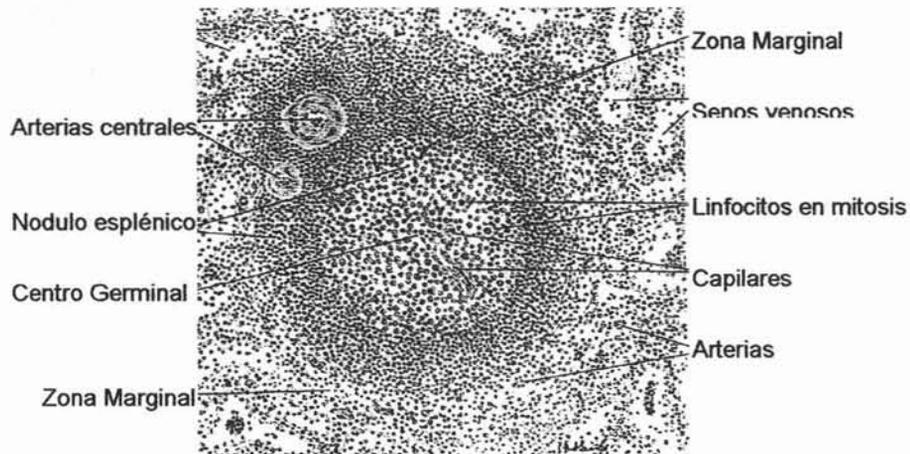


Figura. 2. Componentes de la pulpa blanca (Boya. 1996)

## 2.5. MEGACARIOCITOS

Los megacariocitos son las células más grandes del sistema hematopoyético ya que pueden medir de 20 a 160 $\mu$ m y se clasifican en tres tipos de acuerdo con el grado de maduración de su citoplasma y núcleo (progenitores megacariocíticos, megacariocito inmaduro y megacariocito maduro) (fig. 3) (Gewirtz. 1990; Long. 1998; Ebbe. 1990).

El progenitor megacariocítico es la célula inmadura más reconocible de la serie (fig. 3), tiene un citoplasma altamente basófilo, no granular y núcleo redondeado con uno o más nucleolos, mientras que los megacariocitos inmaduros pueden tener 2 o 4 lóbulos en el núcleo y citoplasma no granular y basófilo (Ebbe. 1990; Long. 1998; Mizutani, *et al.* 2002). Los megacariocitos maduros pueden medir hasta 120 micras, tienen vacuolas citoplasmáticas y pequeños extensiones citoplasmáticos o en la superficie celular, su núcleo es multilobulado y poliploide (4n- 164n) (Gewirtz. 1990; Ebbe. 1990; Baccini, *et al.* 2001) y tienen una gran cantidad de citoplasma con numerosos gránulos (los gránulos densos y los alfa), debido a que sufre de un fenómeno llamado **endomitosis** (división mitótica de la célula sin que se lleve a cabo la citocinesis y cariocinesis), la cual se presenta principalmente en los progenitores megacariocíticos (Gewirtz. 1990; Ebbe. 1990; Long. 1998; Baccini, *et al.* 2001; Shivdasani. 2001; Mizutani, *et al.* 2002).

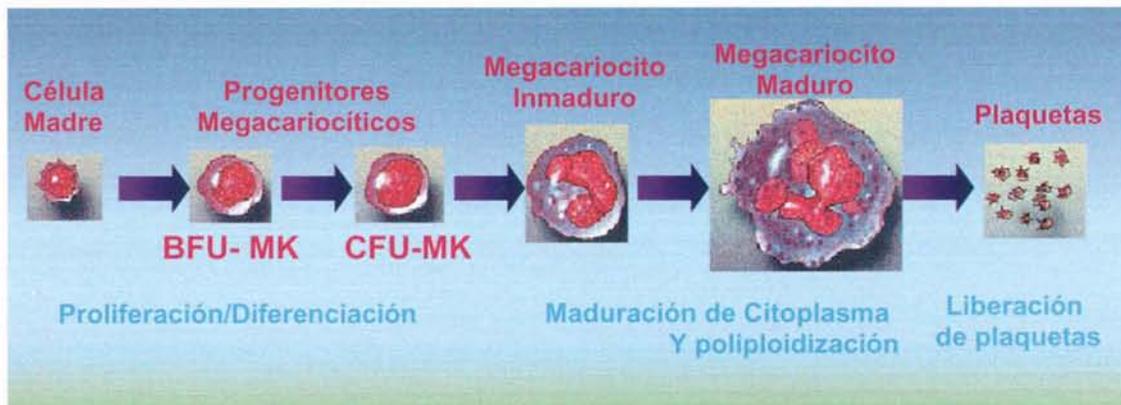


Figura. 3. Estados de maduración de los Megacariocitos

La endomitosis en megacarioblastos y promegacariocitos requieren de la síntesis de ADN y precede a la maduración citoplasmática, aunque ambos fenómenos ocurren casi de forma simultánea (Angchaisuksiri, *et al.* 1999; Shivdasani. 2001; Eto, *et al.* 2002), por lo tanto es posible observar megacariocitos maduros de tamaños, masas nucleares y características citoplasmáticas distintas, no obstante, rara vez se pueden observar megacariocitos produciendo proplaquetas (largas extensiones del citoplasma que posteriormente producirán plaquetas) (Italiano, *et al.* 1999).

### 2.5.1. MEGACARIOPOYESIS

La maduración y desarrollo de megacariocitos tiene una duración de aproximadamente 6 días en humanos, 3 días en perros y de 2 a 3 días en roedores (Burkitt, *et al.* 1993) y comienza en el bazo (en roedores) y médula ósea, con una célula troncal pluripotencial que dará lugar a dos células progenitoras de megacariocitos: la unidad bipotencial formadora de colonias de megacariocitos (BFU-Meg) y la unidad formadora de colonias de megacariocitos (CFU-Meg). Posteriormente ésta última se dividirá y diferenciará en precursores megacariocíticos, los cuales formarán plaquetas. La división y diferenciación de la célula troncal pluripotencial a CFU-Meg está influenciada por el microambiente hematopoyético, las interacciones célula –célula y factores humorales, mientras que la división y división de las CFU- Meg a megacarioblastos es regulada por el factor estimulador específico de colonias de megacariocitos (CSF-Meg) y otras moléculas como Interleucina 6, Interleucina 11 e Interleucina 3 (Ishida, *et al.* 1998; Kaushansky. 1998; Baccini, *et al.* 2001; Mizutani, *et al.* 2002), mientras que el desarrollo de megacariocitos y la producción de plaquetas son principalmente reguladas por trombopoyetina

(Kaushansky. 1998; Metcalf, *et al.* 2002; Kie, *et al.* 2002). Además, la megacariopoyesis difiere únicamente de la eritropoyesis y granulopoyesis en que en ésta hay poliploidización de las células como resultado de la endocitosis o endorreplicación (división nuclear sin división citoplasmática) (Burkitt, *et al.* 1993).

## **2.5.2. FACTORES DE CRECIMIENTO Y PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MEGACARIOPOYESIS**

---

La liberación, desarrollo y proliferación de megacariocitos dependen de diversos factores en la célula, por ejemplo: tener un citoesqueleto intacto (microtúbulos y microfilamentos), glucólisis activa e integridad celular (Lecine, *et al.* 1998). Asimismo, éstos procesos son dependientes de varios factores de crecimiento para su desarrollo, en especial de la Trombopoyetina (Tpo), la cual es un factor humoral que se produce en el hígado y cuyo receptor es c-Mpl, el cual se encuentra en las células de la línea megacariocítica (Abraham y Bassar. 1997; Lecine, *et al.* 1998; Italiano, *et al.* 1999; Italiano y Shivdasani. 2003).

La Tpo induce la endomitosis e incrementa la transcripción de p21 a través de la expresión del activador de transcripción 5 (STAT 5) el cual es conocido por pertenecer a una familia de proteínas inhibidoras de ciclinas dependientes de cinasas, las CDKs, las Cip/Kip (p21, p27, y p57), las cuales interactúan con ciclinas y cinasas e inhiben las actividades de las CDKs, que finalmente provoca que los megacariocitos salgan tardíamente de las fases mitóticas: anafase, telofase y citocinesis y ocurra la poliploidización (Baccini, 2001)

También mediante diversos estudios, se comprobó que las IL-3 e IL-6 trabajan como factores de crecimiento de megacariocitos, actuando específicamente en la maduración del citoplasma (Ishida, *et al.* 1998; Kaushansky. 1998; Metcalf, *et al.* 2002; Kie, *et al.* 2002) y en el caso de IL-6 la regulación de la síntesis de trombopoyetina (Schafer. 2004).

Por último, también se ha comprobado que los megacariocitos expresan receptores para estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) y cuando éstos son activados, inducen la maduración de los mismos. De manera que los estrógenos pueden actuar como factores de crecimiento de estas células (Khetawat, *et al.* 2000; Nagata, *et al.* 2003).

### 2.5.3. ULTRAESTRUCTURA Y CITOQUÍMICA DE MEGACARIOCITOS

---

Las principales características de los megacariocitos visibles por microscopía electrónica varían de acuerdo con la maduración de los mismos, la cual se puede reconocer dependiendo del nivel de desarrollo de 3 zonas en estas células: la perinuclear, la intermedia y periférica. En la zona perinuclear se encuentran distribuidos todos los organelos de la célula (aparato de Golgi, mitocondrias pequeñas y largas, polirribosomas y ribosomas, retículo endoplásmico rugoso y liso), en la zona intermedia se encuentran las membranas de demarcación, las cuales son un reservorio de membrana plasmática; y gránulos alfa y densos, que contienen proteínas como el factor plaquetario 4,  $\beta$ -tromboglobulina, fibrinógeno, Factor de von Willebrand, factor plaquetario 5 y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), mientras que la zona periférica se encuentra libre de organelos y gránulos, aunque se rica en proteínas de citoesqueleto como actina, talina y  $\beta$ 1-tubulina las cuales ayudan a formar unas estructuras denominadas proplaquetas, que finalmente formarán a las plaquetas (Burkitt, *et al.* 1993; Boya. 1996; Italiano, *et al.* 1999)

### 2.5.4. FORMACIÓN DE PLAQUETAS

---

Estudios *in vivo* e *in vitro*, han revelado diferentes modos de formación de plaquetas, una de ellas, es la fragmentación al azar del citoplasma de megacariocitos en forma de proplaquetas (Lecine, *et al.* 1998). Mientras que otro modelo propuesto por Botton y colaboradores en el 2002, indica que la formación de proplaquetas, extensiones citoplásmicas de 2 a 4 micras de longitud (Italiano, *et al.* 1999), puede estar mediada por la activación de caspasas, puesto que encontraron que tanto la caspasa 3 como la 9 podían provocar la posterior formación de proplaquetas.

Asimismo, ahora se conoce que la formación de proplaquetas depende del factor de transcripción **NF-E2**, como lo comprobó Lecine (2000), quien indica que ratones que no expresaban este factor de transcripción mostraban megacariocitos maduros, sin embargo éstos no mostraban indicios de formación de proplaquetas (Deveaux, *et al.* 1997).

### 3. JUSTIFICACIÓN

---

El vanadio es un metaloide que tiene cada vez más importancia como contaminante ambiental en la Ciudad de México, puesto que los niveles de este elemento han aumentado en distintas zonas de la ciudad (Mugica, *et al.* 2001). Asimismo, se demostró que la concentración de vanadio en personas que habitaron el valle de México en los 90's fue mayor a las que residían en la zona en los años 60 (Fortoul, *et al.* 2002).

Por otro lado, el bazo es uno de los órganos en el cual se han encontrado altas concentraciones de vanadio, de manera que es muy importante estudiar los efectos de éste en el bazo (Al-Bayati, *et al.* 1992; Thomson y McNeill. 1998).

Además, el pentóxido de vanadio por vía inhalada provoca trombocitosis y alteraciones en la médula ósea en ratón, por lo tanto al ser el bazo un órgano hematopoyético en roedores y al no haberse realizado estudios en bazo de organismos que han estado expuestos a inhalación de pentóxido de vanadio (WHO, 2000), es de suma importancia estudiar los efectos de este metal en este órgano linfo-hematopoyético.

### 4. OBJETIVOS

---

#### GENERAL

- Analizar los cambios morfológicos del bazo de ratones CD1 inducidos por la inhalación aguda, subaguda y crónica  $V_2O_5$  (0.02 M).

