



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

RELACIÓN DE LA TROMBOPOYETINA, IL-6  
Y LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR C-MPL  
EN LA TROMBOCITOSIS INDUCIDA POR  
LA INHALACIÓN CRÓNICA DE VANADIO.  
MODELO EXPERIMENTAL EN RATÓN

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Q.F.B. PATRICIA MAYELA DÍAZ BECH

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

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A CONACYT por la beca con número de registro 189662 otorgada de Agosto del 2004 a Junio del 2006 para la realización de los estudios de maestría.

A DGEP por la beca otorgada de Agosto del 2004 a Junio del 2006.

Este proyecto fue financiado parcialmente por la Facultad de Medicina de la UNAM. PAPIIT Clave IN 200606.

Agradezco enormemente el apoyo, la guía, orientación y contribuciones que hicieron a este proyecto los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dra. Maria Rosa Ávila Costa

Dr. Mario Altamirano Lozano

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás. Por siempre estar a mi lado para poder cumplir cualquier sueño. Por todo el apoyo, amor y confianza brindados desde hace 27 años. Sin ustedes yo no sería la misma.

A Maru. Hermana! Este trabajo es tan tuyo como mío. Gracias por ser parte de mí, por estar siempre a mi lado y ser mi mejor amiga. Te amo.

A Pepe, Susana. Gracias por todo su cariño y comprensión siempre. Gracias por apoyarme y quererme. Y sobretodo, gracias por Fer! Este trabajo también se los dedico a ustedes.

Fer. Eres la alegría y el amor mas inocente y sincero que conozco hasta ahora!

Isra. Gracias por apoyarme en todas mis loqueras y mis sueños. Gracias por formar parte de mi vida! Te amo.

Isa. Gracias por que somos hermanas por elección propia! Qué más te puedo decir!!

Daniel Ascencio: Mil gracias por introducirme a este mundo de la investigación!

Pao, Caro y Mafer.- Gracias por ser mis amigas y compañeras de vida!

Kriz: Amiga! Tú también formas parte de este trabajo. Gracias por compartir conmigo dos años tan importantes en mi vida.

Tere: Gracias por tu confianza y apoyo incondicional! Fue un placer formar parte de la gran familia de tu laboratorio.

Rose y Paty M: Gracias a la vida porque encontré en este proyecto más que ciencia. Encontré grandes amigas como ustedes! Las quiero mucho!

Gaby, Marce, Jose Luis y Vianey.- Gracias por todo el apoyo para la realización de este proyecto.

Gracias a todo el equipo de técnicas histológicas y del bioterio de la Facultad de Medicina por todo el apoyo brindado.

Gracias al Dr. Javier Ambrosio y a Olivia Reynoso por todo el apoyo y orientación brindados para la realización del Western-Blot.

Gracias al laboratorio del Dr. Gabriel Gutierrez Ospina, especialmente a Paty por todo el apoyo brindado para el montaje del Western-Blot.

## ***1.0. RESUMEN***

## ***2.0. INTRODUCCIÓN***

### **2.1 Contaminación ambiental**

- 2.1.1 Contaminación del Aire
- 2.1.2 Contaminación por Metales Pesados

### **2.2 Vanadio**

- 2.2.1 Características Generales
- 2.2.2 Propiedades Físicas y Químicas
- 2.2.3 Fuentes
- 2.2.4 Usos
- 2.2.5 Niveles Monitoreados
- 2.2.6 Vías de exposición
- 2.2.7 Toxicocinética
- 2.2.8 Efectos en la Salud
- 2.2.9 Efectos a nivel celular
- 2.2.10 Efectos en el sistema hematopoyético

### **2.3. Hematopoyesis**

- 2.3.1 Megacariopoyesis y Trombopoyesis
  - 2.3.1.a Relación de la IL-6 y Trombopoyetina (TPO)
    - IL-6
    - Trombopoyetina
  - 2.3.2. Alteraciones Trombopoyéticas
    - 2.3.2.1. Trombocitosis
      - A) Trombocitosis reactiva o secundaria
      - B) Trombocitosis clonal o primaria

## ***3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:***

## ***4.0. HIPÓTESIS***

## ***5.0. OBJETIVOS***

## ***6.0. METODOLOGÍA***

## ***7.0. RESULTADOS***

### **7.1 IL-6**

- 7.1.1 Inmunohistoquímica
- 7.1.2 Western-Blot

### **7.2 TPO**

- 7.2.1. Western- Blot

### **7.3 c-Mpl**

- 7.3.1 Inmunohistoquímica

## ***8.0. DISCUSIÓN***

## ***9.0. CONCLUSIONES***

## ***10.0. BIBLIOGRAFÍA***

## 1.0. RESUMEN

El vanadio es un metal cuyas concentraciones en la atmósfera se han incrementado en las últimas décadas debido a la quema de combustibles fósiles, principalmente en las grandes ciudades. Recientemente se realizó un estudio para evaluar la toxicidad de este metal en el sistema hematopoyético, usando un modelo murino de exposición por inhalación y se observó que la inhalación de  $V_2O_5$  (0.02M) una hora dos veces a la semana producía trombocitosis en ratones CD-1. Usando este mismo modelo, decidimos caracterizar a la trombocitosis para identificar si su origen era reactivo o clonal. Los marcadores para calificar este fenómeno son: la Trombopoyetina (TPO), la presencia del receptor c-Mpl para TPO y la IL-6.

Se evaluó la presencia de la TPO, el receptor e IL-6 en los megacariocitos del bazo de los ratones expuestos a  $V_2O_5$ , comparándolos con los megacariocitos de ratones control. Las determinaciones de los tres marcadores se hicieron por inmunohistoquímica en cortes incluidos en parafina y TPO e IL-6 se cuantificaron por Western Blot (WB).

Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa del receptor a partir de la cuarta semana de inhalación, evidente por inmunohistoquímica, mientras que IL-6 y TPO se mantuvieron sin modificaciones. Los resultados sugieren que el  $V_2O_5$  produce una trombocitosis clonal en los animales expuestos, ya que no se incrementa la TPO y la IL-6. Este cambio en el receptor altera la regulación de la trombocitopoyesis, favoreciendo su incremento y esto a su vez puede dar como resultado el aumento de fenómenos trombo-embólicos en las ciudades con alta contaminación atmosférica, en especial con partículas suspendidas, que son a las que se adosa el vanadio.

En un futuro será importante evaluar los cambios que ocurren en el receptor y el papel que el vanadio tiene directamente sobre éste.

## 2.0. INTRODUCCIÓN

### *2.1 Contaminación ambiental*

La contaminación es la introducción de cualquier sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en el medio inicial.

Se denomina **contaminación ambiental** a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o bien de una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o bien, que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal. Es también, la incorporación a los cuerpos receptores de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas, o mezclas de ellas, siempre que alteren desfavorablemente las condiciones naturales del mismo, o que puedan afectar la salud, la higiene o el bienestar del público (<http://www1.ceit.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/10CAtm1/200Conta.htm>).

Los efectos más graves por la contaminación ocurren cuando la entrada de las sustancias al ambiente rebasa la capacidad de los ecosistemas para asimilarlas y/o degradarlas.

En todo momento de la historia del hombre, éste ha arrojado materiales que pueden considerarse como contaminantes atmosféricos (humo, vapores y partículas), sin embargo, es a partir del desarrollo industrial que esta acción adquiere proporciones considerables, y después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se agrava esta situación. Esto, debido a que el mundo aumentó el consumo de energía, así como la extracción, producción y/o uso de diversas sustancias para las cuales los mecanismos naturales de asimilación o degradación han sido rebasados o no existen (Albert, 2004a).

Las principales causas de la contaminación son las actividades humanas, aunque existe también la contaminación debida a causas naturales, como las erupciones volcánicas y la erosión (Freeman, 1998). Sin embargo, en términos generales, la contaminación de origen natural nunca es tan grave como la de origen antropogénico, y lo mismo se puede aplicar a sus efectos adversos, sobre todo en el largo plazo (Albert, 2004a).

Dentro de las actividades del hombre, las más contaminantes son: las productivas, por ejemplo, las relacionadas con la generación de energía, incluyendo la explotación de los recursos naturales renovables, la industria en general y la agricultura. Sin embargo también las actividades no productivas son causas de contaminación, por ejemplo: las que se realizan en el hogar o las asociadas con el transporte o los servicios. (Albert, 2004a, <http://www.sagan-gea.org/hojared/CAtm.html>, Ehrlich y Ceballos 1997).

### **2.1.1 Contaminación del Aire**

En un país industrializado la contaminación del aire tiene como fuentes principales en proporciones semejantes, los sistemas de transporte, los grandes focos de emisiones industriales y los pequeños focos de emisiones de las ciudades o el campo; pero no debemos olvidar que siempre, al final, estas fuentes de contaminación dependen de la demanda de productos, energía y servicios que hacemos el conjunto de la sociedad.

Se estima que se producen más de 70 000 compuestos químicos diferentes que se utilizan tanto en la industria como en otras actividades humanas y que, inevitablemente, van a parar tarde o temprano a la atmósfera, muchos de estos contaminantes producen importantes daños al ambiente y a la salud (Albert 2004, <http://www.sagan-gea.org/hojared/CAtm.html>, Ehrlich y Ceballos 1997).

Un contaminante puede ser cualquier elemento, compuesto químico o material de cualquier tipo, natural o artificial, capaz de permanecer o ser



arrastrado por el aire. Puede estar en forma de partículas sólidas, gotas líquidas, gases o en diferentes mezclas de estas formas. Algunos de los principales contaminantes atmosféricos son sustancias que se encuentran de forma natural en la atmósfera. Los consideramos contaminantes cuando sus concentraciones son notablemente más elevadas que en la situación normal

(<http://www1.ceit.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/10CAtm1/200Conta.htm>).

Entre los principales contaminantes del aire encontramos a los óxidos de carbono ( $\text{CO}_2$  y  $\text{CO}$ ), óxidos de azufre ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_3$ ), óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ), hidrocarburos, clorofluorocarbonos (CFC), ozono ( $\text{O}_3$ ), metales pesados (Cd, Pb, Zn, Cu, Ni, Cr) y partículas suspendidas totales (PST) (Albert 2004a; INE 2004; <http://www1.ceit.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/10CAtm1/200Conta.htm>).

Las partículas suspendidas son una mezcla de materia orgánica e inorgánica (Costa *et al.*, 1996) y actualmente se consideran uno de los contaminantes principales a los que se les atribuyen efectos adversos en la salud del ser humano. Están constituidas principalmente por metales, compuestos orgánicos, material biológico, iones, y carbón; además, pueden absorber moléculas de gases tóxicos (Flores-Rodríguez, 2004).

Se clasifican de acuerdo con su tamaño en partículas gruesas o  $\text{PM}_{10}$  (miden entre 2.5 y 10 micras) y partículas finas o  $\text{PM}_{2.5}$  (miden menos de 2.5 micras). Ambos tipos se producen durante cualquier tipo de combustión, por ejemplo: erupciones volcánicas, combustión de gasolinas, aceites y demás derivados del petróleo, basura etc. (INE 2004), así como de la extracción de minerales y rocas, y la producción de cemento (Hinds, 1982).

En su superficie se pueden encontrar tanto compuestos inorgánicos – e.g. aluminosilicatos y óxidos – (Holgate *et al.*, 1999), como compuestos

orgánicos como aquellos asociados al hollín (Ghio y Samet, 1999). Los compuestos encontrados en mayor cantidad son los derivados de la combustión cuyo origen son los derivados del petróleo como es el caso de los hidrocarburos aromáticos y los metales (Fernández *et al.*, 2003).

Debido a la capacidad de los metales de condensarse sobre la superficie de las partículas suspendidas, éstas han tomado importancia en los últimos tiempos. Al ser inhaladas, las  $PM_{10}$  se depositan en las vías respiratorias altas pero las  $PM_{2.5}$  pueden llegar a los bronquiólos, los alvéolos y posteriormente al torrente circulatorio, de esta forma los metales pueden alcanzar cualquier parte del organismo y causar efectos adversos (Lippman, 1989; Vallejo *et al.* 2002; Fernández *et al.* 2003; Englert, 2004).

