

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DEL NÚCLEO
DE LINFOCITOS DE RATONES EXPUESTOS
A LA INHALACIÓN AGUDA, SUBAGUDA
Y CRÓNICA DE V205.
PARTICIPACIÓN DE LAS LÁMINAS NUCLEARES.**

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

VIANEY RODRÍGUEZ LARA

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

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este trabajo a:

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

(**CONACYT**) Número de Becario **203450**

PAPIIT-DGAPA-UNAM PROYECTO **200606**

Del mismo modo agradezco al comité tutorial por su apoyo y sus valiosas aportaciones para poder llevar a cabo este trabajo

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Eduardo García Zepeda

Dra. Fortoul van der Goes

Dr. Mario Altamirano Lozano

Dr. Rogelio Hernández Pando

Agradezco el apoyo y la enseñanza de la técnica y el procesamiento de los tejidos para Microscopía Electrónica de Transmisión a:

Biól. Armando Zepeda Rodríguez

Dr. Adrián Rondán Zárate

Dra. Silvia Antuna Bizarro

M. en C. Patricia Bizarro Nevares

Dra. Laura Colín Barenque

Téc. Francisco Pasos Nájera

De la misma forma, agradezco el apoyo al laboratorio de Técnica Histológica. Depto. de Biología Celular y Tisular. Facultad de Medicina. UNAM. A cargo de la Téc. Verónica Rodríguez Mata. Asimismo, agradezco el apoyo técnico a Téc. Judith Reyes Ruíz.

A la unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina. UNAM. A cargo del Dr. Enrique Pinzón. Por el apoyo continuo para el desarrollo del proyecto.

Al M en C. Francisco Javier García Vázquez del Departamento de Patología. Del Instituto Nacional de Pediatría. Por su apoyo y capacitación para aprender la técnica de inmunofluorescencia.

Agradezco el apoyo en la enseñanza de la técnica y manejo del Citómetro de Flujo al Biól. Germán Alemán Muench, así como al Biól. J. Ramsés Chávez Ríos. Instituto de Ciencias Biomédicas. UNAM.

A la unidad de Citofluorometría del Instituto de Biomédicas. UNAM. A cargo de la Dra. Gloria Soldevila

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A MIS QUERIDOS PADRES: Por todo su amor, su tiempo, paciencia, por sus cuidados y apoyo. Por enseñarme a ser lo que soy, por alentarme en los momentos difíciles, por estar conmigo siempre, por impulsarme a alcanzar mis sueños y por apoyarme a realizar ésta una de mis grandes metas. Por luchar para poder vivir y ver realizados nuestros sueños!!!. Por estar con nosotras. **LOS QUIERO CON TODO MI CORAZÓN SIEMPRE. MIL GRACIAS!!!!.** Les dedico con mucho amor este trabajo.

A MIS HERMANAS: Por su apoyo, cariño y compañía, por estar juntas en las buenas y en las malas, por todo lo que hemos compartido. ¡Las quiero mucho!. Sean tan grandes como quieran ser. ¡Les toca a ustedes!

A MIS ABUELITOS: Por su cariño, amor, cuidados y apoyo incondicional, por darme ánimo para seguir adelante y por estar conmigo siempre! Los quiero mucho abuelitos!!!, les dedico con amor este trabajo.

A MI FAMILIA:

A mis tíos; Arturo Lara, Verónica Lara, Leticia Lara, Claudia Lara, Ma. De las Nieves Rodríguez, Elvira Rodríguez y Adela Rodríguez. Por su cariño y por estar con nosotros siempre, por todo su apoyo en los momentos difíciles y por todo su amor. **MIL GRACIAS.** Los quiero mucho.

A todos mis primos, por estar con nosotros en las buenas y en las malas, por su apoyo para poder desarrollarme.

A JOAQUIN (mi futuro esposo): Por estar conmigo siempre, en los momentos felices y en los difíciles, por ser mi fuerza y mi luz, por todo lo que hemos compartido, los días de trabajo y las aventuras de cada día, por todo el amor y el apoyo que me brindas siempre. Por haber llegado a mi vida.

Gracias Amor.

TE DEDICO ESTA TESIS CON MUCHO CARIÑO

TE AMO POR SIEMPRE

Porque nuestras alas son del tamaño de nuestros sueños.

A Tere Fortoul: Por todo tu cariño, amistad, apoyo incondicional en las buenas y en las malas, por tu tiempo, paciencia, tus valiosas enseñanzas y por impulsarme a ser mejor cada día. Por todo lo que me has enseñado, de todo corazón MIL GRACIAS TERE. TE QUIERO MUCHO!!!.

A mis amigos: Carlos Falcón, Nelly López, Sofía López, por su amistad, compañía y por todo lo que hemos compartido en el laboratorio. Los quiero mucho!

A mis amigos y compañeros de Laboratorio: Patty Bizarro, Laura Colín, Adriana Villalba, Gaby Piñón, Gumaro Cano, Sofía, Adrián, Vero Rodríguez, Judith Reyes, Miguel Herrera, Dr, Castell y Betty por su amistad compañía y valiosos consejos.

A Patty Roa y Sire: Por su amistad y apoyo incondicional. Las quiero mucho chicas.

A mis amigas Sandra y Gala: Por compartir esta etapa conmigo, por su amistad y cariño.

A Germán Alemán: Por su amistad, tiempo, paciencia y valiosas enseñanzas. Gracias!!!

A Dianita, Ramsés, Erika, Anita: Por su compañía en los días de experimentos en Biomédicas y por todo su apoyo. Gracias

A mi Equipo: Por ser la persona increíble que eres, por tu amistad, tu compañía en los momentos felices y tristes, por enseñarme a disfrutar la vida, por las risas, travesuras y momentos inolvidables, GRACIAS mi equipo. TE QUIERO MUCHISIMO SIEMPRE! (Number One for ever).

A José Luis y Anita: Por su amistad y los buenos tiempos. Los quiero mucho!

A MI FAMILIA Y A TODOS USTEDES POR SER MI FORTALEZA Y MI LUZ

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen	1
Abstract	3
2. Introducción	4
2.1 Contaminación Ambiental	4
2.1.1 Contaminación del Aire	5
2.1.2 Contaminación del Aire en las Grandes Urbes	5
2.1.3 Contaminación del Aire y Salud	6
2.1.4 Contaminación del Aire por Metales Pesados	8
2.1 Vanadio	10
2.2.1 Generalidades	10
2.2.2 Propiedades Físico-químicas	10
2.2.3 Fuentes de Vanadio y Vías de Exposición	11
2.2.4 Toxicocinética y Toxicodinamia	12
2.2.5 Efectos en la Salud Humana	15
2.2.6 Efectos Sistémicos del Vanadio. Modelos Experimentales	16
2.2.7 Efectos del Vanadio a Nivel Celular. Modelos Experimentales	17
2.3 Núcleo celular. Modificaciones en células neoplásicas	20
2.3.1 Nucleoesqueleto	22
2.3.2 Láminas nucleares	23
2.3.2.1 Generalidades	23
2.3.2.2 Estructura	23
2.3.2.3 Tipos de Láminas nucleares	25
2.3.2.4 Distribución	26
2.3.2.5 Función	27
2.3.2.6 Alteraciones en las láminas nucleares. Laminopatias y Cáncer	30
3. Justificación	34

4. Objetivos	35
4.1 Generales	
4.2 Particulares	
5. Hipótesis	35
6. Metodología	36
7. Resultados	38
7.1 Evaluación de los cambios en la morfología nuclear de linfocitos de bazo de ratones expuestos a V ₂ O ₅ mediante MET.	
7.2 Evaluación de cambios en las láminas nucleares de linfocitos de ratones expuestos a V ₂ O ₅ .	
8. Discusión	48
9. Conclusiones	59
10. Perspectivas	61
11. Referencias bibliográficas	62

1. RESUMEN

El vanadio es un metaloide que ha tomado importancia como contaminante del aire en las últimas décadas, debido al incremento de su concentración en las grandes ciudades como la de México. Se libera a la atmósfera mediante la quema del petróleo y sus derivados principalmente en forma de V_2O_5 que es el compuesto más tóxico y abundante. Actualmente los habitantes de las grandes urbes presentan una alta incidencia de diferentes enfermedades entre las que se encuentra el cáncer, lo cual ha sido atribuido en parte a la contaminación ambiental, especialmente por metales. Se ha mencionado en diferentes modelos experimentales que el V_2O_5 es un agente carcinogénico, lo cual podría ser consecuencia de su efecto genotóxico, así como de las alteraciones que produce en los mecanismos de muerte por apoptosis, en el ciclo celular y en la estructura y función del citoesqueleto. Sin embargo se desconoce su efecto sobre las láminas nucleares, las cuales forman parte del nucleoesqueleto y recientemente se han relacionado con el desarrollo de eventos neoplásicos. Debido a lo anterior y a que alteraciones sobre estas proteínas producen cambios en la estructura nuclear que podrían estar asociados al establecimiento de eventos malignos, estudiamos el efecto del V_2O_5 vía inhalada sobre la morfología nuclear de linfocitos de bazo y las probables alteraciones en la presencia de las láminas nucleares B1, B2 y AC. Para este estudio se empleó un grupo de 36 animales control y 36 animales expuestos, los cuales inhalaron V_2O_5 (0.02M) 1 hora 2 veces por semana durante 3 meses. Los animales se sacrificaron después de cada semana, se obtuvo el bazo y se procesó para la técnica de MET para observar los cambios ultraestructurales en el núcleo de los linfocitos. Por otro lado, se sacrificaron 25 ratones control y 25 expuestos a los que se les disecó el bazo y se obtuvieron linfocitos T (CD4 y CD8) y B para determinar cambios en la presencia de las láminas nucleares B1, B2 y AC mediante citometría de flujo. En nuestros resultados observamos que la inhalación de V_2O_5 produce alteraciones nucleares en los linfocitos de bazo tales como: invaginaciones y evaginaciones de la envoltura nuclear, cambios en la distribución de la cromatina, edema en la envoltura nuclear, agrupamiento de los poros nucleares, seudoinclusiones y un aparente incremento en el tamaño y número de los nucléolos. Además observamos que el porcentaje de linfocitos con estas alteraciones nucleares incrementa significativamente con el tiempo de exposición. Por otra parte, observamos decremento significativo tanto en el porcentaje de linfocitos que presentan la lámina B1 como en la concentración de esta proteína, desde la primera semana de exposición hasta el final del tratamiento. En el caso de la lámina B2 este decremento en la concentración y en el porcentaje de

linfocitos que la presentan fue significativo sólo en las dos primeras semanas de exposición, mostrando valores parecidos al control al final del tratamiento. Con respecto a la lámina AC, encontramos decremento significativo en las dos primeras semanas de exposición en todas las poblaciones de linfocitos analizadas, mientras que en el caso de los linfocitos TCD8 y B el decremento de estas láminas permaneció hasta el final del tratamiento. Debido a lo anterior podemos concluir que las alteraciones en la estructura nuclear producidas por la exposición a V_2O_5 se explican debido a los cambios en los diferentes tipos de láminas nucleares de los linfocitos de bazo. Dada la importancia de estas proteínas en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del núcleo y debido a su relación con el desarrollo de procesos neoplásicos, los cambios en las láminas nucleares producidos por el vanadio podrían establecer eventos que favorezcan el desarrollo de algún tipo de cáncer de tejido linfoide, sin embargo es necesario realizar otros estudios para comprobar este efecto en nuestro modelo.

1. ABSTRACT

Vanadium (V) is a component of the air suspended particles and it has been associated with a variety of health problems. A predominant source of this element in the atmosphere is the increased combustion of fuel products such as those derived from Venezuelan or Mexican oil, which have a high vanadium concentration. This element has been referred as carcinogenic in experimental models possibly as a consequence of its aneuploidogenic, clastogenic and mutagenic effects. Also, its carcinogenic activity could be associated with cellular cycle interference and cytoskeleton disruption. No information has been found regarding nuclear lamins, which are part of the nuclear cytoskeleton, and vanadium. Nuclear lamina modifications have been associated with neoplastic events. A characteristic of the neoplastic cells is the nuclear variations observed. Findings in our group identify changes in the nuclear structure in cells confronted to vanadium; therefore the exploration of the relation between vanadium exposure and nuclear lamins arise. Thirty six male mice inhaled vanadium (0.02M) twice a week over twelve weeks; a similar group was exposed only to the vehicle and established as controls. Mice were sacrificed each week; the spleen was removed and processed for transmission electron microscopy (TEM) in order to identify lymphocyte's ultrastructural nuclear changes. Other animals were sacrificed to obtain B and T lymphocytes from the spleen for the analysis of the presence of lamins B1, B2 and A/C by fluorescence cytometry. Our results revealed an increase in nuclear modifications such as: invaginations, evaginations, lobulations, chromatin redistribution, nuclear swelling, pseudoinclusions and nuclear pore redistribution in lymphocytes from exposed mice compared with controls. In addition, these changes increased with the time of exposure. The other observed change was regarding nuclear lamins, with a notorious decrease in lamin B1 evident, since the first week of exposure, while B2 diminished at the second week of exposure; however, at the end of the exposure the values returned almost to normal. In the case of lamin A/C the decrease was observed in the first two weeks of exposure, but in TCD8 cells and B cells the decrease persisted until the end of the experimental treatment. With these finding we might conclude that vanadium inhalation interact with nucleoskeleton, mainly with lamins. This interaction could facilitate an event which leads the cell to neoplastic changes in the lymphoid tissue, but further analysis is needed to assure this hypothesis.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación ambiental es actualmente uno de los problemas más importantes a nivel mundial desde el punto de vista económico, social y de salud pública. Se origina como resultado del crecimiento explosivo de la población humana, del desarrollo industrial, el uso creciente de energía y de la cada vez mayor producción de desechos (Ehrlich y Ceballos 1997).

Se define como contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente ya sea físico (ruido, radiaciones ionizantes, calor), químico (clorofluorocarbonos, dióxido de azufre, metales pesados), o biológico (bacterias, virus, toxinas) en lugares, formas y concentraciones tales que modifiquen su composición, alteren el equilibrio ecológico y signifiquen un riesgo para el hombre y demás seres vivos (Romero Placeres *et al.*, 2004).

Según los grandes medios en donde pueda encontrarse, se clasifica en contaminación del suelo, del agua y del aire. La que comprende el suelo se debe principalmente al uso de plaguicidas, a las filtraciones de los rellenos sanitarios, a la acumulación de desechos industriales, entre otros. Esto disminuye la calidad y fertilidad de los suelos dejando de ser útiles para la agricultura. Además la contaminación degrada la vegetación local y algunos tóxicos acumulados en los suelos se incorporan a las cadenas alimenticias (INE 2004).

En lo que se refiere a la contaminación del agua, ésta, hasta hace algunos años provocaba la muerte de millones de personas en el mundo, principalmente debido a la presencia de agentes infecciosos como el cólera, la salmonella, etc. Otros contaminantes del agua son los desechos industriales entre los que se encuentran los metales y los compuestos orgánicos. Los programas actuales de saneamiento han disminuido la mortalidad debida a la contaminación del agua, sin embargo los costos y el mantenimiento de estos sistemas dificultan la tarea. La reducida cantidad de agua para el consumo humano y la contaminación de los cuerpos de agua hacen de éste, un problema que se agravará en los próximos años (Kirbi 2008; Silva 2008).

Por otro lado, la contaminación del aire es otra forma de contaminación ambiental y en las últimas décadas ha incrementado de manera preocupante, por lo que constituye actualmente uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial (WHO 2003; Vargas Marcos 2005; Kampa y Castanas 2007; Ruíz-Godoy *et al.*, 2007).

2.1.1 CONTAMINACIÓN DEL AIRE

Se le define como la emisión al aire de sustancias peligrosas a una tasa que excede la capacidad de los procesos naturales de la atmosfera para transformarlos, precipitarlos, depositarlos o diluirlos por medio del viento y el movimiento del aire (Flores-Rodríguez 2004).

La contaminación atmosférica es actualmente un problema de salud grave, a este respecto, la organización mundial de la salud (OMS) ha reportado que más de 2 millones de muertes prematuras cada año pueden atribuirse a este tipo de contaminación, ya que se emiten toneladas de contaminantes a la atmosfera, algunos de los cuales permanecen largo tiempo en el aire antes de depositarse y difícilmente pueden ser eliminados (WHO 2005).

Los contaminantes del aire provienen principalmente de actividades antropogénicas como: los procesos de la industria metalúrgica, la combustión del petróleo y sus derivados durante la generación de electricidad y la combustión de gasolinas por los vehículos de motor, entre otras, debido a ello, las zonas más afectadas por este tipo de contaminación son las grandes ciudades, donde la concentración de estos tóxicos en el aire y su constante emisión, favorecen la exposición crónica y la acumulación en sus habitantes, lo cual tiene particular incidencia sobre su salud (Kampa y Castanas 2007).

2.1.2 CONTAMINACIÓN DEL AIRE EN LAS GRANDES URBES

Entre las ciudades más contaminadas del mundo se encuentran: Sao Pablo (Brasil), Santiago (Chile), Bogotá (Colombia) y el área metropolitana de la ciudad de México (México), en

ellas los límites de calidad del aire establecidos por la organización mundial de la salud (WHO) son frecuentemente sobrepasados (Romieu *et al.* 1990; IPCS 2001; Molina y Molina 2004).

En las grandes ciudades, son monitoreados diferentes contaminantes del aire, los principales son: el dióxido de carbono (CO₂), el monóxido de carbono (CO), el dióxido de azufre (SO₂), los óxidos de nitrógeno (NO_x), los hidrocarburos, los clorofluorocarbonos (CFC), el ozono (O₃), los metales pesados y las partículas suspendidas totales (PST) (WHO 2005).

Estas últimas son después del ozono los contaminantes más importantes en megaciudades como la de México, debido a su alta concentración en la atmósfera y a que son la principal causa de enfermedades respiratorias graves (IPCS 2001; Mugica *et al.* 2002). Actualmente en México y muchas otras ciudades, su concentración sobrepasa los límites estándar de la calidad del aire, nacionales e internacionales (260 µg/m³ para partículas suspendidas totales o PST y 150 µg/m³ para partículas menores a 10 micras o PM₁₀) (Mugica *et al.* 2002; INE 2004).

Las PST están constituidas principalmente por metales, compuestos orgánicos, material de origen biológico, iones, gases y carbón; provienen de la producción de cemento, la extracción de rocas y minerales, de los incendios, la erosión, las emisiones automovilísticas e industriales y de la quema de combustibles fósiles. Las PST, incluyen a las partículas que miden entre 0.1 y 100 micras. Las partículas de entre 2.5 y 10 micras (PM₁₀), y las que miden de 1 a 2.5 micras (PM_{2.5}), forman la fracción respirable de las PST, las primeras, solo se depositan en el tejido pulmonar, mientras que la fracción fina o PM_{2.5} llega a través de los bronquiolos respiratorios y la región alveolar al torrente sanguíneo mediante difusión causando efectos negativos sobre la salud, que se deben principalmente a su componente metálico (Hinds 1982; Lippmann 1989; HEI 2002; Vallejo *et al.* 2002; Flores-Rodríguez 2004; INE 2004).

2.1.3 CONTAMINACIÓN DEL AIRE Y SALUD

En las últimas décadas se han reportado numerosas evidencias sobre la asociación entre los contaminantes atmosféricos y daños a la salud, principalmente enfermedades respiratorias (Romieu *et al.*, 1996; Téllez-Rojo *et al.*, 1997; Ilabaca *et al.*, 1999; Schwartz 1999; Jarup 2003; Molina y Meneses 2004; Romero Placeres *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2005; Kunzli y Tager, 2005;

Sharma y Agrawal 2005; Huang y Ghio 2006; Campa y Castanas 2007). Los estudios epidemiológicos demuestran que la exposición a diferentes contaminantes atmosféricos, incluso a niveles por debajo de las normas internacionales, se asocian con el incremento en la incidencia de asma, severidad en el deterioro de la función pulmonar, así como mayor gravedad de las enfermedades respiratorias en niños y adolescentes (Romieu *et al.*, 1996; Hernández Cadena *et al.*, 2000; Molina y Meneses 2003; Romero Placeres *et al.*, 2004).

La relación entre la exposición a las PM_{10} y los efectos adversos a la salud se han documentado en diferentes trabajos, por ejemplo, Dockery y Pope (1994) comparan estudios recientes que muestran evidencias de aumento en la mortalidad y en la morbilidad asociadas a la exposición a una concentración moderada de PST. Asimismo en estudios realizados en Estados Unidos, Europa y en algunos países de América (por ejemplo Chile), se demostró que la concentración media anual de las PST estuvo significativamente asociada con la prevalencia de tos y bronquitis en niños escolares siendo más fuerte en aquellos con diagnóstico de asma (Dockery y Pope 1994; Peters *et al.*, 1996; Oyarzún Gómez 2000). De igual forma se ha observado que niños de 5 a 7 años con asma moderada que residen en la Ciudad de México, son afectados por las concentraciones de partículas PM_{10} y en $PM_{2.5}$ afectando el flujo espiratorio máximo (Romieu *et al.*, 1995; Romieu *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1997).

Como se mencionó anteriormente, todos los tipos de contaminantes ambientales en concentraciones altas pueden afectar las vías aéreas. Sin embargo también se ha visto alteraciones en exposiciones largas con concentraciones bajas. Entre los efectos que se han observado se encuentran: inflamación, broncoconstricción, disnea principalmente en individuos asmáticos como resultado de la exposición a SO_2 , NO_2 y metales como arsénico, níquel o vanadio. La exposición a metales también reduce la función pulmonar y son responsables de producir enfisema, asma y eventualmente cáncer. La relación entre la contaminación del aire y la salud es cada vez más evidente. Por ejemplo, el asma y las alergias han aumentado en toda Europa durante las últimas décadas, un 10% de la población infantil padece alguna de estas enfermedades. Los agentes ambientales implicados son el SO_2 , el NO_2 , las PST, el ozono, los compuestos orgánicos volátiles, los hidrocarburos y los metales (Téllez- Rojo *et al.*, 1997).

Por otro lado, ha sido bien documentada la relación entre la exposición a contaminantes del aire y las alteraciones en el sistema cardiovascular. Por ejemplo, contaminantes como el CO modifican la estructura de la hemoglobina y su capacidad para transferir oxígeno afectando órganos como el cerebro y el corazón que consumen una gran cantidad de este gas, además la inflamación sistémica producida por las PST afectan el sistema de coagulación lo cual podría obstruir vasos sanguíneos produciendo problemas cardiacos, incremento en la presión sanguínea y anemia como resultado de alteraciones en la hematopoyesis, lo cual se observa principalmente como consecuencia de la contaminación por metales pesados (Jarup 2003; Cohen *et al.*, 2005; Kunzli y Tager, 2005; Sharma y Agrawal 2005; Huang y Ghio 2006; Campa y Castanas 2007).