#### ESPECÍFICOS

- Analizar los cambios ultraestructurales del bazo de ratones CD1 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$  (0.02 M) por Microscopía Electrónica de Transmisión.
- Analizar los cambios ultraestructurales del bazo de ratones CD1 después de la inhalación aguda, subaguda y crónica de  $V_2O_5$  (0.02 M) por Microscopía de luz.
- Cuantificar las variaciones en el tamaño y número en la población de megacariocitos del bazo de ratones CD1 a lo largo de las exposiciones.

## 5. MÉTODO

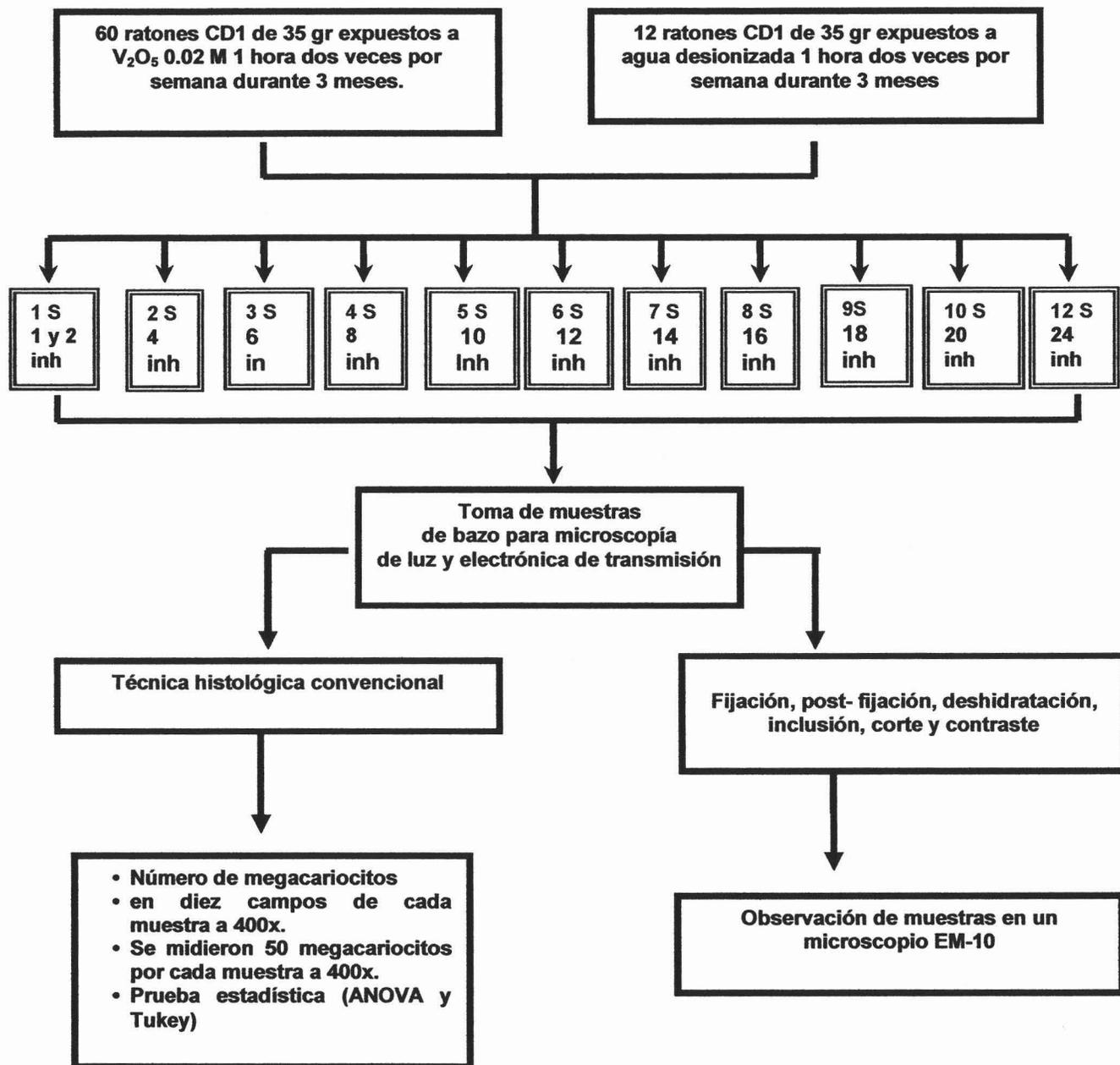
---

Para la realización de este estudio se utilizaron en total 72 ratones macho CD1 de 35 g de peso, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Se formaron dos grupos, en uno de los cuales 12 ratones fueron expuestos a agua desionizada y se les consideró el grupo control, mientras que el otro grupo estuvo compuesto por 60 ratones que fueron expuestos a una concentración 0.02 M de pentóxido de vanadio por vía inhalada en una caja de acrílico 2 veces por semana durante 3 meses. Cada semana, hasta completar el tratamiento, se sacrificó a un grupo de 6 ratones mediante la administración de dosis letal de pentobarbital sódico, posteriormente se profundieron los ratones vía cardiaca primero con solución salina y después con glutaraldehído y paraformaldehído al 2%. A continuación se les extrajo el bazo a los ratones, se pesó y diseccionó en dos partes, una de ellas se introdujo a una solución de formol 10%, mientras que la otra parte se colocó en glutaraldehído 2.5 molar.

Los fragmentos de bazo en formol 10% fueron procesados mediante la técnica histológica habitual (fijación, deshidratación, aclaración, inclusión, corte, tinción [hematoxilina y eosina] y montaje). Posteriormente, se contó el número de megacariocitos en 10 campos de cada individuo a 400X y se midieron 50 megacariocitos de cada muestra a 400x en un microscopio Olympus BX50.

Mientras que para Microscopía Electrónica de Transmisión, después que las muestras se fijaron en glutaraldehído y paraformaldehído al 2% durante 2 horas, se postfijaron con tetraóxido de Osmio al 1% durante 2 horas. Consecutivamente se deshidrató el tejido con alcoholes a concentraciones crecientes del 80 al 100% para finalmente incluir los fragmentos en Araldita 6005. Se hicieron cortes finos con ultramicrotomo Reichert–Jung, para después contrastarlos con acetato de uranilo y citrato de plomo para su posterior observación en un microscopio Zeiss EM–10.

Finalmente los datos discontinuos obtenidos se transformaron (se utilizó  $\log x+1$ ) para tener una distribución normal y se realizó análisis de varianza (ANOVA) y Tukey para conocer el efecto del pentóxido de vanadio sobre el número y tamaño de los megacariocitos y el peso de los bazos.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. MICROSCOPIA DE LUZ.

#### 6.1.1. ANALISIS CUALITATIVO

---

Mediante la observación de los cortes realizados del bazo de los ratones expuestos a  $V_2O_5$  vía inhalada por microscopía de luz, se observó hiperplasia nodular (fig. 4), mayor número de células plasmáticas y linfocitos binucleados (fig. 5). Asimismo, los megacariocitos presentaron mayor número de lobulaciones nucleares conforme aumentaba el tiempo de exposición (fig. 6).

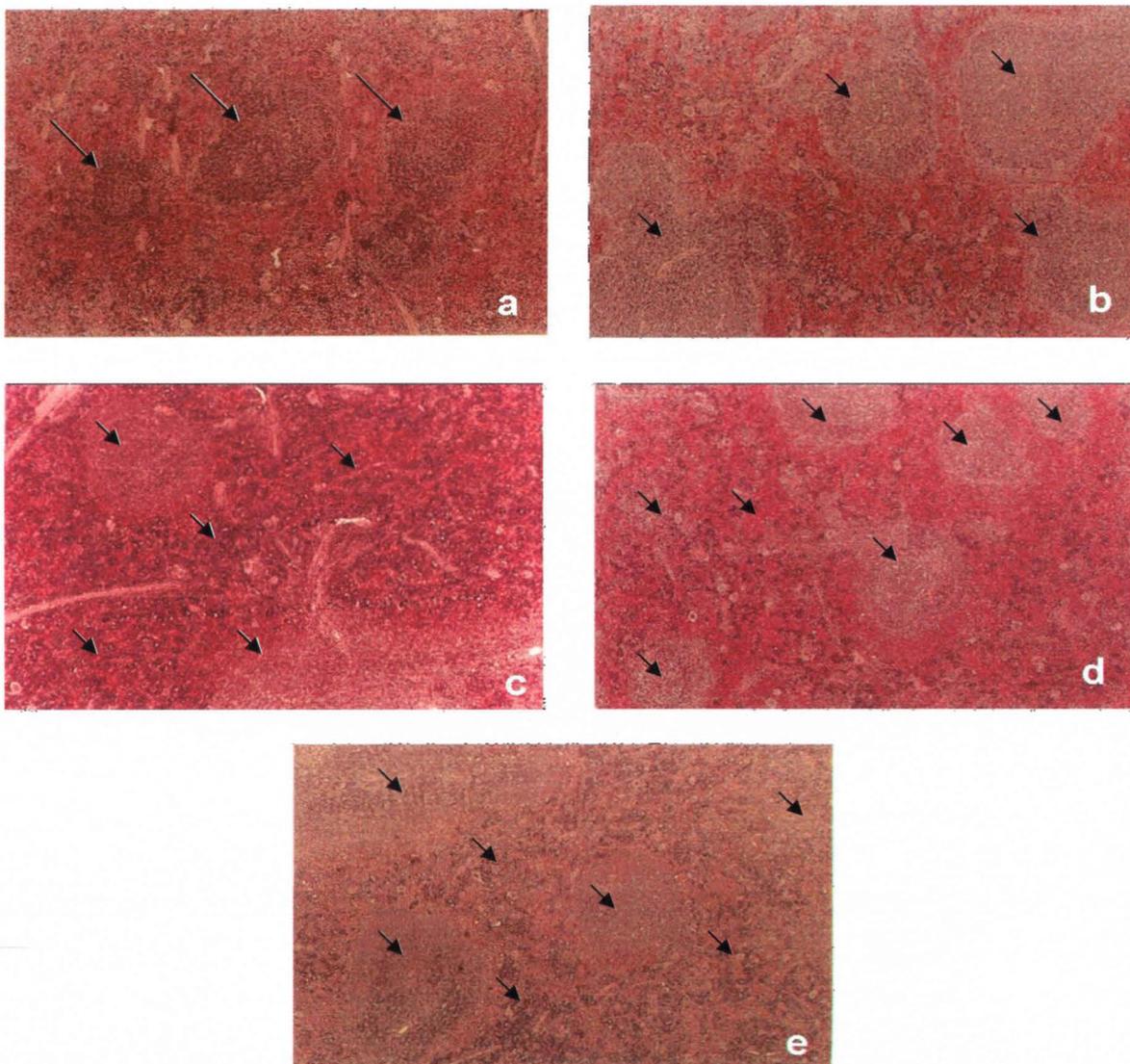


Figura 4: a. Bazo de un animal control. b Exposición aguda (1 inh). c Subaguda (8inh). d Subcrónica (16 inh). e Crónica (24 inh). (400x). Existe proliferación difusa de linfocitos e hiperplasia nodular que se incrementa de acuerdo con el tiempo de exposición (Flechas).

En la figura 5, se observa un aumento en el número de megacariocitos con respecto al control (fig. 5a), además que éstos ya no solo se encontraban en la pulpa roja, también estaban en la blanca. Igualmente, se puede apreciar el aumento en el número de linfocitos y tamaño de nodos linfoides.

