



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ALTERACIÓN EN LA PRESENCIA DE
PROTEÍNAS: TGF-beta, MMP-2 Y MMP-9 Y
VEGFR2 EN MEGACARIOCITOS DE BAZO DE
RATONES EXPUESTOS A LA INHALACIÓN DE
PENTÓXIDO DE VANADIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

VERÓNICA MARTÍNEZ BÁEZ

DIR. DE TESIS :

M. EN C. ADRIANA ELIZABETH GONZÁLEZ
VILLALVA

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Martínez
Báez
Verónica
53386243
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
 2. Datos del tutor
M. en C.
Adriana Elizabeth
González
Villalva
 3. Datos del sinodal 1
Dra.
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes
 4. Datos del sinodal 2
Dra.
Luisa Alvarina
Alba
Lois
 5. Datos del sinodal 3
Dr.
Paul
Carrillo
Mora
 6. Datos del sinodal 4
Dra.
Laura
Colín
Barenque
 7. Datos del trabajo escrito
Alteración en la presencia de proteínas: TGF-beta, MMP-2,
MMP-9 y VEGFR₂ en megacariocitos de bazo de ratones
expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio.
71 p
2011
-

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo de personas invaluable a las que deseo externar mi agradecimiento:

A los miembros de mi comité por sus comentarios para mejorar este trabajo:

Dra. Teresa Fortoul van der Goes

Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

M. en C. Adriana Elizabeth González Villalva

Dr. Paul Carrillo Mora

Dra. Laura Colín Barenque

Al laboratorio de Técnica histológica del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, por el procesamiento de las muestras de técnica histológica:

Téc. Verónica Rodríguez Mata,

Téc. Judith Reyes

Téc. Raquel Guerrero.

Al personal del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM:

MVZ. Enrique Pinzón Estrada.

MVZ. Víctor Manuel Salgado Alfaro

MVZ. Ismael Torres Saldaña.

Al programa PAPIIT IN210409

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Adri, en verdad no sabes lo difícil que es sintetizar lo que significo que estuvieras junto a mi en todo este proceso, gracias por tu apoyo desde el primer momento, por tu comprensión, por tus regaños que al contrario de molestarme, me hicieron mejorar, por ser mi mentora y amiga. Gracias por enseñarme a ver únicamente lo bueno de las personas y porque a pesar de tus compromisos siempre tuviste tiempo para mi, pero sobre todo por darme la oportunidad de conocer a la excelente persona que admiro, respeto y quiero mucho; en verdad Adri, eres la mejor tutora que pude tener y para mi un ejemplo a seguir.

Dra. Tere, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, que me permitieron adquirir conocimientos que me serán útiles para siempre. Por otra parte y aunque se bien que no le agrada tanta palabra, no puedo dejar de decirle que la admiro porque nunca se detiene, sigue aprendiendo y enseñando y en lo personal, siempre recibí de usted ayuda en lo que necesitaba.

Paty Bizarro y Laura Colín, es para mi una fortuna haber encontrado en mi camino a personas como ustedes, ya que además de haberme apoyado para la realización de este trabajo y de darme consejos y asesoría, siempre me dieron animo y me hicieron sentir que en realidad estaba avanzando, gracias de todo corazón.

A las chicas del taller con las que compartí tantos momentos agradables, además de contar “siempre” con su apoyo, por dejarme conocerlas mas allá de lo académico y por brindarme su amistad, gracias, **Dino, Carito, Anaid, Angélica y Andy**.

A **Rubén y Chucho** por apoyarme con mis dudas, escucharme y permitirme escuchar sus aventuras y a los demás miembros del laboratorio **Marce, Vianey, Carlos, Nelly, Gumaro, Sofi, Paquito y Armando**, porque en mas de una ocasión me brindaron su ayuda y fueron también mis maestros de los que aprendí mucho, gracias.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mis papás por darme la vida y apoyarme en todo momento, por creer en mí a pesar de mis errores y porque gracias a su esfuerzo diario, me han permitido alcanzar cada uno de mis sueños y aunque se que no son muy expresivos, el cariño que me dan no requiere palabras, “los quiero mucho”.

A Beto “chivi”, gracias por tu apoyo en la parte gráfica este trabajo, esos megacariocitos y ratones tan bonitos, sin ti no lo hubiera logrado y gracias por ser mi hermano, mi amigo y mi cómplice de toda la vida, con el que he compartido tantos momentos inolvidables y porque aunque no lo sepas, me has enseñado con el ejemplo a que el esfuerzo siempre tiene su recompensa y estoy orgullosa de ti.

A Ale, hermanita, gracias por tu interés en mí y en mi proyecto y por soportar mi frecuente mal humor y por enseñarme que aunque hay cosas que no nos gustan, las tenemos que cumplir, por tantas risas que solo tú, logras en mí, te quiero.

A mi Carlos, gracias por ser mi compañero, amigo, cómplice, todo, por ser mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional para lograr mi sueño, sabes que sin ti esto no hubiera sido posible . Gracias por darle luz a mi vida y por hacerme desear ser una mejor persona para compartir la vida contigo y por no dejarme caer y darme la oportunidad de seguir adelante, “te amo”.

A mis amigos maravillosos, que a pesar de la distancia y el tiempo siempre están en mi corazón y siempre podrán contar conmigo.

A Ponchis, que con su alegría y cariño desinteresado, me estuvo acompañando en el tiempo de realización de este trabajo.

A Dios y a la vida por darme una segunda oportunidad y por permitirme compartir la vida junto a personas maravillosas, por llenarme de bendiciones por las que únicamente puedo decir “gracias”.

INDICE

ABREVIATURAS

1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCIÓN	
2.1) Contaminación atmosférica	2
2.1.1) Tipos de contaminantes	2
2.1.2) Fuentes de contaminación	3
2.1.3) Contaminación en la ZMVM	3
2.1.4) Partículas suspendidas	4
2.1.4.1) Principales metales relacionados con efectos adversos a la Salud	7
2.2) Vanadio	
2.2.1) Generalidades	8
2.2.2) Propiedades químicas	9
2.2.3) Fuentes	10
2.2.4) Usos	11
2.2.5) Vías de exposición	11
2.2.6) Toxicocinética	12
2.2.7) Toxicidad	14
2.2.7.1) Daños a la salud en personas ocupacionalmente expuestas	14
2.2.7.2) Toxicidad celular	15
2.2.7.3) Toxicidad sistémica	17
2.3) Antecedentes	19
2.3.1) Efecto del vanadio en megacariocitos	19

2.3.2) Megacariocitos	20
2.3.2.1) Plaquetas	24
2.3.3) Megacariocitos y su relación con la fibrosis	25
2.3.4) Factores profibrogénicos	28
2.3.4.1) Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)	28
2.3.4.2) Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2 (VEGFR-2)	30
2.3.5) Factores antifibrogénicos	32
2.3.5.1) Metaloproteinasas de matriz (MMPs)	32
3) JUSTIFICACIÓN	34
4) HIPÓTESIS	34
5) OBJETIVO	35
5.1) Objetivo general	35
5.2) Objetivos específicos	35
6) MÉTODO	36
7) RESULTADOS	38
8) DISCUSION	45
9) CONCLUSIONES	55
10) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ABREVIATURAS

AP-1	Proteína activadora 1
ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BMP	Proteína morfogénica de hueso
CTH	Célula troncal hematopoyética
CPH	Célula progenitora hematopoyética
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
ET	Trombocitemia esencial
GDF	Factor de diferenciación y crecimiento
$H_2VO_4^-$	Anión vanadato
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferón gamma
INF-b	Interferón beta
IRF-1	Factor regulatorio del interferón 1
LAP	Péptido asociado a la latencia
LPS	Lipopolisacarido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MF	Mielofibrosis
IMF	Mielofibrosis idiopática
MEC	Matriz extracelular
Mks	Megacariocitos
MMP-2	Metaloproteinasa 2
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MT-MMP	Metaloproteinasa tipo membrana
NF- $\kappa\beta$	Factor nuclear $\kappa\beta$
NH_4VO_3	Metavanadato de amonio
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEM	Progenitora eritroide-megacariocítica
PI-3K	Cinasas 3 fosfotidil inositol
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PKC	Proteína cinasa C