Además del incremento en la incidencia de enfermedades respiratorias y cardiovasculares, recientemente otras alteraciones como el cáncer se han asociado con la contaminación ambiental tanto del agua como del aire. A este respecto se ha reportado que la incidencia de cáncer de pulmón en la ciudad de México podrían asociarse con la emisión de diferentes contaminantes tóxicos entre los que destacan las partículas suspendidas totales (PST) lo cual se atribuye a su contenido metálico (Téllez-Rojo *et al.*, 1997; Ruíz Godoy *et al.*, 2007). De la misma manera, otros tipos de neoplasias como las del tejido linfoide se asocian con la contaminación ambiental, entre ellos se encuentran algunas leucemias y el linfoma no Hodgkin (Linos *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2003).

2.1.4 CONTAMINACIÓN DEL AIRE POR METALES PESADOS

Los metales pesados han tomado importancia como contaminantes ambientales debido al incremento de su concentración en el aire y a los efectos adversos que provocan en la salud humana. Algunos metales como el plomo, el mercurio, el cadmio, la plata, el níquel, el cromo, el manganeso y el vanadio, son componentes naturales de la tierra, éstos se emiten a la atmósfera como partículas, (excepto el mercurio, y el cadmio que se liberan en forma de vapores) principalmente mediante las actividades de la industria metalúrgica y la combustión del petróleo y sus derivados (Järup 2003; Flores-Rodríguez 2004; Gutiérrez-Ruiz 2004; Saldívar-Osorio *et al.*, 2004a).

En el aire, reaccionan con el oxígeno por lo cual se encuentran principalmente en forma de óxidos, los cuales son muy tóxicos (Nriagu 1990). Las partículas metálicas son transportadas por el aire como tales o como parte de las PST, pueden mantenerse largo tiempo en el aire si su diámetro aerodinámico es muy pequeño, sin embargo si son de mayor tamaño se depositan y pueden entrar en contacto con el agua y alimentos humanos. Algunos metales se encuentran en los alimentos y son necesarios para las actividades metabólicas en concentraciones muy pequeñas a estos se les llama traza, sin embargo llegan a ser tóxicos cuando incrementan su concentración en los organismos, lo cual sucede frecuentemente en las ciudades, mediante la inhalación de partículas metálicas que forman parte de los contaminantes atmosféricos (Barceloux 1999; Albert 2004b).

Muchos metales son peligrosos ya que tienden a bioacumularse en los tejidos humanos. Debido a la contaminación muchos metales pueden acumularse más rápido de lo que se metabolizan o desechan. Cuando se acumulan en los tejidos causan alteraciones principalmente en el tracto respiratorio y en los sistemas: nervioso, hematopoyético y cardiovascular, además producen daño renal, alteraciones en la fertilidad y recientemente se ha observado relación con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Albert 2004b; Del Razo *et al.*, 2004; Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2004; Saldívar-Osorio *et al.*, 2004a; Saldívar-Osorio *et al.*, 2004b).

Los principales metales considerados contaminantes del aire son: plomo, cobre, cromo, cadmio, manganeso, mercurio, zinc, hierro, berilio, talio, aluminio, níquel, entre otros (Järup 2003; Albert 2004b; Del Razo *et al.*, 2004; Gutiérrez-Ruiz 2004; Saldívar-Osorio *et al.*, 2004a; Saldívar-Osorio *et al.*, 2004b). Algunos metales como el plomo y el cadmio se han estudiado ampliamente debido a sus efectos tóxicos. Sin embargo, existen en el aire otros metales, cuyos efectos sobre la salud han sido pobremente estudiados. Un ejemplo de ello lo constituye el vanadio, el cual es un metal pesado que en las últimas décadas ha tomado importancia como contaminante ambiental (Dundar 2006) debido al incremento de su concentración en la atmósfera, principalmente en las grandes urbes, como la ciudad de México (Fortoul *et al.*, 2002).

2.2 VANADIO

2.2.1 GENERALIDADES

El vanadio fue descubierto en México en 1801 por el químico Andrés Manuel del Río, quien lo nombró primero pancronium. Sin embargo en 1830, Sefstrom y Swedish, al observar la gama de colores del metal en solución lo llamaron Vanadio, en honor a la diosa griega de la belleza Vanadis (Bhagavan *et al.*, 1983; Morinville *et al.*, 1998; Mukherjee *et al.*, 2004).

Debido a su dureza y capacidad para formar aleaciones, el vanadio se ha empleado en la industria metalúrgica para fabricar aceros de gran calidad y resistentes a la corrosión. Se emplea también en la producción de plásticos, reveladores fotográficos e imanes superconductores. Algunos óxidos de vanadio como el pentóxido (V_2O_5), se emplean en la producción de pigmentos amarillos y como catalizadores en la fabricación de ácido sulfúrico (ATSDR 1992; Barceloux 1999; IPCS 2001).

Por otro lado, algunas sales de vanadio han sido utilizados en el tratamiento de enfermedades como: anemia, tuberculosis, sífilis y diabetes mellitus. Además, el vanadio se ha empleado para disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y azúcar en la sangre (Rehder 1992; Thompson *et al.* 1993; Morinville *et al.*, 1998; Nriagu y Pirrone 1998; Poucheret *et al.*, 1998; Barceloux 1999; Mukherjee *et al.*, 2004;).

2.2.2. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

El vanadio es un metal de transición blanco grisáceo que generalmente se encuentra en forma de cristales. Es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza y ocupa el sitio 22 en abundancia. Pertenece al grupo Vb de la tabla periódica y ocupa en ella el lugar 25. Sus estados de oxidación son del -1 al +5, siendo +3, +4, +5 las valencias más comunes (ATSDR 1997; Barceloux 1999; Mukherjee *et al.*, 2004).

Su estado de oxidación más estable es la forma cuadrivalente o vanadil (VO^{+2}) (Barceloux 1999). En sistemas biológicos, la forma en la cual se encuentre el metal depende del pH, por

ejemplo, en soluciones ácidas existe como vanadil (VO^{+2}) mientras que en soluciones básicas se encuentra como ortovanadato (VO_4^{-3}) (Barceloux 1999).

El vanadio forma diferentes compuestos al combinarse con elementos como el cloro, el sodio, el azufre y el oxígeno, por ejemplo, las formas pentavalentes del vanadio que derivan del ion (VO^{3+}) forman compuestos como el metavanadato de sodio (NaVO_3), el metavanadato de amonio (NH_4VO_3) y el ortovanadato de sodio (Na_3VO_4). Otro de los compuestos que forma el vanadio en estado pentavalente al combinarse con el oxígeno, es el pentóxido de vanadio (V_2O_5), el cual existe en forma de cristales rojos, amarillos o verdes, y constituye la forma más abundante y tóxica de vanadio en el ambiente (Barceloux 1999; IPCS 2000; Baran 2003).

2.2.3 FUENTES DE VANADIO Y VÍAS DE EXPOSICIÓN

Una de las principales vías de exposición a vanadio es la enteral, dado que el agua y algunos alimentos contienen este metal en concentraciones menores a $1 \mu\text{g/L}$ y 1ng/g respectivamente (Barceloux 1999; IPCS 2001; Mukherjee *et al.*, 2004). Algunos alimentos ricos en vanadio son: los cereales, ciertos vegetales, frutos y hongos. Particularmente los alimentos que provienen del mar como pescados y mariscos contienen altas concentraciones de vanadio comparado con otros alimentos (Barceloux 1999). Se ha estimado que el total de vanadio ingerido debido a la dieta es de $11\text{-}30 \mu\text{g/día}$ (IPCS 2001).

Por otro lado, la vía inhalada constituye la más importante para la población general, ya que grandes cantidades de este metal, (aproximadamente 64,000 toneladas) se emiten anualmente a la atmósfera (IPCS 2001). El vanadio que se encuentra en el aire se libera desde fuentes naturales como aerosoles marinos, polvos continentales y erupciones volcánicas. Estas fuentes contribuyen con 8.4 toneladas de vanadio al año, que equivale al 10% del vanadio atmosférico, el 90% restante se emite debido a actividades de la industria metalúrgica y la quema de combustible fósil y carbón (ATSDR 1992; Barceloux 1999; IPCS 2001; Fortoul *et al.*, 2002) ya que este metal se encuentra en altas concentraciones ($> 50\%$) en muchos tipos de petróleos incluyendo los de Venezuela, Irak, Irán, Kuwait y el Golfo de México. Esta actividad genera 58,500 toneladas de las 64,000 generadas cada año (Barceloux 1999; IPCS 2001; Fortoul *et al.*, 2002). El

vanadio que proviene de estas fuentes, se libera en forma de vapores y polvos, principalmente de V_2O_5 (ATSDR 1992; Barceloux 1999).

Existen variaciones en la concentración de vanadio en la atmósfera, de acuerdo con las actividades del lugar geográfico que se estudie, por lo que las ciudades presentan concentraciones más altas de este metal, con respecto a las zonas rurales (Barceloux 1999; Dundar 2006). En el caso de la ciudad de México, Riveros-Rosas y cols. (1997) estimaron una concentración de $23 \pm 12 \text{ ng/m}^3$ de vanadio en el aire.

Sin embargo, la mayor exposición a vanadio se produce durante su manejo industrial y en las operaciones de mantenimiento y limpieza de calderas, dada la presencia de vapores y óxidos de vanadio (ATSDR 1992; IPCS 2001). Debido a la toxicidad de éste, la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha determinado que los límites de exposición para polvos de V_2O_5 sea de 0.5 mg/m^3 , y para vapores de V_2O_5 0.1 mg/m^3 en una jornada laboral de 8 horas. Asimismo, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomienda que el límite de exposición a vapores y polvos de V_2O_5 sea de 0.05 mg/m^3 por un tiempo de 15 minutos (ATSDR 1992; OSHA 2005). Pese a los límites sugeridos por éstas instituciones para ambientes laborales, principalmente durante la limpieza de calderas, es frecuente encontrar personal expuesto a concentraciones de $50\text{-}100 \text{ mg V/m}^3$ e incluso hasta 500 mg V/m^3 (IPCS 1988; Barceloux 1999).

2.2.4. TOXICOCINÉTICA Y TOXICODINAMIA

La toxicidad de este metal depende de varios factores que incluyen: la vía de administración, el tipo de compuesto, la concentración, el tiempo de exposición y la sensibilidad del órgano donde se encuentre (Mohammad *et al.*, 1992; Mukherjee *et al.*, 2004).

En lo que se refiere a la vía de exposición, los compuestos de vanadio son poco tóxicos cuando se administran por vía oral, debido a que el metal se absorbe poco en el tracto gastrointestinal. En contraste, los compuestos administrados por vía inhalada son más tóxicos debido a que éstos alcanzan rápidamente el torrente sanguíneo (Nriagu 1998; Barceloux 1999).

Además, la toxicidad de los compuestos de vanadio aumenta con las valencias, por lo que los compuestos pentavalentes son los más tóxicos dado que son más reactivos (IPCS 2001; Baran 2003). De igual forma, los óxidos son más tóxicos que las sales de vanadio (García-Guevara 1996). Por lo anterior, el compuesto más tóxico que puede formar este metal es el pentóxido de vanadio (V_2O_5) (Nriagu 1998; Barceloux 1999; IPCS 2000; IPCS 2001; Baran 2003).

Éste último al igual que otros compuestos de vanadio, entran en contacto con los organismos mediante las diferentes superficies epiteliales del tracto digestivo, aparato respiratorio o de la piel, dependiendo la vía de exposición. Cuando el vanadio atraviesa los epitelios es absorbido y llega al torrente sanguíneo de donde se distribuye a los diferentes órganos (Gutiérrez-Ruiz y Fortoul 2004).

La absorción de los compuestos de vanadio depende de su solubilidad y de la ruta de entrada (Barceloux 1999), en este contexto, la piel constituye la ruta por la que la absorción es menor, debido a la baja solubilidad del vanadio metálico (IPCS 2001; Barceloux 1999). Por otro lado, mediante la vía enteral, los compuestos de vanadio como el vanadil o el vanadato contenidos en algunos alimentos y el agua, son pobremente absorbidos por el tracto gastrointestinal, en rangos de 0.1-1% del vanadio ingerido (IPCS 2001). Mediante esta vía, el vanadato se transforma a vanadil en el estómago y permanece en esa forma en el duodeno, donde posteriormente es absorbido (Barceloux 1999; IPCS 2001; Mukherjee *et al.*, 2004).

En cuanto a la vía inhalada, esta es la mayor ruta de absorción, dado que los compuestos solubles como el pentóxido de vanadio (V_2O_5) son bien absorbidos por los pulmones, mediante los cuales alcanza rápidamente el torrente sanguíneo (Barceloux 1999). Aunque no se ha determinado un rango de absorción por esta vía, existen diversos estudios en personal ocupacionalmente expuesto y en modelos animales que ofrecen evidencias indirectas de la absorción del vanadio por vía inhalada (Gylseth *et al.*, 1979; Kiviluoto 1980; Orris *et al.*, 1983; ATSDR 1992; IPCS 2000).

Por ejemplo, en personal ocupacionalmente expuesto a concentraciones menores a 1 partícula por millón (ppm) de vanadio, se observó un incremento del metal en la orina y suero (Gylseth *et al.*, 1979; Kiviluoto 1980; Orris *et al.*, 1983). Asimismo, mediante la administración intratraqueal de compuestos solubles de vanadio a ratas se observó que este elemento se

deposita en los pulmones donde es rápidamente absorbido. Lo anterior fue comprobado por otro estudio realizado en ratas a las que se les administró cloruro de vanadil marcado radiactivamente (ATSDR 1992; Conklin *et al.*, 1982).

Además Edel y Sabbioni (1988) observaron que el 80% y 85% de vanadio tetravalente y pentavalente respectivamente, se absorbió en los pulmones de ratones, 3 horas después de su administración vía intratraqueal. En ratas macho, se apreció que más del 50% de vanadil oxicluro fue absorbido por los pulmones después de 24 horas de exposición (Oberg *et al.*, 1978), y en ratas hembra, el 90% del pentóxido de vanadio fue eliminado de los pulmones a los tres días posteriores a su administración (Conklin *et al.*, 1982).

Una vez que el vanadio llega al torrente sanguíneo es reducido a vanadil, la forma más estable del vanadio, la cual predomina también en fluidos intracelulares. Una parte del vanadio en la sangre permanece además como metavanadato debido a que las altas concentraciones de oxígeno en este medio promueven la formación de vanadio pentavalente. Aproximadamente el 90% del vanadio en la sangre reside en el plasma donde el vanadil y vanadato son transportados por albúmina y transferrina respectivamente (Barceloux 1999; Mukherjee *et al.*, 2004).

Seguido al transporte por el plasma, el vanadio se distribuye a los diferentes tejidos y órganos en aproximadamente 1-1 ½ horas (Barceloux 1999), por lo que la concentración del metal en la sangre disminuye rápidamente (Mukherjee *et al.*, 2004). Las concentraciones más altas aparecen inicialmente en riñón, hígado, bazo, pulmones, corazón, músculo, tejido adiposo y hueso, siendo este último el principal sitio de almacenamiento para el vanadio absorbido, donde este metal desplaza al fósforo y calcio. El vanadio también se ha encontrado en menor concentración en cerebro, ovarios y testículo (Nechay 1984; ATSDR 1992; Zaporowska y Scibior 1998; Barceloux 1999; IPCS 2001).

El vanadio que se acumula en el medio extracelular (VO_3^-), en los tejidos o en el plasma, entra a las células mediante canales iónicos inespecíficos o por difusión pasiva, cuando las partículas de vanadio son pequeñas e hidrofóbicas (Nechay 1984; Zaporowska y Scibior 1998).

La mayor parte del vanadio absorbido (40-60%), se elimina por la orina, la cual constituye la principal vía de desecho del metal. El vanadio restante se elimina vía bilis y heces, las cuales son una ruta secundaria de excreción ya que mediante ellas se eliminan rangos menores al 10% (Mukherjee *et al.*, 2004). La excreción de este metal, es rápida, la eliminación sigue un comportamiento bifásico, con una primera fase de eliminación rápida (10-20 horas) y una fase lenta (40-50 días), la cual probablemente refleje la eliminación gradual del vanadio en los órganos (Barceloux 1999; IPCS 2001).

2.2.5 EFECTOS DEL VANADIO EN LA SALUD HUMANA

Los efectos en la salud humana producidos por la exposición a vanadio, se han observado principalmente en personal ocupacionalmente expuesto. Debido a que la principal vía de entrada de este metal en el ambiente laboral es la inhalada, los efectos en las vías respiratorias han sido ampliamente documentados. A este respecto, se ha reportado que la exposición crónica a óxidos de vanadio (principalmente trióxido o pentóxido) produce, irritación del epitelio nasal y del tracto respiratorio, hemorragia nasal y pulmonar, además produce rinitis, bronquitis, broncoespasmo, disnea, dolor de garganta y pecho, asma bronquial y neumonía (Baghavan 1983; Mohammad *et al.*, 1992; ATSDR 1995; IPCS 2001; Baran 2003).

Otros efectos del vanadio se observan a nivel del tracto gastrointestinal. La intoxicación mediante la ingesta de vanadio produce dolor. Es característico que la ingestión de vanadio produzca una coloración negra verdosa en la lengua (Bhagavan 1983; Mohammad *et al.*, 1992).

Por otro lado, la intoxicación crónica por vanadio produce alteraciones cardíacas, como arritmia sinusal, bradicardia y espasmo coronario (IPCS 2000). Además se ha reportado que este metal produce daños a nivel de sistema nervioso manifestados por temblores y depresión del sistema nervioso central (Done 1979).

2.2.6 EFECTOS SISTÉMICOS DEL VANADIO.

Modelos Experimentales.

La exposición a vanadio produce efectos adversos en diferentes sistemas principalmente en los órganos en los que se acumula. Por ejemplo, ha sido ampliamente documentada la toxicidad en riñón ya que en exposición crónica el vanadio tiende a acumularse en forma de vanadil un potente inhibidor de las ATPasas, afectado la reabsorción del sodio lo que ocasiona acidosis tubular hipokalémica (Bhagavan 1983; Nriagu 1998).

El hígado después de los huesos y el riñón es el sitio donde existe la mayor concentración de vanadio en exposiciones crónicas, en éste órgano el vanadio produce hepatotoxicidad ya que se observa elevación de enzimas transaminasas en la sangre posteriormente a la exposición, además se ha identificado muerte celular en el hígado y esteatosis. También se han identificado efectos en el sistema cardiovascular ya que disminuye la fuerza de contracción ventricular, produce vasoconstricción, hipertonía muscular y aumento de la tensión arterial, además se ha visto aumentada la excreción urinaria del potasio (Nriagu 1998). Los efectos reprotóxicos también han sido estudiados, a este respecto se ha observado alteraciones en la espermatogénesis tales como muerte celular y decremento en el conteo espermático, además cambios en la motilidad de los espermatozoides (Llobet *et al.*, 1993; Altamirano-Lozano *et al.*, 1996; Aragón y Altamirano-Lozano 2001)

Por otro lado, el sistema inmune ha sido poco estudiado, sin embargo es uno de los sistemas más sensibles al metal. En el modelo de exposición a V_2O_5 vía inhalada de Fortoul y cols. (1999). Se ha observado que este compuesto produce alteraciones en el bazo el cual es un gran filtro para los antígenos y tóxicos que viajan por la sangre, debido a ello éste órgano es uno de los principales sitios de acumulación del vanadio. En él se ha reportado, incremento en el número y tamaño de megacariocitos, una gran proliferación de tejido linfoide, (más evidente en los nódulos linfoides los cuales incrementan en tamaño con la exposición a vanadio) perdiéndose la relación entre la pulpa roja y la pulpa blanca. Esta proliferación de linfocitos también se observó en el timo el cual de igual forma pierde la relación corteza-médula (Piñón-Zárate *et al.*, 2008; González Villalva 2004).

En diversos estudios se ha determinado que el vanadio induce la proliferación de linfocitos y estimula su activación. En modelos *in vitro* se describió que compuestos como el vanadato y el biperioxovanadio están involucrados en la activación de los linfocitos ya que el vanadio es un potente inhibidor de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), lo que resulta en la activación de segundos mensajeros y proteínas como zap70 que conduce a la activación de los factores de transcripción NFκB y AP1 (Barat y Tremblay 2003). Además el vanadio induce un incremento del Ca^{2+} intracelular, activando IPCγ y abriendo los canales de calcio, lo cual induce la activación de la calmodulina, calcineurina y NFAT (Ehring *et al.*, 2000). Otra de las vías por las cuales este metal produce la activación de linfocitos es mediante la producción de ROS como H_2O_2 que activan NFκB (Krejsa *et al.*, 1997).

En el modelo de inhalación de V_2O_5 (Fortoul *et al.*, 1999; Mussali *et al.*, 2005) que se ha trabajado en nuestro laboratorio, además de la proliferación de tejido linfoide apreciada en bazo y timo, se identificaron linfocitos con alteraciones en sus núcleos, tales como: binucleación y cambios en la morfología nuclear, sin embargo no han sido analizadas tales modificaciones ni el mecanismo por el cual el vanadio las produce. No obstante, son de suma importancia dado su parecido morfológico con las células neoplásicas y debido al carácter carcinógeno, linfoproliferador y antiapoptótico del vanadio observado en este y otros modelos.

2.2.7. EFECTOS DEL VANADIO A NIVEL CELULAR.

Modelos Experimentales.

Debido a su gran similitud química con el fosfato, el vanadio puede interferir con diversos sistemas enzimáticos como la Na^+-K^+ -ATPasa, la H^+-K^+ -ATPasa y Ca^+-Mg^+ -ATPasa, las cuales son inhibidas en presencia de este metal (Baghavan *et al.*, 1983; Nechay 1984). El vanadio también inhibe enzimas involucradas en la formación e hidrólisis de ATP, como la adenilato cinasa y la ATP fosfohidrolasa (Nechay 1984). Además puede interferir en procesos metabólicos como la glucólisis, al inhibir a las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato. Otras enzimas que son inhibidas por el vanadio son las ribonucleasas y ADN polimerasas de manera que el metal produce daños a nivel de síntesis de ADN (Nechay 1984; Barceloux 1999).

Asimismo, el vanadio inhibe las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) como la cdc25, la cual es necesaria para la progresión del ciclo celular (Morinville 1998).

Por otra parte, se ha reportado que el vanadio altera el balance entre oxidantes y antioxidantes en las células provocando estrés oxidante. Algunas formas del vanadio como el vanadil y vanadato funcionan como radicales libres y participan en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las principales vías por las cuales se generan ROS son: el transporte de electrones que se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial y el complejo NADPH oxidasa. Los electrones transferidos por estas vías al oxígeno molecular (O_2) inducen la producción del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual a su vez genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la dismutación llevada a cabo por la superóxido dismutasa (SOD). Esta especie finalmente genera el radical hidroxil ($\cdot OH$) vía la reacción de Fenton ($V(IV) + H_2O_2 \rightarrow V(V) + \cdot OH + \bullet OH$) (Nechay 1984; Martínez-Cayuela 1998; Zhang *et al.*, 2001). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son poco tóxicos, sin embargo generan el radical $\cdot OH$, el cual es una de las especies más tóxicas ya que reacciona rápidamente con cualquier molécula (Martínez-Cayuela 1998).