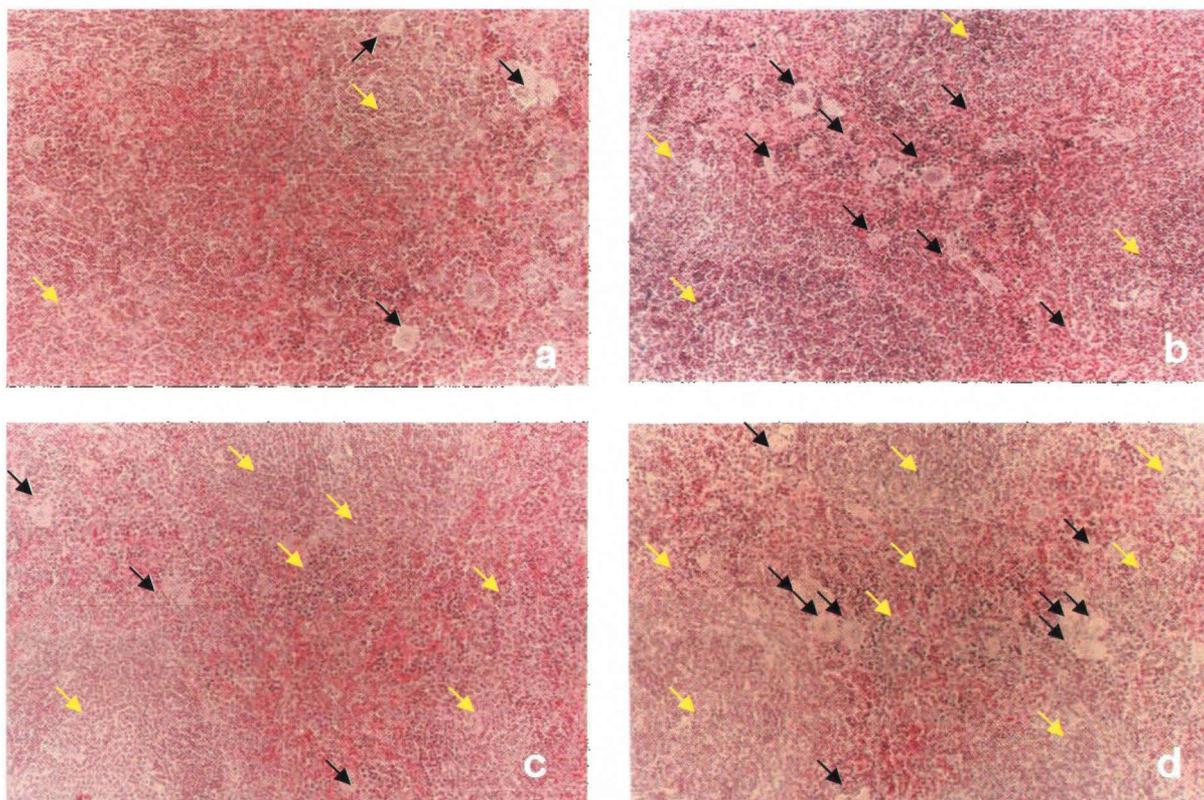


Figura 5. a Bazo de un animal control. b 4inh. c 12inh. d 20inh. Se observa proliferación de megacariocitos (Flechas negras), linfocitos y nodos linfoides (Flechas amarillas) de acuerdo al tiempo de exposición.

En la figura 6 se observan los megacariocitos de un animal control. En ellos se observa la presencia de núcleos semidesarrollados, lo cual indica la existencia de promegacariocitos, además podemos ver claramente como éstos se encuentran en la pulpa roja del bazo. Mientras que en los individuos tratados (fig. 6 b-h), no solo existe un gran desarrollo en el núcleo de los megacariocitos (aumenta la lobulación de los núcleos), sino que se observa una mayor proliferación de los mismos, e inclusive el tratamiento crónico fue capaz de inducir megacariocitos senescentes (megacariocitos que ya liberaron plaquetas) (Battinelli, *et al.* 2001) en los organismos con un tratamiento crónico se observaron megacariocitos senescentes (fig. 6 h), lo que indica

que éstos ya liberaron proplaquetas. También se distingue la presencia de células plasmáticas (\*) (6 d) lo cual estuvo relacionado con el tiempo de exposición.

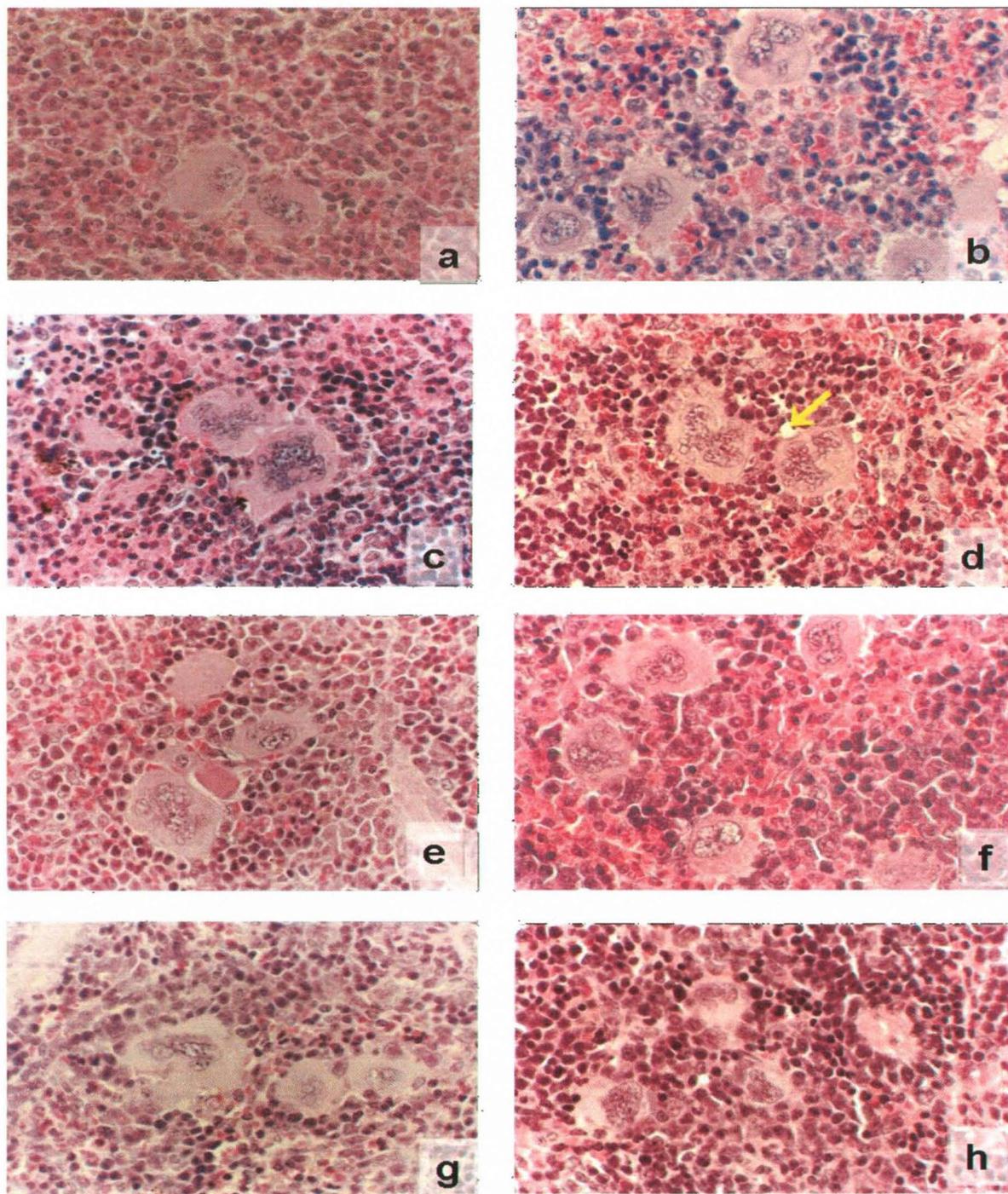


Figura 6. a. Bazo de un animal control. b 1inh. c 4inh . d 8inh . e 12inh. f 16inh. g 20inh. h 24inh. (400x). Se observa un aumento en el desarrollo de los megacariocitos, megacariocitos senescentes (\*) y proliferación de linfocitos, así como la presencia de células plasmáticas (Flecha amarilla) de acuerdo al tiempo de exposición.

De la misma forma se encontraron linfocitos binucleados desde la primera semana de tratamiento (fig. 7).

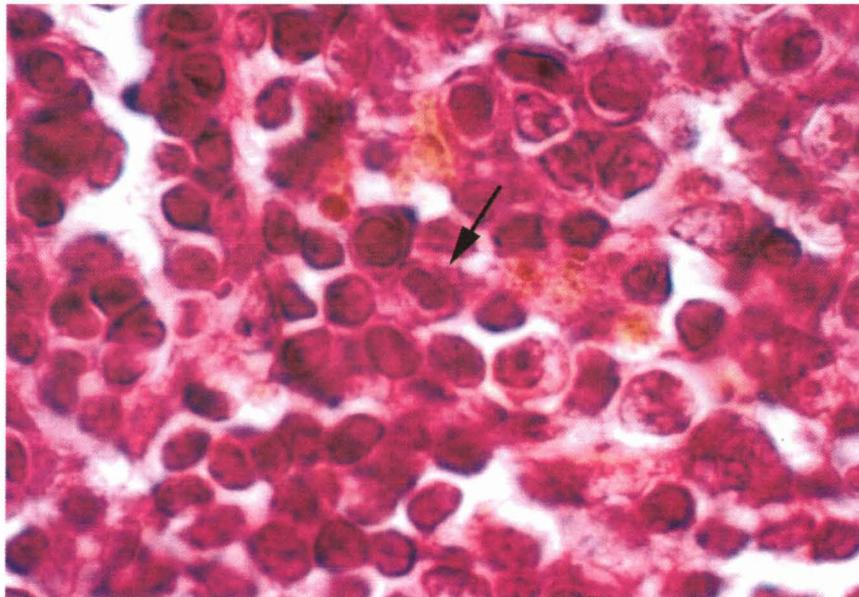


Figura 7. Linfocito binucleado (flecha) (1000x , 8 inh)

### 6.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO

En el análisis cuantitativo realizado al bazo en microscopía de luz registró aumento en el número (fig. 8) y tamaño de megacariocitos (fig. 9) estadísticamente significativo con respecto al control en cada uno de los tratamientos realizados. Mientras que el peso de los bazos no fue significativo en ninguno de los tratamientos (fig. 10).

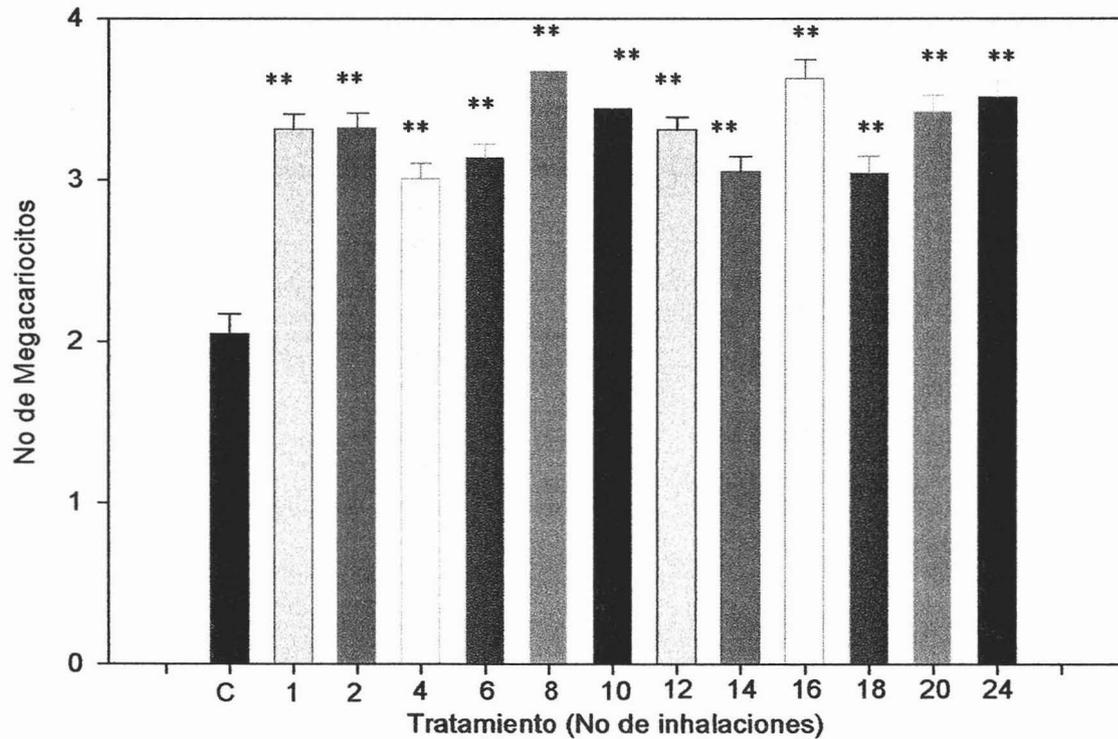


Figura 8. Número de megacariocitos en el bazo de ratones expuestos a  $V_2O_5$  vía inhalada. ( $F_{12, 623} = 17.8532$ ,  $** = p < 0.05$ )