PLC- γ	Fosfolipasa C gamma
PLC	Progenitora linfoide común
PMC	Progenitora mieloide común
PO ₄ ⁻³	Fosfato
PTK	Proteína tirosina cinasa
PV	Policitemia vera
PTP	Proteína tirosina fosfatasas
SMD	Sistema de membranas de demarcación
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor tirosina cinasa
SCF	Factor de células madre
SDF-1	Factor derivado estromal 1
STAT-1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
TGF- β	Factor de crecimiento transformante b
TIMP	Inhibidor de tejido de metaloproteinasa
TPO	Trombopoyetina
TSP-1	Trombospondina 1
V	Vanadio
VO ²⁺	Catión vanadil
VO ₄ ⁻³	Ortovanadato
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR ₂ vascular 2	Receptor del factor de crecimiento endotelial
Zn ²⁺	Zinc

1. RESUMEN

El aumento de contaminación atmosférica en las grandes urbes como la Zona Metropolitana del Valle de México, resultado principalmente de la quema de combustibles fósiles, trae como consecuencia el aumento de contaminantes entre los que se encuentran las partículas suspendidas. Estas entran al organismo junto con metales adosados a su superficie, como es el vanadio; el cual se ha incrementado en el ambiente en los últimos años y ha sido asociado con daño en las vías respiratorias. Entre los efectos tóxicos del vanadio, se han reportado alteraciones en los megacariocitos, como son aumento en el número y tamaño de los megacariocitos en bazo y médula ósea, así mismo se observaron más poliploides, con aumento de gránulos alfa y densos en ratones expuestos a pentóxido de vanadio. Dicho aumento de megacariocitos se ha asociado en otros modelos a fibrosis en médula ósea y pulmón, con alteración en la producción de factores tanto profibrogénicos como antifibrogénicos, por lo tanto nuestro objetivo fue analizar la alteración de la presencia de proteínas profibrogénicas como son TGF- β y VEGFR₂, y proteínas antifibrogénicas como son las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en los megacariocitos de bazo de ratones expuestos a vanadio, vía inhalada. Para lo anterior se emplearon ocho ratones macho CD1 control y 20 expuestos a la inhalación de V₂O₅ 0.02M, dos veces por semana, 1 hora, durante 3 meses y posteriormente, se mantuvieron 1 mes sin exposición. Cada mes se sacrificaron 2 individuos control y 5 expuestos, se obtuvieron los bazos y se realizó la técnica de inmunohistoquímica para identificar las proteínas profibrogénicas (TGF- β , VEGFR₂), y antifibrogénicas (MMP-9 y MMP-2), así como se evaluó la cantidad de colágeno por medio de tinción de Masson. El resultado fue un aumento significativo en la presencia de TGF- β a los 2 y 3 meses de inhalación, para VEGFR₂ se observó aumento al mes 2 y 3, disminución significativa en todos los tiempos de inhalación para MMP-9 y finalmente aumento al mes 2 para la proteína MMP-2. Además se observó que los bazos no presentaban fibrosis. Por lo cual se concluye que a pesar de que la exposición a vanadio favorece el aumento de proteínas profibrogénicas en megacariocitos de bazo, no existe evidencia de fibrosis en este modelo de inhalación y, debido a que en el equilibrio de formar y degradar matriz extracelular intervienen muchas proteínas, probablemente estén involucradas otras que no estamos evaluando en este trabajo.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica antropogénica ha venido acompañando al hombre prácticamente desde hace casi 500 años. El primer caso de efectos severos, reconocido históricamente fue el ocurrido en Londres en diciembre de 1952, donde los altos niveles de contaminantes se asociaron con un alarmante incremento en el número de muertes. Otras ciudades donde se han presentado altos niveles de contaminantes del aire son: México, Río de Janeiro, Milán, y Moscú entre otras (Rosales-Castillo *et al*, 2001).

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afectar estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales, por ejemplo el humo, los polvos, los gases, las cenizas, las bacterias, los residuos y los desperdicios (Vallejo *et al*. 2003).

2.1.1 Tipos de contaminantes

Los contaminantes del aire se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño, origen, estado físico o naturaleza química. Pueden ser átomos, moléculas o compuestos, orgánicos o inorgánicos, iones o radicales libres, mezclas o agregados, partículas o emulsiones, físicos, químicos o biológicos, de origen natural o artificial, generados por fuente móvil o estacionaria, primarios o secundarios, extramuros o intramuros (Munguía Castro *et al*, 2003). Por su origen se clasifican en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios están en la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o por actividades del ser humano, son ejemplos el monóxido de carbono (CO) y el bióxido de azufre (SO₂). Los contaminantes secundarios son los que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen

contaminantes primarios, por ejemplo el ozono (O₃) y los sulfatos (Vallejo *et al.* 2003).

2.1.2 Fuentes de contaminación

Las fuentes de contaminación pueden ser naturales o antropogénicas:

Entre las fuentes naturales se encuentran: los volcanes que emiten óxidos de azufre (SO₂) y partículas; las tormentas eléctricas que generan ozono (O₃) y óxidos de nitrógeno (NO₂); los animales que producen bióxido de carbono (CO₂) e hidrogeniones (H⁺) y la erosión, deforestación y sequías que generan partículas esparcidas por el viento (Munguía-Castro *et al.*, 2003).

Excluyendo a las fuentes naturales, la mayor parte de las emisiones de contaminantes provienen de fuentes antropogénicas, de los vehículos automotores, de la generación de electricidad y de la quema de combustibles empleados en las viviendas, en el sector agrícola y para el transporte.

La contaminación atmosférica tiene efectos a nivel local, regional y global. México enfrenta problemas de calidad de aire en sus principales zonas metropolitanas, destacando la Zona Metropolitana del Valle de México como el caso más conocido y documentado (Urias, 2006).

2.1.3 Contaminación en la Zona Metropolitana del Valle de México.

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) se integra por las 16 delegaciones del Distrito Federal, 58 municipios del Estado de México y un municipio del estado de Hidalgo (COMETAH, 1998). La ZMVM, se encuentra rodeada por una cadena montañosa y está situada a una altitud de 2,240 metros sobre el nivel del mar. El entorno montañoso que rodea la zona constituye una barrera natural que dificulta la libre circulación del viento y la dispersión de los contaminantes (SMA-GDF, 2006).

Las fuentes móviles aportan la mayor parte de las emisiones de toda la ZMVM, considerándose como fuentes móviles, a todas aquellas unidades motrices que sirven como medio de transporte (SMA-GDF, 2005). La flota

vehicular registrada en la ZMVM, se estima en más de 4,5 millones de vehículos, (SMA-GDF, 2008).

Los principales contaminantes relacionados con la calidad del aire son el bióxido de azufre (SO₂), el monóxido de carbono (CO), los óxidos de nitrógeno (NO_x), el ozono (O₃), los compuestos orgánicos volátiles (COV) y las partículas suspendidas (SEMARNAT, 2009).

2.1.4 Partículas suspendidas

La contaminación del aire por quema de combustibles fósiles (biomasa, carbón, madera, petróleo crudo, diesel con alto contenido en azufre) se encuentra en menor concentración que 30 a 40 años atrás, esto debido a una mejor y más limpia tecnología, pero otros contaminantes han ganado prominencia, tal es el caso de partículas suspendidas finas y ultrafinas, gracias a un incremento dramático en el uso a nivel mundial, de vehículos de motor, con la consecuencia del aumento en emisiones en áreas urbanas. Las partículas suspendidas se encuentran no solo en grandes ciudades, sino también en pequeñas poblaciones y la distribución, el tamaño y la composición (por ejemplo, de metales pesados) ha cambiado, resultando en un daño celular oxidativo y efectos toxicológicos mayores (Valavanidis et al, 2008).