Los radicales libres y las ROS provocan la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, carbohidratos y alteraciones sobre el ADN (Nechay 1984; Zhang *et al.*, 2001). El estrés oxidante causado por el vanadio produce un efecto mayor debido a que este metal disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH) y la catalasa en varios órganos, principalmente en hígado y riñón (Ruslanov *et al.*, 1994).

Por otro lado, el efecto carcinogénico o antineoplásico del vanadio ha sido debatido ampliamente. En este contexto, Thompson y cols. (1984) proponen que el $VOSO_4$ vía oral, reduce la incidencia de cáncer en ratas hembras tratadas con el carcinógeno 1-metil-1-nitrosourea. Asimismo, se ha demostrado que el vanadil inhibe eventos relacionados con la metástasis como la migración y la división celular (Molinuevo *et al.*, 2008).

Sin embargo, otros autores sugieren que el vanadio es un agente carcinogénico, a este respecto Chatterjee y Bishavee (1998) reportan un incremento en la incidencia de hepatocarcinomas al administrar vanadato de amonio vía oral. Estudios recientes realizados con pentóxido de vanadio vía inhalada muestran la formación de neoplasias alveolares y bronquiolares tipo A y B en ratas hembras y machos después de dos años de exposición (Ress *et al.*, 2003).

Aunque actualmente no es posible asegurar si el vanadio es un agente neoplásico o antineoplásico, con los datos publicados sabemos que tal efecto depende del compuesto, la dosis y la vía de exposición. En cuanto a ello, las sales y los compuestos orgánicos muestran un efecto antineoplásico (Krishna *et al.*, 2000; Evangelou *et al.*, 2002; Molinuevo *et al.*, 2004; Chattopadhyay *et al.*, 2005; Molinuevo *et al.*, 2006) en tanto, los óxidos que son los compuestos más tóxicos muestran un efecto carcinogénico (Ress *et al.*, 2003). A este respecto, la agencia internacional para la investigación en cáncer (IARC) considera al V₂O₅ como un miembro del grupo 2B (posible carcinógeno en humanos) (IARC 2007).

El efecto carcinogénico del vanadio se ha atribuido entre otras causas, a las alteraciones que produce este metal sobre el ADN y las proteínas del citoesqueleto, principalmente las involucradas en la formación del huso mitótico (Roldán y Altamirano 1990; Migliore 1993; Leonard y Gerber 1994; Zhong *et al.*, 1994; Thompson y Perry 1988).

Se ha observado que algunas sales de vanadio como el metavanadato, ortovanadato y vanadil (Cande y Wolniak 1978), así como el pentóxido de vanadio (Sun 1987; Migliore 1993; Zhong *et al.*, 1994) producen incremento en la incidencia de micronúcleos e inhiben el movimiento de los cromosomas durante la anafase en las líneas celulares PtK1, V79 y de médula ósea. Otras sales como el metavanadato de amonio producen también aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Owusu-Yaw *et al.*, 1990). Asimismo, Roldán y Altamirano (1990), reportaron que el pentóxido de vanadio en linfocitos humanos, incrementa la frecuencia de células poliploides, las asociaciones satelitales y disminuye el índice mitótico, estos resultados son apoyados por Zhong y cols. (1994) quienes observaron que el mismo compuesto produce arresto mitótico. Tales alteraciones han sido atribuidas a daños en el huso mitótico (Owusu-Yaw *et al.*, 1990; Roldán y Altamirano 1990; Zhong *et al.*, 1994).

Además recientemente se ha reportado que el vanadio modifica el proceso de división del centrosoma, un organelo que dirige la segregación cromosómica al ser el sitio de formación y estabilidad de los microtúbulos (Navara *et al.*, 2001). De igual manera en nuestro modelo hemos observado previamente que el V₂O₅ altera otros componentes del citoesqueleto, como la gamma-tubulina (Rodríguez-Lara 2005; Mussali *et al.*, 2005) un componente importante del centrosoma,

lo cual podría favorecer la aparición de células aneuploides relacionadas con el desarrollo de eventos neoplásicos.

Por otro lado, el daño en el ADN es un paso inicial y crítico para la carcinogénesis y un factor etiológico en el cáncer. El vanadio puede ingresar al núcleo celular donde se acumula preferencialmente (Sit *et al.*, 1996; Evangelou 2002), ahí genera radicales libres como el ion hidroxilo (OH[•]), que producen daño oxidante al material genético (Sit *et al.*, 1996). Las ROS dentro de las células actúan como segundos mensajeros en la cascada de señalización celular, la cual induce y mantiene el fenotipo oncogénico de las células cancerosas. Por otro lado pueden inducir senescencia celular y apoptosis y por lo tanto funcionar como especies anticancerígenas. Es común que muchos tipos de cáncer se relacionen con alteraciones en la regulación del estado redox y en las vías de señalización lo que puede desencadenar la estimulación oncogénica (Valko *et al.*, 2006).

A parte del daño en el ADN, en las proteínas del ciclo celular y las proteínas del citoesqueleto, se ha observado recientemente que proteínas del nucleoesqueleto como las láminas nucleares podrían estar implicadas en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Broers *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1999; Prokocimer *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2007), sin embargo se desconoce el efecto que tiene el vanadio, un metal citotóxico y promotor de la carcinogénesis, en estas proteínas.

2.3 NÚCLEO CELULAR.

Modificaciones en Células Neoplásicas.

El núcleo es el organelo más grande de una célula eucariota, por lo regular es esférico y de localización central, ahí se encuentra almacenada la información genética y es el sitio donde se duplica y transcribe. Este organelo presenta un nucleoesqueleto que le brinda sostén y permite organizar espacialmente los procesos que ahí se llevan a cabo. Los cambios morfológicos que sufre el núcleo son de suma importancia para diagnosticar enfermedades como el cáncer (Gerner 2004; Zink *et al.*, 2004).

Estas alteraciones incluyen formas anormales del núcleo, cambios en la relación núcleo-citoplasma, alteraciones en el patrón de distribución de la cromatina y cambios nucleolares (Ghadially 1997; Gerner 2004; Dey 2005) (Figura 1).

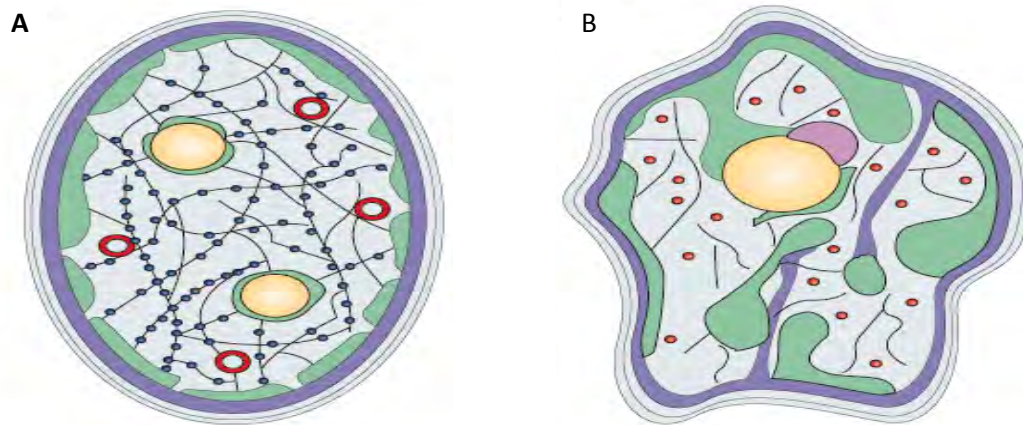


Figura 1. Cambios nucleares en células cancerosas. **A.** Se observa el núcleo de una célula normal: en morado se muestra la lámina nuclear, en verde la cromatina. La matriz nuclear se muestra en azul cielo y las proteínas de la matriz nuclear en azul marino, en amarillo se observan los nucléolos. **B.** Se muestran algunas de las modificaciones nucleares características de una célula neoplásica, entre los que se encuentran cambios morfológicos como: lobulaciones, invaginaciones y evaginaciones de la envoltura nuclear que se propone son resultado de cambios en la lámina nuclear (morado). Estas alteraciones morfológicas se acompañan de cambios en la distribución de la cromatina (verde). Además se muestra incremento en el tamaño y/o número de los nucléolos (Tomado de Zink *et al.*, 2004).

En las células malignas el patrón de la cromatina puede ser granular denso distribuido regular o irregularmente, o bien fino y con una distribución irregular. Ocasionalmente puede presentarse una distribución marginal, mostrando gran cantidad de cromatina en la periferia y zonas más claras en el centro del núcleo. Además puede observarse una acumulación focal de cromatina compacta en la membrana nuclear (Zink *et al.*, 2004)

No es claro por qué una célula maligna presenta estas alteraciones en la estructura y patrón de la cromatina, sin embargo diversos estudios muestran que cambios en la estructura de las histonas producen modificaciones en la estructura del nucleosoma y en el patrón de la cromatina. Asimismo, algunas proteínas de la membrana nuclear (NMP) están alteradas de manera cualitativa y cuantitativa en algunos tipos de cáncer. Algunos experimentos sugieren que las proteínas de la matriz nuclear como las láminas nucleares podrían estar involucradas en este

proceso, ya que forman un esqueleto interno en el núcleo dándole forma y sostén, anclan la cromatina a la envoltura nuclear y regulan la expresión génica (Dey 2005).

Otro elemento característico en el núcleo de una célula maligna es el número anormal de cromosomas o aneuploidías. El exceso de ADN puede producir hiperchromasia. Además este número anormal de cromosomas puede también desorganizar la cromatina. Las aneuploidías son frecuentemente resultado de alteraciones en el citoesqueleto y en el nucleoesqueleto (Dey 2005).

Aunque estos cambios nucleares se presentan en todos los tipos de cáncer, no se conoce con certeza por qué se producen y la relación que tienen con el fenotipo maligno. Sin embargo, actualmente se ha reportado que proteínas que forman parte del nucleoesqueleto, como las láminas nucleares, son importantes y participan en este proceso.

2.3.1 NUCLEOESQUELETO

En los últimos años existe un interés creciente por estudiar las proteínas estructurales del núcleo y su participación en la regulación de los procesos y actividades nucleares, desde el ensamble nuclear hasta la regulación de la expresión génica. Cuando se identificaron por primera vez estas proteínas, se observó que muchas de ellas eran miembros de la misma familia de las proteínas del citoesqueleto, por lo cual a esta red proteica que es análoga estructural y funcionalmente al citoesqueleto, le llamaron nucleoesqueleto (Hozák 1996; Philimonenko *et al.*, 2001).

El nucleoesqueleto está constituido por una lámina nuclear localizada debajo de la envoltura nuclear y se forma por una red de polímeros de proteínas llamadas láminas nucleares y proteínas asociadas a las láminas (LAPs) que se adosan a la envoltura nuclear y un nucleoesqueleto difuso, formado por filamentos de láminas nucleares y actina localizados en el nucleoplasma: En conjunto las proteínas del nucleoesqueleto proveen un sostén para la replicación y transcripción del ADN y para la gran cantidad de funciones nucleares, organizando temporal y espacialmente estos procesos (Hozák 1996; Philimonenko *et al.*, 2001; Shumaker 2003).

Actualmente las proteínas del nucleoesqueleto más estudiadas son las láminas nucleares y sus proteínas asociadas, como consecuencia del papel que juegan en la regulación de distintos procesos nucleares y a la enorme cantidad de patologías en las cuales se encuentran alteradas (Moss *et al.*, 1999; Moir y Spann 2001; Wilsol *et al.*, 2001; Coffey 2002; Rankin y Ellard 2006; Mattout *et al.*, 2006; Prokocimer *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2007).

2.3.2 LÁMINAS NUCLEARES

2.3.2.1 GENERALIDADES

Las láminas nucleares fueron identificadas inicialmente por Aaronson y Blobel en 1974. Mediante métodos bioquímicos, observaron que estas proteínas constituían el principal componente de la lámina nuclear, una capa densa de proteínas que se encuentra entre la membrana nuclear interna y la cromatina. Debido a su posición en la periferia nuclear, las láminas se propusieron primeramente como un sitio de anclaje para la cromatina y los poros nucleares, teniendo una función principalmente estructural. Posteriormente Gerace en 1978, encontró que las láminas se localizan además en el nucleoplasma. Mediante inmunodetección este autor caracterizó tres tipos de láminas, las cuales posteriormente se nombraron como lámina A, B1 y C (Gruenbaum *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2002; Holaska *et al.*, 2002). Con estas observaciones y varios estudios posteriores sabemos hoy que las láminas nucleares, se localizan debajo de la envoltura nuclear y también en el nucleoplasma; además tienen funciones aún más complejas e importantes que las primeramente descritas.

2.3.2.2 ESTRUCTURA DE LAS LÁMINAS NUCLEARES

Las láminas nucleares son filamentos intermedios de tipo V y son los miembros más antiguos de este tipo de proteínas, incluso se sugiere que dieron origen a los filamentos intermedios citoplásmicos. Presentan la estructura clásica de un filamento intermedio; un largo dominio central α -hélice altamente conservado, compuesto principalmente por heptámeros repetidos, característicos de las proteínas α -hélice. Este dominio media la interacción entre dos

cadena de láminas nucleares, para formar un dímero, el cual constituye la unidad de ensamble de las láminas nucleares. Las interacciones laterales entre los dominios centrales de los dímeros son esenciales para el ensamble de una estructura de mayor orden requerida para la polimerización de las láminas, los tetrámeros, los cuales se forman cuando un par de dímeros paralelos se asocian de manera antiparalela. Los tetrámeros no presentan polaridad como los microtúbulos y los microfilamentos y se empaquetan lateralmente entre sí para dar lugar al filamento, formado por ocho protofilamentos en paralelo constituidos por tetrámeros, los cuales se asocian mediante interacciones hidrofóbicas laterales fuertes. El dominio central es limitado por un extremo amino y uno carboxilo terminal, los cuales se modifican en los diferentes tipos de láminas y son importantes para el ensamble de estas proteínas. La fosforilación en estos extremos es esencial para la dinámica durante la mitosis la cual es regulada por la cinasa p34/cdc2 tanto *in vivo* como *in vitro* (Peter *et al.*, 1990).

Para que se lleve a cabo el desensamble de la lámina y la disgregación de la envoltura nuclear durante la mitosis es necesario que los dos extremos se fosforilen, en este sentido, Peter y cols. (1991) observaron que la fosforilación por esta cinasa en el extremo amino, pero no el carboxilo, inhibe el desensamble de las láminas. Estos dominios que son sitios de fosforilación, pueden ser fosforilados por otras cinasas causando la despolimerización de las láminas. Por ejemplo, la fosforilación en residuos de serina en el extremo amino inhibe el ensamble. Así, la fosforilación en el extremo carboxilo por la cinasa β II es responsable del desensamble en ciertos tipos celulares.

Estos datos sugieren que múltiples serinas y treoninas pueden ser fosforiladas causando el desensamble de las láminas y que diferentes células emplean diversas cinasas para dirigir la despolimerización y la dinámica de estas proteínas tanto en la interfase como en mitosis (Stuurman *et al.*, 1998). De igual forma el extremo carboxilo terminal presenta una secuencia de localización nuclear (NLS) para la importación de las láminas al núcleo (Gruenbaum *et al.*, 2000; Goldman *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2004) y una caja CaaX compuesta por una cisteína, dos aminoácidos alifáticos, seguidos de cualquier aminoácido, que se presenta en todas las láminas excepto en las tipo C, donde se llevan a cabo modificaciones postraduccionales como el corte de los últimos tres aminoácidos, la isoprenilación, la metilesterificación en los residuos de cisteína, etc., mediante las cuales se forman láminas nucleares maduras. Estas modificaciones tienen

diferentes fines, por ejemplo la isoprenilación (adición de un grupo isoprenil) se requiere para el anclaje de las láminas a la membrana interna de la envoltura nuclear (Stuurman *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2002)

2.3.2.3 TIPOS DE LÁMINAS NUCLEARES

Las láminas nucleares se agrupan en tipo A y B, con base en sus propiedades bioquímicas (su punto isoeléctrico), su presencia en las células, su comportamiento durante la mitosis, su función y el producto del gen del cual derivan. Las láminas nucleares en general son producto de 3 genes: *LMNA*, *LMNB1*, *LMNB2*, que en mamíferos codifican 7 isoformas diferentes por splicing alternativo. Las de tipo A son: la lámina A, A Δ 10, C y C2, que derivan del gen *LMNA* (Furukawa *et al.*, 1994; Machiels *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 2002) y las de tipo B, dentro de las cuales se encuentran la lámina B1 que es codificada por el gen *LMNB1* y las láminas B2 y B3 que son producto de splicing alternativo del gen *LMNB2* (Furukawa y Hotta *et al.*, 1993; Stuurman *et al.*, 1996; Gruenbaum *et al.*, 2000; Gruenbaum *et al.*, 2005).

El patrón de expresión de las isoformas de láminas nucleares y su arreglo espacial, cambia significativamente durante el desarrollo y la diferenciación celular. Actualmente se conoce que todas las células de los vertebrados expresan al menos las láminas tipo B. La lámina B1 es una proteína constitutiva que se expresa desde las etapas tempranas del desarrollo y durante toda la vida del organismo, en el ciclo celular y en la interfase, es generalmente la más abundante y es esencial para la viabilidad celular, diversos estudios han demostrado que esta proteína es suficiente para mantener la funcionalidad de la lámina nuclear, cuando falta las células sufren apoptosis (Stuurman *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2005). Broers y cols. (1997) han sugerido que la expresión de esta lámina posiblemente se correlaciona con la proliferación celular. Asimismo las de tipo B2 se expresan relativamente a niveles constantes en todas las células (excepto en hepatocitos).

En lo que respecta a las de tipo A, AΔ10 y C, su expresión se regula durante el desarrollo, expresándose preferencialmente en las células diferenciadas, su expresión incrementa durante la diferenciación terminal y el arresto en el crecimiento. Por lo cual presentan expresión tejido y célula específico (Goldman *et al.*, 2002; Taddei *et al.*, 2004; Gruenbaum *et al.*, 2005). A diferencia de las láminas tipo B, las de tipo A no son esenciales para el crecimiento celular ni para la viabilidad celular. Por otro lado, existen otros isotipos como las láminas B3 y C2 que se expresan sólo en las células germinales (Furukawa y Hotta *et al.*, 1993; Machiels *et al.*, 1996). Estas observaciones sugieren que las láminas presentan funciones célula y tejido dependientes.

2.3.2.4 DISTRIBUCIÓN DE LAS LÁMINAS NUCLEARES

Durante la interfase, las láminas nucleares son constantemente sintetizadas e incorporadas a lámina, sugiriendo que continuamente se polimerizan dentro de un núcleo en interfase, donde se incorporan a la lámina nuclear para formar una malla protéica y también se integran al nucleoesqueleto en el interior del núcleo, ahí forman cúmulos llamados puntos intranucleares que contienen láminas de tipo A y B. Las láminas de tipo A y C se distribuyen de forma difusa a través del núcleo (Hozak *et al.*, 1995; Stuurman *et al.*, 1998).

Las distintas estructuras que forman las láminas pueden representar pools de láminas sintetizadas recientemente, las cuales son necesarias para la reestructuración nuclear o la preparación para la división nuclear y el crecimiento del núcleo en las células hijas. Además los focos de láminas pueden representar también sitios donde se lleva a cabo el ensamble de las láminas y la incorporación al nucleoesqueleto difuso y a la lámina nuclear. De igual forma se ha sugerido que estos puntos podrían ser el sitio donde se lleven a cabo las modificaciones postraduccionales (isoprenilación, fosforilación, metilación y proteólisis) que se realizan antes de su incorporación a la lámina (Stuurman *et al.*, 1998). La lámina B también forma puntos intranucleares sin embargo esta lámina no colocaliza con la lámina A. La lámina B es más prominente en la fase S y colocaliza en los sitios de replicación (Moir *et al.*, 1994; Stuurman *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2002).

2.3.2.5 FUNCIÓN DE LAS LÁMINAS NUCLEARES

Aunque es difícil visualizar las láminas nucleares debido a su estrecha relación con la cromatina, actualmente diversos estudios de inmunolocalización, mutagénesis dirigida, RNAi, etc., han permitido dilucidar la gran cantidad de procesos que regulan estas proteínas dentro del núcleo. Por ejemplo las láminas nucleares mantienen la integridad estructural y funcional del núcleo, son responsables de conservar la forma y la estabilidad mecánica de este organelo (Stuurman *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Cohen *et al.*, 2002).

Asimismo ensamblan la envoltura nuclear después de la mitosis (Gant y Wilson 1997; López-Soler *et al.*, 2001) y proveen un soporte estructural para una gran cantidad componentes que se adosan a la envoltura nuclear, como los complejos del poro nuclear y proteínas que participan en la transducción de señales tales como: el receptor de la lámina B (LBR), la proteína asociada a la lámina 1 y 2 (LAP1 y LAP2), MAN1, emerina, otefina, nesprina, la proteína cinasa de unión 149 (AKAP149), p18, etc. (Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2005).

También participan en el correcto espaciamiento de los complejos del poro (Liu *et al.*, 2000; Shirmer *et al.*, 2001) y en la posición y movimiento del núcleo dentro de la célula (Starr *et al.*, 2002). Además se asocian con proteínas del citoesqueleto como la vimentina, la actina, entre otras, permitiendo formar un continuo entre citoesqueleto y nucleoesqueleto manteniendo la forma de la célula completa y equilibrando las fuerzas que se ejercen sobre ella, asimismo permiten la transducción de señales al núcleo mediante su interacción con el citoesqueleto (Sarría *et al.*, 1994; Gruenbaum *et al.*, 2005).

Una de las funciones más importantes de las láminas nucleares es la organización de la cromatina dentro del núcleo, estas proteínas la anclan a la envoltura nuclear, determinan su localización y con ello podrían participar en el silenciamiento de genes y en la expresión génica (Wilson 2000; Sakaki *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 2002; Gruenbaum *et al.*, 2005). Las láminas A y B se asocian a secuencias específicas del ADN llamadas regiones de unión a la matriz nuclear (MARS), de igual forma, interactúan con el material genético a través de la unión al núcleo de histonas mediante una secuencia localizada en el extremo carboxilo (Zhao *et al.*, 1996; Stuurman *et al.*, 1998). Muchas proteínas de la envoltura nuclear también se asocian a la cromatina, como

LAP2 α , LAP2 β , BAF, por lo cual las láminas nucleares además pueden interactuar con la cromatina vía su conexión con estas proteínas. Se ha reportado que tanto la lámina B1 como la B2 pueden interactuar con la cromatina.