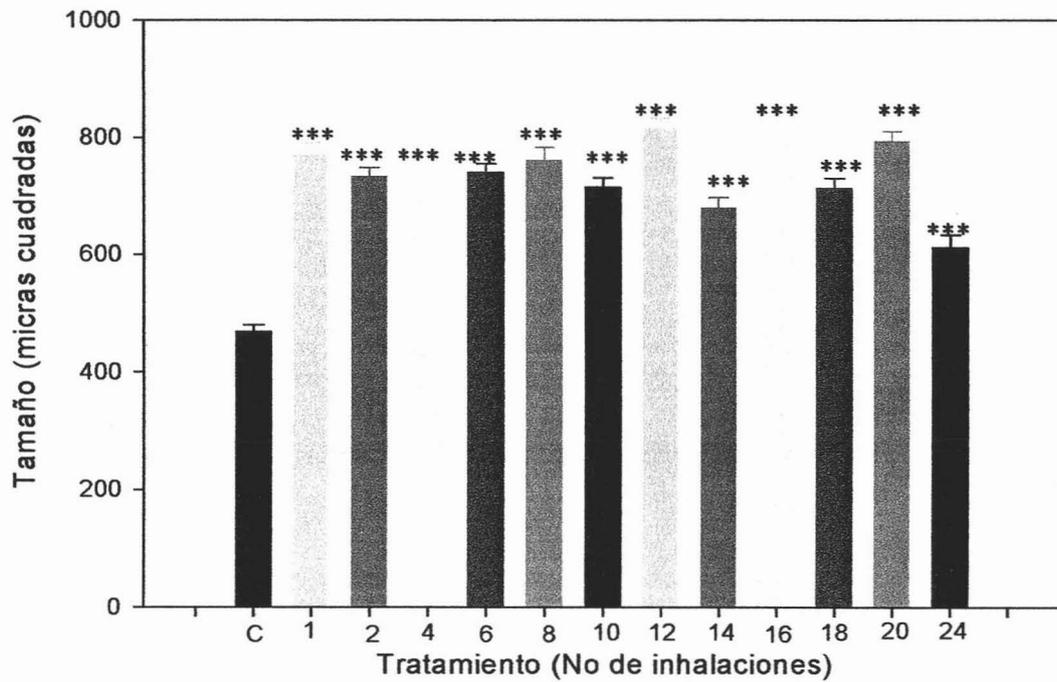


Figura 9. Diferencias en el tamaño de los Megacariocitos por tiempo de exposición a  $V_2O_5$ . ( $F_{12, 3180} = 27.4342117$ , \*\*\*=  $p < 0.05$ )

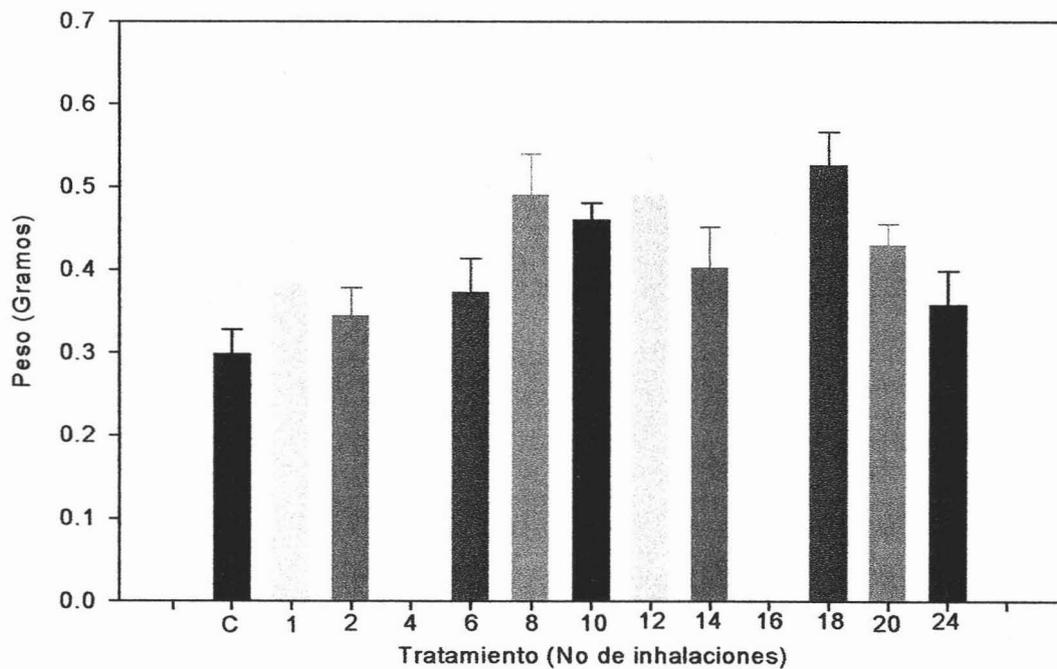


Figura 10. Peso de los bazos de ratones expuestos al  $V_2O_5$  por inhalación.

## 6.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Finalmente se observaron muestras de bazo en microscopía electrónica de transmisión. En los animales control se observaron principalmente linfocitos y neutrófilos, en contraste, la presencia de eosinófilos fue casi nula. Sin embargo, conforme el tiempo de exposición a  $V_2O_5$  era mayor, los eosinófilos eran cada vez más abundantes, mientras que el número de neutrófilos disminuyó (fig. 11).

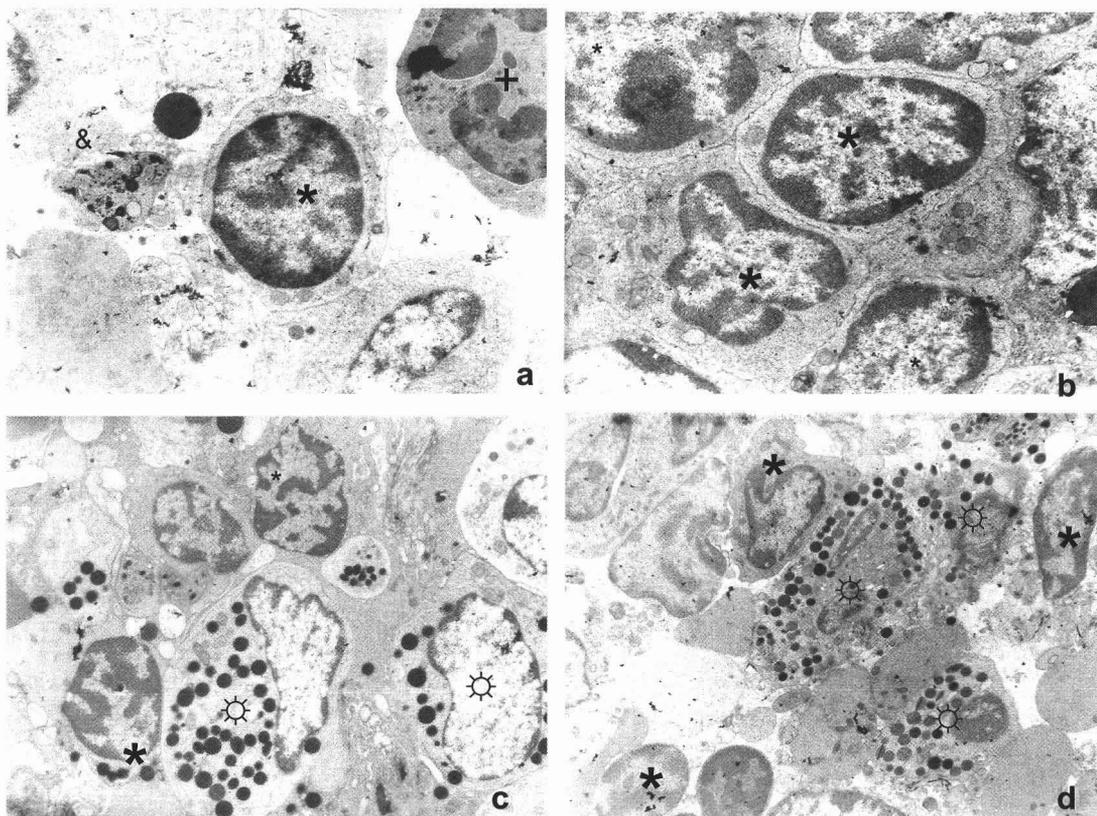


Figura 11. a Animal control (7000x). Se observa un linfocito (\*), un neutrófilo (+) y plaquetas (&) con características morfológicas normales. b Animal control (7000x), Se muestran varios linfocitos con características morfológicas normales. c y d 24inh (300x). Eosinófilos (⊗) y Linfocitos (\*).

Posteriormente se observaron varios cambios dependientes del tiempo de exposición a vanadio. En los animales control, se distinguieron linfocitos con núcleos y cromatina normal (fig. 12a), mientras que en los animales que fueron tratados con  $V_2O_5$ , los linfocitos presentaron cambios en la distribución de su cromatina (fig. 12b) y dobles núcleos (fig.12e), asimismo se hallaron linfocitos con citoplasma claro, lo cual indica una gran

actividad celular (fig. 13a, b) y una gran cantidad de células con núcleo en forma de c, lo cual sugiere la presencia de células inmaduras (12 c, d).

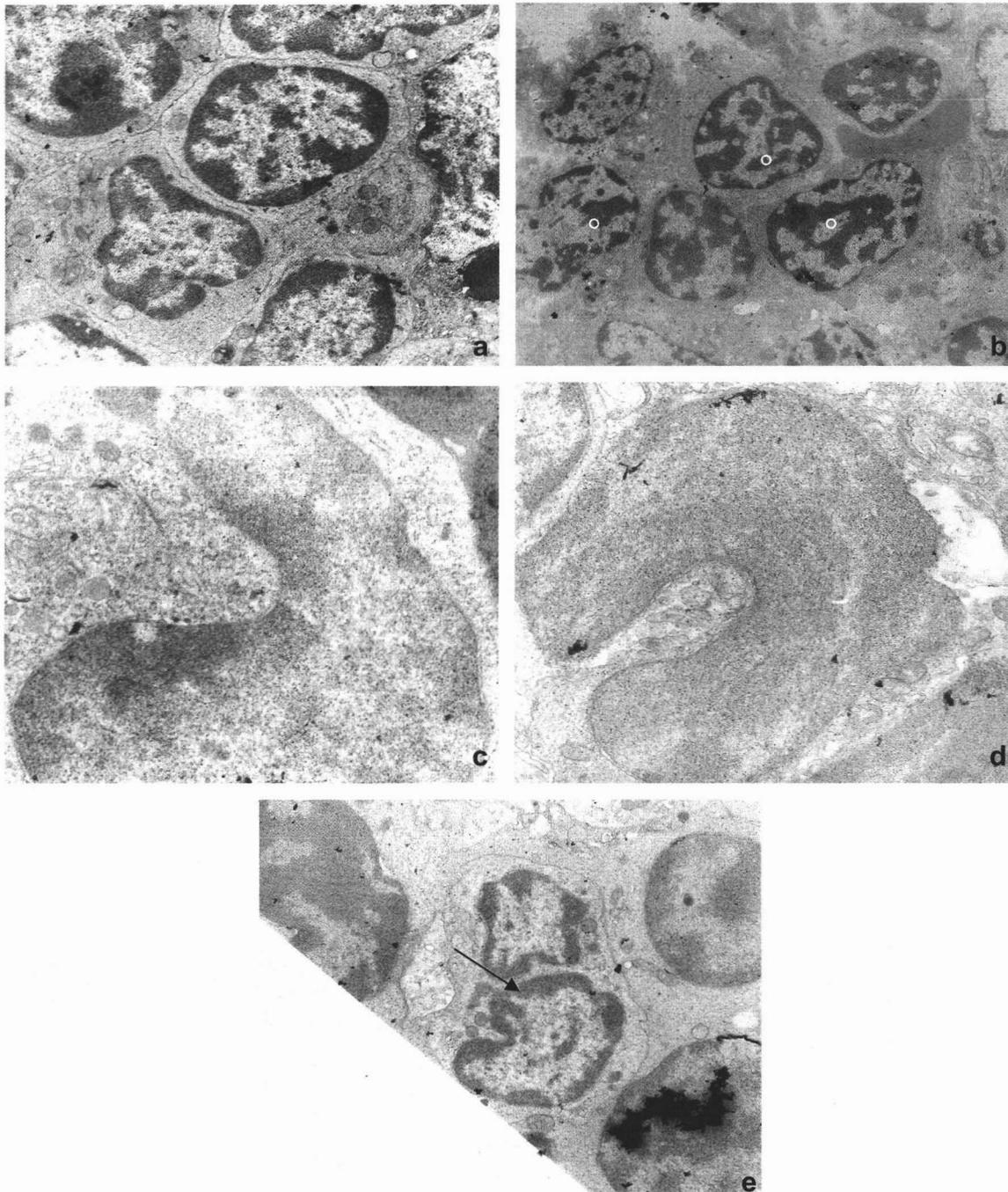


Figura 12. a Animal control (7000x). Linfocitos con morfología normal. b. 8inh (4400x). Linfocitos con alteraciones en la disposición de la cromatina (◦).c y d 24inh (12000x y 20000x). Células con núcleo en forma de C. e 24inh (7000x). Linfocito binucleado (flecha).