### **2.1.2 Contaminación por Metales Pesados**

Los metales se encuentran normalmente en la naturaleza, pero las actividades antropogénicas han contribuido a su incremento en el ambiente. Los metales pesados son los que tienen mayor toxicidad y la mayoría se emiten a la atmósfera como partículas, excepto mercurio, cadmio y selenio, los cuales, debido a su bajo punto de ebullición, llegan a la atmósfera en forma de vapores. (Flores-Rodríguez 2004; Costa 1996; Järup 2003).

Los metales se encuentran en la atmósfera principalmente en forma de óxidos, los cuales son compuestos muy tóxicos, que entran al organismo adosados a la superficie de las partículas  $PM_{2.5}$ . Aquellos metales con más de una valencia estable participan en la transferencia de electrones y de esta forma generan agentes oxidantes, los cuales son altamente tóxicos para la célula. La variedad en sus valencias también favorece su acumulación en el organismo como compuestos orgánicos e inorgánicos y de esta forma, pueden permanecer en el organismo por largos periodos de tiempo (Nriagu 1990; Costa 1996).

Los metales más estudiados hasta la fecha son aquellos que afectan a las personas ocupacionalmente expuestas como es el caso del mercurio, cadmio, plomo, zinc, cobre; los cuales forman parte de las emisiones industriales (Järup 2003; Flores-Rodríguez 2004).

Existen metales ampliamente estudiados por causar efectos adversos como: el arsénico, el cual causa queratosis, hemólisis, cáncer de pulmón, piel, hígado y vejiga (Järup 2003; Nadal et al. 2004; Del Razo et al 2004 ); el cadmio, el cual tiene graves efectos renales y también es cancerígeno (Rivero et al 1993; Järup 2003; Saldívar-Osorio et al. 2004b); el plomo el cual es el metal más estudiado por sus efectos en el sistema hematológico, además de causar efectos en prácticamente todos los órganos y sistemas del organismo como el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular y el riñón (Saldivar-Osorio et al 2004a; Vallejo et al 2002; Järup 2003).

Además de éstos, existen metales que no han sido tan estudiados pero cuyas concentraciones en la atmósfera han aumentado considerablemente. Este es el caso del vanadio, el cual, como demostraron Fortoul y colaboradores en el 2002, aumentó su concentración en la atmósfera de la Ciudad de México en un 23% entre los 60's y los 90's debido al aumento de la quema de combustibles fósiles (Fortoul et al. 2002), y el cual es el motivo de este trabajo.

## ***2.2 Vanadio***

### **2.2.1 Características Generales**

El vanadio fue descubierto en México por el químico Andrés Manuel del Río en 1813 y le llamó pancromium debido a la gama de colores que presenta de acuerdo a su estado de oxidación. Posteriormente, en 1831, el químico sueco Nils Sefstrom lo purificó en forma de óxido y le llamó Vanadio en honor a la dios de la belleza y la fertilidad, Vanadis (Barceloux 1999; Mukherjee 2004).

Es el segundo metal de transición más abundante en disolución en el océano (35nM). En la corteza terrestre, es más abundante que el flúor, cloro, cobre, zinc y molibdeno. Su concentración en la atmósfera se incrementa cada día debido a su uso como catalizador en procesos industriales, y al aumento en la demanda de combustibles fósiles (Guevara 1996; Fortoul et al. 2002).

En la biosfera, se encuentra en mayor proporción en la flora y fauna marina, aunque también tiene concentraciones importantes en hongos. En la dieta, el hombre obtiene este elemento en algunos alimentos como: pimienta negra, hongos, semilla de eneldo, perejil, espinacas, pescado, ostras y calamares, ya que el resto de los alimentos lo contiene en muy bajas concentraciones (<1ngV/g) (Barceloux 1999; Guevara 1996).

El vanadio es un elemento esencial para las plantas, involucrado, entre otras cosas, con la fijación del nitrógeno. Es esencial en la dieta de algunos mamíferos, ya que se ha confirmado que la deficiencia de vanadio, retrasa el crecimiento y afecta las funciones de la tiroides, sin embargo, dichos cambios no son muy específicos. Ahora bien, no se conocen síntomas por deficiencia de vanadio en el humano (Nechay, 1984).

### **2.2.2 Propiedades Físicas y Químicas**

Es un metal de transición que pertenece al grupo VB de la tabla periódica y ocupa la posición 25. Es de color blanco-grisáceo, es dúctil, resistente a la corrosión y existe en estados de oxidación de  $-1$  a  $+5$ . Siendo sus valencias más comunes  $+3$ ,  $+4$  y  $+5$  (Barceloux 1999, Mukherjee 2004). El estado de oxidación más estable es la forma tetravalente vanadilo ( $VO^{+2}$ ) (Barceloux 1999).

En soluciones ácidas en un pH por debajo de 3.5, el vanadio existe como vanadilo ( $VO^{+2}$ ) mientras que en soluciones básicas se encuentra como

vanadato ( $\text{VO}_4^{-3}$ ), el cual es químicamente similar a los fosfatos ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) (Barceloux 1999, Guevara 1996).

El compuesto más tóxico y más abundante del vanadio es el pentóxido de vanadio, éste existe en forma de cristales amarillos, rojos y verdes. Es este compuesto el que tiene más importancia clínica con las personas ocupacionalmente expuestas (Barceloux 1999, Baran 2003, WHO 2000).

### **2.2.3 Fuentes**

La principal fuente del vanadio es el petróleo, siendo el iraquí, iraní, venezolano y mexicano los que contienen mayor concentración (Barceloux 1999; WHO 2000; Ivancsits, et al. 2002). Más del 70% del vanadio se deriva de la combustión de carbón, aceites, gasolinas y demás derivados del petróleo utilizados para la generación de electricidad (Nriagu 1998; Ress et al. 2003). Otras fuentes incluyen los desechos que se generan durante la producción de aleaciones de fierro y el procesamiento de otros metales como el aluminio, titanio y uranio y limpieza de calderas (Barceloux 1999; Byczkowski y Kulkarni 1998). El resto del vanadio procede del polvo continental, erupciones volcánicas, erosión eólica y aerosoles marinos (Fortoul et al. 2002; WHO 2000; Mugica et al. 2001). La mayoría del vanadio, se desprende como óxidos, siendo, como ya se mencionó, el  $\text{V}_2\text{O}_5$  el más tóxico. Debido a esto, el Instituto Nacional para la Seguridad y la Salud Ocupacional (NIOSH) recomienda que el límite de exposición para las personas ocupacionalmente expuestas sea de  $0.05\text{mg}/\text{m}^3$  por un tiempo no mayor de 15 minutos (WHO 2000, U.S. EPA 1991).

### **2.2.4 Usos**

Los usos del vanadio incluyen la producción de acero (ya que mejora la dureza y maleabilidad) y aleaciones no ferrosas, la catálisis para la producción de ácido sulfúrico y para la conversión de naftaleno a anhídrido ftálico durante la formación del plástico, en la manufactura de

semiconductores, reveladores fotográficos y en la fabricación de algunas pinturas y en la producción de pigmentos amarillos y cerámica (Barceloux, 1999).

También ha tenido uso como agente terapéutico para tratar la sífilis, leishmaniasis, anemia, tuberculosis, diabetes y para disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (Barceloux 1999; Morinville et al. 1998; Fortoul et al. 2002; Mukherjee et al. 2004).

### **2.2.5 Niveles Monitoreados**

Los niveles promedio de vanadio monitoreado en lugares donde el consumo de combustibles fósiles para la producción de electricidad y calor es alto, son de alrededor de  $0.62\mu\text{g V/m}^3$ , comparados con una media de  $0.11\mu\text{g V/m}^3$  en otras áreas urbanas. Generalmente, la concentración de vanadio en el aire en áreas rurales es mucho menor, oscilando de  $1\text{-}2\text{ng V/m}^3$  en áreas remotas, hasta  $50\text{-}60\text{ng V/m}^3$  en otras áreas (Barceloux 1999).

Sin embargo, los niveles de vanadio cerca de industrias metalúrgicas usualmente se encuentran alrededor de  $1\mu\text{g V/m}^3$ , y estos niveles se incrementan mucho más en operaciones de limpieza de calderas, donde se alcanzan niveles de hasta  $500\text{mg V/m}^3$  (Barceloux 1999).

Para la Ciudad de México, Rivero-Rosas reporta que las concentraciones de vanadio varían entre  $0.13\mu\text{g/m}^3$  y  $0.24\mu\text{g/m}^3$  (Rivero-Rosas et al. 1997). Mientras que Fortoul y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio en el que señalan que las concentraciones de este metal han aumentado en la Ciudad de México en las últimas décadas y como consecuencia de este aumento en la atmósfera, el vanadio se incrementó en el tejido pulmonar de los casos de autopsia evaluados (Fortoul et al. 2002).

### **2.2.6 Vías de exposición**

La principal vía de exposición al vanadio es la vía enteral, debido a que, como se mencionó anteriormente, este metal está presente en diversos tipos de alimentos y en el agua de bebida aunque en bajas concentraciones:  $<1\text{ng/g}$  y  $<1\mu\text{g/L}$  respectivamente (Mukherjee, 2004; Barceloux, 1999). A pesar de ser esta la vía de exposición más importante, la absorción del vanadio en el intestino es muy pobre (del 0.5 al 2% de la cantidad ingerida) (WHO 2000). Se estima que la ingesta diaria de vanadio varía de 10-60 $\mu\text{g}$  V (Barceloux, 1999).

La vía respiratoria es la principal vía de absorción para la población en general, ya que de esta forma, se absorbe hasta el 35% de la dosis inhalada, lo cual es muy importante, ya que se sabe que las concentraciones de este metal en la atmósfera han aumentado y que se emiten aproximadamente 64,000 toneladas al año, principalmente en forma de óxidos, los cuales son los compuestos más tóxicos (IPCS, 2001; Barceloux 1999).

### **2.2.7 Toxicocinética**

La toxicidad de los compuestos de vanadio depende de una gran variedad de factores como: la ruta de administración, el tipo de compuesto, la dosis, el tiempo de exposición y la sensibilidad del órgano (Barceloux, 1999; Mukherjee et al. 2004; Evangelou, 2002).

En general, la toxicidad de los compuestos de vanadio es baja, y la toxicidad más baja se produce cuando los compuestos son ingeridos debido a que las sales de vanadio se absorben pobremente en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los compuestos inhalados son más solubles y producen mayor toxicidad ya que pueden llegar rápidamente al torrente circulatorio.

La toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta en relación directa con las valencias por lo tanto sus formas pentavalentes son las más tóxicas. Además los óxidos son más tóxicos que las sales, por lo tanto, el compuesto más tóxico de vanadio es el pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) (Nriagu, 1998; Barceloux, 1999).

El vanadio ingerido se transforma en vanadilo en el estómago antes de absorberse en el intestino (Barceloux, 1999).

Para la vía inhalada, los compuestos solubles como el  $V_2O_5$  se absorben en los pulmones y así alcanza rápidamente el torrente sanguíneo, en donde se reduce a vanadilo, aunque éste sufre oxidación a vanadato in vivo. Aproximadamente el 90% del vanadio en sangre, reside en el plasma y así el vanadilo es transportado por la albúmina y la transferrina; mientras que el vanadato por la albúmina, a los diferentes órganos (Barceloux, 1999; Mukjerhee et al. 2004).

Después del transporte en el plasma, la distribución del vanadio en la sangre es rápida, con un tiempo de vida media de aproximadamente 1 hora. Las concentraciones más altas de vanadio aparecen inicialmente en el riñón, hígado, pulmones, hueso y dientes, siendo estos dos últimos los sitios de almacenamiento para este metal (Barceloux, 1999; Mukherjee et al. 2004). El vanadio además, atraviesa la barrera placentaria y la hematotesticular (Nriagu, 1998).

El vanadio entra a la célula por canales iónicos inespecíficos (Nechay, 1984).

La mayor parte del vanadio ingerido es eliminado en las heces (ya que no se absorbe). La principal ruta de eliminación del vanadio absorbido es por los riñones, con una mínima cantidad (<10%) eliminado vía heces. La cinética de eliminación de los óxidos es rápida y bifásica, con una fase



rápida (10-20 horas) y una lenta (40-50 días) (Barceloux, 1999; Mukherjee et al. 2004).