En contaminación atmosférica se reconoce como partícula a cualquier material sólido o líquido con un diámetro que oscila entre 0.0002 y 500 micrómetros. En conjunto se designan como partículas suspendidas totales o PST. En este grupo se incluyen sustancias que se desprenden al ambiente como el polvo proveniente de suelos erosionados y caminos sin asfaltar, o que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas, en las que intervienen gases y compuestos orgánicos. Se clasifican en:

1. Partículas burdas, con un diámetro aerodinámico menor de 10 µm (PM₁₀) y mayor de 2.5 µm. Están compuestas principalmente por sílice, titanio, aluminio, sodio, hierro y cloruros.

-
2. Partículas finas, con un diámetro aerodinámico igual o menor a $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$). Están compuestas por productos derivados de la combustión, particularmente por diesel, e incluyen carbono, plomo, vanadio, dióxido de azufre y dióxido de nitrógeno.
 3. Las partículas ultrafinas son aquellas que tienen un diámetro aerodinámico menor de $1 \mu\text{m}$. Están compuestas por los productos de quemas agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel. Sin embargo permanecen en la atmósfera durante periodos muy cortos, ya que tienden a unirse a partículas de mayor tamaño (Vallejo, et al 2003).

Se ha observado que conforme disminuye el tamaño de partícula aumenta su toxicidad, esto se debe a que las partículas más pequeñas son capaces de penetrar más profundamente en las vías respiratorias y una vez dentro del árbol respiratorio éstas son capaces de acumularse en diferentes sitios, como fosas nasales, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y sacos alveolares (Rosales-Castillo *et al.* 2001).

El diámetro de las partículas que respiran los seres humanos es importante, ya que aquellas partículas cuyo diámetro sea superior a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) son retenidas en la nariz, mientras que las de diámetro de $2.5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$) afectan las vías respiratorias bajas, ya que no encuentran barreras físicas y llegan hasta los alvéolos, siendo muy difícil su expulsión (Jacobson, 2002; Harrison et al, 2005).

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993 de Salud Ambiental, los valores de concentración máxima para PST, PM_{10} y $\text{PM}_{2.5}$ en el aire son:

PST: $210 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas.

PM_{10} : $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas y $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual.

$\text{PM}_{2.5}$: $65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas y $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ promedio anual.

En comparación con valores publicados por la OMS y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA, por sus siglas en inglés) son menores que los valores vigentes de la NOM-025-SSA1-1993. Esto se explica porque desde la última revisión de las NOM, los resultados de estudios

científicos alrededor del mundo han demostrado que los efectos en la salud se pueden observar a concentraciones por debajo de los valores vigentes en las normas nacionales (Tabla 1 y 2) (SMA-GDF, 2009).

	OMS		US EPA	NOM	
	Percentil 99 24 h	Promedio anual	Promedio trianual del 2º máximo 24 h	Promedio anual	Percentil 98 24 h
Valor recomendado	50 µg/m ³	20 µg/m ³	150 µg/m ³	50 µg/m ³	120 µg/m ³
Ciudad de México 2009*	287 µg/m ³	106 µg/m ³	169 µg/m ³	106 µg/m ³	247 µg/m ³
Cumple	NO		NO	NO	

Tabla 1. Evaluación del cumplimiento de los valores recomendados por la OMS, la US EPA y la NOM para partículas menores a 10 micrómetros durante 2009 (SMA-GDF, 2009).

	OMS		US EPA		NOM	
	Percentil 99 24 h	Promedio anual	Promedio trianual del Percentil 98 24 h	Promedio trianual	Percentil 98 24 h	Promedio anual
Valor recomendado	25 µg/m ³	10 µg/m ³	35 µg/m ³	15 µg/m ³	65 µg/m ³	15 µg/m ³
Ciudad de México 2009*	58 µg/m ³	26 µg/m ³	43 µg/m ³	21 µg/m ³	58 µg/m ³	26 µg/m ³
Cumple	NO		NO		NO	

Tabla 2. Evaluación del cumplimiento de los valores recomendados por la OMS, la US EPA y la NOM para partículas menores a 2,5 micrómetros durante 2009 (SMA-GDF- 2009).

Los principales componentes de las PST son compuestos orgánicos adsorbidos en las partículas, los cuales pueden ser especies orgánicas volátiles o semivolátiles, metales de transición (hierro, níquel, vanadio, cobre, etc.), iones (sulfato, nitrato) gases reactivos (ozono, peróxidos, aldehídos) partículas de material carbonoso (principalmente de procesos de combustión y partículas de escape de vehículos), materiales de origen biológico (endotoxinas, bacterias, virus, desechos animales y vegetales) y minerales (cuarzo, asbestos, polvo del suelo). La composición de partículas gruesas consiste principalmente de minerales derivados de la corteza insolubles, sal de mar, material de origen biológico, etc. En contraste, las partículas finas y ultrafinas son principalmente

agregados carbonosos con metales y especies orgánicas adsorbidas en las cavidades de su superficie (Valavanidis *et al*, 2008).

Es importante comprender el papel que juegan los metales, como parte de la contaminación atmosférica, en específico de las partículas suspendidas y sus efectos en la salud de los organismos.

2.1.4.1 Principales metales relacionados con efectos adversos a la salud.

Un metal es un buen conductor del calor y la electricidad (Chang, 2000). Los principales metales relacionados con efectos adversos a la salud son plomo, cadmio, mercurio y arsénico (Järup *et al*, 2003).

Está bien documentado que el plomo puede causar efectos adversos a la salud, los cuales incluyen neurotoxicidad y efectos deletéreos en el sistema hematológico y cardiovascular. (García-Lestón *et al*, 2010). Tiene efectos tóxicos en la función tubular renal causando retención de ácido úrico (Rosin, 2009).

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico. En humanos, la exposición aguda vía inhalada resulta en edema pulmonar e irritación del tracto respiratorio, mientras la exposición crónica frecuentemente lleva a disfunción renal, anemia, osteoporosis y fracturas de los huesos. El Cd es también un potente carcinógeno y es clasificado por la IARC como un carcinógeno humano (Liu *et al*, 2009; Acosta *et al*, 2009).

El mercurio es muy tóxico, en particular cuando se metaboliza para formar mercurio de metilo (MeHg). Puede tener efectos perjudiciales en los sistemas nervioso, digestivo, respiratorio e inmunitario y en los riñones, además de provocar daño pulmonar (OMS, 2005). El sistema nervioso es el tejido blanco para los efectos del MeHg en adultos y también en recién nacidos, bebés y niños (Li *et al*, 2010; OMS, 2005).

La exposición a arsénico se sabe que lleva a cáncer de piel y de órganos internos incluyendo pulmón, vejiga urinaria, riñón e hígado. Los efectos de salud no relacionados con cáncer incluyen lesiones de la piel (hipopigmentación, hiperpigmentación e hiperqueratosis), enfermedad

cardiovascular, enfermedad vascular periférica y diabetes tipo II (Kitchin , 2010) y está relacionado con efectos neurológicos a largo plazo (Järup, 2003).

Dentro de los metales que no se han demostrado que sean esenciales para el humano y otros mamíferos se encuentra el vanadio, cuya importancia ha ido en aumento debido a que la contaminación ambiental por vanadio ha aumentado dramáticamente en las últimas décadas, debido al amplio uso de combustibles fósiles, muchos de los cuales liberan V_2O_5 a la atmósfera durante su combustión (Baran, 2008). Esto se demostró indirectamente por Fortoul *et al*, 2002, quienes realizaron un estudio donde se detectó que la cantidad de vanadio aumentó en pulmón en autopsias practicadas a residentes de la Ciudad de México que vivieron en la década de los 90s, en comparación con los que vivieron en la década de los 60s. Esto implica que el vanadio en la atmósfera está aumentando y puede ser un riesgo para la salud humana.