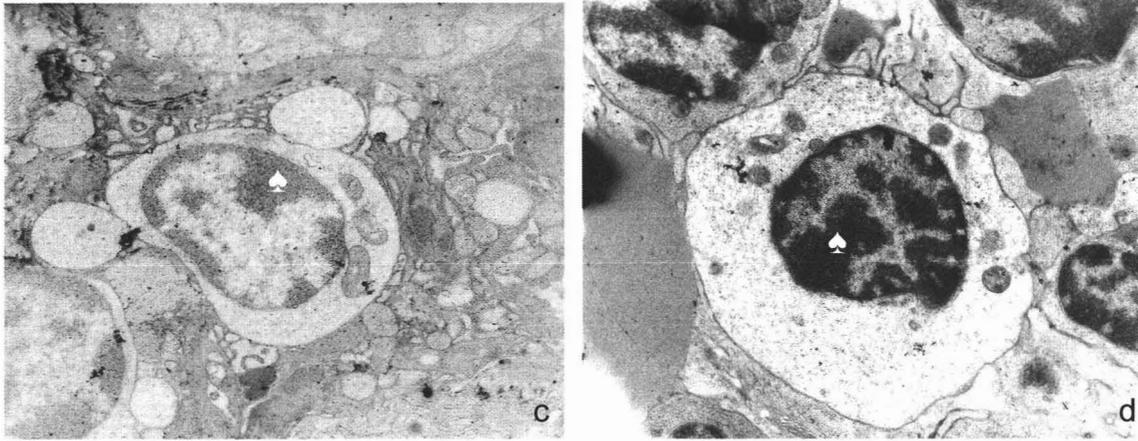


Figura 13. a y b. 24inh (7000X). Micrografías de linfocitos con citoplasma claro de ratones expuestos a pentóxido de vanadio.

Asimismo en los animales con exposición crónica, se observó necrosis y apoptosis (fig 14).

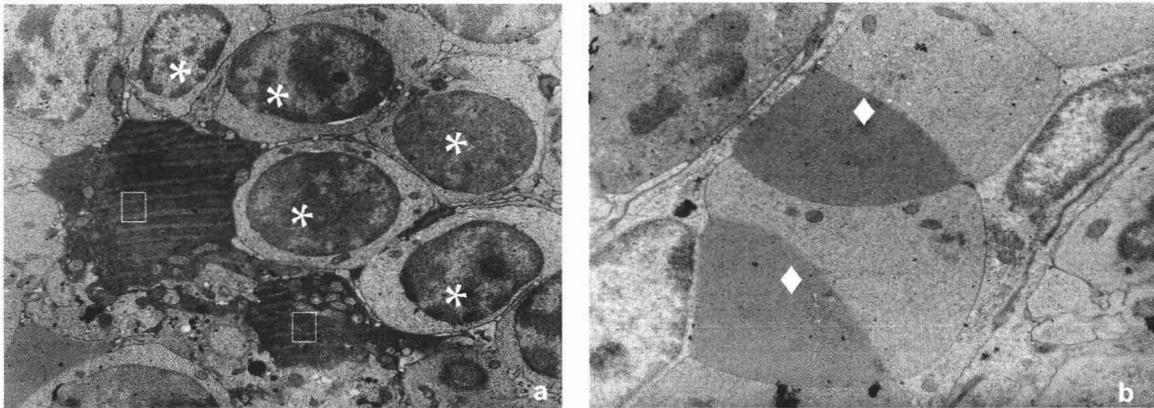


Figura 14. a 24inh (4400x). Células necróticas (□) y linfocitos con características morfológicas normales (\*). b 24inh (7000x). Células apoptóticas (◆).

Por otro lado, en los animales control se encontraron megacariocitos en fases tempranas de desarrollo (núcleo con escasas lobulaciones y citoplasma con un número pequeño de gránulos  $\alpha$  y densos) (fig. 15a, b), además de una gran cantidad de plaquetas (fig. 15e). Por el contrario, en los animales que inhalaban pentóxido de vanadio, se encontraron megacariocitos con un alto grado de maduración (éstos tenían el citoplasma con un sistema canalicular muy prominente, gran número de gránulos y núcleo altamente lobulado) y ausencia de plaquetas. También se observó que la distribución de la

cromatina de megacariocitos control era distinta a la de los megacariocitos de los animales que recibieron el tratamiento con  $V_2O_5$  (fig. 15c, d).

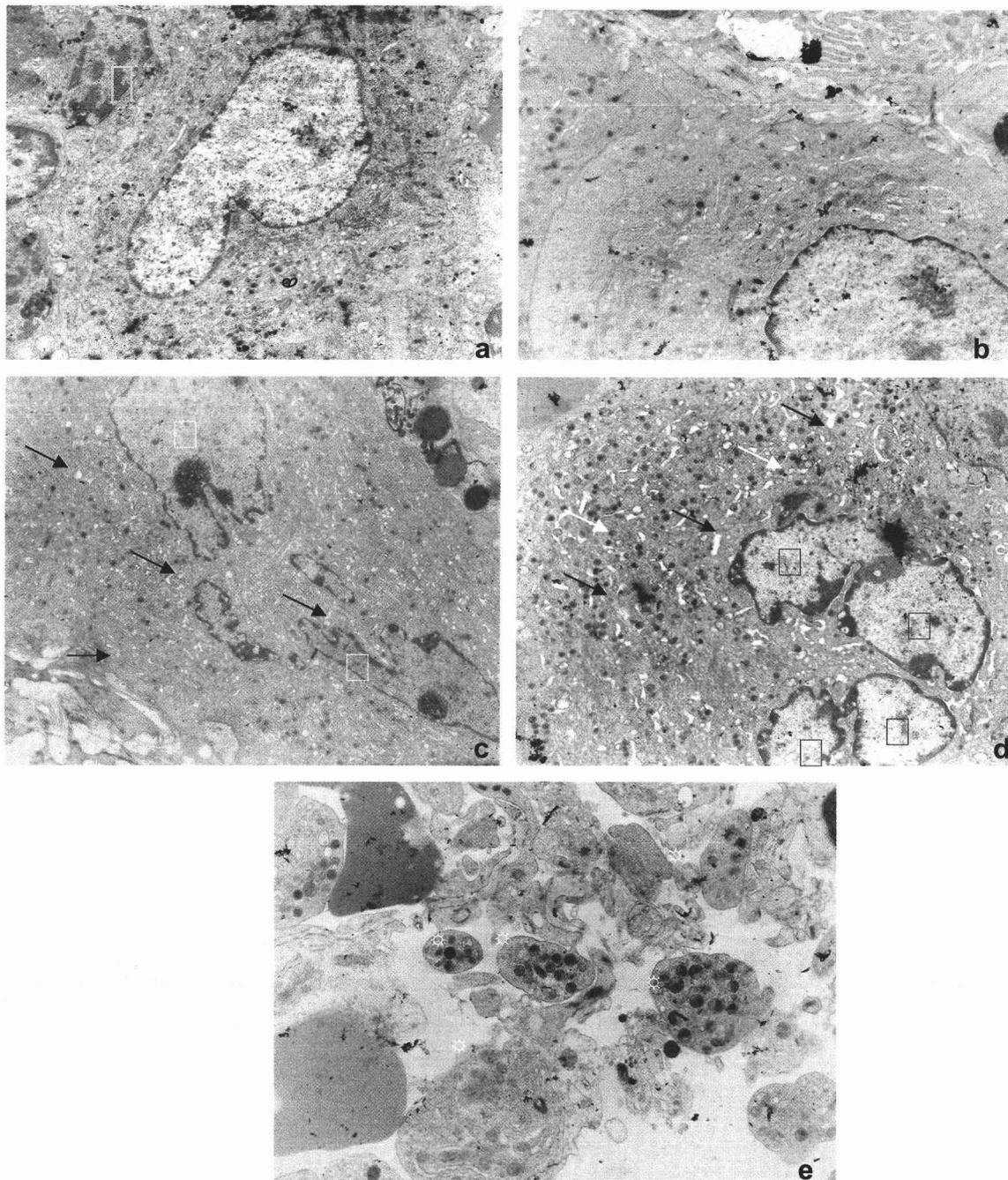


Figura 15. a Animal control (4400x). Promegacariocito (cuadro) y linfocitos (□) b Animal control (7000x). Megacariocito. c Exposición subaguda (4400x). Megacariocito maduro con núcleo muy lobulado (□) y sistema canalicular muy desarrollado (Flechas) d Exposición crónica (24 inh)(4400x). Megacariocito maduro con un gran número de gránulos (Flechas blancas), sistema canalicular altamente desarrollado (flechas negras) y núcleo multilobulado (□). e. Animal control (7000x). Plaquetas (\*).

## 7. DISCUSION

### 7.1. EFECTOS DEL VANADIO EN LA MEGACARIOPOYESIS

---

La exposición crónica a pentóxido de vanadio provocó un aumento significativo en el número y en el tamaño de los megacariocitos (fig. 4 y 5); una gran cantidad de gránulos, mayor desarrollo del sistema canalicular y aumento en la lobulación nuclear; asimismo se observó la formación de proplaquetas y también fueron evidentes los megacariocitos senescentes. Lo que sugiere que este elemento afecta de alguna manera no conocida hasta el momento la actividad endomitótica, la megacariopoyesis y la trombopoyesis.

La endorreplicación (endomitosis), maduración y proliferación de precursores megacariocíticos y megacariocitos requieren de factores de crecimiento, interleucinas y factores humorales como Interleucina 6 (IL-6) (Ishida, *et al.* 1998; Kaser, *et al.* 2001), 2 (IL-2) (Angcharsuksin, *et al.* 1999), 3 (IL-3), 11 (IL-11) (Kaushansky, *et al.* 1998), Factor Estimulador de Células Troncales (SCF) (Metcalf, *et al.* 2002; Kie, *et al.* 2002), Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF) (Long. 1998), Eritropoyetina (Epo) (Kaushansky. 1998) y Trombopoyetina (Tpo). La Tpo es la principal reguladora del desarrollo de megacariocitos (Italiano y Shivdasani. 2003), pues tiene un mayor efecto en la proliferación de células precursoras y megacariocitos que las otras moléculas (Long. 1998; Baccini, *et al.* 2001; Mizutani, *et al.* 2002).

La Tpo se genera en el hígado y la exposición vía inhalada de pentóxido de vanadio provoca la liberación de radicales libres (Acevedo, 2005), de manera que es muy probable que el vanadio, gracias a sus propiedades miméticas con el grupo fosfato (Samet, *et al.* 1998; Giraudier, *et al.* 2002; Ingram, 2003; Theberge, *et al.* 2003; Li, *et al.* 2005) o los radicales libres (Carter, *et al.* 1997; Samet, *et al.* 1998; Woodin, *et al.* 1998) provoquen una mayor liberación de Tpo en el hígado, provocando que aumente la megacariopoyesis (Long. 1998; Kaluzhny, *et al.* 2002; Italiano y Shivdasani. 2003; Spivak, *et al.* 2003; Antonchuk, *et al.* 2004). Además, el nivel de Tpo en el plasma depende de la cantidad de plaquetas que se encuentren en circulación. Los megacariocitos y las plaquetas tienen en su superficie una molécula denominada c-Mpl, la cual es el receptor para Tpo. La Tpo en el plasma se une a los c-Mpl que se encuentran en las plaquetas, de tal manera que cuando el número de plaquetas baja, la concentración de Tpo sube, lo que a su vez

provoca la estimulación de los megacariocitos para su posterior desarrollo y proliferación. Ocurre lo contrario cuando los niveles plaquetarios son elevados, porque la concentración de Tpo baja, al igual que la megacariopoyesis (Kaushansky. 1998; Schafer. 2004), aunque se demostró que el pentóxido de vanadio, también administrado vía inhalada, induce un aumento en el número de plaquetas circulantes (González. 2004), lo cual sugeriría que el nivel de Tpo se mantuviera bajo al igual que la megacariopoyesis, no obstante, en nuestro modelo el número de megacariocitos aumentó.