### **2.2.8 Efectos en la Salud**

Los principales efectos se han observado en personal ocupacionalmente expuesto. Ya que la principal vía de exposición es la inhalada, los efectos en el sistema respiratorio son los más documentados. Los efectos van desde rinitis, estornudos, conjuntivitis, dolor de garganta, tos y dolor torácico, hasta bronquitis, neumonitis y crisis asmáticas. Además, la intoxicación con vanadio causa una coloración verdosa en la lengua (Barceloux 1999; Nriagu 1998; IPCS 2001; Mohammad et al. 1992). En estas personas ocupacionalmente expuestas también se reportan signos y síntomas neurológicos inespecíficos como cefalalgia, debilidad, náuseas, vómito y *tinnitus*, además de alteraciones en los reflejos y excitabilidad neuromuscular (Nriagu 1998).

También se han reportado efectos en el sistema cardiovascular como: arritmia sinusal, bradicardia y espasmo coronario (IPCS 2000).

### **2.2.9 Efectos a nivel celular**

Las valencias del vanadio que tienen relevancia biológica son: el estado pentavalente vanadato ( $\text{HVO}_4^{2-}$  o  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ); el estado tetravalente vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ) y vanadio III. El vanadilo tiene una capacidad muy limitada para cruzar la membrana celular, pero el vanadato entra a través de canales iónicos inespecíficos y ya adentro de la célula, se reduce a vanadilo. Una vez dentro de la célula, el vanadilo se une a los grupos sulfhidrilo de las proteínas, al del glutatión y al ascorbato (Stern et al. 1993).

El vanadio tiene la capacidad de inhibir a una amplia gama de enzimas debido a su capacidad de mimetizar al fosfato, entre ellas se encuentran: la Na-K-ATPasa, la H-K-ATPasa, Ca-ATPasa, Ca-Mg-ATPasa.

Además, inhibe enzimas involucradas en la hidrólisis del ATP como la adenilato cinasa y la ATP fosfohidrolasa, e interviene en procesos metabólicos al inhibir enzimas como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Este metal también causa daños en la síntesis de ADN al inhibir ribonucleasas y ADN polimerasas (Nriagu, 1998; Nechay, 1984; Barceloux 1999).

El vanadio aumenta la fosforilación celular al actuar como análogo de fosfatos sobre las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), algunas de las cuales están involucradas en la progresión del ciclo celular o con la activación de receptores como el receptor de linfocitos T (TCR) (Morinville 1998).

Así como inhibe la actividad de algunas enzimas, el vanadio también puede activar otras como la fosfolipasa C, lo cual lleva a un aumento en la liberación de calcio al citosol y esto en exceso ocasiona daño en adipocitos, hepatocitos, eritrocitos, granulocitos, miocitos y miocardiocitos (Nriagu, 1998). También las MAP cinasas como ERK, JNK y p38 son activadas por el vanadio, y estas vías de señalización finalmente llevan a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y c-Jun, los cuales regulan la expresión de genes como el de la IL-6, IL-8, y TNF $\alpha$ , proteínas involucradas en la respuesta inmune (Byczkowski y Kulkami 1998).

El vanadio también provoca estrés oxidativo ya que el vanadilo y el vanadato pueden actuar como radicales libres y participar en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por el transporte de electrones y por el complejo NADPH oxidasa induciendo la formación de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y este mediante la reacción de Fenton genera el radical hidroxilo (OH) (Nechay 1984; Zhang et al. 2001; Stern et al. 1993).

Estas especies reactivas de oxígeno y los radicales libres provocan la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y causan daños en el ADN (Zhang et al. 2001). Además, disminuye la actividad de enzimas

antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH) y la catalasa en órganos como el hígado y el riñón (Ruslanov et al. 1994).

Al vanadio también se le han atribuido efectos genotóxicos ya que se han observado células con micronúcleos, aberraciones cromosómicas, y aumento de células poliploides y binucleadas en diferentes líneas celulares y en linfocitos humanos (Ivancsits et al. 2002; Roldan y Altamirano 1990; Rodríguez Mercado et al. 2003)., posiblemente como resultado de la interacción del vanadio con las tubulinas ocasionando errores en la formación y función del huso mitótico y arrestos en la fase G2 impidiendo la mitosis (Roldan y Altamirano 1990; Navara et al. 2001; Ramírez et al. 1997; Ivancsits et al. 2002; Morinville et al. 1998).

Hasta la fecha existe controversia acerca de si el vanadio es un metal con efectos cancerígenos o antineoplásicos, ya que hay estudios que reportan que el vanadio ocasiona fibrosis, proliferación celular, carcinomas, adenomas y papilomas (WHO 2000, Riss et al. 2003; Morinville et al. 1998) pero existen otros estudios que mencionan que el vanadio induce apoptosis y necrosis debido a la liberación de radicales libres, peroxidación lipídica y activación de proteínas como Ras que llevan a muerte celular (Capella et al. 2002; Thomson y McNeill 1998; Morinville et al. 1998; Aragón et al. 2005).

#### **2.2.10 Efectos en el sistema hematopoyético**

Poco se sabe acerca de los efectos del vanadio en el sistema hematopoyético y la mayoría de los estudios muestran resultados contradictorios. Por ejemplo después de la administración de metavanadato de amonio 0.19mmolV/kg/día, sulfato de vanadilo 0.15 mmolV/kg/día y bis(maltolato) de oxovanadio (i.v) 0.18 mmol V/kg/día en el agua de bebida por 12 semanas, no se observaron diferencias en el hematocrito, hemoglobina, cuenta eritrocitaria, porcentaje de reticulocitos, cuenta leucocitaria y su cuenta diferencial, conteo plaquetario y fragilidad osmótica

de los eritrocitos de ratas Wistar (Dai et al., 1995). Mientras en otro estudio, Hogan et al. Reportan que una sólo inyección de cloruro de vanadio (V-III), sulfato de vanadilo (V-IV) u ortovanadato de sodio (V-V) causaron un decremento significativo de los eritrocitos circulantes, y un incremento en el porcentaje de reticulocitos (Hogan, 2000).

En 1992, Zaporowska publicó una revisión acerca de los efectos de diferentes compuestos de vanadio, diferentes rutas de administración y tiempos de intoxicación de diferentes animales de laboratorio. En este estudio se muestra que a pesar de que es difícil establecer comparaciones entre los resultados, se ha demostrado que el vanadio reduce la capacidad de deformación de los eritrocitos, produce cambios peroxidativos en la membrana de los eritrocitos llevando a hemólisis. Por lo tanto, la cuenta eritrocitaria baja presente en los animales intoxicados con vanadio pueden ser la consecuencia de ambas: la acción hemolítica del vanadio y la vida media reducida de los eritrocitos. Cambios en el precursor del grupo hemo en suero y orina observados en personas ocupacionalmente expuestos sugieren la influencia de este elemento en la su síntesis (Zaporowska H. y Wasilewski W., 1992A).

En el mismo año, el mismo autor usó ratas Wistar de ambos sexos y les dio como agua de bebida, una solución acuosa que contenía  $0.15\text{mg V/cm}^3$  encontrando un aumento en el porcentaje de reticulocitos y eritrocitos policromatófilos; así como un incremento significativo en los neutrófilos y en los linfocitos. También se observó una influencia inhibitoria en la actividad fagocítica de los granulocitos (Zaporowska H. y Wasilewski W., 1992B).

En 1997, un estudio llevado a cabo en humanos, evaluó los efectos de sulfato de vanadilo por vía oral (100 mg/día por tres semanas) en los índices hematológicos, viscosidad sanguínea y bioquímica encontrando un decremento significativo en la hemoglobina y hematocrito. Las cuentas plaquetarias y leucocitarias se mantuvieron sin cambio (Cohen et al., 1995).

Mientras que en otro estudio realizado usando el mismo compuesto (0.5mg/kg/día), no se encontraron cambios en los índices hematológicos en sujetos sanos (Fawcett et al., 1997).

En el 2002, se realizó un estudio en el cual ratas inhalaban concentraciones de 4, 8, 16 y 32 mg/m<sup>3</sup> de pentóxido de vanadio durante 6 horas, cinco días a la semana y mostró que después de tres meses, los animales presentaban eritrocitosis microcítica (National Toxicology Program, 2002).

Un estudio reciente con el propósito de evaluar los efectos in vivo de una sola dosis de ortovanadato de sodio (33mg/kg i.p) en la eritropoyésis, se realizó en ratones CF-1. Se evaluaron parámetros hematológicos de sangre periférica y médula ósea, maduración de los eritrocitos en el torrente sanguíneo y tejidos hematopoyéticos, frecuencia de progenitores eritrocíticos en médula ósea (ensayos clonogénicos) y expresión de proteínas cruciales para el desarrollo y supervivencia de los eritrocitos (GATA-1, erythropoietin receptor (Epo-R) y Bcl-xL. Los resultados obtenidos sugieren que el ortovanadato no causa citotoxicidad en la médula ósea, pero acelera la maduración de precursores eritrocíticos comprometidos. La expresión sin variaciones de Bcl-xL durante el tiempo del estudio indica que el efecto estimulante del tratamiento con ortovanadato en la eritropoyesis se debe principalmente a la maduración de los precursores de las células rojas y no a la antiapoptosis de los progenitores eritrocíticos terminales (Aguirre et al. 2005).

Hemos desarrollado un modelo experimental en ratón por vía inhalada, usando pentóxido de vanadio 0.02M. Debido a que los reportes sobre la toxicidad del vanadio inhalado en sangre y sus órganos precursores son limitados, se decidió utilizar este modelo para evaluar los efectos del vanadio en el sistema hematopoyético. Para esto se analizó la cuenta sanguínea total y se realizó la cuantificación y el análisis morfológico de las

plaquetas en frotis sanguíneos. Se encontró un incremento significativo en el número de plaquetas desde la tercera semana de exposición, así como la presencia de megaplaquetas. Estos resultados son los primeros que reportan la presencia de trombocitosis después de la exposición a vanadio. La presencia de megaplaquetas sugiere una trombocitosis de tipo clonal, relacionada con un desorden mieloproliferativo, pero esta hipótesis requiere de un análisis más profundo (González-Villalva et al., 2006).

No existe, en la literatura, información previa acerca del Vanadio y la trombocitosis, pero si podemos asociar que en aquellas áreas con gran contaminación ambiental por partículas suspendidas, ha aumentado el número de muertes como consecuencia de enfermedades isquémicas (Dockery DW and Pope CA, 1994; Brook et al. ,2004) lo que puede sugerir que los metales que se adsorben en las partículas suspendidas, y en especial el vanadio, pueden estar involucrados en el inicio de eventos tromboembólicos (González-Villalva et al., 2006).

## ***2.3. Hematopoyesis***

### **2.3.1 Megacariopoyesis y Trombopoyesis**

#### **Megacariocitos**

Los megacariocitos son las células más grandes del sistema hematopoyético ya que pueden medir de 20 a 160 $\mu$ m. De acuerdo a su grado de maduración pueden clasificarse en:

- a) Progenitor megacariocítico.- con un citoplasma altamente basófilo, no granular y núcleo redondeado con uno o más nucleolos es la célula inmadura más reconocible de la serie.
- b) Megacariocito inmaduro.- pueden tener de 2 a 4 lóbulos en el núcleo y citoplasma no granular basófilo.

c) Megacariocito maduro.- Pueden medir hasta 160µm, tienen vacuolas citoplasmáticas y pequeñas extensiones citoplasmáticas o en la superficie celular, contienen una gran cantidad de citoplasma con numerosos gránulos (los gránulos densos contienen serotonina, calcio, ATP y ADP mientras que los gránulos alfa contienen diferentes grupos de proteínas involucradas en la coagulación). El núcleo de los megacariocitos maduros es multilobulado y poliploide (hasta 164n) debido a que se multiplican cromosómicamente sin que se divida el citoplasma y los cromosomas no se segregan en núcleos separados en un proceso llamado endomitosis (Baccini, et al. 2001; Ebbe 1990; Gewirtz 1990; Long. 1990; Shivdasani. 2001).

Los megacariocitos están entre las más raras de las células hematopoyéticas y su función principal es la producción de plaquetas. Estudios genéticos recientes han provisto de un rico panorama acerca de la regulación molecular y transcripcional de la diferenciación megacariocítica y trombopoyética. Los mecanismos de la trombopoyesis son de un interés considerable en la hematología debido a la variedad de síndromes trombocitopénicos y debido a que la diferenciación megacariocítica comprende varios atributos inusuales, como la poliploidía y la fragmentación citoplásmica para formar plaquetas (Shivdasani 2001).