Con las observaciones a cerca de que la cromatina se ancla a las láminas nucleares se sugirió que éstas podrían estar implicadas en otros procesos como la replicación y transcripción del ADN. De esta forma se ha reportado en diversos estudios que para que la replicación del material genético se lleve a cabo correctamente es necesaria la organización adecuada de las láminas nucleares. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que en los núcleos que no presentan estas proteínas el proceso de replicación se bloquea (Newport *et al.*, 1990; Goldman *et al.*, 2002). Lo mismo sucede cuando se introducen láminas mutadas (Moir *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que una de las funciones de estas proteínas en la síntesis del ADN es mantener la integridad de la envoltura nuclear para permitir el adecuado transporte y la retención de los factores de replicación en el interior del núcleo esto podría establecer las condiciones necesarias como la concentración de estos factores en los sitios en donde se esté llevando a cabo la replicación (Walter *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 2002).

Asimismo se sugiere que estas proteínas son esenciales para establecer centros de replicación (Ellis *et al.*, 1997). El bloqueo en la síntesis del ADN parece ser debido a la inhibición de la fase de elongación, lo cual podría relacionarse con la reorganización de factores requeridos para el funcionamiento de la DNA-polimerasa δ (enzima responsable de la síntesis del ADN durante la fase de elongación) como RFC y PCNA que se produce con la disrupción de las láminas nucleares (Moir *et al.*, 2000). Además las láminas nucleares brindan un soporte estructural para organizar y mantener los factores que participan en este proceso y facilitan su ensamble al ADN (Ellis *et al.*, 1997; Goldman *et al.*, 2002)

De igual forma, participan en el proceso de transcripción del ADN. A este respecto Spann y cols. (2002), observaron que al introducir la lámina mutada Δ NLA la cual no presentan el dominio NH₂-Terminal, se altera la distribución normal de las láminas dentro del núcleo y con ello se inhibe la transcripción, debido a que cambia la distribución de factores importantes para este proceso como la TBP (TATA binding protein) un factor de transcripción para las RNA polimerasas. La TBP se

localiza en todo el núcleo en condiciones normales y su distribución es mantenida por las láminas nucleares, cuando la distribución de estas cambia, la TBP se localiza en agregados con las láminas nucleares. Debido a lo anterior la actividad de la RNA polimerasa II, encargada de formar el mRNA se bloquea en células de mamífero y en núcleos de *Xenopus laevis* (Spann *et al.*, 2002).

Estas proteínas también participan en la regulación del ciclo celular (Liu *et al.*, 2000), la diferenciación (Furukawa *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998) y la muerte celular por apoptosis. Las alteraciones en la organización de la lámina nuclear son un paso inicial en este proceso, el estado en el ensamble puede estar involucrado en disparar la apoptosis, además la inhibición del ensamble de la lámina B induce la muerte celular (Steen y Collas 2001). Durante la apoptosis las láminas son blanco de las caspasas, en particular la caspasa 3 está involucrada en el desensamble de las láminas tipo B (Slee *et al.*, 2001), mientras que las tipo A/C son blanco de la caspasa 6 (Orth *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 1996; Taimen y Kallajoki 2003), directamente o a través de otras proteasas (Kivinen *et al.*, 2005).

Una de las funciones más importantes y que actualmente se estudia arduamente debido a su probable implicación en el desarrollo procesos neoplásicos es la regulación de la expresión génica. Existe suficiente evidencia experimental de diversos grupos que ha mostrado que las asociaciones entre ciertos genes y la periferia nuclear juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, teniendo principalmente una función represora o de silenciamiento de los genes que ahí se localizan.

Aunque otros grupos han mostrado que no siempre la asociación con la periferia nuclear resulta en la represión de la expresión génica (Cosolari *et al.*, 2004; Taddei *et al.*, 2006). Recientemente se ha observado que la localización de la cromatina y de ciertos genes dentro del núcleo se regula por las láminas nucleares, lo cual se observó durante el estudio de la localización del locus humano 4q35.2 implicado en la distrofia muscular fascioescapulohumeral (FSHD). A este respecto, Masny y cols. (2004), encontraron que la región 4q35.2 migra dentro del territorio cromosómico cuando la asociación con la lámina A se pierde.

La relación entre la lámina A y la cromatina es bien conocida, de manera que diversas patologías que se producen por alteraciones en estas proteínas se relacionan con las regiones cromosómicas a las que se asocia. Las láminas de tipo B también juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica, recientemente Malhas y cols. (2007) encontraron que en células *Lmnb1*^{-/-} que fueron modificadas genéticamente para no expresar lámina B, se disminuye la expresión de 614 genes. Estos autores también describieron que la expresión de ciertos genes se relaciona con su asociación a las láminas inmaduras y otros a su asociación a las láminas maduras. Asimismo, observaron que en las células *Lmnb1*^{-/-}, el cromosoma 18 que normalmente se encuentra en la periferia nuclear, se aleja de la periferia nuclear.

Las láminas nucleares regulan la función de diversos factores de transcripción entre los que se encuentran: germ-cell less (GCL), young arrest (YA), la proteína de retinoblastoma (RB) y Oct1. Los genes transcripcionalmente activos y los factores de transcripción se han identificado en sitios ricos en láminas nucleares, por ejemplo Oct1 un represor del gen de la colagenasa, colocaliza en la periferia con la lámina B (Imai *et al.*, 1997). Conforme las células llegan a la senescencia la disociación de Oct1 de la lámina nuclear coincide con un incremento en la expresión de la colagenasa, sugiriendo que la expresión de esta proteína está regulada por su asociación a la lámina nuclear (Imai *et al.*, 1997). La asociación de la lámina A con la proteína RB también apoya el papel de las láminas en la transcripción. El producto del gen *RB* reprime la transcripción de los genes del ciclo celular a través de su interacción con E2F (Kaelin *et al.*, 1999).

2.3.2.6 ALTERACIONES EN LAS LÁMINAS NUCLEARES.

Laminopatías y Cáncer.

Desde hace algunos años, se han estudiado con especial interés las funciones de las láminas nucleares y ello debido a que se ha observado que las mutaciones principalmente en las láminas de tipo A se asocian a un gran número de enfermedades hereditarias que se han llamado en conjunto laminopatías.

Hay una lista creciente de estas laminopatías entre las cuales se encuentran diferentes tipos de distrofias que afectan al tejido muscular como la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), la distrofia muscular de extremidades y la cardiomiopatía dilatada, otras afectan el tejido adiposo como la lipodistrofia parcial y algunas otras alteran directamente a las neuronas como el desorden tipo 2 de Charcot-Marie-Tooth (Smith *et al.*, 2005).

Además recientemente se ha descrito que los síndromes de envejecimiento temprano también se asocian con mutaciones en la lámina A, tales como la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), el síndrome atípico de Werner y la displasia mandibuloacral (MAD). Las mutaciones en la lámina A también producen enfermedades prenatales como las dermatopatías restrictivas y la pérdida total de esta lámina es causa de mortalidad prenatal (Jacob y Garg 2006).

Como es que las mutaciones en esta proteína producen la gran variedad de enfermedades no es claro aún, sin embargo se ha propuesto que las funciones que sostienen estas proteínas son la clave para entender el origen de las laminopatías. Por ejemplo la pérdida de láminas nucleares produce fragilidad nuclear y en las células musculares esto dirige a la muerte celular, de igual forma la falta de la lámina A dirige a la desregulación de diferentes genes tejido-específicos directamente o a nivel epigenético, a la pérdida de la heterocromatina como se observa en las células de los pacientes con HGPS y MAD. Además las láminas A juegan un papel en la proliferación celular, particularmente en los mecanismos que controlan el ciclo celular, dado que los miofibroblastos de personas con EDMD son incapaces de diferenciarse completamente (Smith *et al.*, 2005; Jacob y Garg 2006).

Por otro lado, las progerias que son resultado de la expresión de láminas inmaduras o pre-láminas llamadas progerinas ó LA Δ 50, a las que les faltan 50 aminoácidos en uno de sus extremos produce alteraciones en el ciclo celular, el cultivo de fibroblastos de pacientes con HGPS presentan una limitada capacidad de proliferación y entran pronto en senescencia (Moir y Spann 2001; Mattout *et al.*, 2006; Rankin *et al.*, 2006).

Aunque no existe una lista de enfermedades en humanos asociadas con mutaciones en las láminas B, en modelos experimentales se han reportado algunas patologías asociadas a la falta de esta proteína. Por ejemplo, los ratones deficientes de lámina B1 mueren después del nacimiento

con anomalías en pulmones y huesos. Asimismo se ha reportado que la sobreexpresión de lámina B1 produce leucodistrofia autosómica dominante (ADLD). Estos resultados sugieren que las alteraciones en la expresión de lámina B puede asociarse también con muchas enfermedades humanas y que la ADLD puede ser agregada a la lista de laminopatías (Malhas *et al.*, 2007).

Uno de los datos importantes en las células con alteraciones en las láminas A o B ya sea en células derivadas de pacientes con laminopatías o células en las cuales se introducen láminas mutadas, o en las que se alteran de alguna manera estas proteínas; es que muestran diversas alteraciones nucleares entre las que se encuentran cambios en la forma nuclear como lobulaciones, invaginaciones, evaginaciones, también se observan cambios en la densidad de la lámina nuclear, pérdida de la heterocromatina, o cambios en la localización de la cromatina así como condensación anormal de la cromatina, agrupamiento de los complejos del poro nuclear, edema en la envoltura nuclear, presencia de vesículas o seudoinclusiones dentro del núcleo, pérdida de cromosomas, alteraciones en la segregación del material genético durante la mitosis, un incremento en el contenido de ADN (Liu *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002).

Uno de los descubrimientos más importantes en cuanto a las láminas es su relación con diversos tipos de cáncer. Debido a que estas proteínas están involucradas en funciones como el mantenimiento de la estructura nuclear, la organización de la cromatina, la regulación del ciclo celular, la replicación y transcripción del ADN, la diferenciación y la apoptosis, consecuentemente alteraciones en las láminas nucleares tienen relevancia potencial en el desarrollo del cáncer.

Por ejemplo la expresión de la lámina A/C se modifica en muchos tipos de cáncer con una reducción en los niveles de esta proteína que se asocian con un incremento en la agresividad del cáncer. La relación que se propone entre la reducción en la lámina nuclear y el cáncer se basa en que estas proteínas se expresan en células diferenciadas y se asocian con la reorganización de la cromatina y en la reprogramación necesaria para la diferenciación terminal y el arresto en el crecimiento y el ciclo celular. Una reducción en la lámina A/C podría facilitar el fenotipo desdiferenciado, favorable para la progresión de una célula tumoral. A este respecto se ha determinado que el silenciamiento de la lámina A por el promotor (CpG island metilation) es el elemento de mayor relevancia en el diagnóstico de leucemias y linfomas. Estas metilaciones pueden ser revertidas con agentes desmetilantes como la 5-azacitidina aprobada por la FDA para

el tratamiento de síndromes mielodisplásicos. Además se ha observado que la progerina afecta específicamente el control epigenético de la heterocromatina facultativa y constitutiva, los pacientes de HGSP presentan niveles reducidos de lisina 9 trimetilada en la histona H3 (Ramírez *et al.*, 2007).

De la misma manera, en una serie de carcinomas primarios de pulmón, Broers y cols. (1993) encontraron decremento en la expresión de lámina B en 11 de 23 muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas y una expresión reducida de láminas A en 13 de 15 muestras de cáncer de pulmón de células pequeñas; con ello se sugirió el papel de las láminas nucleares en el diagnóstico de estos tipos de cáncer. Debido al uso potencial de la expresión de las láminas nucleares como marcadores de tumores se ha examinado la expresión en diferentes tipos de cáncer y se ha observado que en la gran mayoría las láminas principalmente las tipo A/C se encuentra reducidas o ausentes aunque la expresión de las láminas B también se modifica (Tabla 1) (Moss *et al.*, 1999; Brunagel *et al.*, 2002; Agrelo *et al.*, 2005; Prokocimer *et al.*, 2006)

Tipo de cáncer	Lámina AC		Lámina B1	
	Reducido	Ausente	Reducido	Ausente
Colon	100%	83%	89%	39%
Adenoma	100%	82%	100%	41%
Adenocarcinoma				
Adenocarcinoma Gástrico	88%	50%	75%	50%
Cáncer de esófago	100%	50%	50%	50%
Adenocarcinoma				
Carcinoma cervical epidermoide	100%	100%	67%	0%
Adenocarcinoma Uterino	100%	100%	67%	33%
Adenocarcinoma de próstata	75%	0%	75%	0%
Adenocarcioma de mama	100%	0%	100%	0%
Carcinoma de pulmón de cél. no pequeñas	100%	67	67%	67%

Tabla 1. Cambios en la expresión de las láminas nucleares en diferentes tipos de cáncer. Se muestra en porcentaje la frecuencia en la cual las láminas nucleares se encuentran reducidas o ausentes y algunos ejemplos de los tipos de cáncer en donde se ha observado esta relación (Modificado de Moss *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

El vanadio ha tomado importancia como contaminante ambiental en las últimas décadas, principalmente en las grandes ciudades como la de México. Este metal se emite a la atmósfera como V_2O_5 , que es su forma más tóxica. Debido a que diariamente se emanan grandes cantidades de este compuesto al aire y que mediante la vía aérea se absorbe hasta el 95%, se considera que la vía de exposición más importante para la población general es la inhalada.

En el modelo de inhalación de V_2O_5 en ratón macho de la cepa CD1 (Fortoul *et al.*, 2002) investigado en nuestro grupo de trabajo, se ha observado que la exposición a este compuesto produce alteraciones nucleares en los linfocitos de timo y bazo, siendo más evidentes en este último órgano. Sin embargo no se han realizado análisis morfológicos y estadísticos para determinar dichos cambios, así como la probable causa y la significancia biológica y funcional de éste efecto.

Los cambios nucleares en los linfocitos podrían asociarse con modificaciones en el nucleoesqueleto, pero se desconoce su efecto sobre las láminas nucleares. Considerando lo anterior y dado que los cambios sobre estas proteínas podrían producir alteraciones en la estructura y función nuclear asociadas entre otros, a eventos neoplásicos, es importante estudiar el efecto de este metal sobre las láminas nucleares B1, B2 y A/C de las subpoblaciones de linfocitos de bazo.

4. OBJETIVOS

4.1 Generales

1. Analizar morfológicamente los cambios nucleares, en los linfocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación aguda, subaguda y crónica de V_2O_5 .
2. Identificar las posibles alteraciones sobre los componentes del núcleoesqueleto de linfocitos de bazo de ratones posteriormente al tratamiento con V_2O_5 .

4.2 Particulares

1. Identificar los cambios ultraestructurales del núcleo de linfocitos de bazo, inducidos por la inhalación aguda, subaguda y crónica de V_2O_5 mediante Microscopía electrónica de transmisión (MET).
2. Analizar el efecto que la inhalación de V_2O_5 tiene sobre la presencia y concentración de las láminas nucleares B1, B2 y A/C en las poblaciones de linfocitos T CD4, T CD8 y B de bazo mediante Citometría de Flujo.
3. Correlacionar las posibles variaciones en la presencia y/o concentración de las láminas nucleares B1, B2 y A/C en los linfocitos T CD4, T CD8 y B de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 con los cambios en la morfología nuclear.

5. HIPÓTESIS

Si la exposición a V_2O_5 vía inhalada produce alteraciones estructurales en el núcleo de los linfocitos de bazo de ratón, entonces se observarán cambios con respecto a los controles en la presencia y/o concentración de las láminas nucleares B1, B2 y A/C en los linfocitos T y B de bazo.

6. METODOLOGÍA

A) Modelo de Exposición por inhalación a V_2O_5 .

Para este estudio, se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de 1 mes de edad y de 35 gramos de peso. Durante el experimento los ratones se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. Se establecieron dos grupos de 36 ratones cada uno, un grupo control el cual fue expuesto a vehículo (agua desionizada) y un grupo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio (V_2O_5) a una concentración de 0.02 M, para lo cual cada grupo de ratones fue colocado en una caja de acrílico cerrada y conectada a un ultranebulizador (UltraNeb99 Devilbiss). El tiempo de exposición para ambos grupos fue de 1 hora dos veces por semana, durante 3 meses. Las condiciones del modelo y el tiempo de exposición fueron establecidos por Fortoul y cols. (1999).

B) Obtención del bazo y procesamiento para MET.

Posteriormente a la primera exposición, un grupo de 3 ratones expuestos y 3 controles se sacrificaron bajo anestesia con pentobarbital sódico dosis letal, para observar alteraciones por exposición aguda. Después se sacrificaron cada semana con el propósito de observar los cambios durante la exposición subaguda y crónica.

Los ratones se perfundieron vía intracardiaca con solución salina y posteriormente con fijador de glutaraldehído y paraformaldehído al 2% en buffer de cacodilatos (pH 7.4). A continuación se tomó el bazo y se procesó para la técnica de microscopía electrónica de transmisión de la siguiente manera: postfijación con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas, deshidratación en alcoholes de concentraciones crecientes del 70 al 100%, inclusión de los fragmentos de tejido en araldita 6005 (resina epóxica).

Finalmente se realizaron cortes semifinos con un ultramicrotomo Reichert-Jung, las muestras se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio de luz para identificar la pulpa blanca en el bazo. Posteriormente se obtuvieron cortes finos de estas zonas, los cuales se

contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su posterior observación en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10.

En cada individuo se analizaron 15 campos al azar de $55\mu\text{m}^2$ en los cuales se contaron el total de células por campo y las células con alteraciones nucleares para obtener un porcentaje de células con cambios nucleares. Se analizaron 450 células por individuo. De acuerdo a la literatura se establecieron como cambios nucleares, modificaciones en la morfología del núcleo tales como: lobulaciones, invaginaciones o evaginaciones de la envoltura nuclear, cambios en el patrón de distribución de la cromatina compacta y laxa y núcleos con seudoinclusiones.

Seguido a la obtención de los porcentajes de linfocitos con núcleos alterados se realizó un análisis estadístico ANOVA para determinar si estos cambios en los individuos expuestos a V_2O_5 fueron estadísticamente significativos con respecto a los controles.

C) Análisis de los cambios en la concentración de las láminas nucleares en las subpoblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y B mediante Citometría de Flujo.

Un grupo de 60 ratones machos de la cepa CD1 de 35 gramos de peso inhaló V_2O_5 durante 5 semanas siguiendo el modelo de inhalación anteriormente mencionado, el tiempo de exposición en esta ocasión se determinó de esta manera, debido a que posteriormente a las 5 semanas de inhalación al tóxico, se apreció una meseta en cuanto al efecto que produce el vanadio sobre la morfología nuclear de los linfocitos de bazo.

Después de cada semana de exposición se sacrificaron 5 ratones expuestos a V_2O_5 y 5 controles, se tomó el bazo de cada individuo, se maceró entre dos mallas para obtener sólo células y desechar el estroma. Los eritrocitos se lisaron con una solución de cloruro de amonio al 0.83% para obtener una suspensión de leucocitos, a los cuales se realizó un inmunomarcaje con anticuerpos de superficie acoplados a un fluorocromo para identificar las subpoblaciones de linfocitos T y B en el bazo, los anticuerpos empleados fueron CD4-FITC (BD) (1:100), CD8-CY5 (BD) (1:300) y CD19-PE (BD) (1:250).

A continuación se realizó en estas células un segundo marcaje para identificar las láminas nucleares B1, B2 y AC en muestras separadas una para cada tipo de lámina nuclear, esto mediante el uso de anticuerpos anti-lámina B1, B2 y AC biotinilados (Abcam) (1µl sobre la solución celular), previamente se permeabilizó el núcleo agregando a la solución de leucocitos 100 µl de buffer de permeabilización (BD).

Posteriormente las células se incubaron con biotina acoplada al fluorocromo APC y se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur) (BD). Para ello se adquirieron 100,000 células por ratón por lo cual, para cada condición se analizaron 500,000 células. Para cada individuo analizado se obtuvo el porcentaje de linfocitos de cada población: TCD4, TCD8 y B inmunopositivos a las láminas B1, B2 y AC, así como las medias de fluorescencia para cada tipo de lámina, con el fin de determinar indirectamente las posibles variaciones en la concentración de estas proteínas durante el tratamiento.

De igual forma se realizó un análisis estadístico (prueba de t) para determinar si los cambios fueron significativos con respecto a los obtenidos para el control. Finalmente se correlacionaron los cambios observados por MET y los obtenidos por citometría de flujo y se analizaron los resultados.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de los cambios en la morfología nuclear de linfocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación de V₂O₅ mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

Se realizó el análisis en un microscopio electrónico de transmisión para identificar los cambios ultraestructurales en el núcleo de linfocitos de bazo que se produjeron posteriormente a la inhalación de V₂O₅, para lo cual se cortó y analizó sólo la pulpa blanca del bazo la cual se identificó mediante cortes semifinos, con el propósito de asegurar que la mayor parte de las células observadas correspondieran a linfocitos, los cuales fueron identificados morfológicamente.

En los controles se observaron linfocitos con un núcleo de forma regular y un patrón de localización de la cromatina en rueda de carreta, con la cromatina compacta (heterocromatina) asociada a la envoltura nuclear y distribuida regularmente y la cromatina laxa (eucromatina) en el centro del núcleo, asimismo la envoltura nuclear fue homogénea, se observaron nucléolos bien definidos y por lo general uno por núcleo (Figura 2A).

En contraste, en el bazo de los individuos tratados, se observaron desde la primera semana de exposición a V_2O_5 cambios en la forma nuclear de los linfocitos, tales como: núcleos con lobulaciones (Figura 2B), invaginaciones (Figura 2C) y evaginaciones (Figura 2D) muy pronunciadas, asociados a cambios evidentes en la distribución de la cromatina predominando la cromatina compacta o heterocromatina, la cual no solo se encontró en la periferia del núcleo sino también en el interior, estos cambios en la distribución de la cromatina se observaron en los sitios donde se deformó el núcleo (Figura 2 . B-D).

Asimismo se observó edema en la envoltura nuclear (Figura 2 E) y se evidenciaron estructuras que podrían corresponder a los complejos del poro nuclear, los cuales son aparentemente más amplios y evidentes que en los controles. De igual forma, en los linfocitos de los individuos tratados estas estructuras se agruparon (Figura 2 F). Se encontraron además, linfocitos con seudo inclusiones nucleares cuyo contenido fueron organelos membranosos como mitocondrias (Figura 2 G). Finalmente fueron evidentes núcleos con nucléolos más grandes y frecuentemente más de uno por linfocito (Figura 2 H).