Lo anterior sugiere que el pentóxido de vanadio provoque la formación de un desorden mieloproliferativo, en este caso trombocitosis, la cual se caracteriza por el aumento en el número de plaquetas y nivel de Tpo en el plasma (Abraham y Basser. 1997; Spivak, *et al.* 2003; Bock, *et al.* 2004; Schafer. 2004), asimismo, puesto que el pentóxido de vanadio provocó que los megacariocitos aumentaran de tamaño, ploidía y presentaran mayor desarrollo en el citoplasma (gran cantidad de citoplasma, mayor número de gránulos y membranas de demarcación), es muy posible que la trombocitosis observada tenga un origen clonal (Kaluzhany, *et al.* 2002; Bock, *et al.* 2004; Schafer. 2004), lo cual es muy relevante puesto que la presencia de este síndrome aumenta el riesgo de padecer enfermedades trombo-hemorrágicas (Spivak, *et al.* 2003; Schafer. 2004).

Igualmente, existe otro tipo de trombocitosis, la reactiva que se caracteriza por el aumento en el número de citocinas inflamatorias, las cuales funcionan como factores de crecimiento en progenitores megacariocíticos y megacariocitos (Kaser, *et al.* 2001; Hillman. 2002; Spivak, *et al.* 2003; Bock, *et al.* 2004; Schafer. 2004). El vanadio o las partículas que contienen vanadio son conocidas por provocar la liberación de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-2 IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF (Haque, *et al.* 1995; Samet, *et al.* 1998; Barat. 2003; Ingram, *et al.* 2003 ; Mukherjee, *et al.* 2004) las cuales, como ya se había mencionado, pueden actuar como factores de crecimiento en la línea megacariopoyética (Kimura, *et al.* 1990; Ishida, *et al.* 1998; Long. 1998; Angcharsuksin, *et al.* 1999), además las plaquetas también contienen en sus gránulos moléculas que estimulan al sistema inmune (contienen en sus gránulos interleucinas) y los linfocitos del bazo también liberan interleucinas, y debido a que el pentóxido de vanadio provocó el desarrollo de gránulos en los megacariocitos, aumento en el número de plaquetas (Gonzalez. 2004) y linfocitos, es posible que las moléculas liberadas por éstos influyeran en el desarrollo megacariocítico.

Por todo lo anterior, es muy posible que el pentóxido de vanadio vía inhalada haya provocado la proliferación y desarrollo de megacariocitos por un aumento en los niveles de Tpo en el hígado y de interleucinas, dado que estas moléculas son indispensables en la megacariopoyesis. Asimismo, éstos resultados indican que posiblemente este metal provoque trombocitosis (ya sea clonal o reactiva) (Levin, *et al.* 1999), la cual puede aumentar el riesgo de contraer enfermedades trombo-hemorrágicas, de manera que es muy importante que se lleven a cabo estudios posteriores en los cambios inducidos en la megacariopoyesis por pentóxido de vanadio, como la medición de citocinas y factores de crecimiento en el bazo y en el hígado, así como de otras proteínas involucradas en la megacariopoyesis.

## **7.2. OTROS EFECTOS EN EL BAZO**

### **7.2.1. PROLIFERACIÓN DE CENTROS GERMINALES, APOPTOSIS Y NECROSIS**

---

Otro cambio muy importante en el bazo después de la inhalación de pentóxido de vanadio, fue la proliferación de centros germinales, los cuales se caracterizan por albergar a linfocitos B, y tejido linfoide, como las vainas linfoides periarteriales que contienen en su mayoría de linfocitos T (Geneser. 1996; Hillman y Ault. 2002). Cuando los linfocitos T y B se activan liberan interleucinas que regulan la respuesta inmune (Shen, *et al.* 2001; Hillman y Ault. 2002), por lo que es posible que estas células se hayan activado gracias al pentóxido de vanadio y posteriormente liberaran interleucinas que no sólo provocarían la activación y proliferación de linfocitos, sino también de otras células como los megacariocitos y leucocitos.

El efecto del vanadio en los tejidos linfoides se ha estudiado sobre todo con personas ocupacionalmente expuestas a vanadio. Igualmente, este elemento (10mg/kg, vía oral) provocó en aves no sólo la liberación de citocinas inflamatorias, sino la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+ (Quereshi, *et al.* 1999), mientras que en mamíferos, el metavanadato de sodio (100µg), pentóxido de vanadio *in vitro* y partículas que contenían pentóxido de vanadio indujeron la producción de un mayor número de interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18) (Krejsa, *et al.* 1997; Lee, *et al.* 2001) y proteínas relacionadas con la respuesta inmune (Interferón  $\gamma$  y el Factor Estimulador de

Colonias de Granulocitos y Macrófagos) (Carter, *et al.* 1997; Huang, *et al.* 2000; Ress, *et al.* 2003), además que el peroxovanadio causó proliferación y activación de linfocitos T (Marini, *et al.* 1987; Ouellet, *et al.* 2003; Dyakonova, *et al.* 2004). Estos datos indican que las diferentes especies de vanadio activan la respuesta inmune, puesto que provocan la activación, proliferación y liberación de moléculas que regulan la respuesta inmune. Por tanto, nuestros resultados nos hacen suponer que el pentóxido de vanadio *in vivo* (puesto que la mayoría de los estudios realizados con linfocitos han sido *in vitro*, con excepción del realizado en aves) vía inhalada, también provoca aumento en la actividad inmune (proliferación y activación de leucocitos, linfocitos y nodos germinales) posiblemente por la liberación de factores de crecimiento de linfocitos y leucocitos, así como a la activación de linfocitos. Sin embargo, nuestro modelo no nos permite conocer que tipo de poblaciones de linfocitos son las que proliferan y se activan, dado que las características morfológicas de las células observadas no indican a que población celular pertenecen, de manera que sería importante la realización de estudios que confirmen el fenotipo de las células en el bazo para conocer mejor la repuesta inmune en el bazo después de la exposición a pentóxido de vanadio.

Las partículas contaminantes y los metales, entre ellos el vanadio, son conocidos por provocar la formación de radicales libres (Sanjay, *et al.* 1999; Wang, *et al.* 2003; Yaglom, *et al.* 2003; Li, *et al.* 2004; Horbinski y Chu. 2005). Cabe señalar que en el bazo se albergan células productoras de especies reactivas del oxígeno (ROS), como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Geneser. 1996; Hillman y Ault. 2002), asimismo los niveles de vanadio en el bazo son altos (Al-Bayati. *et al.* 1992; Thomson y McNeill. 1998; WHO, 2000; Mukherjee, *et al.* 2004), de manera que es muy probable que el vanadio interactúe con ROS mediante la reacción de Fenton y se produzcan radicales libres ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$  y  $OH^\cdot$ ) (Zhang, *et al.* 2001; Rodríguez- Mercado, *et al.* 2003; Mukherjee, *et al.* 2004), que pueden estimular la producción de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8) y aumento en los niveles de leucocitos (Carter, *et al.* 1997; Samet, *et al.* 1998; Woodin, *et al.* 1998; Vandenplas, *et al.* 2002). Por tanto las ROS también podrían estar relacionadas con la estimulación del sistema inmune.

Ahora bien, después de la exposición a pentóxido de vanadio se encontraron células con características morfológicas que indicaban la presencia de apoptosis y necrosis, lo cual ya había sido reportado con metavanadato de amonio vía intraperitoneal (Wei, *et al.* 1982; Al-

Bayati, *et al.* 1992), sin embargo, no se habían observado estos resultados después de la exposición a pentóxido de vanadio.

También las ROS pueden promover la activación de distintas vías de señalización que finalmente pueden inducir la aparición de apoptosis o necrosis (Sanjay, *et al.* 1999; Liu, *et al.* 2001; Wang, *et al.* 2002; Yaglom, *et al.* 2003; Wang, *et al.* 2003; Horbinski y Chu. 2005; Li, *et al.* 2004), conjuntamente si los niveles de radicales libres son muy altos, es muy posible que se encuentren mayor número de células necróticas que apoptóticas (Morinville, *et al.* 1998; Wang, *et al.* 2003) como lo que sucedió con nuestro modelo.

Ahora, como ya se había mencionado, los macrófagos del bazo, además de liberar ROS, igualmente tienen la función de fagocitar tanto células necróticas como apoptóticas aunque existe una gran diferencia, cuando se fagocitan células apoptóticas no se liberan citocinas inflamatorias, mientras que cuando se fagocitan células necróticas si existe respuesta inflamatoria (Hillman y Ault. 2002). Por lo tanto es muy posible que los macrófagos del bazo hayan liberado una gran cantidad de citocinas inflamatorias que más tarde pudieron haber tenido un efecto en las demás células residentes del bazo, provocando, entre otras cosas, la proliferación de linfocitos, granulocitos, blastos y megacariocitos.

Por lo tanto, es muy posible que los radicales libres sean muy importantes en los cambios observados en el bazo, ya que pueden estar involucrados en la activación de linfocitos o en la inducción de necrosis o apoptosis en células del bazo, de la misma forma, la presencia de necrosis en este órgano indica una posible explicación de la liberación de citocinas en el bazo, las cuales pueden ser causantes de la proliferación y activación de linfocitos, granulocitos, blastos y megacariocitos. De manera que sería indispensable medir la concentración de radicales libres en el bazo, puesto que tienen un papel muy importante en la activación de vías de señalización, proliferación y muerte celular.

Además, es muy importante indicar que la presencia de células necróticas, apoptóticas y binucleadas en un mismo órgano indicaría que el pentóxido de vanadio causa daño genotóxico (Fenech, *et al.* 2003) en las células del bazo, puesto que daño en el ADN provoca la formación de células binucleadas, apoptóticas y necróticas, por lo que sería

muy interesante realizar estudios en el bazo para conocer el daño genotóxico ocasionado por pentóxido de vanadio.

### 7.2.2. CÉLULAS BINUCLEADAS

---

Además de los cambios mencionados, se observaron linfocitos binucleados o con núcleos atípicos e inclusiones nucleares (Fenech, *et al.* 2003), los cuales posiblemente son resultado de una falla en la polimerización de tubulinas, ensamble erróneo de los microtúbulos e inhibición de la formación del huso mitótico después de la exposición a vanadio, como lo indicó Ramírez y cols en 1997, quien incluso señaló que el pentóxido de vanadio podía causar aneuploidias en los linfocitos debido a lo anterior (Ramírez, *et al.* 1997).

Asimismo, la ausencia de proteínas que se encuentran en el cuerpo medio (como las syntaxinas y la endobrevina) y del centrosoma, pueden provocar la formación de células binucleadas, dado que ambos son esenciales para que se lleve a cabo la citocinesis (Khodjakov, *et al.* 2001; Hui-Low, *et al.* 2003; Piel, *et al.* 2003). Además muy posiblemente el pentóxido de vanadio vía inhalada puede haber provocado daño en el ADN, lo cual pudo ocasionar un fenómeno conocido como catástrofe mitótica que tiene como resultado la formación de células binucleadas después de que éstas sufrieron daño en su ADN (Huang, *et al.* 2005).

Por lo anterior es posible postular que el vanadio actúe sobre el citoesqueleto, el centrosoma, el cuerpo medio o el ADN, dado que cambios en éstos pueden provocar la formación de células binucleadas, de manera que sería importante realizar estudios posteriores en las proteínas que forman estas estructuras y en el ADN de células que hayan sido expuestas a pentóxido de vanadio para verificar el efecto que tiene éste compuesto sobre ellas.

## 8. CONCLUSIONES

---

El pentóxido de vanadio inhalado fue capaz de inducir en el bazo de ratones:

- Proliferación y aumento en la maduración de megacariocitos, que indica la existencia de un posible trastorno en la megacariopoyesis por vanadio, lo cual podría provocar la aparición de enfermedades trombo- hemorrágicas
- Proliferación de linfocitos, células de citoplasma claro con polirribosomas y nodos linfoides, lo cual indica un aumento en la respuesta inmune después de la exposición a vanadio.
- Células apoptóticas y necróticas.
- Células binucleadas muy posiblemente a la interacción del vanadio con proteínas del citoesqueleto, cuerpo medio o daño en el ADN.