2.2 VANADIO

2.2.1 Generalidades

Fue descubierto en 1801 por el mineralogista mexicano Andrés Manuel del Río, como resultado del estudio de un mineral en Zimapán, al que llamó “pancromio” debido al espectro de colores asociado con varios óxidos del metal, pero cambió el nombre a “eritronio”, por formar con los álcalis sales que se ponían rojas tras calentarse. Posteriormente Alexander von Humboldt lo convenció de que había confundido al eritronio con el cromo (Cr), lo que resultó finalmente falso. El metal fue redescubierto en 1830 por Sefstrom, quien le denominó vanadio (V), como lo conocemos hoy en honor a la diosa Nórdica de la belleza, *Vanadis* (Garritz, 2007).

Es un metal de transición ampliamente distribuido en la corteza terrestre con una abundancia promedio de 0.14 mg/Kg; es el 20º elemento más abundante y el 5º en cantidad en metales de transición. Se puede encontrar en el petróleo en niveles arriba de 1500 mg/Kg. Se presenta mayormente como el ión vanadil (VO^{2+}) en la forma de complejos organometálicos con porfirinas, las cuales se originan de la formación de petróleo crudo, por la substitución del Mg de

clorofila de las plantas por V (Amorim *et al*, 2007). Algunos compuestos de vanadio han sido estudiados para utilizarse en la terapia contra la diabetes y la obesidad, además por sus propiedades moduladoras de la expresión de diversos genes, es usado en modelos experimentales como agente anticarcinogénico (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Está presente normalmente en muy bajas concentraciones (10^{-8} mol/L) en prácticamente todas las células de plantas y animales (Barrio *et al*, 2006). El vanadio es caracterizado como un elemento traza para plantas y animales, el cual estimula la síntesis de clorofila (Amorim *et al*, 2007), la deficiencia de vanadio en animales se manifiesta en disminución del crecimiento, alteraciones reproductivas y trastornos de la función metabólica y celular en el riñón, corazón y cerebro (Bishayee *et al*, 2010). Su papel como elemento traza esencial para humanos y para mamíferos aún no ha sido establecido, así mismo las enfermedades relacionadas a su deficiencia no han sido identificadas (Amorim *et al*, 2007).

2.2.2 Propiedades químicas

En la siguiente tabla se presentan algunas propiedades químicas del vanadio (tabla 3)

Nº oxidación	-1 a +5
Color	Grisáceo
Densidad	6.11 g/cm ³
Grupo	VB
Nº atómico	23
Configuración electrónica	[Ar] 4s ² 3d ³
Peso atómico	50.95
Punto de fusión	1950 °C
Punto de ebullición	3600°C
Geometría	Octaédrica, piramidal

Tabla 3. Propiedades químicas del Vanadio (Barrio *et al*, 2006; Rodríguez-Mercado *et al*, 2006).

El vanadio participa en los procesos biológicos en forma de anión o catión. En condiciones fisiológicas V^V predomina como anión vanadato (H₂VO₄⁻) y V^{IV} como catión vanadilo (VO²⁺) (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Se presenta como vanadilo (VO²⁺) debajo de un pH 3.5 y en soluciones básicas, su forma

predominante es ortovanadato (VO_4^{3-}), el cual es químicamente similar al fosfato (PO_4^{3-}) (Srivastava *et al*, 2004).

El pentóxido de vanadio (V_2O_5), es el compuesto más comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de 1750 °C y punto de ebullición de 690 °C, es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m³ (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Su producción mundial anual esta en el rango de 60,000 toneladas (Ehrlich *et al*, 2008).

2.2.3 Fuentes

La liberación de vanadio a la atmósfera es principalmente ocasionada por la actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental. Se ha estimado que de las 64 mil toneladas de vanadio descargadas anualmente, alrededor del 91% son producto de la actividad industrial, de la combustión de petróleo, de carbón y de aceites pesados (Rodríguez-Mercado, 2006).

El vanadio se obtiene de los minerales cuprodescloicita, patronita, vanadinita, carnotita, entre otros. También se encuentra en grandes cantidades en forma de complejos metálicos y organometálicos en todos los petróleos crudos y materiales de origen fósil. La concentración en los petróleos del mundo es muy variable y depende del lugar de origen (IPCS, 2001). Los petróleos de América son los que contienen más vanadio, en crudos provenientes de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1,180 µg/g, en la variedad atabasca de Canadá y la maya de México el contenido es de 640 a 243 µg/g, respectivamente (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Los combustibles crudos contienen trazas detectables de vanadio (desde menos de 1 a 1600 mg/Kg) y las cenizas de la combustión del petróleo contienen más de un 80% de pentóxido de vanadio (V_2O_5) (García, 2006). Aunque la mayoría de los alimentos contienen baja cantidad de vanadio (<1 ng/g), los alimentos son la mayor fuente de exposición a vanadio para la población en general Muchos cereales, pescado, fruta fresca y vegetales contienen de este elemento más de 40 mg por gramo de comida. Alimentos ricos en vanadio son champiñones, mariscos, perejil, pimienta negra, etc (Barceloux, 1999; Bishayee *et al*, 2010).

Las emisiones atmosféricas de vanadio por fuentes naturales han sido estimadas en 8.4 toneladas por año mundialmente. Las fuentes naturales en orden de importancia son: polvos continentales, volcanes, aerosoles marinos, incendios forestales y procesos biogénicos (IPCS, 2001).

2.2.4 Usos

Se emplea en la producción de acero y aleaciones no ferrosas, fabricación de semiconductores, reveladores fotográficos y agentes colorantes. La adición de compuestos de vanadio mejora la dureza, maleabilidad y resistencia del acero. Sus aleaciones son usadas en aviones, tecnología espacial y la industria de la energía atómica (Barceloux, 1999). Los óxidos de vanadio como el pentóxido, son usados para la producción de aleaciones de metales, la fabricación de baterías de litio y lámparas de alta presión y para la síntesis de químicos (Ehrlich *et al*, 2008); se utiliza como catalizador de procesos de oxidación en fase gaseosa, particularmente la conversión de dióxido de azufre a trióxido de azufre durante la fabricación de ácido sulfúrico; también es usado en algunos pigmentos y tintas usadas en la industria de la cerámica para dar un color que va del marrón al verde (Barceloux, 1999; Chandra *et al*, 2007; IPCS, 2001). En la industria agrícola se emplea en la elaboración de fungicidas e insecticidas y como micronutrientes en fertilizantes, además en la producción de caucho sintético. (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006). Además estudios que emplean técnica de fluorescencia de rayos-X, sugieren que el vanadio se acumula en mayor cantidad en tejido mamario canceroso, que en tejido normal, por lo tanto utilizando la radiación emitida por isótopo ^{48}V , se pueden generar imágenes que permitirán dar un diagnóstico temprano del cáncer de mama (Bishayee *et al*, 2010).

2.2.5 Vías de exposición

El Vanadio ingresa al organismo por inhalación, el tracto gastrointestinal y la piel y se acumula principalmente en el riñón, bazo, huesos, hígado (Barrio, 2006) y pulmón (Evangelou, 2002), aunque también se presenta en cerebro, páncreas, testículos y corazón (Bishayee *et al*, 2010). Para la población en general, los

alimentos representan la mayor fuente de exposición a vanadio, con un consumo de $<10 \mu\text{g}/\text{día}$ (Amorim et al, 2007), pero solo se absorbe del 0.5 al 2% de la cantidad ingerida (IPCS, 2001) así, es pobremente absorbido por el tracto gastrointestinal. La inhalación es la principal vía de absorción del cuerpo (Cooper, 2007). La piel probablemente es la ruta de menor absorción, debido a la baja solubilidad del vanadio metálico (Barceloux, 1999).

La exposición ocupacional a óxidos de vanadio se presenta en los centros de producción, durante el procesamiento y refinación de minerales de vanadio, durante la elaboración de productos que contienen vanadio, en el curso de la quema de combustibles ricos en vanadio y por la manipulación de catalizadores en la industria química (Ehrlich et al, 2008).

Debido a la concentración de vanadio a la que está expuesta la población, en particular las personas ocupacionalmente expuestas es importante mencionar como se lleva a cabo la absorción, distribución y excreción de este elemento.