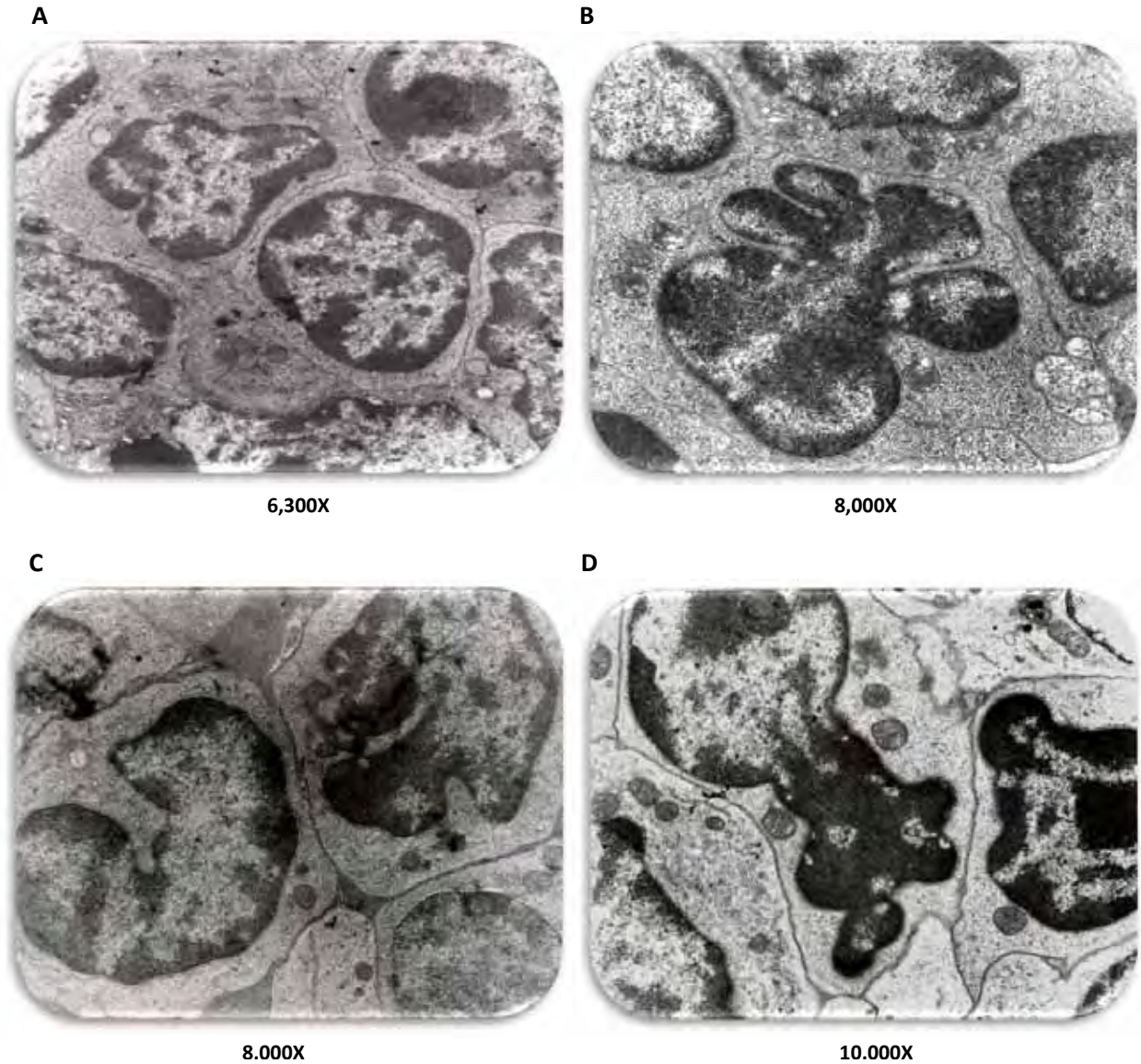


Figura 2. (A-D). Alteraciones nucleares en linfocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 . **A.** Núcleo de un linfocito control. Se observa un núcleo de forma regular con un patrón de distribución de la cromatina en rueda de carreta característico de estas células. **B-H.** Se observan diferentes alteraciones en la morfología nuclear y en la distribución de la cromatina de los linfocitos de ratones expuestos a V_2O_5 . **B.** Núcleo lobulado. **C.** Núcleo con invaginaciones. **D.** Núcleo con evaginaciones. **B-D.** Se aprecia una mayor proporción de cromatina compacta (heterocromatina) en los linfocitos de individuos expuestos al metal.

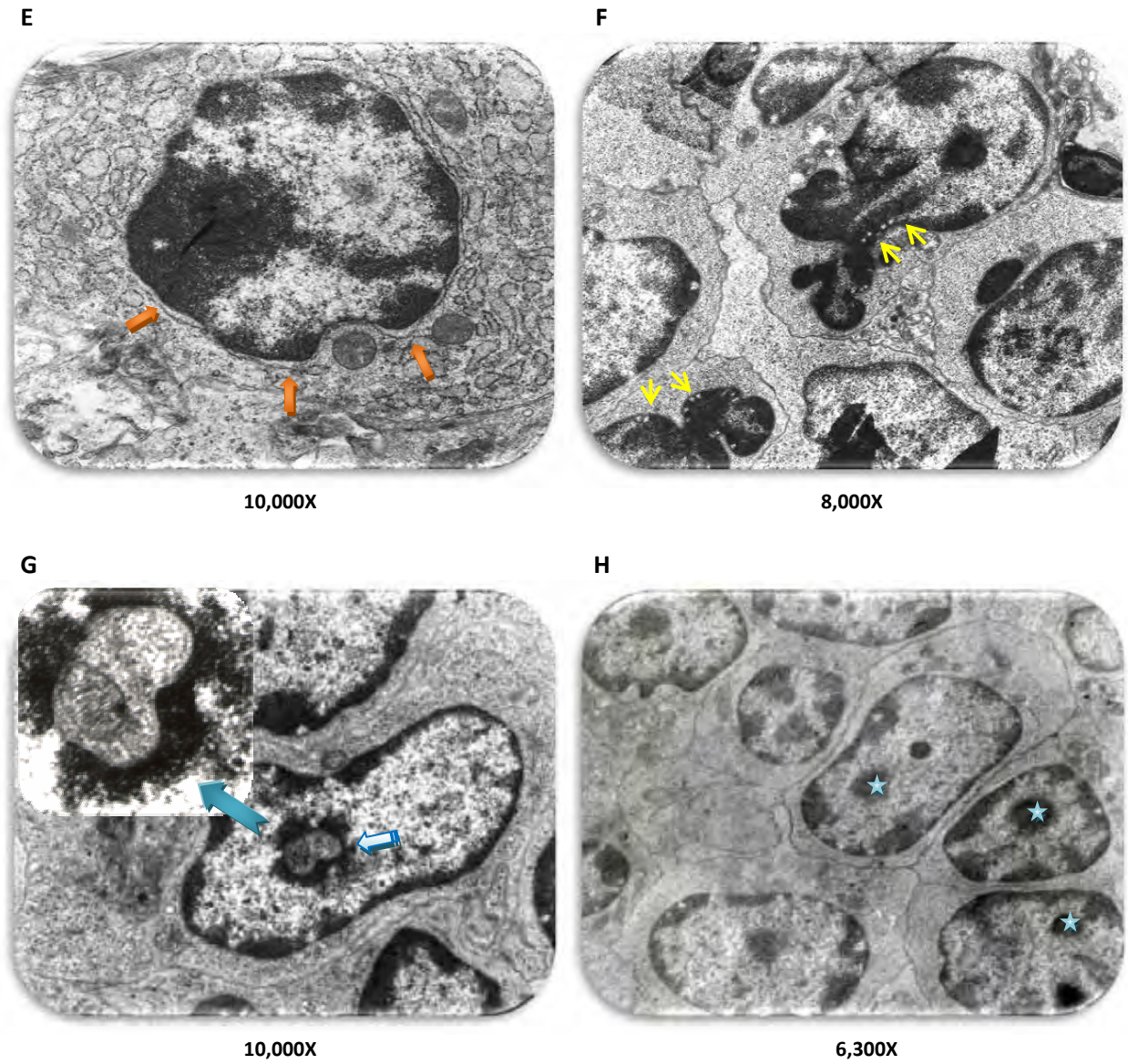


Figura 2 (E-H). Alteraciones nucleares en linfocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 . **E.** Se observó edema en la envoltura nuclear marcada con una flecha (\Rightarrow). **F.** Cambios en la distribución de los complejos del poro. Algunas estructuras que podrían ser los poros nucleares mostrados con una flecha (\rightarrow) se agrupan en ciertas zonas del núcleo, principalmente donde se deforma el organelo. **G.** Se observaron linfocitos con seudoinclusiones nucleares (\dashrightarrow), cuyo contenido fueron organelos membranosos. En la ampliación mostrada con la flecha (azul oscuro) se muestra una mitocondria. **H.** Se observó mayor cantidad de nucléolos en los núcleos de linfocitos de ratones expuestos, estos se marcan con una estrella (\star).

Posteriormente a la observación al MET, se obtuvo el porcentaje de linfocitos con estos cambios nucleares tanto en el bazo de los individuos controles como en los expuestos a V_2O_5 . En los resultados se muestra que los controles no presentan alteraciones nucleares como las mencionadas anteriormente o se observan en un porcentaje muy bajo (0.9%) (Figura 3). En contraste, se observó incremento estadísticamente significativo con respecto al control en el porcentaje de linfocitos con estas alteraciones nucleares en los ratones tratados, desde la primera semana de exposición y durante el tratamiento.

De la misma forma se observó que el porcentaje de células con estas modificaciones incrementa conforme el tiempo de exposición presentándose hasta en un 37.5% de las células analizadas. Además el efecto del vanadio sobre la estructura nuclear presentó una meseta, dado que desde la quinta semana de exposición hasta las 12 semanas los cambios no son significativos, lo cual se determinó mediante una prueba de ANOVA con post-análisis de Tukey (Figura 3).

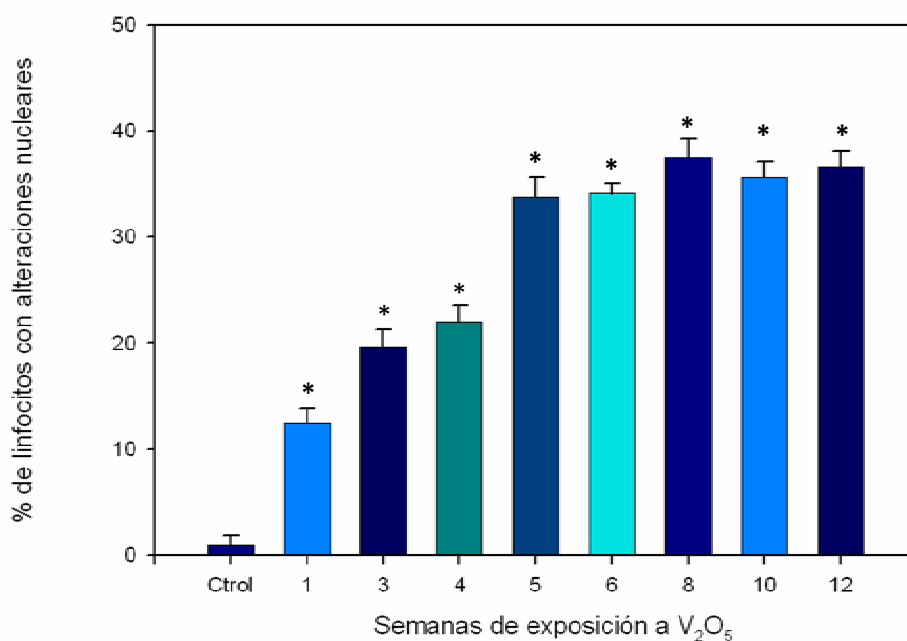


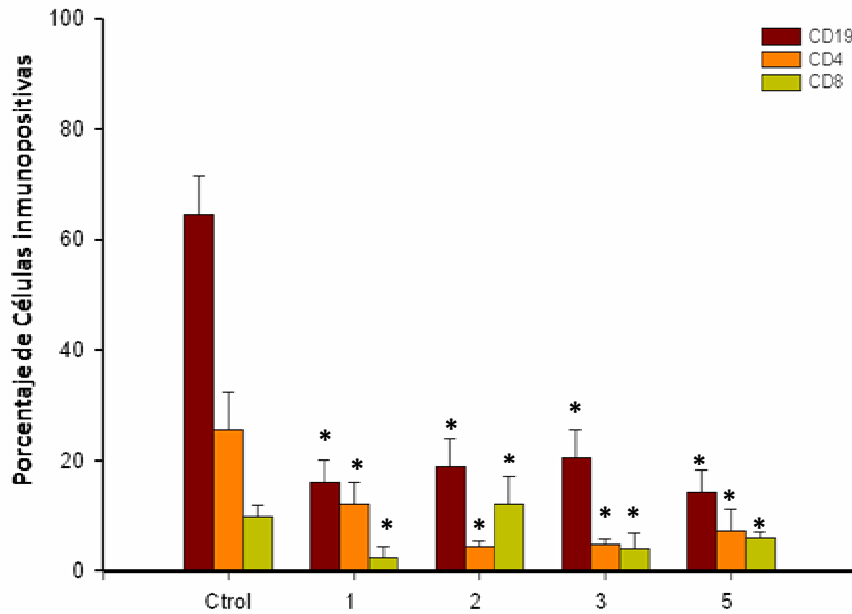
Figura 3. Efecto del V_2O_5 sobre la estructura del núcleo de los linfocitos de bazo. Se muestra un incremento significativo con respecto al control en el porcentaje de linfocitos con alteraciones nucleares. Además se muestra que tal efecto fue dependiente del tiempo de exposición. $*=P<0.001$ ANOVA (TUKEY).

7.2. Evaluación de cambios en las láminas nucleares de linfocitos de ratones expuestos a V_2O_5 .

Una vez que se observó que la exposición a V_2O_5 produce alteraciones nucleares en un porcentaje importante de linfocitos y que este efecto se mantuvo durante el tratamiento, se determinó si el vanadio modificaba la presencia y/o concentración de las láminas nucleares B1, B2 y A/C en las diferentes poblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y B (CD19), para tratar de explicar estas alteraciones. Para ello se inmunolocalizaron los diferentes tipos de láminas en los linfocitos y las muestras de linfocitos de ratones controles y tratados se analizaron mediante citometría de flujo.

En cuanto a la lámina B1 se observó mediante una prueba de t, que el decremento en la concentración y en el porcentaje de células que presentan esta proteína en todas las poblaciones de linfocitos analizadas, fue estadísticamente significativo en los individuos tratados con respecto al control. Este decremento fue paulatino, observándose desde la primera hasta la quinta semana de exposición, donde se encuentran los valores más bajos en cuanto al porcentaje de linfocitos que presentan lámina B1 y su concentración en estas células. Por lo cual el efecto fue dependiente del tiempo de exposición, sin embargo fue independiente del tipo celular ya que tanto los linfocitos T (CD4 y CD8) como los B presentaron decremento en el porcentaje de células con la proteína y en su concentración. Es importante mencionar que los cambios en la lámina B1 se correlacionaron con el incremento en el porcentaje de linfocitos con alteraciones nucleares observados por MET. Asimismo se observó que esta lámina nuclear fue la más sensible al vanadio ya que se observaron los porcentajes y concentraciones más bajas posteriores al tratamiento con este metal (Figura 4).

A



B

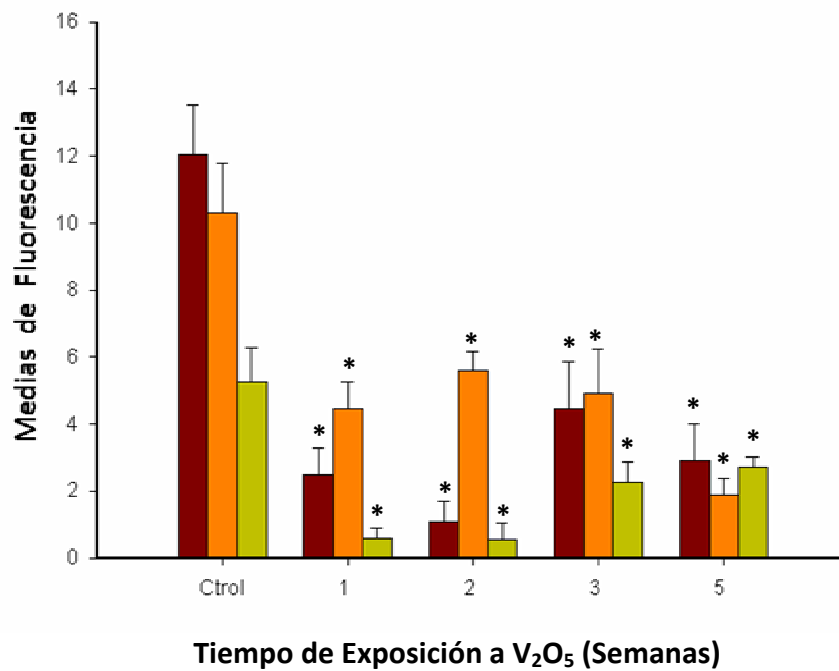


Figura 4. A. Cambios en el porcentaje de linfocitos de bazo inmunopositivos a la lámina B1 posteriormente a la inhalación de V₂O₅. **B.** Modificaciones en la concentración de la lámina B1 de los linfocitos de bazo, posteriormente a la exposición a V₂O₅. Se observa decremento significativo en el porcentaje de linfocitos TCD4, TCD8 y B después del tratamiento a vanadio (A), así como en la concentración de la proteína (B). Tal decremento fue dependiente del tiempo de exposición. * = P= 0.01 Prueba de t.

En el caso de la lámina B2, fue evidente el decremento en el porcentaje de linfocitos que presentan la proteína y en su concentración solamente durante la primera y la segunda semana. Observándose al final del tratamiento valores parecidos al control. Estos cambios fueron estadísticamente significativos ($P= 0.01$ Prueba de t) (Figura 5).

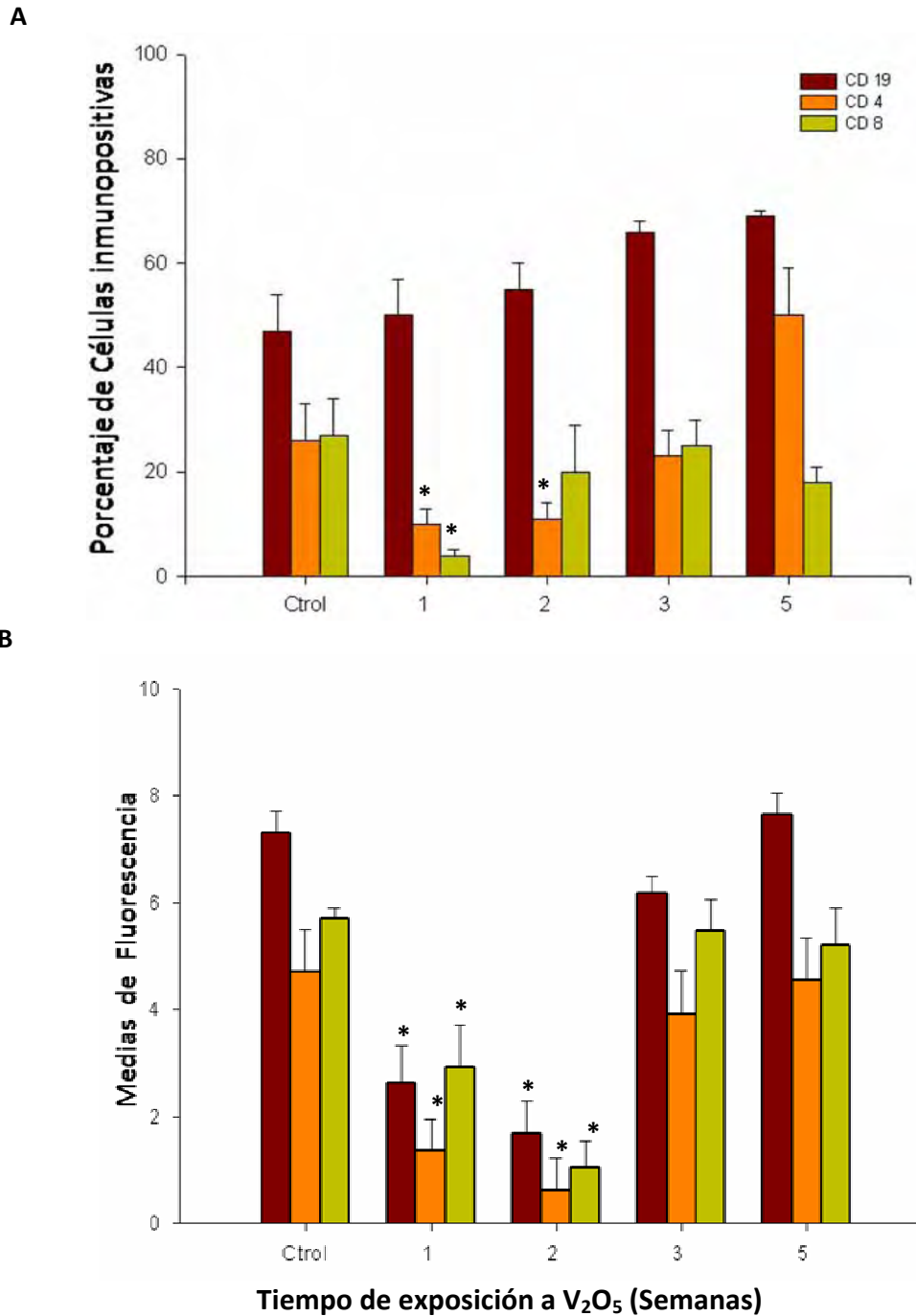
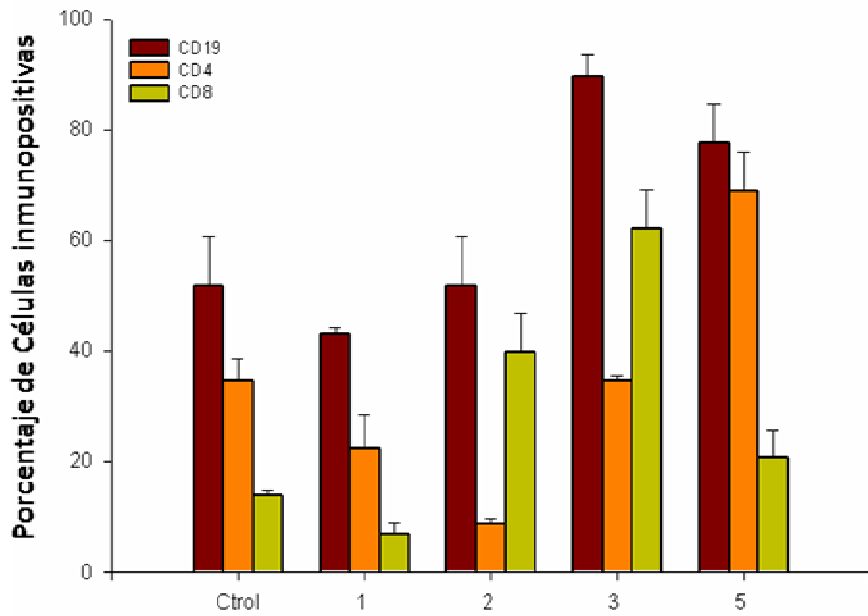


Figura 5. Efecto del V₂O₅ sobre la lámina B2 de linfocitos de bazo. Se observa decremento significativo en el porcentaje de linfocitos TCD4, TCD8 y B que presentan lámina B2 (A), también fue evidente el decremento en la concentración de la proteína (B), en la primera y segunda semana de exposición. * = $P= 0.01$ Prueba de t.