La maduración de los megacariocitos dura aproximadamente 6 días en humanos y de 2 a 3 días en roedores. Empieza en médula ósea y en el bazo (únicamente en roedores) con una célula madre hematopoyética pluripotencial que se diferencia a un progenitor mielocítico. Este a su vez da lugar a la unidad formadora de colonias de megacariocitos (CFU-MK) la cual se diferencia a megacarioblasto, éste a promegacariocito, megacariocito y éste último será el formador de plaquetas. (Figura 1).

Estudios recientes han demostrado la importancia particular de tres reguladores transcripcionales eritroides y megacariocíticos: GATA-1, FOG-1 y

NF-E2 en diferentes estadios de la diferenciación megacariocítica y plaquetaria.

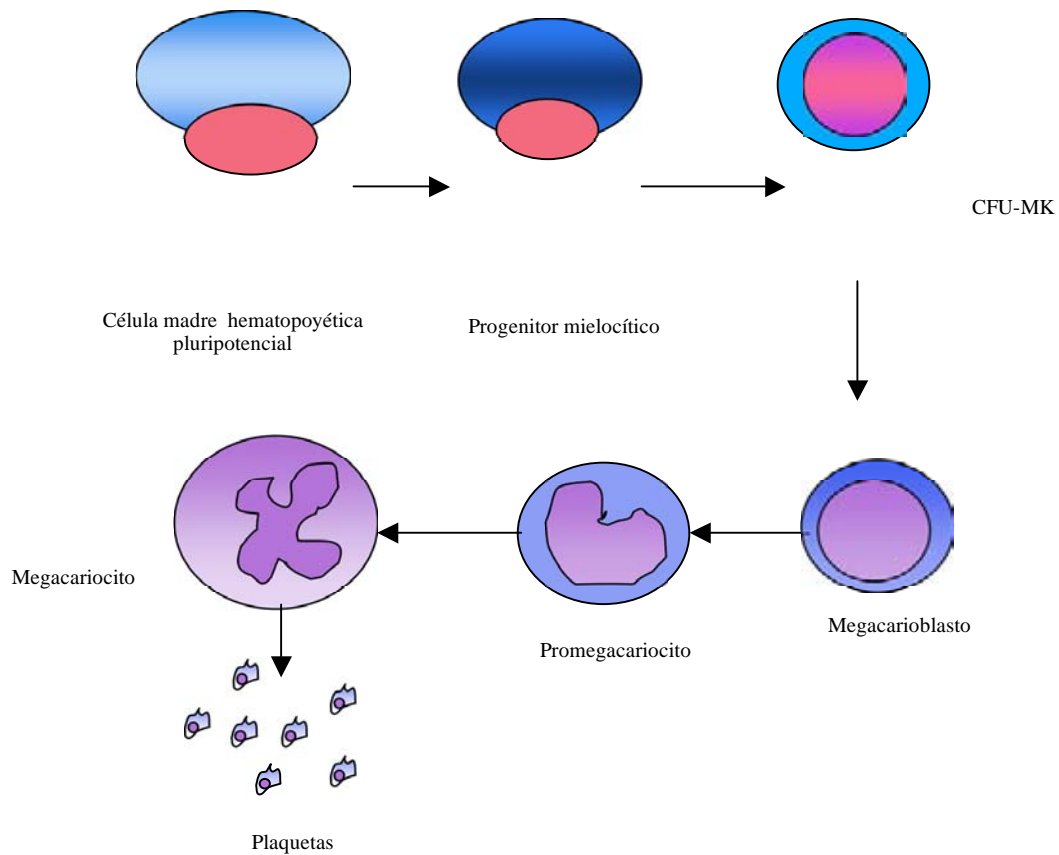


Figura 1.- Etapas de maduración de los megacariocitos.

Asimismo, existen diferentes factores de crecimiento involucrados en la regulación de la megacariopoyesis y la trombocitopoyesis. Dos de estos factores se encuentran fuertemente involucrados en el desarrollo de la trombocitosis: la trombopoyetina (TPO) y la interleucina 6 (IL-6)(Schafer, 2004). Debido a que el motivo de este trabajo es determinar el tipo de trombocitosis producida por la inhalación de pentóxido de vanadio, estos factores se describen a continuación.



### 2.3.1.a Relación de la IL-6 y Trombopoyetina (TPO)

#### *IL-6*

La interleucina 6 pertenece a una familia de citocinas de la cual también forman parte la oncostatina M (OSM), factor inhibitorio de leucemia (LIF) y la interleucina 11 (IL-11). Todas estas comparten funciones en la mayoría de los órganos. Estas funciones incluyen la estimulación de células progenitoras de la médula ósea, síntesis de proteínas de la fase aguda y la inhibición de la conversión adiposa en la médula ósea entre otras. La redundancia en la funcionalidad de estas moléculas puede explicarse por la utilización de una subunidad de señalamiento que tienen en común sus receptores: gp130. Además de ésta, se unen a una subunidad citocina-específica de baja afinidad. Todos los receptores de la superfamilia de los receptores de citocinas están asociados con moléculas llamadas *Janus cinasas* (JAKs). La activación de éstos receptores induce la fosforilación de tirosinas y la activación de JAK las cuales a su vez activan a las STATs (signal transducers and activators of transcription). Los dímeros de STAT, se translocan al núcleo y se unen directamente al DNA (Thomas D y Lopez A., 2001; Balkwill F, 2001).

La IL-6 fue descubierta en el suero de pacientes con inflamación. Es un monómero proteínico glicosilado de 186 aminoácidos con dos puentes disulfuro internos en las cisternas 44 y 50 y 73 y 83. Es producida por una gran variedad de células y puede ser inducida por IL-1 y TNF de fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, astrositos, células B, T y otras. La producción de IL-6 por monolitos puede inducirse por lipopolisacárido y IL-1 $\alpha$ , TNF, IFN $\gamma$  y GM-CSF y es inhibida por los glucocorticosteroides. La IL-6 humana es activa en células murinas, pero la IL-6 de origen murino no es activa en células humanas.

La IL-6 es un factor de diferenciación tardío de la transición de células B estimuladas a células plasmáticas y favorece la secreción de IgM, IgG e IgA. Regula la proliferación de células T y la diferenciación de linfocitos T citotóxicos junto con la IL-1.

La IL-6 tiene diferentes actividades en la hematopoyesis, junto con la IL-3 favorece la formación de colonias de diferentes linajes, incluyendo los progenitores megacariocíticos.

Una de las principales funciones de la IL-6 *in vivo* parece ser el inicio de la respuesta de fase aguda en el hígado durante la inflamación, por la inducción de proteínas de fase aguda. Es capaz de producir fiebre si se inyecta en el organismo (Mire-Sluis A., 2001; Balkwill F, 2001).

### ***Trombopoyetina***

La trombopoyetina (TPO) es el regulador principal de la maduración y proliferación megacariocítica y de la producción plaquetaria, Estructuralmente, la TPO consiste de dos dominios, un dominio N-terminal homólogo a la eritropoyetina, la cual es responsable de la unión al receptor, un C-terminal, altamente glicosilado el cual incrementa la vida media de la molécula en circulación. La TPO se clonó en 1994 como el ligando que estimula al receptor c-Mpl, un receptor de citocina proto-oncogénico expresado en la superficie de los megacariocitos, plaquetas y sus progenitores. Los megacariocitos y su progenie plaquetaria, tienen dichos receptores para la trombopoyetina en su superficie.

La concentración de TPO en la sangre periférica se regula por su unión al receptor c-Mpl en la superficie plaquetaria. La trombopoyetina libre permite la expansión, supervivencia y aumento en la poliploidía de los progenitores megacariocíticos, para aumentar el conteo plaquetario. Así, cuando el conteo plaquetario decae, los niveles aumentados de trombopoyetina libre estimulan la megacariopoyesis, contrariamente,

cuando la cuenta plaquetaria aumenta, los niveles reducidos de trombopoyetina libre disminuyen la megacariopoyesis (Schafer A., 2004; Thomas D y Lopez A., 2001).

### **2.3.2. Alteraciones Trombopoyéticas**

#### **2.3.2.1. Trombocitosis**

La trombocitosis se define como el aumento en el conteo plaquetario a más de 450, 000 plaquetas/mm<sup>3</sup>. Es típicamente descubierta como una anomalía de laboratorio cuando se realiza la cuenta sanguínea completa por una razón no relacionada. Sin embargo, cuando se encuentra, crea un importante reto diagnóstico.

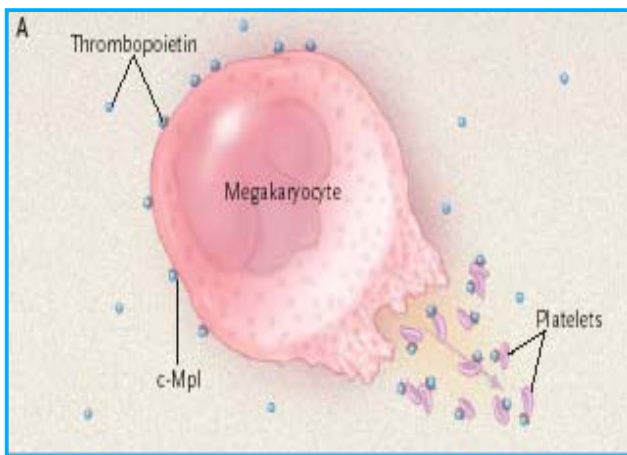
Existen dos tipos de trombocitosis:

A) ***Trombocitosis reactiva o secundaria.***- Es la más común. Este tipo de trombocitosis es causada por niveles elevados de trombopoyetina, IL-6 y algunas otras citocinas producidas en condiciones infecciosas, de inflamación o neoplasias, o incluso en situaciones de estrés. La IL-6 juega un papel relevante en la fase aguda de la respuesta inflamatoria y en enfermedades neoplásicas y regula la expresión del RNA mensajero de la trombopoyetina en el hígado. Por lo cual, la IL-6 puede ser la clave para el aumento de la trombopoyetina y por lo tanto, el factor principal en la trombocitosis reactiva (Kaser A. et al., 2001; Schafer A., 2004; Wang J. et al., 1998).

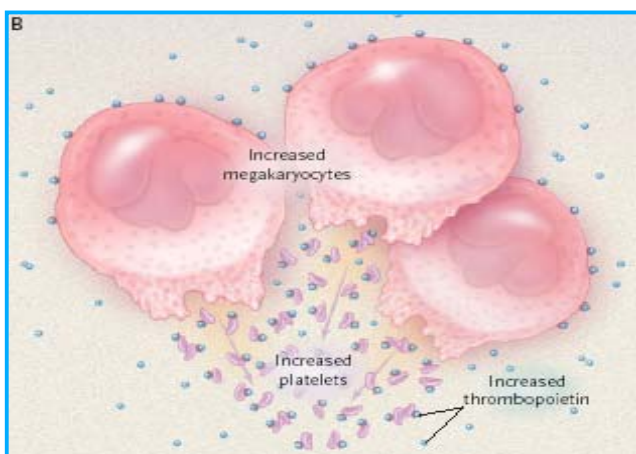
B) ***Trombocitosis clonal o primaria.***- Pertenece al grupo de desórdenes mieloproliferativos crónicos. En este tipo de trombocitosis los niveles de trombopoyetina también se pueden encontrar aumentados, pero en este caso, el mecanismo involucra anomalías en la unión de la TPO al receptor c-Mpl. Un defecto clonal en la expresión de este receptor en megacariocitos y plaquetas, causa la unión ineficiente de la TPO, lo cual conlleva a niveles de trombopoyetina libre, más altos de lo esperado. A

pesar de la pérdida de receptores c-Mpl, los megacariocitos son hipersensibles a la acción de la TPO y el resultado es el aumento de la megacariocitopoyesis y la producción plaquetaria.