2.2.6 Toxicocinética

Por vía inhalada, el vanadio es absorbido en partículas suspendidas $<2.5 \mu\text{m}$, y con este diámetro el vanadio fácilmente llega a los alvéolos y entra directamente a la circulación (Fortoul et al, 2007). Estas partículas pueden permanecer en pulmones si el cuerpo no provee un mecanismo para su eliminación (Fernández-Espinosa et al, 2002), por ejemplo, las partículas de 1 a 5 μm son depositadas en la región traqueobronquiolar del pulmón, que es la región intermedia, de aquí pueden ser eliminadas por el moco mediante un movimiento de los cilios hacia arriba, a las regiones donde se podrían eliminar por medio de estornudos o tos y pueden pasar al tracto gastrointestinal. Las partículas de 1 μm y mas pequeñas pueden ser eliminadas a través del sistema linfático o por medio de macrófagos alveolares (Peña et al, 2001)

Por vía oral, la mayoría del vanadio ingerido es transformado a la forma vanadilo catiónico en el estómago antes de ser absorbido en el duodeno a través de un mecanismo desconocido. Por otra parte, el vanadio en su forma de vanadato aniónico (H_2VO^4) es absorbido en cantidades mayores (cerca de cinco

veces más que la forma vanadilo) a través del sistema de transporte aniónico (Mukherjee *et al*, 2004).

El vanadio al llegar al torrente sanguíneo es reducido de vanadato (V^V) a vanadilo (V^{IV}) por glutatión de eritrocitos o por ácido ascórbico en plasma (Chandra *et al*, 2007; Evangelou, 2002). Aproximadamente 90% del vanadio en la sangre reside en el plasma (Barceloux, 1999). El V es rápidamente transportado por proteínas de la sangre a varios tejidos, el vanadato por la transferrina y el vanadilo por la albúmina y transferrina (Mukherjee *et al*, 2004). Las condiciones de pH neutro propician el dominio de V^V en plasma. Se tiene bien establecido que el V^V entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato. En el interior de la célula el V^V puede ser nuevamente reducido a V^{IV} por el glutatión y otros sustratos donde permanece unido (Rodríguez-Mercado *et al*, 2006).

Los efectos de la administración de vanadio persisten incluso después de que el vanadio ha sido retirado por varios días. El vanadio no absorbido es excretado en las heces. Cuando el vanadio es administrado por ruta parenteral, 10% del vanadio es encontrado en las heces de humanos y ratas. Se ha reportado que el vanadio es excretado a través de la bilis y de la orina (Mukherjee *et al*, 2004).

Estudios en animales indican que la eliminación de vanadio del cuerpo a través de la orina, es bifásica con una tasa rápida inicial de eliminación (10-20 horas) y una fase larga terminal (40-50 días) (Barceloux, 1999) (Figura 1).

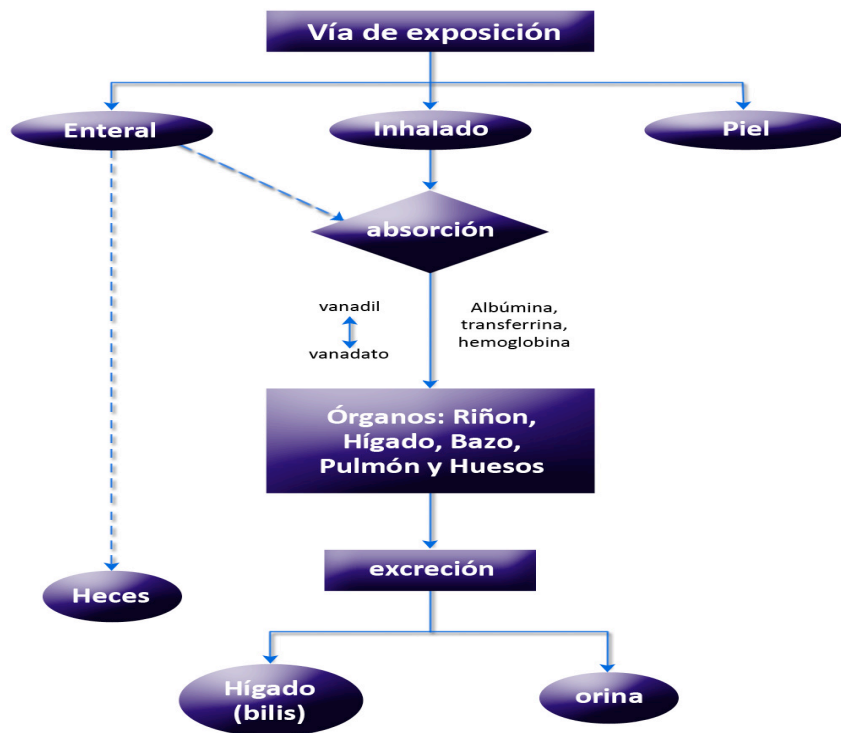


Figura 1. Toxicocinética del vanadio.

2.2.7 Toxicidad

En general la toxicidad del V aumenta conforme aumenta la valencia, siendo el vanadio pentavalente el más tóxico. Los óxidos de vanadio pueden llegar a ser mas tóxicos que las sales de vanadio (Evangelou et al, 2002). Aunque en condiciones naturales, los efectos tóxicos no se presentan con frecuencia, en altas dosis, o como consecuencia de exposición crónica, es un elemento relativamente tóxico para humanos (Baran, 2008).

2.2.7.1 Daños a la salud en humanos ocupacionalmente expuestos

El tracto respiratorio alto es el principal blanco en la exposición ocupacional. Los compuestos del vanadio, principalmente V_2O_5 , son fuertes irritantes de las vías respiratorias y ojos. La exposición aguda y crónica da lugar a conjuntivitis, rinitis, bronquitis, broncoespasmo (Baran, 2008) y enfermedades parecidas al

asma en casos más graves (Ingram *et al*, 2007). También produce fatiga, palpitaciones cardiacas, malestar gastrointestinal, daño hepático e incluso desordenes neurológicos. En humano, la toxicidad aguda ha sido observada en trabajadores de minas de vanadio y trabajadores de industrias, expuestos a altas dosis de vanadio, donde los síntomas clásicos son el síndrome de la “lengua verde”, junto con algunos ya mencionados (Baran, 2008).

De acuerdo a la International Agency for Research on Cancer (IARC, 2006), la exposición por inhalación de V_2O_5 en plantas de vanadio existe mundialmente y cientos de trabajadores pueden estar afectados. La Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de exposición ocupacional de 0.05 mg/m^3 de pentóxido de vanadio en el polvo respirable, para trabajadores que están expuestos a vanadio en el aire del lugar de trabajo en un día laboral de 8 horas, durante una semana de trabajo de 40 horas (Barceloux, 1999; ATSDR). Sin embargo mediciones realizadas de la concentración de vanadio en el aire, en fábricas de vanadio dieron valores en el rango de $0.02 - 5 \text{ mg/m}^3$ (IARC 2006).

2.2.7.2 Toxicidad celular

El vanadio posee un papel regulatorio en diferentes procesos fisiológicos tales como crecimiento celular, metabolismo de glucosa y lipídico (Chandra *et al*, 2007), estimula la diferenciación celular (IARC, 2006) influye en una serie de enzimas (fosfatasas, ATPasas, peroxidasas, ribonucleasas, proteína cinasas y oxido reductasas), regula la función de varios segundos mensajeros y modula una serie de genes. Presenta diversas propiedades farmacológicas: hipolipemiente, antihipertensiva, provoca disminución de peso corporal, tiene efectos diuréticos y mejora la afinidad por el oxígeno de la hemoglobina y mioglobina y presenta acción diurética (Bishayee *et al*, 2010), por otro lado, ha sido empleado como anticonceptivo vaginal (Chandra *et al*, 2007). Además, se cree que el vanadato (V^V) es capaz de imitar algunas de las acciones biológicas del fosfato (Assem & Levi, 2009).

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) sirven como importantes reguladores de vías de transducción de señales y son blancos sensibles de estrés oxidante. El

vanadio induce inactivación intracelular de PTPs, por una variedad de mecanismos bioquímicos (Evangelou et al, 2002). Esta inhibición media el arresto del ciclo celular inducido por complejos de V. Dicho arresto también se puede llevar a cabo a través de la activación de la superfamilia de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPKs) (Evangelou et al, 2002).