Por lo tanto se deduce que el pentóxido de vanadio vía inhalada es linfohematotóxico

(Fig. 16)

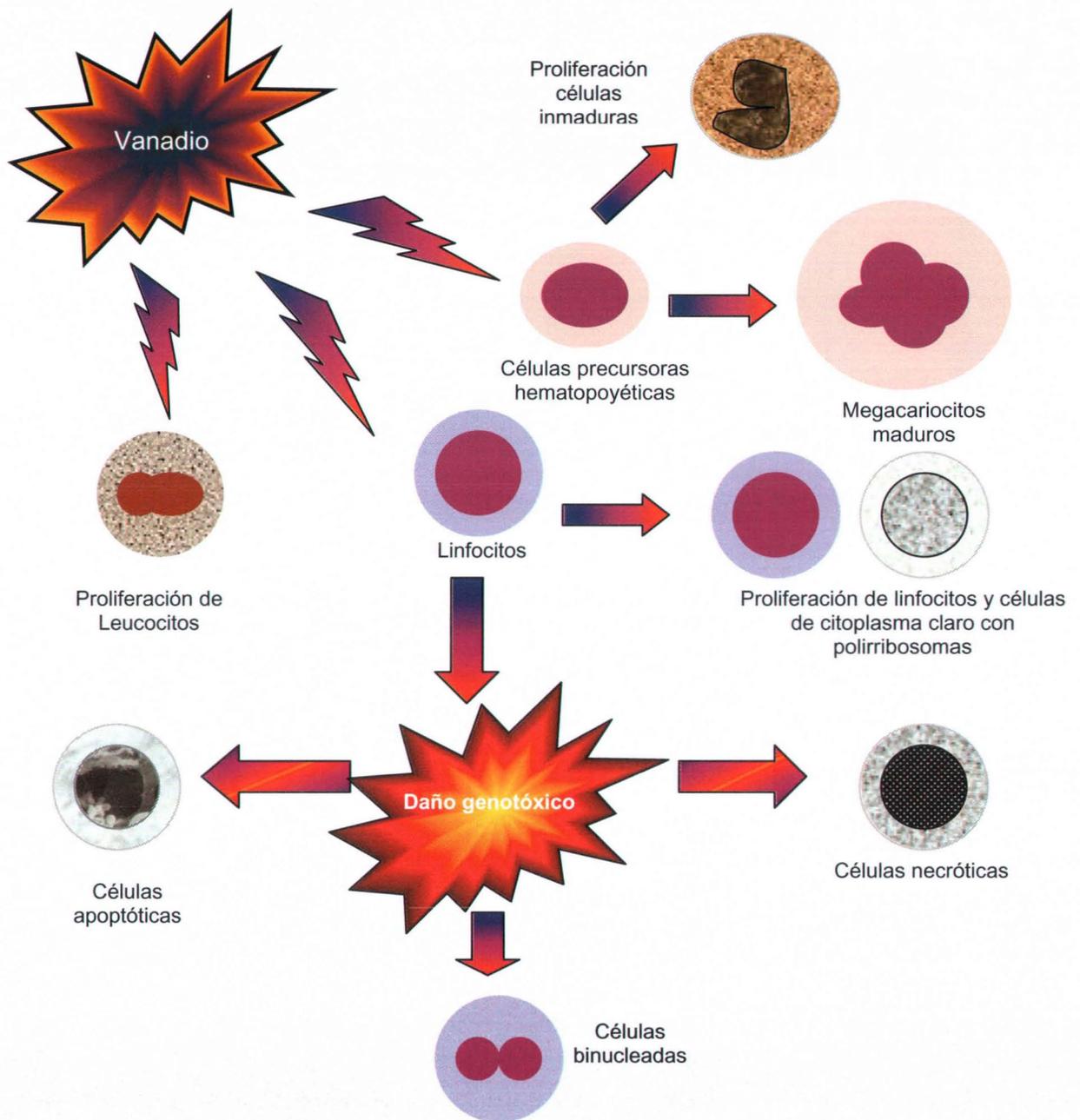


Figura 16. Posibles cambios realizados por la inhalación de pentóxido de vanadio

## 9. REFERENCIAS

---

- **Abbas AK, Litchman AH.** Inmunología Celular y Molecular. Quinta Edición. ELSERVIER. Madrid. 563 pp.
- **Abraham R, Basser RL.** Megakaryocyte growth and development factor: a review of early clinical studies. *The Oncologist.* 1997; 2: 311-318.
- **Acevedo Nava S.** 2005. La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM
- **Al-Bayati M, Mohammad A, Culbertson R, Scheider JP, Rosenblatt LS, Raabe OG.** The Lymphotoxic Action of Vanadate. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology.* 1992; 2: 19-27
- **Angchaisuksiri, P, Grigus S, Carlson PL, Crystal GW, Dessypris EN.** Secretion of a unique peptide from interleukin-2-stimulated natural killer cells that induces endomitosis in immature human megakaryocytes. *Blood.* 1999; 130:136.
- **Antonchuk J, Hyland Douglas J, Craig D, Warren A.** Synergistic effects on erythropoiesis, thrombopoiesis, and stem cell competitiveness in mice in thrombopoietin and steel factor receptors. *Blood.* 2004; 104: 1306-1313.
- **Aragón MA, Ayala Me, Fortoul TI, Bizarro P, Altamirano- Lozano M.** Vanadium induced ultra structural changes and apoptosis in males germ cells. *Reproductive Toxicology.* 2005; 20: 127-134
- **Baccini V, Roy L, Vitrat N, Chagrouit H, Sabri S, Le Cordic JP, Debili N, Wendling F, Vainchenker W.** Role of p1 (Cip/Waf1) in cell-cycle exit of endomitotic megakaryocytes. *Blood.* 2001; 98: 3274-3282.
- **Baran EJ.** Model studies related to vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal of Brazilian Chemistry Society.* 2003; 14: 878-888
- **Bock O, Schluè J, Mengal M, Búsche G, Serinsóz E y Kreipe H.** Thrombopoietin receptor (mpl) expression by megakaryocytes in myeloproliferative disorders. *Journal of Pathology.* 2004; 203: 609-615.
- **Boffeta P y Nyberg F.** Contribution of environmental factors to cancer risk. *British Medical Bulletin.* 2003; 68: 1-71.
- **Boya J.** 1996. Atlas de Histología y Organografía Microscópica. Edit. Panamericana. México DF. 419 pp

- **Briggs D.** Environmental pollution and the global burden of disease *British Medical Bulletin*. 2003; 68:1-24.
- **Burkitt HG, Young B, Heath JW.** Wheather's Funtional Histology. 1993 A Text and Colour. Tercera Edición. Churchill Livingtone. New York. 406pp.
- **Byczkowski J, Kulkarni AP.** 1998. Oxidative Stress and pro-oxidant Biological Effects of Vanadium. Vanadium in the Enviroment Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver, 397 pp.
- **Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Chung CJ, Valencia G, Fordham LA, Garcia R, Osnaya N, Romero L, Acuna H, Villarreal-Calderon A, Devlin RB, Koren HS.** Exposure to air pollution is associated with lung hyperinflation in healthy children and adolescents in Southwest Mexico City: a pilot study. *Inhal Toxicol*. 2000; 12(6):537-61.
- **Carter JD, Ghio AJ, Samet JM y Devlin RV.** Cytokine Production by Human Airway Epithelial Cells after Exposure to an Air Pollution Particle Is Metal-Dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 146: 180-188.
- **Chang R.** 1999. Química. Sexta Edición. Mc Graw Hill. México. 993 pp.
- **Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X.** Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001; 222: 183-188.
- **Churg A, Brauer M.** Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastructural Pathology*. 2000;24(6):353-61.
- **Cormack HD.** 1988. Histología de HAM. Novena Edición. Edit. Harla. 892 pp.
- **D' Cruz O, Uckun FM.** Metavanadate: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2002; 11:1829 – 1836.
- **D' Cruz O y Uckun F.** Vanadocene- Mediated in vivo male germ cell apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 166: 186-195
- **De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W y Debili N.** Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002; 100: 1310-1316.
- **Deveaux S, Cohen – Kaminsky S, Shivdasani R, Andrews N, Filipe A, Kuzniak I, Orkin S, Romeo PH, Mignotte V.** p45 NF-E2 regulates

expression of thromboxane synthase in megakaryocytes. *The EMBO Journal*. 1997; 16: 5654-5661.

- **Dyakonova V, Dambaeva SV, Pinegin BV, Khaitov RM.** Study of interaction between the polyoxidonium immunomoulator and the human immune system cells. *International Immunopharmacology*. 2004; 4: 1615- 1623.
- **Ebbe S.** Megakaryocyte size and ploidy in thrombocytopenic or megakaryocytopenic mice. *The Biology of Hematopoiesis*. 1990; 133-144.
- **Englert N.** Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149: 235–242.
- **Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nagako T, Leavitt AD, Shattil S.** Megakaryocytes derived from embrionyc stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *PNAS*. 2002; 99: 12819-12824.
- **Evangelou AM.** Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*. 2002; 42: 249–265.
- **Ezcurra E, Mazari-Hiriart M.** Are megacities viable? A cautionary tale from Mexico City. *Environment*. 1996;38(1):26-35.
- **Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E.** HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 2003; 534: 65–75.
- **Fernandez A, Wents JO, Wolski N, Hein KRG, Wang S, Witten ML.** Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chenisphere* 51(2003)1129-1139
- **Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldivar Osorio L, Espejel Maya G, Ávila Casado MC, Ávila Costa MR, Colín Barenque L, Navarro Villanueva D, Olaiz Fernández G.** Vanadium in Ambient Air: Concentrations in Luna Tissue from Autopsies of Mexico City Residents in 1960s and 1990s. *Archives of Enviromental Health* 2002; 57: 446-449
- **Freeman B.** 1998. Environmental Ecology. The Ecological Effects of pollution, Disturbance and other Stresses. Academic Press. New York. 606 pp
- **García- Guevara JA.** Una semblanza de la química del vanadio. *Profesores al día*. 1996; 185- 189.

- **Geneser F.** 1996. *Histología. Segunda Edición.* Editorial Médica Panamericana. México. 768 pp.
- **Gewirtz AM.** In vitro regulation of human megakaryocyte maturation. *The Biology of Hematopoiesis.* 1990: 123-132.
- **Ghio AJ, Samet JM.** 1999. *Air Pollutions and Health.* Academic Press, New York. 648 pp.
- **Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, Barnache S, Blachet B, LeCouedic JP, Smith D, Larbret F, Taksin AL, Moreau-Gachelin F, Casadevall N, Tuilliez M, Hulin A, Debili N, Vainchenker W.** Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood.* 2002;100: 2932-2940.
- **González Villalva A.** 2005. Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda y crónica de vanadio en médula osea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- **Hannigan MP, Busby WF Jr, Cass GR.** Source contributions to the mutagenicity of urban particulate air pollution. *J Air Waste Manag Assoc.* 2005; 55(4):399-410.
- **Haque S, Flati V, Deb A, Williams B.** Roles of Protein- tyrosine phosphatases in Stat1a- mediated cell signaling. *The Journal of Biological Chemistry.* 1995; 270: 25709-25757.
- **Haynes D, Rogers S, Hay S, Pearsey M, Howie D.** The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium alloy wear particles. *Journal of Bone Jint Surg Am.* 1993; 74<sup>a</sup>: 825-834.
- **Hillman RS, Ault KA.** 2002. *Hematology in Clinical Practice.* Tercera Edición. Lange. 429 pp.
- **Hogan, GR.** Comparative erythropoietic effects of three vanadium compounds. *The Science of the Total Environment.* 2000; 256: 185-189.
- **Horbinski C, Chu CT.** Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radical Biology and Medicine.* 2005; 38: 2-11.
- **Huang C, Dinos M, Li J, Leonard S, Rojanasakul Y, Casatranova V, Vallyanthan V, Ju Gong J, Shi X.** Vanadium induced nuclear factor of activated T cells activation through Hidrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry.* 2000; 276: 22397-22403.