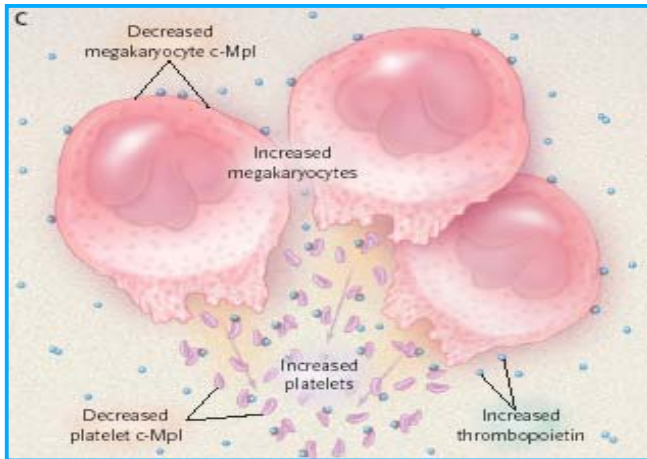
Las hemorragias y eventos trombóticos son las principales complicaciones y causas de muerte en pacientes con trombocitosis esencial y otros desórdenes mieloproliferativos. Estos problemas hemostáticos no ocurren en la trombocitosis secundaria, a pesar del nivel de elevación en el conteo plaquetario (Schafer A., 2004; Wang J et al., 1998; Hoffman R., 1989; Horikawa Y. et al., 1997).



La regulación de la producción plaquetaria por los megacariocitos involucra la unión de la trombopoyetina libre a los megacariocitos, un proceso que estimula la megacariopoyesis y conlleva a la producción de plaquetas.



En la trombocitosis reactiva citocinas inflamatorias como la IL-6 aumentan la síntesis de trombopoyetina lo cual provoca un aumento en la megacariopoyesis y producción plaquetaria.



En la trombocitosis clonal, la unión defectuosa de la TPO al receptor c-Mpl incrementa sus niveles en plasma. A pesar de la pérdida de receptores c-Mpl, los megacariocitos son hipersensibles a la acción de la TPO teniendo como resultado aumento en la megacariocitopoyesis y producción plaquetaria.

### **3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN:**

El vanadio es un metal cuyas concentraciones en la atmósfera de la Ciudad de México han aumentado en las últimas décadas como consecuencia del incremento en la quema de combustibles fósiles. Este metal se encuentra en la atmósfera principalmente adosado a las partículas suspendidas.

Se ha tratado de implicar la participación de los contaminantes, especialmente de las partículas suspendidas totales como causa de enfermedades vasculares trombóticas como el infarto agudo del miocardio. Un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo demostró que la inhalación crónica de pentóxido de vanadio ocasiona trombocitosis en un modelo murino. Por lo tanto, la importancia de diferenciar si se trata de una trombocitosis reactiva o clonal radica en que la segunda está asociada a alteraciones trombohemorrágicas y neoplásicas. De esta forma, si se tratara de una trombocitosis clonal, podríamos sugerir que el vanadio está involucrado con el aumento de fenómenos trombo-embólicos en las ciudades con grandes índices de contaminación atmosférica.

#### 4.0. HIPÓTESIS

La trombocitosis ocasionada por la inhalación crónica de  $V_2O_5$  está relacionada con modificaciones en las concentraciones de IL-6 en bazo, TPO en hígado y bazo y el receptor c-Mpl para trombopoyetina en megacariocitos de bazo.

## 5.0. OBJETIVOS

### Generales

Determinar el tipo de trombocitosis generada por la inhalación de Pentóxido de Vanadio, de acuerdo con la relación entre IL-6, TPO y el receptor c-Mpl.

### Particulares

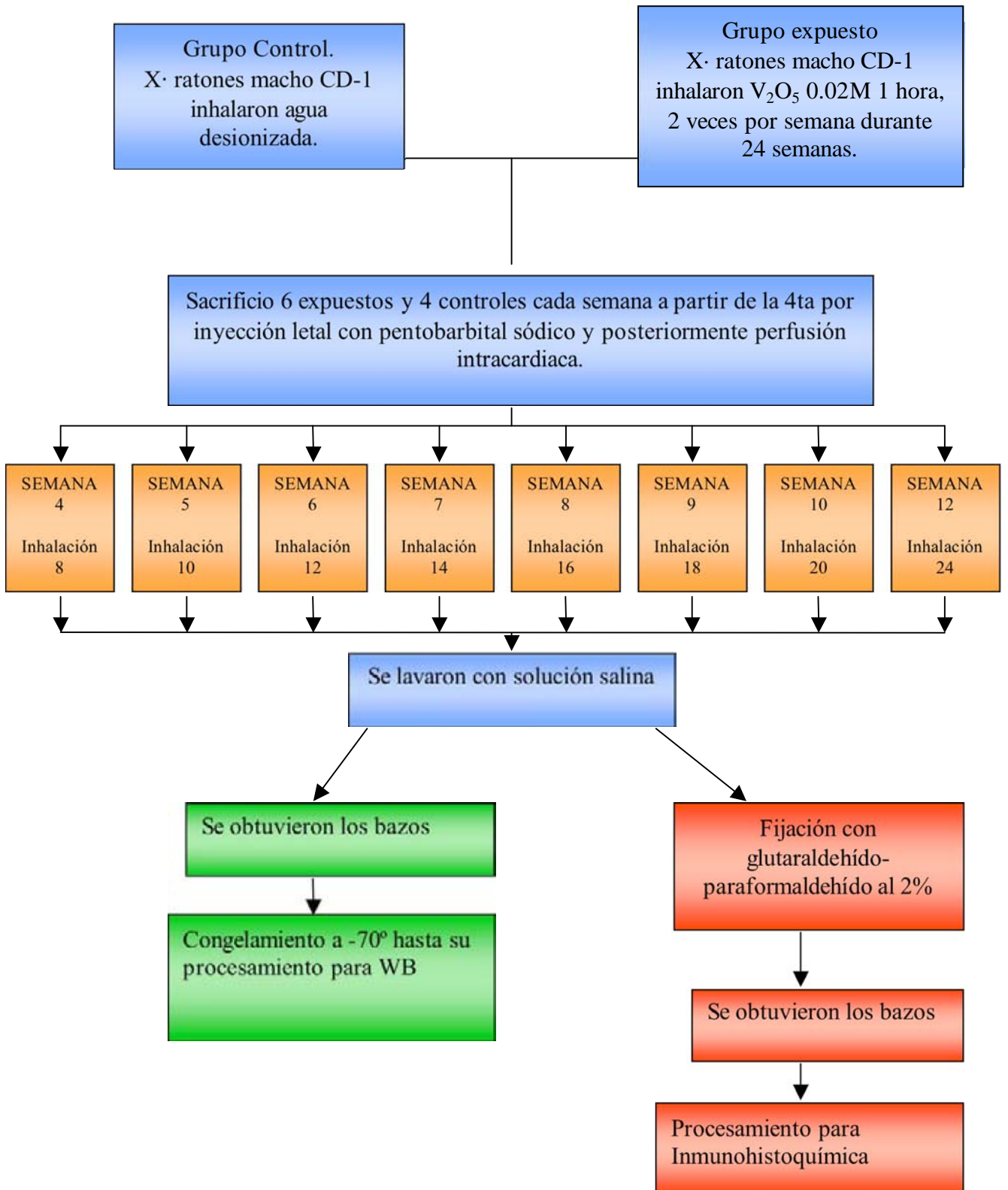
- Cuantificar por IH en bazo:
  - c-Mpl
  - IL-6
  
- Cuantificar por WB:
  - TPO (en bazo e hígado)
  - IL-6 (en bazo)



## 6.0. METODOLOGÍA

Para este estudio se utilizaron 80 ratones macho de la cepa CD-1 de 35 gramos de peso, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Se establecieron dos grupos: uno conformado por 48 ratones expuestos a pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) 0.02M y un grupo control conformado por 32 ratones los cuales fueron expuestos a agua desionizada. La exposición se llevó a cabo colocando los ratones en cajas de acrílico cerradas y conectadas a un ultranebulizador. Cada grupo inhaló durante 1 hora dos veces por semana durante tres meses (Fortoul et al. 1999; Avila-Costa et al. 2004). Debido a que en un estudio anterior realizado por nuestro grupo de trabajo se observó que los animales expuestos presentaban trombocitosis a partir de la cuarta semana de inhalación, se decidió sacrificar a los animales a partir de este tiempo de exposición. Se sacrificaron 6 animales expuestos y 4 controles hasta la semana 12. El sacrificio se hizo por inyección letal con pentobarbital sódico. Los ratones se perfundieron vía intracardiaca con solución salina. A tres de esos ratones expuestos, y dos controles se les sacó el bazo y el hígado y se congelaron a  $-70^{\circ}C$ . Los otros tres ratones expuestos y 2 controles se fijaron con glutaraldehído y paraformaldehído al 2% en amortiguador de cacodilatos (pH 7.4). El bazo de estos animales se colocó en formol al 10% hasta su procesamiento para la técnica de inmunohistoquímica (Figura 2).

Figura 2



### **Western-Blot:**

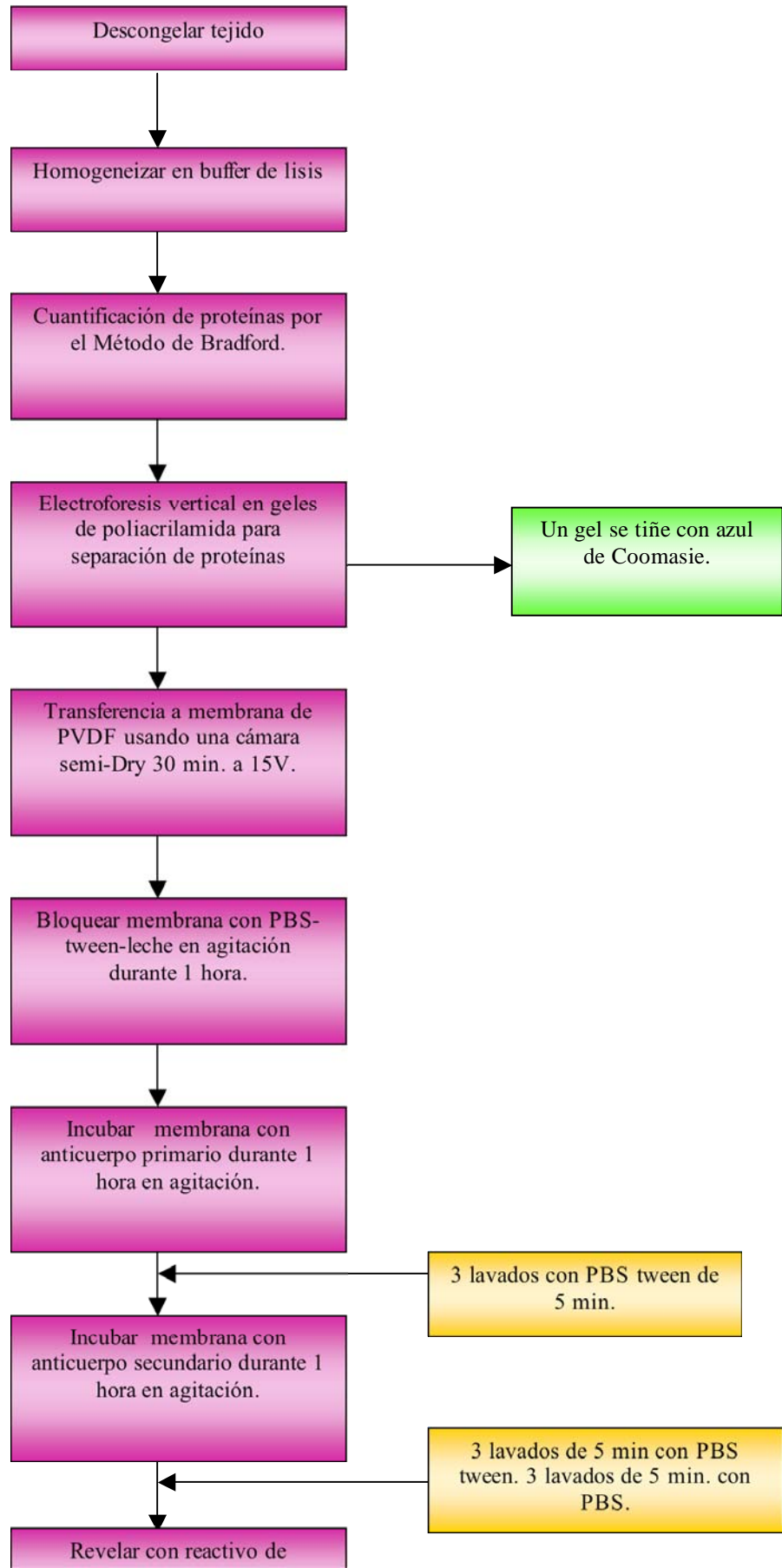
Para la técnica de Western-Blot los bazos e hígados congelados, se descongelaron y se homogeneizaron en buffer de lisis utilizando un sonicador a VELOCIDAD en ciclos de 40 seg. Posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína en estos homogenados por el método de Bradford en microplaca utilizando un lector de ELISA. Después de esto, se siguió el esquema de la figura 3. Esta técnica se utilizó para 2 proteínas: IL-6 (en bazo) y TPO (en hígado y bazo). Para IL-6 se usó una dilución del anticuerpo primario de 1:1000; secundario 1:15,000. Para TPO: primario 1:3,000; secundario 1:15,000.