Otra consecuencia de la inhibición de las PTPs por el vanadio, es que provoca un desbalance en el sistema Proteína Tirosina Cinasa (PTKs)/PTPs, causando la activación de (Factor Nuclear kappa B) NF- κ B a través de la fosforilación de MAPKs (Jung et al, 2009).

Los efectos miméticos a la insulina de algunos compuestos de V que se estudian para tratar la diabetes humana, se pueden atribuir a su analogía con el fosfato y a la inhibición de PTPs (Barrio, 2006; Bortolini *et al*, 2005).

Los compuestos del vanadio provocan estrés celular vía la inhibición de PTPs (Ingram *et al*, 2002) y a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ehrlich *et al*, 2008). Se ha demostrado que los compuestos del vanadio estimulan la liberación de H₂O₂ en varios tipos de células pulmonares, incluyendo macrófagos alveolares, células epiteliales pulmonares humanas y fibroblastos de pulmón de humano. El estrés oxidante inducido por vanadio aumenta la fosforilación de MAPKs a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y estimula la activación de múltiples factores de crecimiento incluyendo p53, AP-1, NF- κ B y STAT-1, los cuales juegan un papel importante en la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y la inducción de mediadores proinflamatorios (Evangelou *et al*, 2002; Ingram *et al*, 2007).

Después de la administración intragástrica de sulfato de vanadilo, ortovanadato de sodio y sulfato de amonio, se observó daño al ADN, clastogenicidad y aneugenicidad en algunas células (Assem & Levy, 2009), así como aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones (Evangelou *et al*, 2002).

En un estudio realizado por Ehrlich y cols en 2008, donde los trabajadores estaban expuestos al polvo de V₂O₅ durante 8 horas diarias, a lo largo de 7 meses, observaron que el V₂O₅ causa oxidación de las bases del ADN en células

sanguíneas, sugiriendo que los trabajadores están en un mayor riesgo de cáncer y otras enfermedades, relacionadas a la inestabilidad del ADN.

2.2.7.3 Toxicidad sistémica

En la evaluación del riesgo de la exposición a V, hacen falta datos referentes al ser humano, por lo que se han utilizado modelos animales, encontrando por ejemplo, aumento de adenomas y carcinomas de pulmón en ratones después de la inhalación de V_2O_5 , así como hiperplasia en tejido pulmonar. Estos hallazgos llevaron a la reevaluación del óxido del metal y a su clasificación en el grupo 2B como posible carcinógeno para el ser humano (Ehrlich *et al*, 2008).

En el sistema inmune se ha encontrado que la inhalación de V reduce el índice fagocítico y la producción de interleucina (IL)-6 e interferón (IFN)- γ en macrófagos de pulmón de ratas (Cohen *et al*, 1997).

Un estudio realizado por Hogan, 2000, donde se administró una inyección de sulfato de vanadilo vía intraperitoneal, observó aumento del 26.8% en el número de leucocitos en la circulación comenzando un día después de la inyección y continuando hasta el día 7.

También han sido establecidos los efectos tóxicos en las funciones reproductivas y en el desarrollo de ratas y ratones, tales como impacto negativo en la tasa de concepción y desarrollo fetal, por compuestos de vanadio. La reducción en la fertilidad de ratones machos fue confirmada por una reducción en la motilidad de los espermatozoides *in vitro* (IARC, 2006).

En un estudio realizado administrando metavanadato de amonio a ratas en dosis de 0.4 y 0.6 mg/kg diariamente durante 26 días, así como un estudio *in vitro*, demostraron que el vanadio aumenta la peroxidación lipídica testicular, se presenta una marcada inhibición en el nivel de superóxido dismutasa así como de actividad de catalasa, disminución del conteo espermático y disminución del nivel de testosterona en suero. El examen histopatológico reveló inhibición de la espermatogénesis, pérdida de espermátidas maduras y aumento del porcentaje de espermatozoides anormales, sugiriendo que el aumento en la formación de

radicales libres y pérdida del sistema de defensa antioxidante durante la exposición a V, pueden hacer que los testículos sean más susceptibles al daño oxidante llegando a su inactivación funcional (Chandra *et al*, 2007).

En lo referente al hueso, se sabe que el vanadio se acumula en los huesos en grandes cantidades (10-26 µg/g), debido probablemente a su asociación con el fosfato, sustituyendo los aniones fosfato en la red de hidroxiapatita. Varios grupos de investigación han reportado previamente que derivados del vanadio se comportan como componentes miméticos de factores de crecimiento, por el parecido con factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), promoviendo así la formación y reparación de hueso. Estudios en fibroblastos han mostrado que los compuestos de vanadio estimulan la síntesis de DNA y colágeno, sugiriendo que son inductores y promotores de diferenciación osteoblástica (Barrio *et al*, 2006).

En nuestro grupo de investigación, usando un modelo de inhalación de V₂O₅ 0.02 M, dos veces por semana, en el cual se alcanza una concentración de 1.5 mg/m³ en la caja de inhalación, se han encontrado hallazgos como los siguientes:

Autor	Hallazgo
Mussali-Galante <i>et al</i> , <i>Toxicology and Industrial Health</i> , 2005; 21: 215-222.	Acumulación de V en testículos de ratones macho, provocando una disminución en el porcentaje de gama tubulina en las células testiculares analizadas (Sertoli, Leydig y germinales). Lo anterior puede provocar alteraciones en la espermatogénesis, llegando probablemente a infertilidad (Mussali <i>et al</i> , 2008).
Avila-Costa <i>et al</i> , <i>Neurotoxicology</i> , 2006; 27: 1007-1012.	Pérdida de espinas dendríticas de CA1 piramidal y necrosis celular en el hipocampo, asociada a alteraciones de la memoria espacial.
Fortoul <i>et al</i> , <i>Reproductive Toxicology</i> , 2007; 23: 588-592.	Necrosis de espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli, así como disrupción de uniones celulares, resaltando la importancia de la barrera hemato-testicular en la función de las células de Sertoli.
Colín-Barenque <i>et al</i> , <i>J Appl Toxicol</i> . 2008;28(6):718-23	Aumento en la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y 9 en diferentes estructuras del sistema nervioso central (SNC), asociado a pérdida de espinas dendríticas y muerte neuronal.
Piñón-Zarate <i>et al</i> , <i>Journal</i>	Cambios histológicos y daño funcional en el bazo, como son aumento del número de centros germinales (con

<p><i>of Immunotoxicology</i>, 2008; 5: 115-122.</p>	<p>presencia de mayor número de linfocitos); también se demostró el aumento en el nivel de anticuerpo HBSAb, pero con disminución de la afinidad de los anticuerpos a su antígeno, afectando así la respuesta inmune humoral del organismo.</p>
<p>González-Villalva et al, <i>Current Topics in Toxicology</i>. 2009; 6: 31-38.</p>	<p>Disminución de la concentración tanto de hemoglobina como de hematocrito, relacionándolo con acción hemolítica del vanadio, lo cual puede estar asociado con la generación de ROS y su acción oxidante en los lípidos de membrana, facilitando la fragilidad osmótica. Así mismo se observó leucocitosis, neutrofilia, linfocitosis, trombocitosis y megaplaquetas, sugiriendo que el V inhalado induce modificaciones en la sangre e inflamación sistémica crónica.</p>

Además en este mismo modelo de inhalación se han realizado estudios post-exposición encontrándose por ejemplo aumento en la frecuencia de micronúcleos presentes en los eritrocitos policromáticos de los ratones expuestos durante 30 días de exposición y manteniéndose dicho efecto después de 90 días después de finalizada la exposición (Rojas-Lemus, 2009). Por otro lado, en sistema nervioso de ratones expuestos a 4 semanas, se encontró disminución en la densidad de espinas dendríticas en giro dentado del hipocampo, pero en este sitio sí hubo recuperación a las 12 semanas después de finalizada la exposición (Vega-Bautista, 2010).