- **Huang X, Tran T, Zhang L, Hatcher R, Zhang P.** DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *PNAS*, 2005; 102: 1065–1070
- **Huang YC, Soukup J, Harder S, Becker S.** Mitochondrial oxidant production by a pollutant dust and NO- mediated apoptosis in human alveolar macrophage. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003; 284: c 24- c 32.
- **Hui Low S, Li X, Miura M, Kudo N, Quin B y WeimbsJ.** Syntaxin 2 and Endobrevin Are Required for the Terminal Step of Cytokinesis in Mammalian Cells. *Developmental Cell*. 2003; 4: 53–759.
- **Ingram JL, Rice AB, Santos J, Van Houten B, Bonner JC.** Vanadium –induced HB-EGF expression in human lung fibroblast is oxidant dependent and requires MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284: L774-L782.
- **Instituto Nacional de Ecología.** Primer coloquio binacional México-Japón sobre gestión ambiental: contaminación atmosférica. 1996. 1-173.
- **Ishida Y, Ito T, Kuriya SI.** Effects on c-Mpl ligand on cytoplasmic maturation of murine megakaryocytes and on platelet production. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46: 49-57
- **Italiano J, Bergmeiers W, Tiwari S, Falet H, Hartwig J, Hoffmeister K, André P, Wagner DD, Shivdasani R.** Mechanisms and implications of platelet discoid shape. Hemostasis, Thrombosis and Vascular Biology. *Blood*. 2003; 101:4789-4796.
- **Italiano J, Lecine P, Shivdasani RA y Hartwig J.** Blood platelets are assembled principally at the end proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *The Journal of Cell Biology*. 1999; 147: 1299-1312
- **Italiano, JE, Shivdasani RA.** Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; 1: 1174-1182.
- **Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger WH.** Vanadate induces DNA strand break in culture human fibroblasts at doses relevant occupational exposure. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002; 519:25-35.
- **Järup L.** Hazards of heavy metals contamination. *British Medical Bulletin*. 2003; 68:167-182.
- **Kaluzhny Y, Hechler B, Lu J, Nguyen HG, Cataldo LM, Ravid K.** A selective effect of c-mpl ligand on RNA stabilization during megakaryocyte differentiation. *Federation of European Biochemical Societies*. 2002; 527: 279- 283.

- **Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, Theurt I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins M, Mier JW, Tilg H.** Interleukin- 6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood.* 2001; 98: 2720- 2725.
- **Katsouyanni K.** Ambient Air pollution and health. *British Medical Bulletin.* 2003; 68:143-156.
- **Kaushansky K.** Thrombopoietin. *The New England Journal of Medicine.* 1998; 746-754.
- **Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan V, Bolton E, Noga SJ, Bray PF.** Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor  $\beta$  and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood.* 2000; 95: 2289-2296.
- **Khodjakov A y Rieder CL.** Centrosomes Enhance the Fidelity of Cytokinesis in Vertebrates and Are Required for Cell Cycle Progression. *The Journal of Cell Biology.* 2001; 153: 237–242.
- **Kie JH, Yang WI, Lee MK, Kwon TJ, Min YH, Kim HO, Ahn HS, Im SA, Kim HL, Park HY, Ryu KH, Cheng WS, Shin MH, Jung Yj, Woo SY, Park HK, Seoh JY.** Decrease in apoptosis in increase in polyploidization of megakaryocytes by ítem cell factor during ex vivo expansion of human cord blood CD34+ using thrombopoietin. *Stem Cells.* 2002; 20:73-79.
- **Kimura H, Toshiyuki I, Shikama Y, Okano A, Akiyama Y, Ucida T, Maruyama Y.** Interleukin. 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induces thrombocytosis in mice: Possible implication of IL-6. *Blood.* 1990; 76: 2493-2500.
- **Krejsa C, Nadler SG, Esselstn M, Kavanagh T, Ledbetter JA; Schievens GL.** Role of Oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *JBC.* 1997; 272: 11549-11549.
- **Lecine P, Italiano JE, Sang-We K, Villeval JL y Shivdasani RA.** Hematopoietic-specific b1 tubulin participates in a pathway of platelet biogénesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood.* 2000; 96: 1366-1373.
- **Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani R.** Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show < platelet production defect is intrinsic to megakaryocytes. *Blood.* 1998; 98: 1608-1616.
- **Lee K, Shen X, Kónig R.** Effects of Cadmium and vanadium ions on antigen- induced signaling in CD4+ Tcells. *Toxicology.* 2001; 169: 53-65.

- **Leonard A, Gerber GB.** Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of vanadium. Vanadium in the environment. Segunda Parte. 1998. *Health Effects. Wiley and Sons.*
- **Levin J, Peng-Peng J, Baker GR, Villeval JL, Lecine P, Burstein S y Shivdasani RA.** Pathophysiology of Thrombocytopenia and Anemia Mice Lacking Transcription Factor NF-E2. *Blood.* 1999; 94: 3037-3047.
- **Li J, Dokka S, Wang L, Shi X, Castranova V, Yan Y, Costa M, Huang C.** Activation of a pPKC is required for vanadate-induced phosphorylation of protein kinase B(Akt) but not p70<sup>S6k</sup> in mouse epidermal JB6 cells. *Molecular and Cellular biochemistry.* 2004; 255: 217-225.
- **Liu H, McPherson B y Zhenhai Y.** Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: H404-H410.
- **Long MW.** Thrombopoietin requires additional Megakaryocyte-Active Cytokines for Optimal Ex Vivo Expansion of Megakaryocyte Precursor Cells. *Blood.* 1998; 91: 4118-26
- **Marini M, Zunica G, Bagnara GP, Franceschi C.** Effect of Vanadate on PHA- Induced proliferation of human lymphocytes from young and old subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1987; 142:836-342.
- **Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S.** Synergistic and Inhibitory interaction in the Vitro control of Murine Megakaryocyte Colony Formation. *Stem cells.* 2002; 20:552-560.
- **Mizutani C, Tohyama Y, Miura Y, Terutoshi H, Nishihara T, Yamamura H, Ichiyama T y Tohyama K.** Sustained activation of Mec-1-ERK1/2 pathway in membrane skeleton occurs dependently on cell adhesion in megakaryocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297: 664-671
- **Molina MJ, Molina LT.** Megacities and atmospheric pollution. *J Air Waste Manag Assoc.* 2004;54(6):644-80.
- **Morinville A, Maysinger D, Shaver A.** From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS.* 1998; 19: 452-460
- **Mugica V, Maubert M, Torres M, Muñoz J, Rico E.** temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico city during 1996-1998. *Journal of Aerosol Science.* 2001; 33: 91-102.
- **Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S , Banerjee P, Tiwari A , Chatterjee M.** Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters.* 2004;150: 135–143

- **Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL.** Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Science Of the Total Environment*. 2004; 321: 59-69
- **Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A, Yamamoto M, Payne A, Todokoro K.** Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine- synthesized estradiol. *Genes and Development* 2003;17: 2864- 2869.
- **Newman CM y McIntosh AW.** 1991. Advances in Trace Substances Research Metal Ecotoxicology. *Concepts and Applications*. Lewis Publishers. Orlando. 456 pp.
- **Ohba S, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori I, Mori A.** Metal ions affect neuronal membrane fluidity of rat cerebral cortex. *Neurochemistry Res*. 1994; 19: 237-241.
- **Ouellet M, Roy J, Barbeau B, Geleziunas R y Tremblay M.** NK-kB Induction by Bisperoxocanium compounds requires CD45, p36LAT, PKC y IKK activity and exhibits kinetics of activation comparable to those of TCR/CD28 Coengagement. *Biochemistry*. 2003; 42: 8260-8271.
- **Piel M, Nordberg J, Euteneuer U, Bornens M.** Centrosome-Dependent Exit of Cytokinesis in Animal Cells. *Science*. 2001; 291:1550-1553.
- **Qureshi MA, Hill CH, Heggen CL.** Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999; 68: 61-71.
- **Ramírez P, Eatmond DA, Laclette JP, Ostrosky- Wegman P.** Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 1997; 386: 291- 298.
- **Ress NB, Chon JB, Renne RA, Dill JA ; Miller RA, Roycroft JH, Hailey JR, JK Haseman y Bucher JR.** Carcinogenicity of inhaled Vanadium pentoxide in F344/rats and B5C3F Mice. *Toxicological Science*. 2003; 74: 287-296.
- **Riveros Rosas H, Pfeifer G, Lynam D, Pedroza JL, Julian Sanchez A. Canales O, Garfias J.** Personal exposure to elements in Mexico City air. *The science of total environment* .1997; 79-96.
- **Rodriguez- Mercado J, Roldan Reyes E, Altamirano Lozano M.** Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood. *Toxicology Letters*.2003;144: 359-369.
- **Roldan RE, Altamirano- Lozano M.** Chromosomal aberration, sister chromatid exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human

lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat Res* 1990; 245: 61-65.

- **Roldan Reyes E y Rodriguez Mercado JJ.** Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood. *Toxicology Letters* 2003; 144: 359-369.
- **Rosales-Castillo JA, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH.** Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud pública de México.* 2001; 43:544-555
- **Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg P y Reed W.** Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals *Am. J. Physiol (Lung Cell. Mol. Physiol).* 1998; 19: L551-L558.
- **Samet JM, Reed E, Ree W.** Vanadium-induced kB-Dependent Transcription Depends upon Proxide- Induced activation of the p38 Mitogen-Activated protein Kinase. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000; 23:95-102.
- **Schafer AI.** Thrombocytosis. Current concepts. *N Engl J ed* 2004; 350:1211-1219.
- **Schuster G, Caughman GB.** Alteration of cell lipids by metal salts. *Journal of Biomedical Mater Rest.* 2004; 70A: 347-353.
- **Shen X, Lee K, König R.** Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4+ T cells. *Toxicology.* 2001; 169; 67-80.
- **Shivdasani RA.** Molecular and Transcriptional Regulation of Megakaryocyte Differentiation. *Stem Cells.* 2001; 19: 397-407.
- **Spivak j, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, Marchioli R y Marchetti M.** Chronic Myeloproliferative Disorders. *American Society of Hematology.* 2003; 220.
- **Théberge JF, Mehdi MZ, Pandey SK y Srivastava AK.** Prolongation of insulin-induced activation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and phosphatidylinositol3- kinase by vanadil sulfate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 420; 2003: 9-17.
- **Thomson KH, McNeill JH.** 1998. Toxicology of vanadium in mammals. Vanadium in the Enviroment. Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver, 397 pp.

- **Tiwari S, Italiano JE, Barral DC, Mules EH, Novak EK, Swank RT, Seabra M, Shivdasani RA.** A role for Rab27b in NF-E2- dependent pathway of platelet formation. *Blood*. 2003; 3970 - 3979.
- **U.S. EPA.** 1987. Health Effects Assessment for Vanadium and Compounds. *Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH.*
- **U.S. EPA.** 1991a. Health Effects Assessment Summary Tables. Annual FY-91. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, *Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response.* Washington, DC.
- **U.S. EPA.** 1991b. Vanadium Pentoxide. Integrated Risk Information System (IRIS). *Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH.*
- **Vallejo M, Jáuregui- Renaud K, Hermosillo AG, Márquez MF y Cárdenas F.** Efectos de la contaminación atmosférica y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003; 139: 57-62.
- **Vandenplas O, Binard –van Cangh F, Gregoire J, Brumagne A, Larbanois A.** Fever and neutrophilic alveolitis caused by a vanadium based catalyst. *Occup Environ med*. 2002; 59: 785-787.
- **Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin S, Shivdasani.** Consequences of GATA-1 deficiency in Megakaryocytes and Platelets. *Blood*.1999; 93: 2867-2875.
- **Wang JC, Chen C, Novetsky A, Lichter S, Ahmed F, Friedberg N.** *Blood* Thrombopoietin levels in clonal Thrombocytosis and Reactive Thrombocytosis. *Am J Med*.1998; 104:451-455
- **Wang L, Medan D, Mercer R, Shi X, Huang C, Castranova V, Ding M, Rojanasakul Y.** Role of neutrophil apoptosis in vanadium-induced pulmonary inflammation in mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2002; 21:343-50.
- **Wang Y Z, Ingram JL, Walters DM, Rice AB, Santos JH, Van Houten B y Bonner JC.** Vanadium-induced STAT-1 activation in lung myelofibroblasts requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and P38 MAP Kinase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35: 845-855.
- **Wei CI, Cohen MD, Tan H.** Effect of Ammonium Metavanadate on the Murine Immune Response. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1986; 19: 279-298.
- **Woodin MA, Hauser R, Liu Y, Smith TJ, Siegel PD, Lewis DM, Tollerud DJ, Christiani DC.** Molecular Markers of Acute Upper Airway:

Inflammation in workers exposed to Fuel-Oil Ash. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 182-187.

- **World Health Organization.** International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. 2000
- **Yaglom J, Ekhterae D, Gabai V, Sherman MY.** Regulation of Necrosis of H9c2 Myogenic Cells upon Transient Energy Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278: 50483-50496
- **Ye J, Ding M, Leonard SS, Robinson VA, Millecchia L, Zhang X, Castranova V, Vallyathan V, Shi X.** Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem.* 1999; 20:9-17.
- **Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard S, Lanciotti R, Butterworth L y Shi X.** Vanadate- induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2001; 392: 311-320.