### **Inmunohistoquímica:**

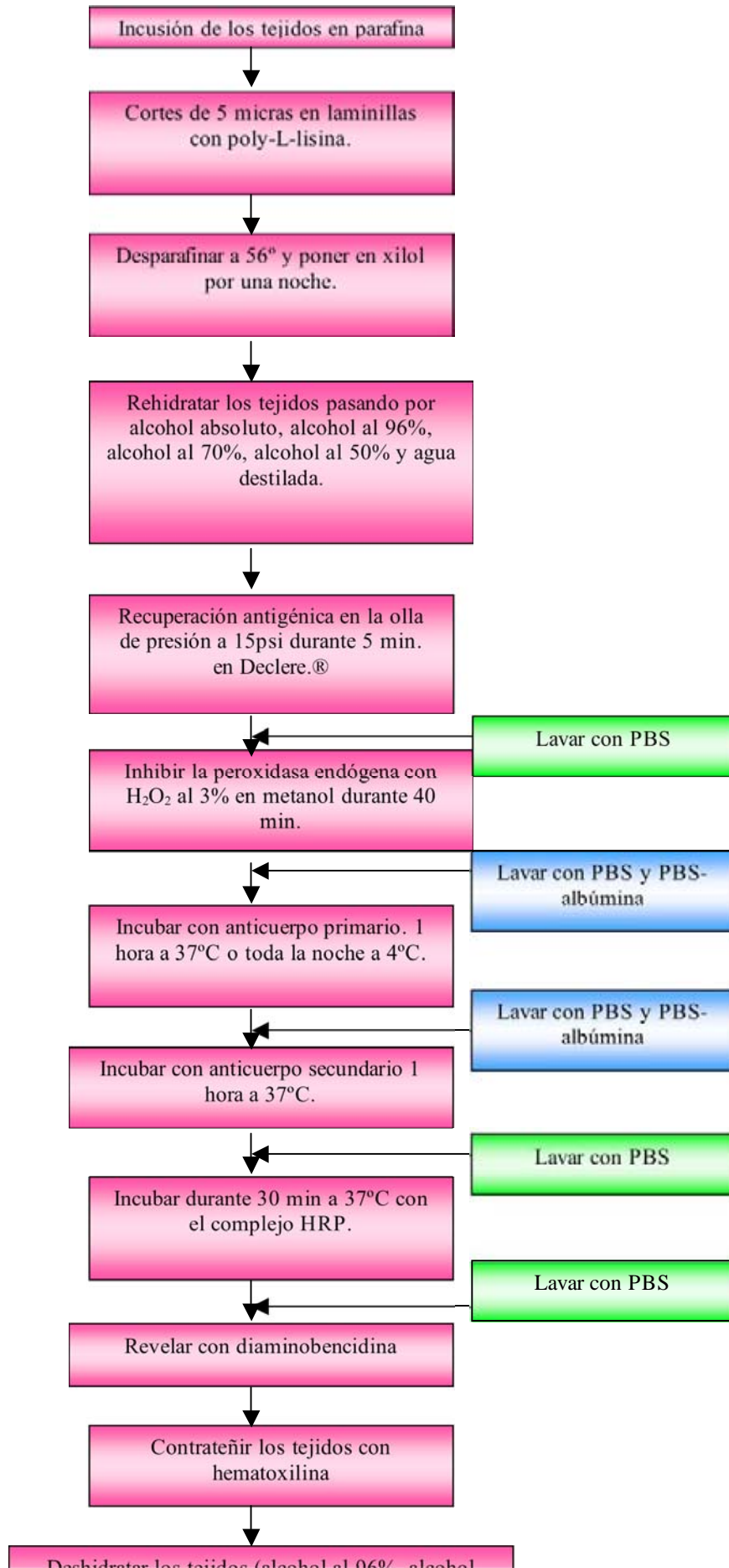
Para la técnica de inmunohistoquímica los bazos fijados se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 micras los cuales se colocaron en laminillas con poly-l-lisina. Posteriormente los tejidos se desparafinaron a 56°C y se mantuvieron en xilol durante una noche. A la mañana siguiente los tejidos se rehidrataron pasándolos por alcohol absoluto, alcohol al 96%, alcohol al 70%, alcohol al 50% y finalmente agua destilada. A continuación se realizó la técnica convencional de inmunohistoquímica siguiendo el siguiente diagrama de la fig. 4.

Esta técnica se realizó para dos proteínas: IL-6 y el receptor c-Mpl. Para la IL-6 se utilizó una dilución de 1:50 y para el receptor c-Mpl 1:200, ambos se diluyeron en buffer de dilución de MARCA.

### Western-Blot. (Figura 3)



Inmunohistoquímica. (Figura 4)



## 7.0. RESULTADOS

### 7.1 IL-6

#### 7.1.1 Inmunohistoquímica

El análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) no mostró diferencia significativa en la concentración de IL-6 de los animales expuestos con respecto al grupo control como se muestra en la figura 5.

Figura 5

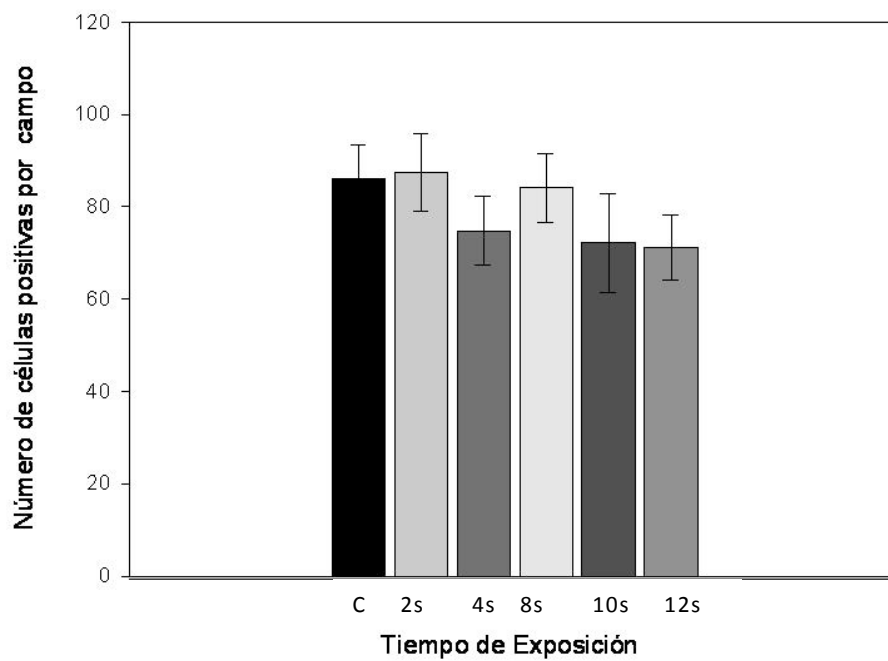
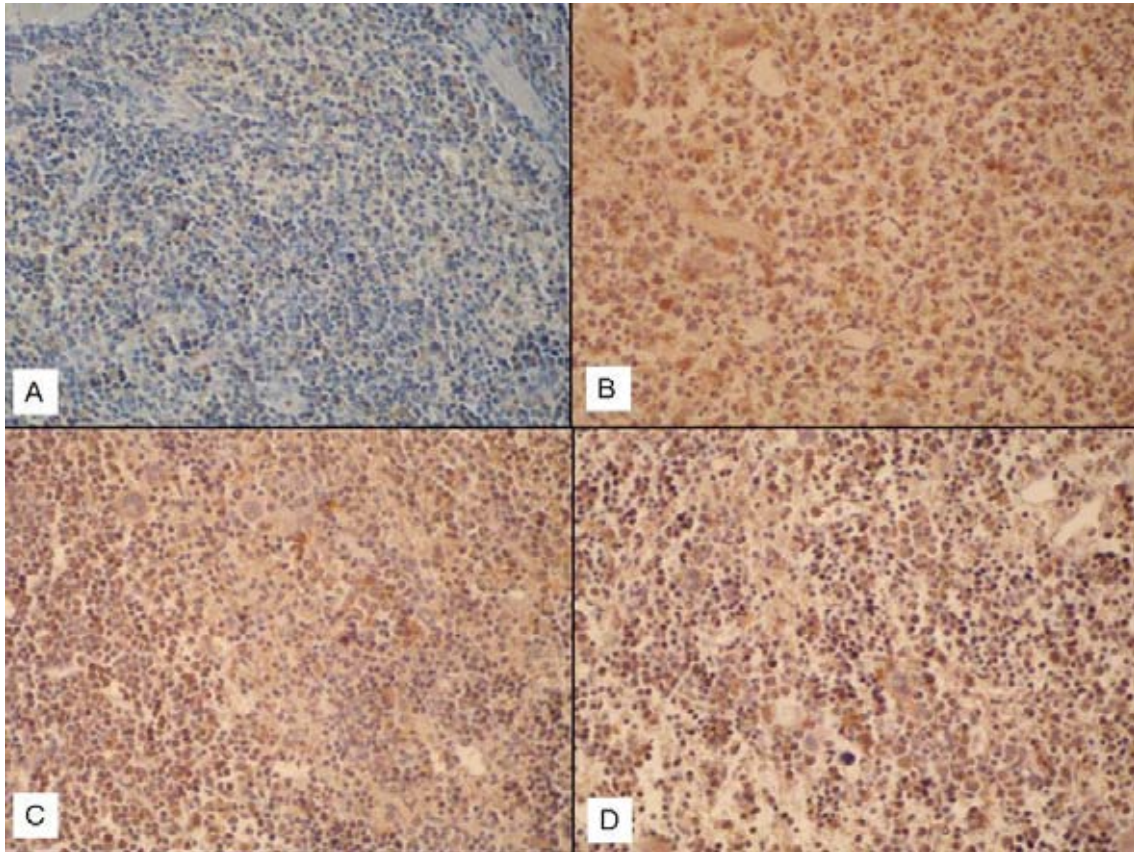


Figura 5.- Número de células positivas a IL-6 contra tiempo de exposición a pentóxido de Vanadio

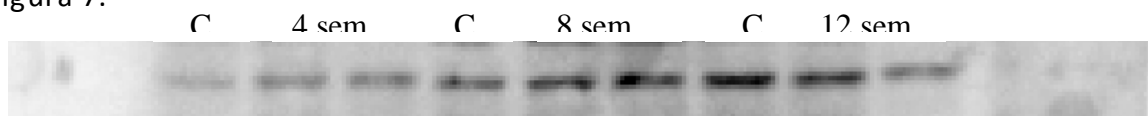


**Figura 6.** Células de bazo positivas a IL-6 después del tratamiento con  $V_2O_5$ . A) Bazo de animal control. B) Bazo de animal tratado 4 semanas. C) Bazo de animal tratado 6 semanas. D) Bazo de animal tratado 8 semanas. No se observa diferencia significativa en la concentración de IL-6. Cabe destacar que la marca es tanto intra como extra celular.

### 7.1.2 Western-Blot

Con la técnica de WB se observa el mismo resultado que con la inmunohistoquímica. La membrana revelada por quimioluminiscencia y como se ve en la figura 7 tampoco se observa diferencia significativa en la concentración de IL-6 en los bazos de animales tratados con  $V_2O_5$  con respecto a los bazos de animales control.

Figura 7.-



**Figura 7.-** Western Blot para IL-6 en Bazo de ratones expuestos a  $V_2O_5$

## 7.2 TPO

### 7.2.1. Western- Blot

La trombopoyetina por WB se analizó tanto en bazo como en hígado de animales expuestos a  $V_2O_5$  y animales control. Como se observa en las figuras 8 y 9 tampoco hay diferencia significativa en las concentraciones de TPO en los bazos e hígados de animales con diferentes semanas de exposición con respecto a los animales control.