2.3 ANTECEDENTES

2.3.1 EFECTO DEL VANADIO EN LOS MEGACARIOCITOS

El primero en reportar aumento en el número de megacariocitos (Mks) en bazo, así como aumento de tamaño de bazo de ratones expuestos a vanadio fue, Cohen et al, 1984, quien inyectó a ratones hembra vía intraperitoneal, metavanadato de amonio (NH_4VO_3), durante 9 semanas. Así mismo Al-bayati *et al*, 1992, menciona aumento en el número de megacariocitos en bazo de ratones expuestos a Vanadio. No fue hasta que en nuestro grupo de trabajo, González Villalva *et al*, 2006, reporta que ratones machos CD1, los cuales inhalaban V_2O_5 durante doce semanas presentaron aumento en el número de plaquetas y la presencia de plaquetas gigantes, además de leucocitosis y anemia. Con estos antecedentes, en el mismo modelo, se analizó el bazo y la médula ósea de ratones expuestos a

vanadio y se encontró aumento en el número y tamaño de megacariocitos, con su pico máximo a las 8 semanas de exposición, los cuales se observaron más poliploides en ambos órganos (Fortoul *et al*, 2008). Además, se analizó la ultraestructura de los megacariocitos, observando aumento en el contenido de gránulos α y densos, así como de membranas de demarcación en los megacariocitos de ratones expuestos a V_2O_5 (Fortoul *et al*, 2009). Sin embargo es importante mencionar que no se ha realizado un estudio pos-exposición en Mks de órganos expuestos a vanadio.

La Trombopoyetina (TPO) y su receptor c-Mpl, son fundamentales en el desarrollo de los megacariocitos y la producción de plaquetas (Kaushansky, 2005) y en este modelo se ha encontrado disminución significativa en la concentración del receptor de trombopoyetina, c-Mpl, en megacariocitos de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 por inhalación, sin cambios significativos en las concentraciones de trombopoyetina (TPO) e IL-6 lo que sugiere una trombocitosis de tipo clonal, aunque no se descarta la posibilidad de que sea una trombocitosis de tipo reactivo por inflamación crónica (Díaz-Bech, 2007). Relacionado a la trombocitosis y megacariocitosis reportada anteriormente, se midió la presencia de TPO en bazo no encontrándose cambios significativos con respecto al control, sin embargo sí hay aumento de dicha hormona en hígado y pulmón, lo que nos indica que el vanadio podría estar estimulando la producción de TPO en órganos en los que no lo hace en condiciones normales, como es el caso del pulmón (Díaz-Fuentes, 2009).

2.3.2 MEGACARIOCITOS

Los megacariocitos (Mks) residen principalmente en la médula ósea donde constituyen el 1% de la población celular total (Beaulieu & Freedman, 2010), aunque en algunas especies como en el ratón, también se encuentran en el bazo, debido a que este órgano conserva su capacidad hematopoyética incluso en el adulto. Es una célula 10 veces más grande que el resto de células de médula ósea, mide hasta 150 μm de diámetro debido a que presenta un proceso llamado endomitosis, en el cual la célula duplica su material genético y tiene mitosis pero sin cariocinesis ni citocinesis, por lo que es de gran tamaño y con núcleo

poliploide, llega a tener hasta $64n$ de material genético, de hecho debe su nombre a esta característica (*mega* = grande; *karyo* = núcleo) (González Villalva *et al*, 2010) (Figura 2).

Los megacariocitos se forman a través de un proceso de diferenciación y maduración, el cual forma parte de la hematopoyesis, denominado “megacariopoyesis” (Beaulie & Freedman, 2010), en donde el megacariocito, como en el caso de todas las otras células de linajes hematopoyéticos, deriva de células troncales hematopoyéticas (CTH) (Bluteau *et al*, 2009), las cuales son capaces de auto-renovarse (al dividirse, por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos) (Mayani *et al*, 2007). La CTH da origen a una Progenitora Linfoide Común (PLC) y otra Progenitora Mieloide Común (PMC), siendo esta última, la que da origen a la Progenitora Eritroide-Megacariocítica (PEM), de la cual se diferencian eritrocitos y megacariocitos. (González Villalva *et al*, 2010).

El promegacarioblasto es el primer precursor megacariocítico reconocible. El megacarioblasto o estadio I del megacariocito, tiene un núcleo de forma arriñonada con dos grupos de cromosomas ($4N$); mide de 10 a 50 μm de diámetro, es basófilo debido a la gran cantidad de ribosomas, aunque el citoplasma en este estadio carece de gránulos. El promegacariocito, o estadio II del megacariocito es 20 a 80 μm de diámetro, su citoplasma es menos basófilo que el megacarioblasto y contiene gránulos en desarrollo (Italiano & Hartwig, 2007).

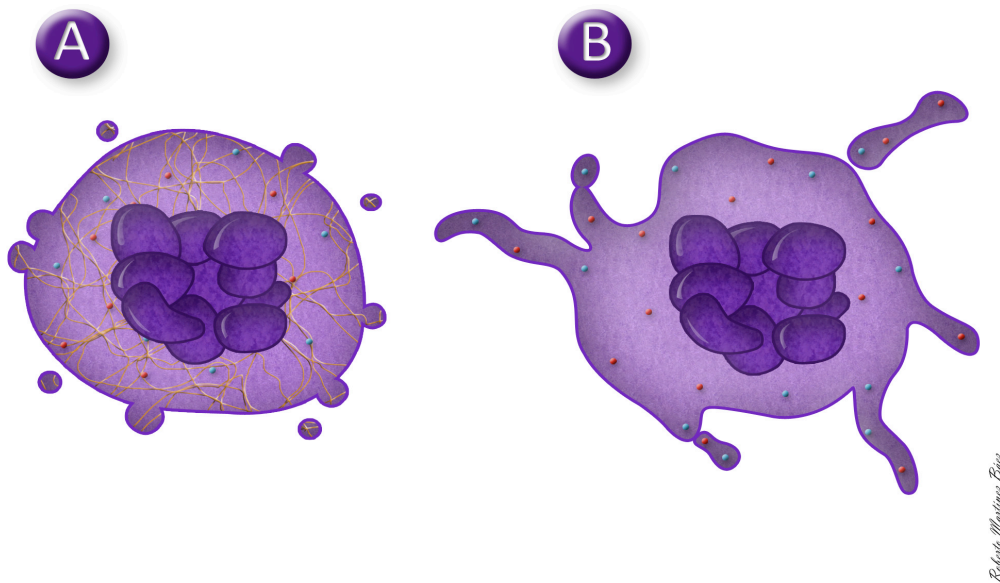


Figura 2. A) Megacariocito con núcleo poliploide, donde se puede observar su sistema de membranas de demarcación y sus gránulos alfa y densos. B) Megacariocito con proplaquetas, las cuales dan lugar a las plaquetas.

El megacariocito presenta endomitosis y llega a ser poliploide a través de repetidos ciclos de replicación de DNA sin división celular. Aunque el número de ciclos endomitóticos puede oscilar de 2 a 6, la mayoría de los megacariocitos presenta 3 ciclos para lograr un contenido de DNA de 16N (Italiano & Hartwig, 2007). Que el megacariocito sea poliploide, es una manera de aumentar el volumen de citoplasma del megacariocito de forma paralela a la ploidía, para así aumentar la producción de plaquetas. (Bluteau *et al*, 2009).

Después de que el proceso de endomitosis se completa, el megacariocito comienza un estadio de maduración en el cual, el citoplasma se llena con proteínas específicas (figura 3) de plaquetas, organelos y una de las más extraordinarias características de un megacariocito maduro, su sistema de membrana de demarcación (SMD) - una extensa red de canales de membranas compuesta de cisternas y túbulos. Se ha propuesto que el SMD deriva de la membrana plasmática del megacariocito en forma de invaginaciones tubulares (Italiano & Hartwig, 2007). Junto con el SMD, los microtúbulos y filamentos de actina son los principales actores en la formación de plaquetas (Bluteau *et al*, 2009).