Las láminas A/C presentaron un comportamiento diferente con respecto a las láminas tipo B (B1 y B2) en los ratones tratados con vanadio. Presentando variaciones durante el tratamiento. Se observó de igual manera un decremento en la primera y segunda semana de exposición sin embargo en cuanto al porcentaje de células con lámina A/C este decremento no fue estadísticamente significativo.

En contraste, la concentración de ésta lámina si presentó un decremento significativo en la primera semana de exposición en el caso de los linfocitos B (CD19) y los T (CD8), y para los T (CD4) en la segunda semana de exposición. Pese a que en la siguiente semana se observó un ligero incremento llegando a valores parecidos al control, al final del tratamiento fue evidente el decremento en la concentración de lámina A/C en los linfocitos B y T (CD8). Se empleó una prueba de t para determinar la significancia en cada caso (Figura 6).

A



B

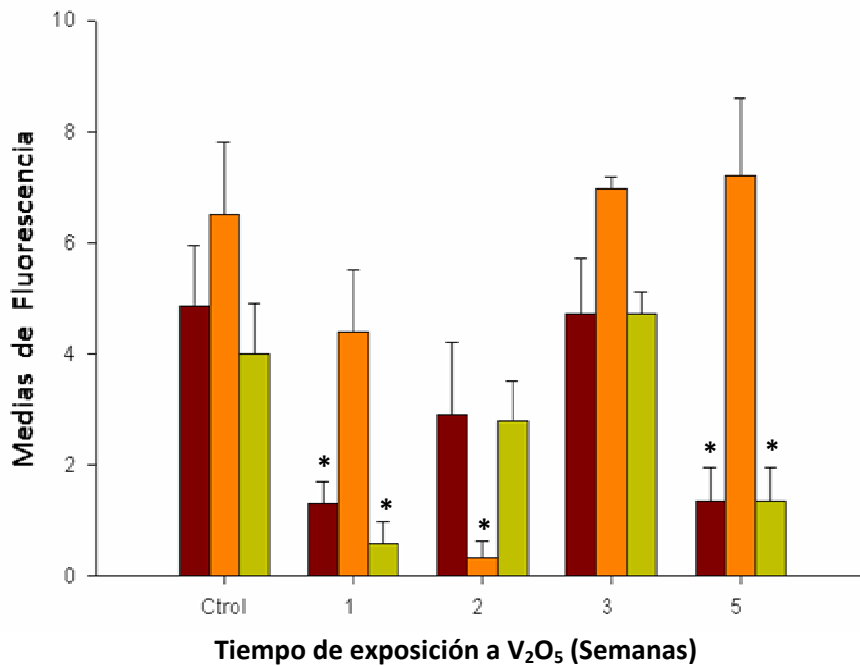


Figura 6. Efecto del V_2O_5 sobre la lámina AC en linfocitos de bazo. **A.** No se observaron cambios significativos en cuanto a al porcentaje de linfocitos TCD4, TCD8 y B que presentan lámina AC. **B.** Se observa decremento significativo en la concentración de la lámina AC en las primeras semanas y al final del tratamiento en los linfocitos B y T (CD8) $*= P= 0.01$ Prueba de t.

8. DISCUSIÓN

Actualmente el desarrollo industrial ha propiciado la liberación al ambiente de una gran variedad de metales entre ellos el vanadio, el cual ha tomado importancia como contaminante del aire en las últimas décadas. La exposición a este metal produce diversos efectos adversos en los organismos como lo hemos visto en este y otros modelos, muchos de los cuales pueden explicarse con base en las alteraciones que induce en las proteínas del citoesqueleto el cual es esencial para mantener las funciones celulares durante la interfase y la división celular (Nechay 1984; Li *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 1997; Stoiber *et al.*, 2004).

Se ha reportado previamente que el V₂O₅ (Ramírez *et al.*, 1997; Rodríguez-Lara 2005; Mussali-Galante *et al.*, 2005) puede modificar la integridad de esta red protéica, sin embargo no existe información del efecto de este tóxico sobre otra red con la cual se conecta, el nucleoesqueleto, siendo este un elemento clave para conservar la integridad estructural y funcional del núcleo y regular funciones como el ciclo celular, la muerte celular y la expresión génica, las cuales son importantes para el mantenimiento de la viabilidad celular y en su defecto, el establecimiento de eventos que conllevan al desarrollo de cáncer, una patología que recientemente ha incrementado su frecuencia especialmente en habitantes de las grandes ciudades lo cual se relaciona en parte con la contaminación ambiental particularmente aquella que tiene como componente principal a los metales.

Como se ha mencionado, el vanadio produce diversos efectos adversos en la salud, sin embargo el sistema inmune ha sido pobremente estudiado. En nuestro modelo previamente se observó que la exposición a V₂O₅ produce esplenomegalia debida principalmente al aumento de tamaño de los nódulos linfoides, lo cual fue evidente desde la primera semana de tratamiento hasta los tres meses de exposición, cuando se observó el predominio de la pulpa blanca (Piñón-Zárate *et al.*, 2008; Fortoul TI *et al.*, 2008).

Lo anterior se corrobora con lo que se había observado en diversos modelos *in vitro*, en los cuales se reporta el efecto linfoproliferador del vanadio (Marini. 1987; Quereshi, *et al.*, 1999). Asimismo fue evidente que en los linfocitos de bazo la frecuencia de muerte por apoptosis

disminuye con la exposición al metal (Piñón-Zárate *et al.*, 2008). Por otro lado en el presente trabajo se encontró que la exposición a vanadio, induce cambios nucleares parecidos a los que se observan en células neoplásicas, en los linfocitos de los diferentes órganos linfoides, no obstante estos cambios fueron más evidentes en el bazo.

El bazo además de presentar funciones inmunológicas que llevan a cabo los macrófagos y otras células del sistema inmune innato y los linfocitos T y B de la pulpa blanca, presenta una irrigación abundante y cumple con las funciones de un filtro para la sangre, de manera que todos los tóxicos que viajan por esta vía y se distribuyen a los órganos pasan por el bazo. Debido a ello gran cantidad del vanadio que se absorbe se acumula en este órgano. Diversos estudios muestran que posteriormente a la exposición a diferentes compuestos de vanadio administrados vía inhalada, oral o intraperitoneal las concentraciones más altas del metal se observan en riñón, hígado, bazo, pulmones y hueso (Zaporowska y Scibior 1998; Barceloux 1999; IPCS 2001).

Una vez en el bazo, el vanadio es capaz de alterar diversas funciones celulares. Ingresa a las células, mediante canales aniónicos inespecíficos generalmente como vanadato (Bhagavan 1983; Nechay 1984; Zaporowska y Scibior 1998; Barceloux 1999; Baran 2003; Mukherjee *et al.*, 2004). Aunque se ha propuesto que debido a la similitud química de éste con el fosfato, el vanadio también puede entrar a las células a través del mecanismo de transporte de fosfatos (Baran 2003).

Particularmente las células del sistema inmune son sumamente sensibles a diversos tóxicos, entre ellos al vanadio. A este respecto se ha reportado ampliamente el efecto genotóxico de este metal en linfocitos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* en los cuales observan micronúcleos, rompimientos de cadena doble y simple, entrecruzamientos en el DNA (Migliore *et al.*, 1993; Rodríguez-Mercado *et al.*, 2003; Leopardi *et al.*, 2005), así como incremento en la frecuencia de células poliploides y de asociaciones satelitales (Roldán y Altamirano 1990). Además se ha observado que este metal produce alteraciones en el ciclo celular de los linfocitos alterando algunas proteínas importantes. Por otro lado algunos autores han reportado que el vanadio produce muerte celular por necrosis y apoptosis en estas células sin embargo este efecto es controversial (Au *et al.*, 2006).

El efecto genotóxico frecuentemente observado se debe a que el vanadio es capaz de ingresar al núcleo y dañar sus componentes. Se ha mencionado que uno de los principales organelos en los cuales se acumula este metal es en el núcleo donde se han encontrado las concentraciones más altas (Sit *et al.*, 1996; Evangelou 2002). Asimismo se ha observado que el vanadio puede interactuar con las histonas y otras proteínas del núcleo cargadas positivamente (Michele *et al.*, 1997).

Pese a que el núcleo es uno de los organelos donde el vanadio se acumula preferencialmente y que los linfocitos son células sumamente sensibles, en nuestro modelo se reporta por primera vez que la exposición a este metal produce alteraciones en la estructura nuclear en linfocitos de bazo, parecidas a las que exhiben las células cancerosas. Nuestros resultados muestran que los núcleos de estas células presentan cambios morfológicos como invaginaciones y evaginaciones pronunciadas de la envoltura nuclear acompañadas de cambios en la distribución de la cromatina, edema en la envoltura nuclear, agrupamiento de estructuras que podrían corresponder a los complejos del poro (CPN), seudoinclusiones nucleares y un aparente incremento en el número y tamaño de los nucléolos. Tales cambios fueron dependientes del tiempo de exposición.

Recientemente se ha indicado que las alteraciones en proteínas del nucleoesqueleto principalmente en las láminas nucleares producen cambios importantes en la estructura nuclear. A este respecto Liu y cols. (2000) observaron en *C. elegans* que al introducir RNA de interferencia (RNAi) para Ce-lámina (la única lámina presente en este organismo) las células que dejaban de expresar por completo la lámina se arrestaban en el ciclo celular. En contraparte más del 95% de las células en las que se reducía la expresión de esta proteína, presentaban alteraciones en la forma nuclear sin perder su capacidad de división, no obstante presentaron daños en este proceso como incapacidad para completar el ciclo y distribución desigual de los cromosomas entre las células hijas.

Además observaron cambios en la localización de la cromatina con regiones en el núcleo con gran cantidad de DNA y otras con una cantidad mínima o ausente de éste. También fue evidente en las células sin lámina nuclear, el cambio en la distribución de los complejos del poro nuclear (CPN), los cuales se agruparon en un lado del núcleo. Estos resultados fueron

corroborados más tarde por Cohen y cols. (2002) quienes usando un RNAi para Ce-lámina mostraron que la falta de esta proteína produce núcleos con formas y tamaños anormales en *C. elegans*, asimismo alteraciones en la envoltura nuclear como burbujas (blebbing) o edema y muchas células una gran fracción de la cromatina sumamente condensada, así como núcleos con pseudoinclusiones y agrupamiento de los CPN

Debido a los datos en la literatura comentados previamente y a los antecedentes en nuestro modelo de daño en el citoesqueleto por la exposición a V₂O₅, estudiamos el efecto de este metal sobre las láminas nucleares las cuales son miembros de la familia V de los filamentos intermedios.

En primera instancia encontramos mediante citometría de flujo la presencia de los tres tipos de láminas nucleares: B1, B2 y AC en las poblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y B de bazo de ratones controles. A este respecto existe controversia en cuanto a la presencia de estas proteínas en los linfocitos. Se ha reportado que la lámina B1 es constitutiva de tal forma que se presenta en los linfocitos en todos los órganos linfoides y en sangre periférica así como en todos los estadios del ciclo celular (Guilly *et al.*, 1987; Rober *et al.*, 1990).

De manera similar se ha reportado que la lámina B2 se encuentra en todos los linfocitos sin embargo en menor proporción que la lámina B1 lo cual apoya nuestros resultados. Con respecto a la lámina AC Rober y cols. (1990) encontraron mediante inmunohistoquímica que los únicos órganos en el ratón adulto donde la mayoría de las células no presentan estas proteínas son el timo y el bazo. También observaron la ausencia de ésta lámina en linfocitos de sangre periférica y en las líneas linfoides HK22 y BW5147, lo cual se corroboró en ratón y en rata (Hornbeck *et al.*, 1988; Kaufmann 1989). Asimismo, Guilly y cols. (1987) encontraron que las láminas de tipo B son el único componente de la lámina nuclear en la línea humana de linfoblastos T (KE37) y sugieren que la expresión de las láminas puede estar sujeta a variaciones cuantitativas importantes principalmente de lámina AC ya que la tipo B es constitutiva.

Esto fue evidente también en clones de linfocitos T y linfocitos B transformados donde la concentración de lámina B fue equivalente en ambas líneas no obstante los niveles de lámina AC variaron ampliamente. Por otro lado, Worman y cols. (1988) en experimentos de inmunomarcaje

para la lámina AC encontraron inmunopositividad en el bazo, sin embargo algunos autores sugieren que ésta proviene de las células no linfoides de éste órgano. En estudios más recientes se ha observado que las láminas AC se restringen más bien a las células diferenciadas y no se encuentra en las células que proliferan (Nigg *et al.*, 1992; Cance *et al.*, 1992). Por ejemplo, los linfocitos humanos de estadios tempranos de diferenciación así como células neoplásicas de leucemia linfoblástica aguda y linfomas no Hodgkin no presentan láminas AC (Guilly *et al.*, 1987; Paulin-Levasseur *et al.*, 1988; Guilly *et al.*, 1990; Stadelmann *et al.*, 1990).

De igual forma la expresión de la lámina AC es mutuamente excluyente a la del marcador de proliferación Ki67 (Janse *et al.*, 1997). Se ha descrito en nódulos linfoides que linfocitos B CD20 del centro folicular y fuera de éste, así como linfocitos TCD3 de la paracorteza y médula son negativas a la lámina AC. Sin embargo los linfocitos activados con expresión de CD30 son positivos a esta lámina, por lo que las células que proliferan pierden la lámina AC y ésta se expresa en estadios diferenciados (Jansen *et al.*, 1997).

Nuestros resultados apoyan lo reportado en la literatura con respecto a las láminas B1 y B2 y corroboran que estas proteínas son constitutivas ya que las encontramos en las poblaciones de linfocitos TCD4, TCD8 y B de bazo. Por otro lado encontramos en contraste con lo reportado en otros trabajos, la presencia de lámina AC en los linfocitos T (CD4 y CD8) y B en el bazo y sugerimos que las variaciones en su expresión en condiciones normales pueden responder a cambios en el ciclo celular como lo han sugerido otros autores (Jansen *et al.*, 1997; Guilly *et al.*, 1990).

Por otra parte encontramos que la exposición a V₂O₅ vía inhalada produce cambios en la presencia y concentración de las láminas nucleares B1, B2 y A/C en los linfocitos de bazo siendo estos cambios dependientes del tiempo de exposición.

En cuanto a la lámina B1, se observó que el decremento en el porcentaje y concentración de ésta proteína en los linfocitos (TCD4, TCD8 y B) se correlaciona con el incremento en el porcentaje de linfocitos con alteraciones nucleares. Fue evidente una relación inversamente proporcional ya que al reducirse la concentración y el porcentaje de células con lámina B1, incrementó el porcentaje de estas células con alteraciones nucleares. Lo cual indica que los daños en esta proteína, son suficientes para producir cambios en la estructura y probablemente en la

función nuclear como se ha descrito en otros modelos (Lui *et al.*, 2000; Steen y Collas 2001). De igual manera nuestros resultados mostraron que esta lámina fue la más sensible al vanadio, lo cual podría deberse a que esta proteína es constitutiva y es la más abundante en el núcleo de los linfocitos.

Por otro lado, se encontró decremento en el porcentaje y concentración de lámina B2 en las dos primeras semanas de exposición en las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8, sin embargo para los linfocitos B solo observamos cambios en la concentración de la proteína en las dos primeras semanas de exposición. Asimismo se apreció que tanto las concentraciones como el porcentaje de células que presentan lámina B2 fueron muy parecidas a los controles al final del tratamiento en todas las poblaciones de linfocitos.

Lo anterior podría explicarse mediante un mecanismo de compensación como el que se ha observado en otros modelos, en el cual cuando se altera la lámina B1 la cual es esencial para la viabilidad celular, se expresan otros tipos de láminas que normalmente no se expresan, o bien incrementa la expresión de láminas minoritarias como la B2 y la AC en el caso de los linfocitos, de tal manera que no se comprometa la viabilidad celular, sin embargo en estos modelos se ha descrito que el exceso de otros tipos de láminas no restaura el daño producido por la falta de lámina B1 y en ocasiones las células mueren por apoptosis (Liu *et al.*, 2000; Steen y Collas 2001; Holaska *et al.*, 2002).

En lo que se refiere a la lámina A/C encontramos cambios significativos en la concentración de esta proteína en la primera semana de exposición en los linfocitos B y TCD8 y a la segunda semana de tratamiento, en los linfocitos TCD4, recuperando valores parecidos al control en los TCD4 y disminuyendo la concentración significativamente en los linfocitos B y TCD8 al final del tratamiento. En cuanto a los porcentajes de linfocitos no se encontraron diferencias significativas con respecto al control.

Estos cambios en la concentración de la lámina AC en los linfocitos B y TCD8 podrían promover la división celular. Lo cual explicaría en parte, el incremento en la población de linfocitos B y el aumento en el tamaño de los nódulos linfoides observado previamente en nuestro modelo (Piñón-Zárate *et al.*, 2008; Fortoul TI *et al.*, 2008).

Lo anterior se corrobora con lo reportado en modelos *in vitro* donde se ha observado que la falta de lámina AC promueve la división celular (Guilly *et al.*, 1990; Nigg *et al.*, 1992; Cance *et al.*, 1992).

Por lo anterior, nuestros resultados mostraron que el vanadio fue capaz de alterar las láminas nucleares. A este respecto, no existen datos previos en los cuales se muestre el daño a estas proteínas por un xenobiótico. En este sentido, este es el primer estudio donde se reporta que un agente externo puede ingresar al núcleo celular y producir cambios en el nucleoesqueleto al alterar a las láminas nucleares. Estas proteínas como otras del citoesqueleto son sensibles al vanadio, una de las causas de tal sensibilidad se debe probablemente a los diversos sitios fosforilables que presentan mediante los cuales se regula su función durante la interfase y en la mitosis (Kill *et al.*, 1995; Stuurman 1997; Tabellini *et al.*, 2002; Mattout-Drubezki y Gruenbaum 2003).

La similitud química del vanadato con el fosfato produce la alteración de proteínas tirosina fosfatasa como la cdc25 y otros sistemas enzimáticos que requieren fosfato (Morinville 1998); de forma similar este metal podría alterar otras proteínas cuya actividad es regulada por ciclos de fosforilación como el complejo p34-cinasa cdc2 (complejo p34-ciclina B) que permite la dinámica de las láminas durante la mitosis (Stuurman 1997; Moir *et al.*, 2000b) o la proteína fosfatasa de unión a la cromatina 1 (PP1) la cual es reclutada por AKAP149 y en conjunto regulan el reensamble de la envoltura nuclear al final de la mitosis. Holaska y cols. (2002) observaron que cuando la unión de PP1 con AKAP149 se modifica, simultáneamente el ensamble de la lámina a la envoltura nuclear falla.

Asimismo Steen y Collas (2001) reportaron que la inhibición de la actividad de PP1 evita el ensamble de la lámina B a la envoltura nuclear, lo cual dirige a su proteólisis. Otra de las proteínas que podría alterar el vanadio y resultar en modificaciones sobre las láminas nucleares es la PKC- ζ la cual fosforila la serina 395 y 405 de estas proteínas y regula su localización en el núcleo durante la interfase (Tabellini *et al.*, 2002). A este respecto, se ha observado que durante la fase S las láminas se redistribuyen de la envoltura nuclear a los sitios de replicación tras dicha fosforilación (Kill y Hutchinson 1995). La intervención del vanadio con estas proteínas podría alterar la localización y función de las láminas resultando en las alteraciones nucleares observadas por MET.

En este sentido, el vanadio podría alterar enzimas que producen las modificaciones postraduccionales que permiten la maduración y localización de las láminas en la envoltura nuclear ya que estas proteínas se activan por fosforilación. Estas incluyen a la Zmpste24, la cual está involucrada en el procesamiento de la pre-lámina A (Fong *et al.*, 2006) y Rce1 que remueve los últimos tres residuos en la pre-lámina B para formar la lámina B madura (Maske *et al.*, 2003). Se ha reportado que alteraciones en estas proteínas impiden la maduración de las láminas nucleares y por tanto su anclaje a la envoltura nuclear y asociación con otras proteínas (Bergo *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2005; Rusiñol y Sinensk 2006) lo que resulta en un fenotipo parecido al que observamos en los núcleos de los linfocitos de ratones expuestos a vanadio. Esto se relaciona con las alteraciones encontradas con inhibidores de proteasas (Caron *et al.*, 2007).

Otra de los probables mecanismos mediante los cuales este metal podría alterar las láminas nucleares es mediante el estrés oxidante que genera dentro del núcleo. Se ha descrito que el vanadil y el vanadato, las formas en la que se encuentra el metal dentro de las células, funcionan como radicales libres y participan en la producción de ROS como el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxil ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Nechay 1984; Martínez-Cayuela 1998; Zhang *et al.* 2001).

Los filamentos intermedios como otras proteínas del citoesqueleto son particularmente sensibles al daño por estrés oxidante, esto se ha probado en diferentes modelos por ejemplo se ha observado que la vimentina forma bandas perinucleares en condiciones de estrés oxidante (Mirabelli *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1991). Dado que las láminas nucleares presentan una estructura similar a la de los filamentos intermedios citoplásmicos es probable que las ROS generadas por el vanadio interactúen con estas proteínas. Por tanto, la sensibilidad de las láminas nucleares al estrés oxidante se podría explicar debido a que presentan una gran cantidad de sitios de alta afinidad para los radicales libres, como los residuos de cisteína o los múltiples grupos tiol (Pekovic *et al.*, 2007).

Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar a alteraciones estructurales en las proteínas, provocando entrecruzamientos y agregación debido a la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares que dirigen a una proteólisis parcial de las láminas (Martínez-Cayuela 1998; Pekovic *et al.*, 2007). Asimismo, los daños producidos por el radical ($\bullet\text{OH}$), el cual es la especie más reactiva, son irreversibles ya que al oxidar a las proteínas, éstas son ubiquitinizadas y posteriormente degradadas vía proteosoma (Cea-Bonilla *et al.*, 2002).

Las láminas nucleares son indispensables para las células, los cambios producidos por el vanadio en estas proteínas podrían comprometer la viabilidad de los linfocitos. Se ha reportado que la falta de lámina B1 o cambios en su localización produce apoptosis (Liu *et al.*, 2000; Harborth *et al.*, 2001; Slee *et al.*, 2001; Steen y Collas 2001; Taimen y Kallajoki 2003). En nuestro modelo la disminución en la frecuencia de apoptosis en los linfocitos de los individuos tratados (los cuales pierden lámina B1) podría explicarse por el incremento en la expresión de otros tipos de láminas y la probable alteración en la vía apoptótica.