Figura 8

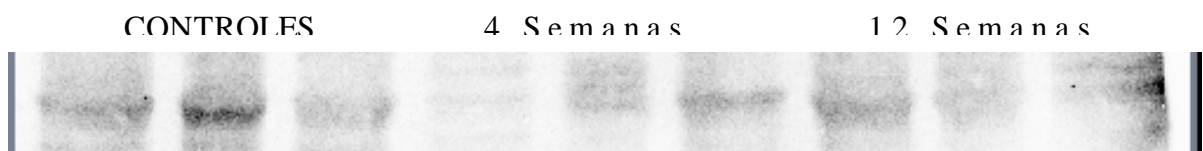


Figura 8.- Western Blot para TPO en Bazo de ratones expuestos a  $V_2O_5$

Figura.9



Figura 9.- Western Blot para TPO en Hígado de ratones expuestos a  $V_2O_5$

## 7.3 *c-Mpl*

### 7.3.1 Inmunohistoquímica

El análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA ( $P < 0.05$ ) muestra una disminución significativa a partir de las 4 semanas de exposición en la



concentración de receptores c-Mpl en los megacariocitos de bazo de los animales expuestos a  $V_2O_5$  con respecto al grupo control como se muestra en la figura 10.

Figura 10

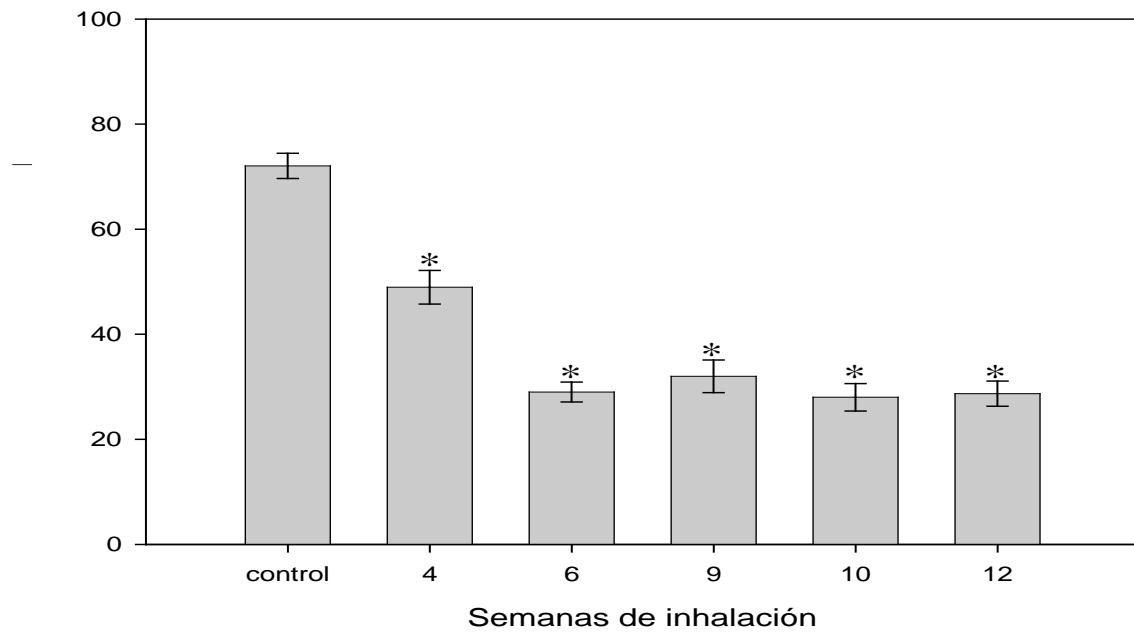


Figura 10.- Número de megacariocitos positivos a c-Mpl contra tiempo de inhalación a  $V_2O_5$ .

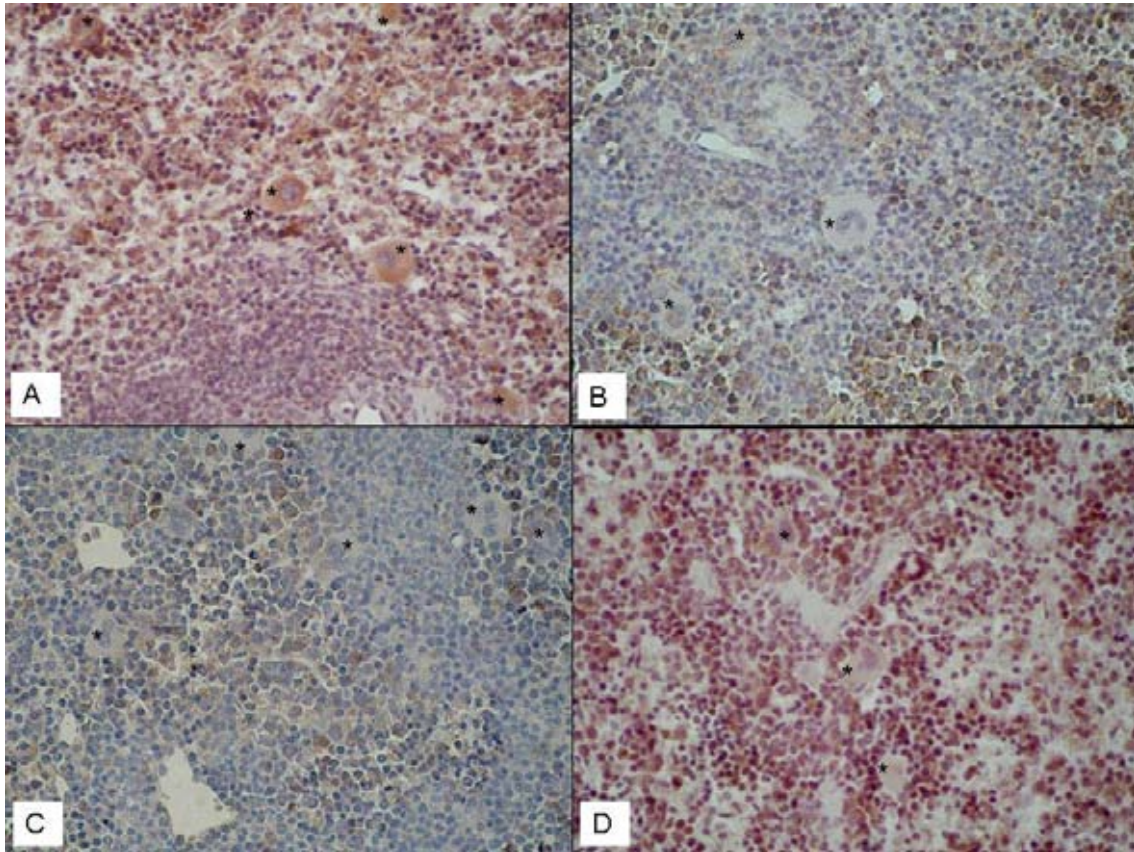


Figura.11. Células de bazo positivas a c-Mpl después del tratamiento con  $V_2O_5$ . A) Bazo de animal control. B) Bazo de animal tratado de 6 semanas. C) Bazo de animal tratado de 12 semanas. D) Bazo de animal tratado de 4 semanas. Los asteriscos señalan megacariocitos. Se observa disminución en la marca en los megacariocitos de bazo de los animales expuestos.

## 8.0. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, poco se ha estudiado acerca de los efectos del vanadio en el sistema hematopoyético y los pocos resultados que hay son contradictorios. Por lo anterior, se decidió utilizar un modelo experimental en ratón para estudiar los efectos del pentóxido de vanadio por vía inhalada. Los resultados obtenidos son los primeros en reportar la presencia de trombocitosis después de la exposición a vanadio. El aumento y las características morfológicas de los megacariocitos (gigantes, poliploides y displásicos) y la presencia de megaplaquetas sugirió que la inhalación de V indujo una trombocitosis de tipo clonal (Gonzalez-Villalva *et al.*, 2006), la cual se reporta asociada con desórdenes mieloproliferativos. Por otro lado los cambios observados pueden explicar parcialmente el incremento en la incidencia de enfermedades isquémicas en las áreas en donde la contaminación ambiental por partículas suspendidas es muy elevada (Dockery DW and Pope CA, 1994; Brook *et al.*, 2004) y podríamos sugerir que el vanadio, que forma parte de las partículas suspendidas, está involucrado en el inicio de los eventos tromboembólicos (González-Villalva *et al.*, 2006).

La exposición a pentóxido de vanadio provocó una disminución significativa del receptor **c-Mpl** para trombopoyetina en los megacariocitos del bazo de los animales expuestos a partir de la cuarta semana. Además de esto, no se encontraron cambios significativos en las concentraciones de IL-6 y TPO, factores que como se mencionó en los antecedentes, ayudan a definir el tipo de trombocitosis a la que nos enfrentamos.

Se sabe que la trombocitosis reactiva es causada por niveles elevados de trombopoyetina, IL-6 y algunas otras citocinas producidas en procesos infecciosos, de inflamación o neoplasias, incluso en situaciones de estrés. Debido a que la IL-6 juega un papel relevante en la fase aguda de la respuesta inflamatoria y en las enfermedades neoplásicas y regula la expresión del RNA mensajero de la trombopoyetina en el hígado, la IL-6

puede ser la clave para el aumento de la trombopoyetina y por lo tanto, el factor principal en la trombocitosis reactiva (Kaser et al, 2001; Schafer, 2004; Wang J. et al., 1998). En nuestro caso, la IL-6 no se incrementó y esto en parte puede explicar que, al menos por esta vía la expresión genética de la TPO no ocurrió.

La disminución de la concentración del receptor c-Mpl en megacariocitos sugiere una trombocitosis de tipo clonal, la cual pertenece al grupo de desórdenes mieloproliferativos crónicos. Además, el nivel de TPO en el plasma depende de la cantidad de plaquetas que se encuentren en circulación, ya que esta molécula es regulada por su unión al receptor c-Mpl en megacariocitos y en las plaquetas, de tal forma que cuando el número de plaquetas baja, la concentración de TPO sube, y lo contrario sucede cuando los niveles plaquetarios son elevados (la concentración de TPO baja al igual que la megacariopoyesis). En este modelo el  $V_2O_5$  indujo un aumento en el número de plaquetas circulantes, lo cual sugeriría que a mayor número de plaquetas, menor concentración de TPO y por lo tanto, la megacariopoyesis se encontraría disminuida, sin embargo, a pesar del aumento en la cuenta plaquetaria, las concentraciones de TPO no se modificaron y la megacariopoyesis aumentó. Esto apoya la hipótesis de que la trombocitosis inducida es de tipo clonal, ya que en ésta, a pesar de la ausencia de receptores c-Mpl, los megacariocitos son hipersensibles a la acción de la TPO teniendo como resultado aumento en la megacariocitopoyesis y en la producción plaquetaria (Schafer, 2004).

Se sabe que el tráfico del receptor c-Mpl hacia y desde la membrana celular es especial en la trombopoyesis, por tres razones:

- 1.- El receptor se recicla a la membrana de las células hematopoyéticas después de la activación y separación de la trombopoyetina.

2.- La regulación de la TPO circulante ocurre por la unión y posterior internalización del complejo ligando-receptor y la degradación de la TPO por las plaquetas.

3.- El tráfico, maduración, glicosilación y estabilidad del receptor se encuentran alterados en diversos desórdenes mieloproliferativos.

El c-Mpl se encuentra unido a las proteínas JAK2 y TyK2 por su dominio citoplásmico. Trabajos recientes se enfocan en el estudio del papel que juegan estas proteínas en los desórdenes mieloproliferativos, y se ha identificado que tanto JAK2 como TyK2 juegan un papel esencial en regular la localización celular del receptor, estimulando su reciclaje, además de prevenir la degradación endosomal y promover la estabilidad del c-Mpl en la superficie celular (Gurney et al. 1995; Rawlings J et al 2004; Royer Y et al. 2005).

#### La participación del Vanadio

El Vanadio tiene la capacidad de alterar la función de diversas enzimas, puede inhibir una gran variedad de ellas, pero también tienen la capacidad de estimular algunas otras (Nriagu, 1998). Se sabe que el Vanadio interfiere con las enzimas que contienen fosfatos, actuando como análogo del grupo fosfato y oxidando su dominio catalítico (Morinville *et al.*, 1999; Samet *et al.*, 1999). Por lo tanto, esto podría explicar la disminución del receptor c-Mpl en los megacariocitos de los animales expuestos a  $V_2O_5$ , ya que el vanadio, al interferir con JAK2 y TyK2 podría afectar el reciclaje y estabilidad del receptor, además de favorecer la degradación del mismo por la vía endosomal (Royer Y. et al., 2005; Mesa RA. et al., 2002; Horikawa Y et al., 1997; Gurney A et al., 1995).

West y cols., en el 2000 realizaron un estudio para determinar la relación entre la contaminación ambiental y la aparición de síndromes mielodisplásicos; en la médula ósea encontraron que algunos metales

como el arsénico, cobre, níquel y aleaciones de aceros, se asocian con aberraciones cromosómicas (West y cols, 2000). Además, en el 2002 se realizó otro estudio en el que se expusieron ratones a diferentes compuestos de partículas (incluyendo pentóxido de vanadio) y se encontró que los animales presentaban arteritis coronaria (Moyer et al. 2002).

El vanadio es uno de esos metales que tienen efectos contradictorios dependiendo del compuesto y el modelo. Poco hay referido de la exposición por la vía inhalada en relación con este elemento y lo interesante es que en algunos casos resulta benéfico y en otros, como en nuestro caso, no.

Aunque en nuestro modelo, después de tres meses de exposición, los animales expuestos no presentaron complicaciones trombóticas, debido a que la trombocitosis clonal se relaciona con mal funcionamiento plaquetario, queda abierta la posibilidad de realizar pruebas de función plaquetaria.

Asimismo, queda aún por identificar el sitio de actividad del elemento, campo totalmente abierto para explorar y que podría dar muchas posibilidades terapéuticas, o tóxicas de este elemento.

## 9.0. CONCLUSIONES

En nuestro modelo encontramos:

- Disminución significativa en la concentración del receptor c-Mpl en megacariocitos de bazo de ratones expuestos, sin cambios significativos en las concentraciones de TPO e IL-6 lo que sugiere una trombocitosis de tipo clonal.

Como consecuencia de lo anterior podemos sugerir que en nuestro modelo, el pentóxido de vanadio tiene un efecto tóxico para el sistema hematopoyético. Queda por explorar si este efecto pudiera tener implicaciones tromboembólicas, lo que implicaría un estudio más profundo sobre la funcionalidad plaquetaria.

## 10.0. BIBLIOGRAFÍA

\*Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC. (2005). Characteristics of in vivo murine erythropoietic response to sodium orthovanadate. *Chem Biol Interact.* Sep 10; 156(1):55-68.

\*Albert L.A. (2004a). Contaminación Ambiental: origen, clases, causas y efectos. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 61-74.

\*Albert L.A. (2004b). Contaminantes ambientales y criterios de evaluación. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 147-164.

\*Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I., Bizarro P., Altamirano-Lozano M. (2005). Vanadium induced ultra structural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproductive Toxicology.* 20: 127-134.

\*Baran EJ.(2003) Model Studies related to vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal of Brazilian Chemistry Society.* 14: 878-888.

\*Barceloux G.D. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology.* 37:265-278.

\*Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I. (2004). Air Pollution and Cardiovascular Disease. A Statement for Healthcare Professionals from the



Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*, 109(21):2655-71.

\*Byczkowski J, Kulkarni AP.(1998). Oxidative Stress and pro-oxidant Biological Effects of Vanadium. Vanadium in the Environment Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver. pp 397.

\*Capella L., Gefé M.R., Silva E.F., Affonso-Mitidieri O., Lopez A.G., Rumjanek V.M., Capella Marcia A.M. (2002). Mecanismos of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch Biochem Biophysics*. 406: 65-72.

\*Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shamoan H, Rossetti L. (1995) Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. Jun; 95(6):2501-9.

\*Costa D.L., Amdur M.O. (1996). Air Pollution. En: Klaassen C.D. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. (5ta ed.). McGraw-Hill. E.U.A., pp 857-883.

\*Dai S, Vera E, McNeill JH (1995). Lack of haematological effect of oral vanadium treatment in rats. *Pharmacol Toxicol*. Apr; 76(4):263-8.

\*Del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Albores A.(2004). Arsénico. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 295-308.

\* Dockery DW, Pope CA. (1994). Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annual Reviews of Public Health*, 15:107–132.

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

\*Ehrlich R.P., Cevallos G. (1997). Población y medio ambiente: ¿qué nos espera? *Ciencia* 48 (4): 19-30.

\*Englert N.(2004) ( Fine particles and human health-a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 149: 235-242.

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

\*Fawcett JP, Farquhar SJ, Thou T, Shand BI. (1997). Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol*. Apr;80(4):202-6.

\*Fernandez A, Wents JO, Wolski N, Hein KRG, Wang S, Witten ML.(2003). Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chemosphere* 51:1129-1139.

\*Flores-Rodriguez J. (2004). Causas y efectos de la contaminación atmosférica. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 167-189.

\*Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López E.I., Bizarro P., Mendoza ML, Saldívar-O L., Espejel G. (2002). Vanadium in ambient air; Concentrations in lung tissue from autopsies of México City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of environmental health*. 57: 446-449.

\*Freeman B. (1998). Environmental Ecology. The Ecological Effects of pollution, Disturbance and other Stresses. Academic Press. New York. pp 606.

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

\*Ghio AJ, Samet JM. (1999). *Air pollutions and Health*. Academic Press. New York. pp 648.

\* González-Villalva A, Fortoul T., Avila-Costa M.R, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Bizarro-Nevarés P, Díaz-Bech P, Mussali-Galante P, Colin-Barenque L. (2006). Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inhalation. *Toxicology and Industrial Health*. 22(3): 113-116.

\*Gurney A.L., Wong S.C, Henzel W.J., De Sauvage F.J. (1995). Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 5292-5296.

\*Hinds W. (1982). *Aerosol Technology. Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles.* John Wiley and Sons. EUA.

\*Hoffman R. (1989). Regulation of Megakaryocytopoiesis. *Blood.* 74(4):1196-1212.

\*Hogan GR. (2000). Comparative erythropoietic effects of three vanadium compounds. *Sci Total Environ.* Jul 10; 256(2-3):185-9.

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

\*Horikawa Y., Matsumura I., Hashimoto K., Shiraga M., Kosugi S., Tadokoro S., Kato T., Miyazaki H., Tomiyama Y., Kurata Y., Matsuzawa Y., Kanakura Y. (1997). Markedly Reduced Expression of Platelet c-mpl Receptor in Essential Thrombocythemia. *Blood.* 90(10): 4031-4038.

\*International Program on Chemical Safety. (IPCS). (2000). *Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds.* Geneva: World Health Organization. (Concise International Chemical Assessment Document 29), pp. 52.

\*International Program on Chemical Safety. (IPCS). (2001). Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Geneva: World Health Organization. (Concise International Chemical Assessment Document 29), pp 36.

\*Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger WH. 2002. Vanadate induces DNA strand break in culture human fibroblasts at doses relevant to occupational exposure. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 519: 25-35.

\*Järup L. (2003) Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1): 167-182

\*Kaser A., Brandacher G., Steurer W., Susanne K., Offner F.A., Zoller H., Theurl I., Widder W., Molnar C., Ludwiczek O., Atkins M.B., Mier J.W., Tilg H. (2001). Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 98(9): 2720-2725.

\*Lippman, M. (1989). Size-selective Health Hazard Sampling, En: Hering S.V. Air Sampling Instruments for Evaluation of Atmospheric Contaminants. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. (7<sup>th</sup> ed). Ohio, U.S.A., pp 163-198.

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

\*Mesa AR., Hanson CA., Li CY., Yoon S., Rajkumar V., Schroeder G y Tefferi A. (2002). Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expresión in essential thrombocythemia. *Blood*. 98(11): 4131-4137.

\*Mohammad A. Al-Bayati, M. Roger Cubertson, Jay P. Shreinder, Leon S. Rosenblatt, Otto G. Raabe. (1992). The Lymphotoxic Action of Vanadate. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 11 (2): 19-27.

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

\*Moyer CF., Kodavanti UP., Haseman JK., Costa DL., Nyska A. (2002). Systemic vascular disease in male B6C3F1 mice exposed to particulate matter by inhalation: studies conducted by the National Toxicology Program. *Toxicology Pathology*. 30(4): 427-434.

\*Mugica V, Maubert M, Torres M, Muñoz J, Rico E. (2001). Temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico city during 1996-1998. *Journal of Aerosol Science*. 33: 91-102.

\*Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., Banerjee P., Tiwari A., Chatterjee M. (2004). Vanadium-an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters* 150:135-143.

\*Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. (2004). Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Science of the Total Environment*. 321: 59-69.

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

\*Navara C.S., Benyumov A., Vassilev A., Naria R.K., Ghosh P., Uckun F.M. (2001). Vanadocenes as potent anti-proliferativ agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*. 12: 369-376.

\* Nechay, B.R. (1984) Mechanisms of action of vanadium. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 24: 501-524.

\*Nriagu J.O., Pirrone N. (1998). Emission of vanadium into atmosphere. En: Nriagu. Vanadium in the environment. Part I. Health effects. John Wiley & sons. New York. pp. 25-36

\*Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegman P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenic and vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 386: 291-298.

\*Rawlings J.S, Rosler K.M, Harrison D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 117: 1281-1283.

\*Ress N.B, Chou B.J., Renne R.A., Dill J.A., Miller R.A., Roycroft J.H., Hailey J.R., Hasseman J.K., Bucher R.B. (2003). Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F mice. *Toxicological Sciences*. 74: 287-296.

\*Rivero Rosas H, Pfeifer G, Lynam D, Pedroza JL, Julian Sánchez A. Canales O, Garfias J. (1997). Personal exposure to elements in Mexico City air. *The science of total environment*. 79-96.

\*Rodriguez-Mercado J., Roldan Reyes E., Altamirano-Lozano M.(2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood. *Toxicology Letters*. 144: 359-369.

\*Roldán R.E., Altamirano L.M.A. (1990). Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutation Research*. 245:61-65.

\*Royer A., Staerk J., Costuleanu M., Courtoy P., Constantinescu S.N. (2005). Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(29): 27251-27261.



\*Russanov E., Zaporowska H., Ivancheva E., Kirkova M., Konstantiniva S. (1994). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 107(3):415-421.

\*Saldívar-Osorio L., Tovar-Tovar A, Namihira-Guerrero D.(2004). Plomo. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 217-239.

\*Saldívar-Osorio L., Tovar-Tovar A., Fortoul-van der Goes T. (2004b). Cadmio. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 259-275.

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

\* Schafer A.I. (2004). Thrombocytosis. *New England Journal of Medicine*, 350: 1211-19.

\*Shivdasani R.A. (2001). Molecular and Transcriptional Regulation of Megakaryocyte Differentiation. *Stem Cells*.19: 397-407.

\*Stern A., Yin X., Tsang S-S., Davison A., Moon J. (1993). Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem. Cell Biol*. 71: 103-112.

- \*Thomas D., Lopez A.F. (2001). Haematopoietic Growth Factors. *Encyclopedia of Life Sciences*. Pp 1-7.
- \*Thomson K.H., McNeil J.H.(1998). Toxicology of vanadium in mammals. Vanadium in the Environment. Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver. pp. 397.
- \*U.S. EPA. (1991). 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 A.G., Márquez M.F., Cárdenas M. (2002). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica Mexicana* 139(1): 57-63.
- \*Wang J.C., Chen C., Novetsky A.D., Litcher S.M., Ahmed F., Friedberg N.(1998). Blood Thrombopoietin Levels in Clonal Thrombocytosis and Reactive Thrombocytosis. *The American Journal of Medicine*. 104: 451-455.
- \*West RR., Stafford DA., White AD., Bowen DT. y Padua RA. (2000). Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood*. 95: 2093-2097.
- \*World Health Organization. 2000. International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds.

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

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

\*Zhang Z., Huang C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterwortg L., Shi X. (2001). Vanadate-Induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 329(2): 311-320.

#### PAGINAS DE INTERNET

\* <http://www.sagan-gea.org/hojared/CAtm.html>

\*<http://www1.ceit.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/10CAtm1/200Conta.htm>

\*Instituto Nacional de Ecología (INE) (2004). <http://www.ine.gob.mx>