Por otro lado, la disminución de lámina B1, así como los cambios en la presencia de las láminas B2 y AC y la consecuente pérdida de la estructura nuclear también podrían inhibir, atenuar o modificar los procesos de replicación y transcripción del ADN en los linfocitos de bazo como se ha reportado en otros modelos (Spann *et al.*, 1997; Moir *et al.*, 2000a; Spann *et al.*, 2002; Lammerding *et al.*, 2004). Además podría incrementar la fragilidad nuclear, sin embargo se ha descrito que en las células donde estas proteínas faltan o están alteradas, solo entre el 3 y 5% presentan ruptura del organelo ya que son necesarios otros eventos para que ello ocurra y se active la vía de muerte celular (Lammerding *et al.*, 2004).

Los cambios en las láminas nucleares también se reflejan en modificaciones en la localización de proteínas que se adosan a la envoltura nuclear como la emerina y LAP2 β que permanecen en el citoplasma como resultado de las alteraciones en estas proteínas. Lo anterior también modifica las vías de señalización hacia el núcleo (Lammerding *et al.*, 2004; Broers *et al.*, 2005; Lammerding *et al.*, 2005; Maraldi *et al.*, 2005a). Las células con estas alteraciones son capaces de entrar en ciclo como lo hemos corroborado en estudios posteriores (no se muestran estos datos) no obstante podrían presentar daños estructurales en el ADN, así como en los

mecanismos de reparación, en la segregación cromosómica y de manera muy importante en la expresión génica (Maraldi *et al.*, 2005; Less-Miller 2006).

Como se ha referido en diversos estudios, el ADN no se localiza al azar en el núcleo, las regiones pobres en genes como la heterocromatina, incluyendo los centrómeros, telómeros y secuencias repetidas de ADN, se localizan preferencialmente en la periferia nuclear, en cambio las zonas ricas en genes se ubican en el centro del núcleo, por lo que el anclaje de la cromatina a la lámina nuclear o su relocalización hacia la periferia tiene un efecto de silenciamiento o inhibición de la expresión génica (Goldmann *et al.*, 2002; Mattout-Drubezki *et al.*, 2003).

Nuestros resultados mostraron cambios evidentes en el patrón de distribución de la cromatina predominando la heterocromatina en los linfocitos de ratones expuestos, por lo cual los cambios en la presencia de las láminas nucleares y los consecuentes cambios en la distribución de la cromatina podrían inducir el silenciamiento de algunos genes y/o la expresión de otros. Por ejemplo es probable que el gen RB, un represor de la transcripción de diversos genes del ciclo celular se mantenga inactivo como resultado de los cambios en las láminas nucleares AC a las cuales se une y mediante lo cual, se regula su transcripción como se ha visto en otros modelos (Mancini *et al.*, 1994; Maraldi *et al.*, 2005a; Maraldi *et al.*, 2005b). Asimismo se podría modificar la transcripción de otros genes como oct1 cuya expresión se regula por su asociación con la lámina B (Imai *et al.*, 1997).

Finalmente, es importante mencionar que si bien no se ha descrito actualmente una laminopatía para el tejido linfoide, las alteraciones en los patrones de presencia de las láminas nucleares producidos por el vanadio podrían establecer eventos que favorezcan el desarrollo de neoplasias. Sin embargo es necesario realizar otros estudios para evaluar la probable transformación celular y analizar si el vanadio es capaz de producir linfomas en los animales expuestos al metal.

Asimismo es importante determinar el significado biológico de la proliferación del tejido linfoide y el papel de las láminas en este proceso. Debido a la importancia de estas proteínas en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del núcleo y su reciente relación con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, es esencial determinar el mecanismo por el cual el vanadio induce linfoproliferación y como se podría modificar la expresión genética en estas células. Por lo anterior el daño a las láminas nucleares constituye una evidencia que apoya el carácter neoplásico de este metal.

9. CONCLUSIONES

1. La exposición a V_2O_5 por la vía inhalada produce alteraciones morfológicas en los núcleos de los linfocitos de bazo, tales como: invaginaciones y evaginaciones pronunciadas de la envoltura nuclear. Estas alteraciones se acompañan de cambios en la distribución de los complejos del poro nuclear, edema en la envoltura nuclear, pseudoinclusiones y cambios en la organización de la cromatina, observándose mayor proporción de cromatina compacta o heterocromatina.
2. Las alteraciones nucleares de los linfocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 podrían explicarse debido a que el vanadio fue capaz de interactuar con las láminas nucleares, modificando su asociación con la envoltura nuclear, con la cromatina y otros componentes nucleares, probablemente al alterar la estructura de estas proteínas, su localización en el núcleo o su interacción con otras proteínas nucleares.
3. El decremento en la lámina B1 producido por la exposición a vanadio, fue suficiente para producir alteraciones nucleares en linfocitos TCD4, TCD8 y B de bazo, lo cual puede comprometer la viabilidad de estas células.
4. Las láminas nucleares presentaron sensibilidad diferencial al vanadio, siendo el tipo B1 el más susceptible, seguido por la lámina B2. En cuanto a la lámina AC, el efecto fue dependiente del tipo celular.
5. Los linfocitos podrían presentar un mecanismo de compensación, en el cual incrementan la producción de láminas que normalmente expresan en concentraciones menores, ante daños a la lámina constitutiva. Sin embargo, los cambios en la estructura y función nuclear no son compensados por el exceso en de las láminas B2 o AC.
6. La baja concentración de la lámina AC en linfocitos B y TCD8 en los animales tratados con respecto al control, sugiere la presencia de células inmaduras, lo que se correlaciona con el incremento en el tamaño de los nódulos linfoides observados en trabajos previos.

7. Dado que en nuestro modelo la apoptosis es inhibida por el vanadio en las células del bazo, y debido a que este metal es un mitógeno para los linfocitos, este mecanismo podría inducir la transformación celular, lo cual se ha observado en otros modelos que es favorecida por los cambios en el patrón de expresión de las láminas nucleares.

8. Las alteraciones en las láminas podrían producir cambios en la localización de algunos cromosomas y cambiar la expresión génica, lo cual podría explicar el efecto carcinogénico observado en otros modelos.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar en este modelo las consecuencias funcionales del daño sobre las láminas nucleares en los linfocitos T y B de ratón.
2. Analizar si el incremento en el tejido linfoide en el bazo se debe a la proliferación de los linfocitos presentes en el órgano o bien si son resultado de migración celular y correlacionarlo con los cambios en las láminas nucleares.
3. Investigar si las células con estas alteraciones nucleares son viables y si existe un incremento en el porcentaje de muerte por otro proceso diferente a la apoptosis en los linfocitos del bazo y sus consecuencias fisiológicas.
4. Determinar si las alteraciones sobre las láminas nucleares producidas por el vanadio alteran los patrones de expresión génica que puedan conducir al desarrollo de eventos neoplásicos.
5. Identificar los posibles cambios en la actividad de factores de transcripción que son regulados por las láminas nucleares como Rb, Oct1, GCL, etc., y su relación con un probable evento linfoproliferativo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaranson RP., Blobel G. (1974). On the Attachment of the Nuclear Pore Complex. *Journal of Cell Biology* 62: 746-754.
- Agency for toxic substances and diseases registry. (ATSDR) (1992). Toxicological Profile for Vanadium and Compounds. Atlanta, GA: U.S. Departamento de salud y servicios humanos. Servicio de Salud Pública.
- Agency for toxic substances and diseases registry. (ATSDR) (1995). Vanadio. Atlanta, GA: U.S. Departamento de salud y servicios humanos. Servicio de Salud Pública. CAS # 7440-62-2.
- Agrelo R., Setien F., Espada J., Artiga MJ., Rodríguez M., Pérez-Rosado A., Sánchez-Aguilera A., Fraga MF., Piris MA., Esteller M. (2005). Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 23(17):3940-3947.
- Albert L.A. (2004a). Contaminantes ambientales y criterios de evaluación. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de la Ciudad Juárez, Chihuahua México, pp 147-164.
- Albert L.A. (2004b). Contaminantes inorgánicos: Cromo. En: Albert L.A. Toxicología ambiental. (1ª ed). Universidad Autónoma de la Ciudad Juárez. Chihuahua México, pp 277-294.
- Altamirano-Lozano M., Álvarez Barrera L., Basurto-Alcántara F., Valverde M., Rojas E. (1996). Reprotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 16: 7-17.
- Aragón A.M., Altamirano-Lozano M. (2001). Sperm and testicular modifications induced by subchronic treatments with vanadium (IV) in CD-1 mice. *Reproductive Toxicology* 15(2):145-51.
- Au A., Ha J., Hernández M., Polotsky A., Hungerford DS., Frondoza CG. (2006). Nickel and vanadium metal ions induce apoptosis of T-lymphocyte Jurkat cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 79A: 512–521.
- Baran E.J. (2003). Model studies related to Vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal Brazilian Chemistry Society* 14(6): 878-888.

- Barat C., Tremblay JM. (2003). Treatment of Human T Cells with Bisperoxovanadium Phosphotyrosyl Phosphatase Inhibitors Leads to Activation of Cyclooxygenase-2 Gene. *The Journal of Biological Chemistry* 278(9): 6992–7000.
- Barceloux G. D. (1999). Vanadium. *Clinical Toxicology*. 37: 265-278.
- Bergo MO., Gavino B., Ross J., Schmid WK., Hong C., Kendall LV., Mohr A., Meta M., Genant H., Jiang Y., Wisner ER., Van Bruggen N., Carano RAD., Michaelis S., Griffey SM., Young SG. (2002). Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *PNAS* 99(20):13049-13050.
- Bhagavan S., Jandhyala G., Hom J. (1983). Physiological and Pharmaceutical properties of vanadium. *Life of Science* 33: 1325-1340.
- Broers JL., Raymond Y., Ror MK. (1993). Nuclear A-Type- Lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *American Journal of Pathology* 143:211-220.
- Broers JL., Machiels BM., Kuijpers HJ., Smedts F., Van der Kieboom R., Raymond Y., Ramaekers FC. (1997). A and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochemical Cell Biology* 107: 505-517.
- Broers JL, Kuijpers HJ, Ostlund C, Worman HJ, Endert J, Ramaekers FC. (2005). Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Experimental Cell Research* 304(2):582-92.
- Brunagel G., Schoen RE., Bauer AJ., Vietmeier NB., Getzenberg RH. (2002). Nuclear Matrix Protein Alterations Associated with Colon Cancer Metastasis to the Liver. *Clinical Cancer Research* 8: 3039–3045.
- Cance WG., Chaudhary N., Worman HJ., Blobel G., Cordon-Cardo C. (1992). Expression of the nuclear lamins in normal and neoplastic human tissues. *Journal Experimental Clinical Cancer Research* 11:233-246.
- Cande W.Z. y Wolniak S.M. (1978). Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate. *Journal of Cell Biology* 79:573-580.
- Caron M., Auclair M., Donadille B., Béréziat V., Guerci B., Laville M., Narbonne H., Bodemer C., Lascols O., Capeau J., Vigouroux C. (2007). Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death and Differentiation*. 14: 1759–1767.

- Cea-Bonilla A., Del Arenal-Mena I.P., Riveros-Rosas H, Vázquez-Contreras E (2002). Biología de las especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico* 25: 19-54.
- Chatterje M., Bishayee A. (1998). Vanadium – A new tool for cancer prevention. En: Nriagu. Vanadium in the Environment. Parte II: Health effects. 347-383. John Wiley & Sons. New York, pp. 347-385.
- Coffey DS. (2002). Nuclear Matrix Proteins as Proteomic Markers of Prenoeplastic and Cancer Lesion. *Clinical Cancer Research* 8:3031-3033.
- Cohen, A.J., Ross Anderson, H., Ostro, B., Pandey, K.D., Krzyzanowski, M., Kunzli, N., Gutschmidt, K., Pope, A., Romieu, I., Samet, J.M., Smith, K. (2005). The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of Toxicology Environmental Health A* 68: 1301.
- Cohen M., Tzur YB., Neufeld E., Feinstein N., Delannoy MR., Wilson KL., Gruenbaum Y. (2002). Transmission electron microscope studies of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Journal of Structural Biology* 140: 232-240.
- Conklin A.W., Skinner C.S., Felten T.L. (1982). Clearance and distribution of intratracheally instilled vanadium-48 compounds in the rat. *Toxicology Letters* 11:199-203.
- Cosolari JM., Brown CR., Komili S., West J. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *The Cell* 117:427-439.
- Del Razo L.M., Quintanilla-Vega B., Albores A. (2004). Contaminantes Inorgánicos: Arsénico. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 295-308
- Dey Pranab, M.D., M.I.A.C. (2005) Chromatin Pattern Alteration in Malignant Cells: An Enigma. *Diagnostic Cytopathology* 32: 25-30.
- Dockery DW, Pope III CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. Environmental Epidemiology Program. (1994). Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts. *Annual Review of Public Health* 15:107-32.
- Done A.K. (1979). Of metals and chelation. *Emerg. Medical* 11:186-218.
- Mattout-Drubezki A, Gruenbaum Y. (2003). Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Molecular Life Science* 60(10):2053-63.

- Dundar MS. (2006). Vanadium concentrations in settled outdoor dust particles. *Environmental Monitoring and Assessment* 123: 345–350.
- Edel J, Sabbioni E. (1988). Retention of intratracheally instilled and ingested tetravalent and pentavalent vanadium in the rat. *Journal Trace Elements Electrolytes Health Disease* 2:23-30.
- Ehring GR., Kerschbaum HH., Fanger CM., Eder C, Rauer H., Cahalan MD. (2000). Vanadate Induces Calcium Signaling, Ca²⁺ Release-Activated, Ca²⁺ Channel Activation, and Gene Expression in T Lymphocytes and RBL-2H3 Mast Cells Via Thiol Oxidation. *The Journal of Immunology* 164: 679–687.
- Ehrlich R.P., Ceballos G. (1997). Población y medio ambiente: ¿qué nos espera? *Ciencia* 48 (4): 19-30
- Ellis DJ., Jenkison H., Whitfield WG., Hutchinson CJ. (1997). GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamin in DNA replication. *Journal of Cell Science* 110:2507-2518.
- EPA (2005). Human Health. Environment Pollution. Evangelou AM. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42:249-265.
- Evangelou AM. (2002). Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42(3):249-65.
- Narla RK, Dong Y, D'Cruz OJ, Navara C, Uckun FM. (2000). Bis (4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) Sulfatoxovanadium (IV) as a Novel Apoptosis-inducing Anticancer Agent. *Clinical Cancer Research* 6: 1546–1556.
- Flores-Rodríguez J. (2004). Causas y Efectos de la contaminación atmosférica. En Albert LA. Toxicología Ambiental. 1ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de la Ciudad de Juárez. Chihuahua, México. pp 167-189.
- Fong LG., Ng JK., Lammerding J., Vickers TA., Meta M., Coté N., Gavino B., Qiao X., Chang SY., Young RS. Yang SH., Stewart CL., Lee RT., Bennett CF., Bergo M., Young SG. (2006). Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *Journal of Clinical Investigation* 116:743–752.
- Fortoul TI., Piñón-Zárate G., Díaz-Bech P., González-Villalva A., Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Colín-Barenque L., Martínez-Pedraza M., Montañón LF. (2008). Spleen and Bone Marrow Megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histology and Histopathology* (en prensa)

- Fortoul T.I., Quan-Torres A., Sánchez I., López E. I., Bizarro P., Mendoza M., Saldivar O., Espejel G. (2002). Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Archives of environmental health*. 57: 446-449.
- Fortoul T.I., Salgado R.C., Moncada S.G., Sánchez I., López I.E., Espejel G., Calderón N.L., Saldivar L. (1999). Ultrastructural findings in the murine non ciliated bronchiolar cells (NCBC) alter subacute inhalation of lead acetate. *Acta Veterinaria Brno*. 68 (1): 51–56.
- Furukawa, K., and Hotta, Y. (1993) cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells, *EMBO Journal* 12: 97-106.
- Furukawa, K., Inagaki, H., and Hotta, Y. (1994) Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Experimental Cell Research* 212: 426–430.
- Gant TM., Wilson KL (1997). Nuclear assembly. *Annual Review of Cell Developmental Biology* 13: 669-695.
- García-Guevara JA. (1996). Una semblanza de la química del vanadio. *Profesores al día*. Octubre: 185- 189.
- Gerace L. Blum A. Blobel G. (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *Journal of Cell Biology* 79: 546-566.
- Gerner C. (2004). Characteristic Alterations of Nuclear Structure and Chromatin Organisation of cancer cells addressed by Proteasome Analysis. *Current Proteomic* 1(2):113-129.
- Ghadially FN. (1997). Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. 4ta. Ed. Vol 1. Butterworth-Heinemann. USA. pp 1-42
- Gold DR, Damokosh AI, Pope A, Dockery DW, McDonnell WF, Serrano P. (1999). Particulate and ozone pollutant effect on respiratory function of children in Southwest Mexico City. 1999. *Epidemiology* 10(1):8-16.
- Goldman RD., Gruenbaum Y., Moir RD., Shumaker DK., Spann TP. (2002). Nuclear Lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes and Development* 16(5):533-547.
- González Villalva A. (2005). Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en medula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. UNAM.

- Gruenbaum Y, Wilson K., Harel A., Goldberg M., Cohen M. (2000). Review: Nuclear lamins- Structural proteins with fundamental functions. *Journal of Structural Biology* 129: 313-323.
- Gruenbaum Y., Margalit A., Goldman RD., Shumaker DK., Wilson KL. (2005). The Nuclear Lamina Comes of Age. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6: 21-31.
- Guilly MN., Bensussan A., Bourge JF., Bornens M, Courvalin JC. (1987). A human T lymphoblastic cell line lacks lamins A and C. *The MBO Journal* 6(12): 3795-3799.
- Guilly MN., Kolb JP., Gosti F., Godeau F., Courvalin JC. (1990). Lamins A and C are not expressed at early stages of human lymphocyte differentiation. *Experimental Cell Research* 189: 145-147.
- Gutiérrez JH, Romieu I, Corey G, Fortoul T. Contaminación del aire, riesgos para la salud. México DF: UNAM/El Manual Moderno. 1997:4-5.
- Gutiérrez-Ruiz M.C., Bucio-Ortiz L., Souza Arroyo V. (2004). Contaminantes Inorgánicos: Mercurio. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 241-258.
- Gutiérrez-Ruiz M.C., Fortoul van der Goes (2004). Conceptos básicos de toxicología. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la ciudad de Juárez, Chihuahua México, 75-98.
- Gylseth B., Leira H.L., Steinnes E. (1979). Vanadium in the blood and urine of workers in a ferroalloy plant. *Scandinavian Journal Work and Environmental Health* 5:188-194.
- Harborth J. Elbashir SM., Bechert K., Tuschli T., Weber K. (2001). Identification of esencial genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *Journal of Cell Science* 114: 4557-4565.
- Hernández-Cadena L, Téllez-rojo MM, Sanín-Aguirre LH, Lacasaña-Navarro M, Campos A, Romieu I. (2000). Relación entre consultas a urgencias por enfermedad respiratoria y contaminación atmosférica en Ciudad Juárez, Chihuahua. *Sal Públ Mex.* 42:288-97.
- Hinds W. (1982). Aerosol Technology. Properties, Behaviour, and Measurement of Airborne Particles. John Wiley & Sons, EUA.
- Holaska JM., Wilson KL., Mansharamani M. (2002). The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology*14:357-364.

- Hornbeck P., Huang KP., Paul WE. (1988). Lamin B is rapidly phosphorylated in lymphocytes after activation of protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 85: 2279-2283.
- Hozák P. (1996). The Nucleoskeleton and Attached Activities. *Experimental Cell Research* 229:267-271.
- Hozák P., Sasseville Marie-Josée A., Raymond Y., Cook RP. (1995). Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as peripheral lamina in human cells. *Journal of Cell Science*. 108:635-644.
- Huang, Y.C., Ghio, A.J., (2006). Vascular effects of ambient pollutant particles and metals. *Current Vascular Pharmacology* 4: 199.
- Ilabaca M, Olaeta I, Campos E, Villaire J, Téllez MM, Romieu I. (1999). Association between levels of fine particulate and emergency visits for pneumonia and other respiratory illness among children in Santiago. Chile. *Journal Air Waste Manag Assoc*. 49:174-85.
- Imai S., Nishibayashi S., Takao K., Tomifuji M., Fujino T. Hasegawa M. Takano T. (1997) Dissociation of Oct-1 from the nuclear peripheral structure induces the cellular aging-associated collagenase gene expression. *Molecular Biology of the Cell* 8:2407-2419.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). (1997) Estadísticas del Medio Ambiente. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y protección al Ambiente 1995-1996. [Environmental statistics. General information about environmental protection and equilibrium, 1995-1996.] México. pp. 461.
- International Program on Chemical Safety (IPCS). (1988). Vanadium. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 81), pp. 170.
- International Program on Chemical Safety (IPCS). (2000). Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. Geneva: World Health Organization. (Concise International Chemical Assessment Document), 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)
- Jacob KN., Garg A. (2006). Laminopathies: Multisystem dystrophy syndromes. *Molecular Genetics and Metabolism* 87: 289-302.

- Jansen MPH.M., Machiels BM., Hopman AHN., Broers JLV., Bot FJ., Arends JW., Ramaekers FCS., Shouten HC. (1997). Comparison of A and B-Type lamin expression in reactive lymph nodes and nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Histopathology* 31:304-312.
- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68: 16.
- Johnson KC., Pan S., Fry R., Mao Y. (2003). Residential proximity to industrial plants and non-Hodgkin lymphoma. *Epidemiology* 14:687-693.
- Kaelin Jr WG. (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21:950-958.
- Kampa M., Castanas E. (2007). Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 20: 1-6
- Kaufmann SH. (1899). Additional members of the rat liver lamin polypeptide family. Structural and immunological characterization. *Journal of Biology And Chemistry* 264:13946-13955.
- Kill IR., Hutchinson CJ. (1995). S-Phase phosphorylation of lamin B2. *FEBS Letters* 377:26-30.
- Kiviluoto M. (1980). Observations on the lungs of vanadium workers. *British Journal Industrial Medicine* 37: 363-366.
- Kivinen K. Kallajoki M., Taimen P. (2005). Caspase-3 is required in the apoptotic desintegration of the nuclear matrix. *Experimental Cell Research* 311: 62-73.
- Krejsa CM., Nadler SG., Esselstyn JM., Kavanagh TJ., Ledbetter JA., Schieven GL. (1997). Role of Oxidative Stress in the Action of Vanadium Phosphotyrosine Phosphatase Inhibitors. Redox independent activation of NF-kB. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (17): 11541–11549.
- Kunzli, N., Tager, I.B. (2005). Air pollution: from lung to heart. *Swiss Med. Wkly* 135: 697.
- Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *Journal Clinical Investigation* 113(3):370-8.
- Lammerding J, Hsiao J, Schulze PC, Kozlov S, Stewart CL, Lee RT. (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *Journal of Cell Biology* 170(5):781-91.

- Leonard A. y Gerber G.B. (1994). Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of vanadium compounds. *Mutation Research* 317:81-88.
- Leopardi P., Villani P., Cordelli E., Siniscalchi E., Veschetti E., Crebelli R. (2005). Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicology Letters* 158: 39-49.
- Lees-Miller SP. (2006). Dysfunction of lamin A triggers a DNA damage response and cellular senescence. *DNA Repair* 5 (2): 286-289.
- Li W., Zhao Y., Chou I. (1996). Mg^{2+} antagonism on Ni^{2+} induced changes in microtubules assembly and cellular thiol homeostasis. *Toxicology and applied pharmacology* 136: 101-111.
- Linos A, Blair A, Gibson RW, Everett G, Van Lier S, Cantor KP, Schuman L, Burmeister L. (1991). Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma and residential proximity to industrial plants. *Arch Environ Health* 46:70-74.
- Lippmann, 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, Seventh Edition, Ohio, U.S.A., pp.163-198.
- Liu J., Ben-Shahar TR., Riemer D., Treinin M., Spann P., Weber K., Fire A., Gruenbaum Y. (2000). Essential Roles for *Caenorhabditis elegans* Lamin Gene in Nuclear Organization of Nuclear Pore Complexes. *Molecular Biology of the Cell* 11:3937-3947.
- López-Soler RI., Moir RD., Spann TP., Stick R., Goldman RD. (2001). A role of nuclear lamins in nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology* 154: 61-70.
- Llobet M.J., Colomina T.M., Sirvent J.J., Domingo L.J., Corbella. (1993). Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice. *Journal Toxicology* 80: 199-206.
- Machiels BM., Kuijpers H.J.H., Smedts F., Van den Kieboom R., Frans YR., Ramaekers CS. (1997). A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochemistry Cell Biology* 107:505–517.
- Machiels, B. M., Zorenc, A. H., Endert, J. M., Kuijpers, H. J., van, E. G., Ramaekers, F. C., and Broers, J. L. (1996) An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *Journal of Biological Chemistry* 271: 9249–9253.
- Malhas A., Lee CF., Sanders R., Saunders NJ., Vaux DJ. (2007). Defects in lamin B expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression. *Journal of Cell Biology* 176(5): 593-603.

- Mancini, MA., Shan B., Nickerson JA., Penman S., Lee WH. (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proceeding National Academy of Science USA*. 91:418–422.
- Maraldi NM, Lattanzi G, Squarzone S, Capanni C, Cenni V, Manzoli FA. (2005a). Implications for nuclear organization and gene transcription of lamin A/C specific mutations. *Adv Enzyme Regul* 45:1-16.
- Maraldi NM, Lattanzi G. (2005b). Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 15(4):277-94.
- Marini M, Zunica G, Bagnara GP, Franceschi C. (1987). Effect of vanadate of PHA-induced proliferation of human lymphocytes from young and old subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 142(3): 836-42.
- Martínez-Cayuela M. (1998). Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 39(1): 5-18.
- Masny PS., Bengtsson S., Chung JH., Martin B., Van Engelen SM., Van der Maarel y Winokur ST. (2004). Localization of 4q32.5 to the nuclear periphery: is FSHD a nuclear envelope disease?. *Human Molecular Genetics* 13: 1857-1871.
- Maske CP., Hollinshead MS., Higbee NC., Bergo MO., Young SG., Vaux DJ. (2003). A carboxyl-terminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation. *Journal of Cell Biology* 162(7): 10223-1232.
- Mattout A., Dechat T., Stephen AA., Goldman RD., Gruenbaum Y. (2006). Nuclear Lamins Disease and Aging. *Current Opinion in Cell Biology* 18: 335-341.
- Mattout-Drubezki y Gruenbaum Y. (2003). Dynamic interaction of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. *Cell Molecular Life Science* 60:2053-2063.
- Michele DE., Thomsen D., Louters LL. (1997). Vanadates form insoluble complexes with histones. *Biochimie* 79(7):457-462.
- Migliore L, Bocciardi R, Macri C, Lo Jacono F. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research* 319(3): 205-13.
- Mirabelli F., Salis A., Perotti M., Taddei F., Bellomo G. Orrenius S. (1988). Alterations of surface morphology caused by the metabolism of menadione in mammalian cells are associated with the oxidation of critical sulfhydryl groups in cytoskeletal proteins. *Biochem. Pharmacol.* 37: 3423-3427.

- Mohammad A. Al-Bayati, M. Roger Cubertson, Jay P. Shreinder, Leon S. Rosenblatt y Otto G. Raabe. (1992). The Lymphotoxic Action of Vanadate. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 11 (2): 19-27.
- Moir RD., Spann TP. (2001). The Structure and Function of Nuclear Lamins: Implications for Disease. *Cell Molecular Life Science* 58:1748-1757.
- Moir RD., Spann TP., Herrman H., Goldman RD. (2000a), Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *Journal of Cell Biology* 149(6):1179-1191.
- Moir RD., Spann TP., López-Soler RI., Yoon M., Goldman AE, Khuon S., Goldman RD. (2000b). Review: The Dinamics of the nuclear lamins durig the cell cycle-Relationship between structure and function. *Journal of Strutural Biology* 129:324-334.
- Moir, R. D., Montaglowy, M., and Goldman, R. D. (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: Lamin B is associated with sites of DNA replication. *Journal of Cell Biology* 125: 1201–1212.
- Molina E, Meneses E. (2003). Evaluación epidemiológica del impacto de los contaminantes del aire. Propuesta metodológica. *Rev Cubana Hig Epidemiol*. 41(2-3).
- Molina E, Meneses E. (2004). Funciones exposición-respuesta para evaluaciones de impacto de contaminantes prioritarios del aire en la salud. En: Memorias I. Congreso Internacional de Ambiente, Escuela y Salud. La Habana, Cuba.
- Molina M.J., Molina L.T., (2004). Megacities and atmospheric pollution. *Air & Waste Management Associated* 54: 644–680.
- Molinuevo MS., Barrio DA., Cortizo AM., Etcheverry SB. (2004). Antitumoral properties of two new vanadyl (IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 163–172.
- Molinuevo MS., Cortizo AM., Etcheverry SB. (2008). Vanadium (IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells *Cancer. Chemotherapy and Pharmacology* 61(5):767-73.
- Morinville, A., Maysinger, D., Shaver, A. (1998). From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends in Pharmacology Science* 19: 452–460.

- Moss SF, Krivosheyev V., de Souza A., Chin K., Gaetz HP., Chaudhary N., Worman HJ., Holt PR. (1999). Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut* 45:723-729.
- Mugica V., Maubert M., Torres M., Muñoz J., Rico E. (2002). Temporal and spatial variations of metals content in TPS and PM10 in Mexico City during 1996-1998. *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.
- Mussali- Galante P., Rodríguez-Lara V., Hernández-Tellez B., Ávila-Costa MR., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., Martínez-Levy G., Rojas-Lemus M., Piñón Zarate G., Saldivar-Osorio L., Tovar-Sánchez E., y Fortoul TI. (2005). Inhaled Vanadium Alters Gamma-Tubulin of Mouse Testes at Different Exposures Times. *Toxicology and Industrial Health* 21:215-222.
- 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
- Navarro CL., De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Boccaccio I., Boyer A., Geneviève D., Hadj-Rabia S., Gaudy-Marqueste C., Smitt HS., Vabres S., Faivre L., Verloes J., Essen TV., Flori E., Hennekam R., Beemer FA., Laurent F., Le Merrer, Cau P., Lévy N. (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Human Molecular Genetics* 13 (20): 2493–2503.
- Nigg EA. (1992). Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin. Cell Biol.* 3. 245-253.
- Nechay B. R. (1984). Mechanisms of action of vanadium. *Annual Review Pharmacology and Toxicology* 24: 501-524.
- Newport JW., Wilson KL., Dunphy WG. (1990). A lamin independent pathway for nuclear envelope assembly. *Journal of Cell Biology* 111: 2247-2259.
- Nriagu J.O. (1990). Global metal pollution. Poisoning the biosphere?. *Environment* 32(7): 7-32.

- Nriagu J.O., Pirrone N. (1998). Emission of vanadium into atmosphere. En: Nriagu. Vanadium in the environment. Parte I. Health effects. John Wiley & Sons. New York. pp. 25-36.
- Oberg S.G, Parker D.R., Sharma R.P. (1978). Distribution and elimination of an intratracheally administered vanadium compound in the rat. *Toxicology* 11: 315-323.
- Orris P, Cone J, McQuilkin S. (1983). Health hazard evaluation report. Eureka Company, Bloomington Il. Washington, D.C. National Institute of Occupational Safety and Health. U.S. Department of Health and Human Services. (NTIS-PB85-163574).
- Orth K., Chinnaiyan AM., Garg M., Froelich CJ., Dixit VM. (1996). The CED-3/ICE-like proteasa Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry* 271: 16443-16446.
- Owusu-Yaw J., Cohen M.D., Fernando S.Y. Wei C.I. (1990). An assessment of the genotoxicity of vanadium. *Toxicology Letters* 50: 327-336.
- Oyarzún Gómez M. (2000). Contaminación atmosférica y asma bronquial. *Rev chil enferm respir.* 16(3):142-7.
- Pauling–Levasseur M., Scherbarth A., Traub U. Traub P. (1988). Lack of Lamin A and C in mammalian hematopoietic cell lines devoid of intermediate filament proteins. *Eur J. Cell Biol* 47:121:131.
- Pekovic V., Benham A., Dixon D., Edwards R., Hutchison C., Kill I., Bushby K., Foisner R. (2007). The functional involvement of lamin A and LAPa in human ageing: the role for lamina protein redox modifications in senescence signaling. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 146: S53–S62.
- Peter M. y Nigg EA. (1991) Ectopic expression of an A-type lamin does not interfere with differentiation of lamin A-negative embryonal carcinoma cells. *Journal of Cell Science* 100: 589–598.
- Peter, M., Heitlinger, E., Häner, M., Aebi, U., Nigg, E. A. (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J.* 10: 1535–1544.
- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E. A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *The Cell* 61: 591–602.

- Peters A., Goldstein IF, Beyer U, Franke K, Heinrich J, Dockery W. (1996) Acute health effects of exposure to high levels of air pollution in Eastern Europe. *Am J Epidemiol* 144(6):570-81.
- Philimonenko VV., Flechon Jaques-Edmond y Hozák P. (2001). The Nucleoskeleton: A permanent structure of the cell nuclei regardless of their transcripcional activity. *Experimental Cell Research* 264:201-210
- Piñón-Zárate G., Rodríguez-Lara V., Rojas-Lemus M. Martínez-Pedraza M., Villalva-González A., Mussali-Galante P., Fortoul TI. (2008). Vanadium pentoxide-inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses. *Inmunotoxicology* (en prensa).
- Poucheret, P., Verma, S., Grynepas, M.D., McNeill, J.H. (1998). Vanadium and diabetes. *Molecular Cell Biochemistry* 188: 73-80.
- Prokocimer M., Ayelet M., Gruenbaum Y. (2006). The nuclear lamina and its proposed roles in tumorigenesis: Projection on the hematologic malignancies and future target therapy. *Journal of Structural Biology* 155(2):351-60.
- Qureshi MA., Hill CH., Heggen CL. (1999). Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68(1): 61-71.
- Rama Krishna Narla, Yanhong Dong, Osmond J. D’Cruz, Christopher Navara, Ramírez CL., Cadiñanos I., Varela JM., Freije MP., López-Otín C. (2007). Human progeroid síndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questios. *Cell Molecular Life Science* 64:155-170.
- Ramírez CL., Cadiñanos J., Varela I., Freije J. M. P., López-Otín C. (2007). Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:155-170.
- Ramírez 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.
- Rankin J., Ellard S. (2006). The Laminopathies: a clinical review. *Clinical Genetics* 70:261-274.
- Rehder, D. (1992). Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals* 5: 3-12.

- Ress N.B., Chou B.J., Renne R.A., Dill J.A., Miller R.A., Roycroft J.H., Hailey J.R., Haseman J.K., Bucher R.B. (2003). Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F mice. *Toxicological Sciences* 74: 287-296.
- Riveros-Rosas H., Pfeifer G.D., Lyman D.R., Pedroza J.L., Julián-Sánchez A., Canales O., Garfias J. (1997). Personal exposure to elements in Mexico city air. *The Science of the Total Environment* 198: 79-96.
- Rober RA., Sauter H., Weber K., Osborn M. (1990) Cells of the immune and hematopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *Journal of the cell Science* 95: 587-598.
- Rodríguez-Lara Vianey (2005). Efecto del Pentóxido de Vanadio sobre la gamma-tubulina de células testiculares en un modelo murino de exposición por inhalación. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias UNAM. 2005.
- Rodríguez-Mercado JJ., Roldán-Reyes E., Altamirano-Lozano M. (2003). Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology Letters* 144: 359-369.
- Rogers KR., Morris CJ., Blake DR. (1991). Oxidation of thiol in the vimentin cytoskeleton. *Biochem. J.* 275: 789-791.
- Rogers KR., Morris CJ., Blake DR. (1989). Cytoskeletal rearrangement by oxidative stress. *Int. J. Tissue Reactions* 11: 309-314.
- 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.
- Romero Placeres M, Más Bermejo P, Lacasaña Navarro M, Téllez Rojo Solís MM, Aguilar Valdés J, Romieu I. (2004). Contaminación atmosférica, asma bronquial e infecciones respiratorias agudas en menores de edad de La Habana. *Salud Pública Mexicana* 46:222-3.
- Romero Placeres M., Diego Olite F., Álvarez Toste M. (2006) La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. *Revista Cubana de Higiene Epidemiológica* 44(2): 1-14.
- Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Sienna JJ, Huerta J, White MC, Etzel RA. (1996). Effect of air pollution on the respiratory health of asthmatic children living in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med.* 154:300-7.

- Romieu I, Meneses F, Sienra-Monge JJ, Huerta J, Ruiz S, White M, Etzel R, Hernández-Ávila M. (1995). Effects of urban air pollutants on emergency visits for childhood asthma in Mexico City. *Am J Epidemiol.*141:546-53.
- Romieu I., Weitzenfeld h., Finkelman J. (1990). Urban air pollution in latin America and Caribbean: Health perspectives. *World Health Statistics Query* 43 (3): 153-67.
- Ross RD. (1974). La industria y la Contaminación del aire. (1ª ed). Editorial Diana, México, pp 19-27.
- Ruíz Godoy L., Rizo Ríos P., Sánchez Cervantes F., Osornio Vargas A., García Cuellar C., Meneses García A. (2007). Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 58: 184-190.
- Rusiñol AE., Sinensky MS. (2006). Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Cell Science* 119: 3265-3272.
- Russanov E, Zaporowska H, Ivancheva E, Kirkova M y Konstantiniva S. (1994). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 107(3): 415-421.
- Sakaki M., Koike H., Takahashi H. Sasagawa N. Tomioka S., Aratha K., Ishiura S. (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *Journal of Biochemistry* 129:321-327.
- Saldívar-Osorio L., Tovar Tovar A, Guerrero-Namihira D. (2004b). Contaminantes inorgánicos: Plomo. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 217-39.
- Saldívar-Osorio L., Tovar Tovar A., Fortoul van der Goes Teresa. (2004a). Contaminantes inorgánicos: Cadmio. En: Albert L.A. Toxicología Ambiental. (1ª ed). Universidad de la Ciudad de Juárez, Chihuahua México, pp. 259-276.
- Sarria AJ., Lieber JG., Nordeen SK., Evans R. (1994). The presence of a vimentin-type intermediate filament network affects the shape of the nucleus in human SW-13 cells. *Journal of Cell Science* 107:1593-1607.
- Schwartz J. (1999). Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight U.S. counties. *Epidemiology.* 10(1)17-22.
- Sharma, R.K., Agrawal, M. (2005). Biological effects of heavy metals: An Overview. *J. Environ. Biol.* 26: 301.

- Shirmer EC., Guan T., Gerace L. (2001). Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interaction important for nuclear organization. *Journal of Cell Biology* 153: 479-490.
- Shumaker DK., Kuczmarski ER., Goldman RD. (2003). The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Current Opinion in Cell Biology* 15:358-366.
- Sit KH., Paramanatham R., Bay BH., Wong KP., Thong P., Watt F. (1996). Induction of vanadium accumulation and nuclear sequestration causing cell suicide in human Chang liver cells. *Experientia* 52(8):778-85.
- Slee EA., Adrain C., Martin SJ. (2001). Executioner caspase-3, -6 and -7 perform distinct non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *Journal of Cell Chemistry* 276:7320-7326.
- Smith ED., Kudlow BA., Frock RL., Kennedy BK. (2005). A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mechanisms of Ageing and Development* 126: 447-460.
- Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, Goldman RD. (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *Journal of Cell Biology* 136(6):1201-12.
- Spann TP., Goldman AE., Wang C. Huang S., Goldman RD. (2002). Alteration Of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *Journal of Cell Biology* 156(4):603-608.
- Staldemann B., Khandjian E., Hirt A., Luthy A., Weil R., Wargner HP. (1990). Repression of nuclear lamin A and C expression in humana acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkins lymphoma cells. *Leuk. Res.* 14:815-821.
- Starr DA., Han M. (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science* 11: 406-409.
- Steen RL., Collas P. (2001). Mitergeting of B-type lamins at the end of mitosis: Implications on the cell survival and regulation of lamin A/C expression. *Journal of Cell Biology* 153: 621-626.
- Stoiber T., Bonacker D., Böhm K.J., Bolt H.M., Thies R., Degen G.H., Unger E. (2004). Disturber microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutation Research* 563: 97-106.

- Stuurman N. (1997). Identification of a conserved phosphorylation site modulating nuclear lamin polymerization. *FEBS Letters* 401:171-174.
- Stuurman N., Heins S., Aebi U. (1998). Nuclear Lamins: Their structure assembly and interactions. *Journal of Structural Biology* 122: 42-66.
- Stuurman, N., Sasse, B., and Fisher, P. A. (1996) Intermediate filament polymerization: Molecular analysis of nuclear lamin head-to-tail binding. *J. Struct. Biol.* 117: 1–15.
- Sun M. (1987). Toxicity of vanadium and its environmental health standar. Universidad de Ciencias Médicas. Changdu China.
- Tabellini G., Bortul R., Alugi M., Billi AM., Bareggi r., Grill V., Narducci P., Martelli AM. (2002). *Cellular Signalling* 14: 819-827.
- Taddei A., Hediger F., Neumann RF., Gasser SM. (2004). The Function of Nuclear Architecture: A Genetic Approach. *Annu. Rev. Genet.* 38:305-345.
- Taddei A., Van Houwe G., Hediger A., Kalck V., Cubizolles F., Shober H., Gasser SM. (2006). Nuclear pore association confers optimal expression levels for an inducible yeast gene. *Nature* 441:774-778.
- Taimen P. y Kallajoki M. (2003). NuMA and nuclear lamins behave differently in Fas-mediated apoptosis. *Journal of Cell Science* 116: 571-583.
- Takahashi A., Alnemri ES., Lazebnik YA., Fernandes-Alnemri T., Litwak G., Moir RD., Goldman RD., Poirier GG., Kaufmann SH., Earnshaw WC. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition proprieties are active in apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8395-8400.
- Téllez-Rojo MM, Romieu I, Ruiz-Velazco S, Meneses-González F, Hernández-Avila M. (1997). Efecto de la contaminación ambiental sobre las consultas por infecciones respiratorias en niños de Ciudad de México. *Sal Publ Mex.* 39:513-22.
- Téllez-Rojo MM., Romieu I., Polo-Peña M., Ruíz-Velazco S., Meneses González F., Hernández-Avila M. (1997). Efecto de la contaminación ambiental sobre las consultas por infecciones respiratorias en niños de la Ciudad de México. *Salud pública México* 39(6):513-522.
- Thompson E.J. y Perry P.E. (1988). The identification of micronucleated chromosomes: A possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 3: 415-418.

- Thompson H., Chasteen N.D., Meeker L.D. (1984). Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 5: 849-852.
- Thompson, K.H., Leichter, J., McNeil, J.H. (1993). Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ diabetic rats. *Biochemistry Biophysics Research Community* 97: 1549–1555.
- Valko M., C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1):1-40.
- Vallejo M., Jáuregui-Renaud K., Hermsillo 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.
- Varela I., Cadiñanos J., Pendás AM., Gutiérrez-Fernández A., Folgueras AR., Sánchez LM., Zhou Z., Rodríguez FJ., Stewart CL., Vega JA., Tryggvason K., Freije JMP., López-Otín C. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature Letters* 437(22): 564-568.
- Vargas Marcos F. (2005). La contaminación ambiental como un factor determinante de salud. *Revista Española de Salud Pública* 79(002): 117-127.
- Walter J., Sun L., Newport J. (1998). Regulated chromosomal DNA in absence of a nucleus. *Molecular Cell* 1:519-529.
- WHO (2003). Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen Dioxide. Report on a WHO Working Group Bonn, Germany.
- Wilson KL., Zastrow MS., Lee KK. (2001). Lamins and Disease: Insights into Nuclear Infrastructure. *The Cell* 104:647-65.
- Worman HJ., Lazaridis I., Georgatos SD. (1988). Nuclear lamina heterogeneity in mammalian cells. *Journal of Biology and Chemistry* 263:12135-12141.
- Zaporowska H., Scibior A. (1998). Vanadium and its significance in animal cell metabolism. En: Nriagu. Vanadium in the Environment. Parte II. John Wiley & sons, New York, pp 121-133.
- 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* 392(2): 311-320.

- Zhao K, Harel A., Stuurman N., Guedalia D., Gruenbaum Y. (1996). Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on nuclear lamin polymerization state. *FEBS. Letters* 380: 161-164.
- Zhong B.Z., Gu Z.W., Wallace W.E., Whong W.Z., Ong T. (1994) Genotoxicity of vanadium pentoxide in Chinese hamster V79 cells. *Mutation Research* 321: 35-42.
- Zink D, Fischer AH., Nickerson JA. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nature Reviews. Cancer* 4:677-687.

Páginas WEB

- EPA (2008). <http://www.epa.gov/roe/roe/html/roeHealthEn.htm>
- Health Effects Institute (HEI) (2002). Understanding the Health Effects of Components of the Particulate Matter Mix: Progress and Next Steps. *HEI Perspectives*. En línea en: <http://www.healtheffects.org/Pubs/Perspectives-2.pdf>
- IARQ (2007). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr02b.php>
- Instituto Nacional de Ecología (INE) (2004). <http://www.ine.gob.mx>
- Kirby A. (2008). http://www.agua.org.mx/component/option,com_frontpage/Itemid,1/
- Occupational Safety and Health (OSHA) (2005). Guideline for vanadium pentoxide. En línea en: <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/vanadiumpentoxidedust/recognition.html>
- Silva MA. (2008). [agua.org.mx](http://www.agua.org.mx)
- World Health Organization (WHO) (2005). Air quality guidelines - global update 2005. En Línea en: http://www.who.int/phe/health_topics/outdoorair_aqg/en/index.html