Los megacariocitos contienen un sistema tubular denso, el cual se cree que es el sitio de síntesis de prostaglandinas en plaquetas y almacén de calcio.

La maduración de megacariocitos se caracteriza por la formación y aparición progresiva de una variedad de gránulos secretores (Italiano & Hartwig, 2007), que incluyen lisosomas, gránulos densos y gránulos α (Bluteau et al, 2009). Los más abundantes son los gránulos α , que contienen proteínas (que pueden ser sintetizadas o endocitadas) esenciales de adhesión plaquetaria durante la reparación vascular. Varias proteínas de membrana, críticas para la función plaquetaria son empaquetadas en gránulos α (Bluteau et al, 2009; Tachil, 2009; Martínez-Ezquerro & Herrera, 2006). Los gránulos densos (o cuerpos densos) tienen un tamaño aproximado de 250 nm, contienen sustancias de actividad hemostática, que son liberadas tras la activación plaquetaria, incluyendo serotonina, catecolaminas, ADP, ATP y calcio (Italiano & Hartwig, 2007) (Figura 3).

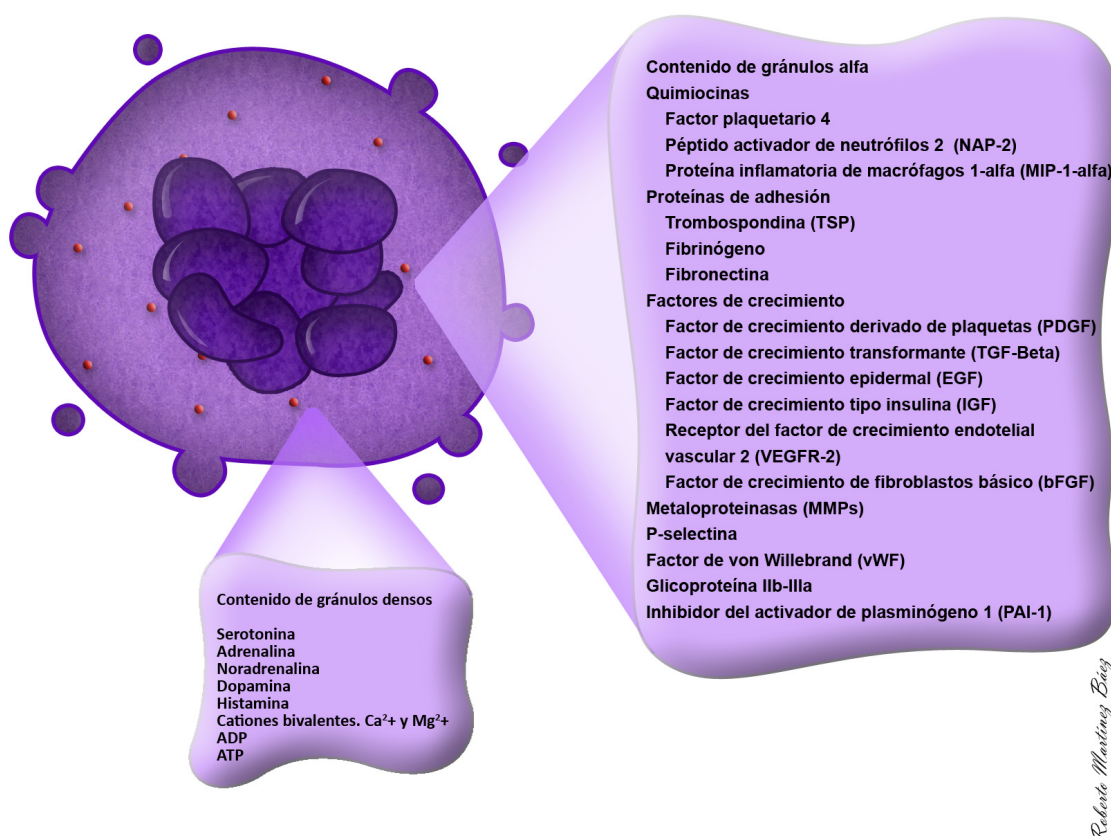


Figura 3. Contenido de gránulos alfa y densos de los megacariocitos.

Tras la estimulación de múltiples factores, incluyendo trombopoyetina, los megacariocitos se adhieren al endotelio de los sinusoides de médula ósea, y forman prolongaciones del citoplasma llamadas proplaquetas, las cuales maduran en plaquetas en un proceso denominado trombopoyesis (Beaulieu & Freedman, 2010). Antes de la formación de proplaquetas, el SMD se asocia con microtúbulos y filamentos de actina. La polimerización de moléculas de tubulina es necesaria al inicio, y más adelante, el deslizamiento de microtúbulos sobrelapados actúa como un motor primario para la elongación de las proplaquetas. (Bluteau et al, 2010). (Italiano et al, 2007). Los microtúbulos también sirven para el transporte de las mitocondrias, gránulos y otros organelos vesiculares de las plaquetas, además de transportar spliceosomas que podrían ser importantes por permitir la síntesis de proteínas en las plaquetas. La fragmentación de las proplaquetas ocurre exclusivamente dentro de los sinusoides, en la circulación sanguínea, de otro modo las plaquetas permanecerían atrapadas en la médula (Bluteau et al, 2010).

El principal regulador de la producción de plaquetas es la trombopoyetina (TPO), una glicoproteína producida en el hígado, riñón y médula ósea. (Kaushansky, 2005).

2.3.2.1 Plaquetas

Las plaquetas son pequeños elementos sanguíneos anucleados (1-3 μm) cuyo progenitor es el megacariocito. El conteo de plaquetas en humano generalmente está entre 100,000-400,000/ μL , haciendo a las plaquetas la segunda célula más abundante (Ombrello *et al*, 2010) de la sangre, con una membrana celular que se invagina formando los llamados sistemas canicular abierto y el tubular denso. El primero constituye una serie de canales abiertos hacia el exterior que facilitan el proceso de secreción y permiten el acceso de sustancias hacia el interior de la plaqueta. El sistema tubular denso se forma de componentes del retículo endoplásmico del Mk y constituye el sitio principal de almacenamiento de Ca^{2+} . Inmediatamente, por debajo y alrededor de toda la membrana plasmática se presenta un haz microtubular y una red de

microfilamentos con propiedades contráctiles que constituyen el citoesqueleto de la plaqueta. En el citoplasma plaquetario se encuentran mitocondrias, peroxisomas, lisosomas, partículas de glucógeno y diferentes tipos de numerosos gránulos (Guzmán Grenfell, 2005).

Contienen tres tipos de compartimentos de almacenamiento – gránulos α , gránulos densos y lisosomas – cuyos contenidos son liberados a la circulación o translocados a la superficie de la plaqueta tras la activación plaquetaria (Smyth et al, 2009) donde cambian de forma, secretan sus gránulos intracelulares y se agregan unas con otras (Reed *et al*, 2000); es importante señalar que estos gránulos son los mismos que se encuentran presentes en los megacariocitos. Desde los años ochenta se sabe que las plaquetas sintetizan proteínas constitutivas a partir de mRNA estable (Guzmán Grenfell, 2005). Las plaquetas tienen varios mecanismos extranucleares únicos para la traducción de mRNA en proteínas de una forma dependiente de señal (Smyth et al, 2009).

Juegan un papel importante en diversos procesos como son la hemostasia, trombosis, promoviendo respuestas inflamatorias e inmunes, mantenimiento de la integridad vascular y contribuyen a la curación de heridas (Smyth et al, 2009).

Las plaquetas pueden reclutar leucocitos y células progenitoras a sitios de lesión vascular y trombosis; almacenan, producen y liberan factores proinflamatorios, anti-inflamatorios y angiogénicos a la circulación, además estimulan la generación de trombina; en modelos experimentales, se ha mostrado que estas funciones contribuyen a patologías como son aterosclerosis, sepsis, hepatitis, reestenosis vascular (Smyth et al, 2009), aterogénesis (Blair et al, 2009) y metástasis (Gupta, 2004).

2.3.3 MEGACARIOCITOSIS Y SU RELACIÓN CON FIBROSIS

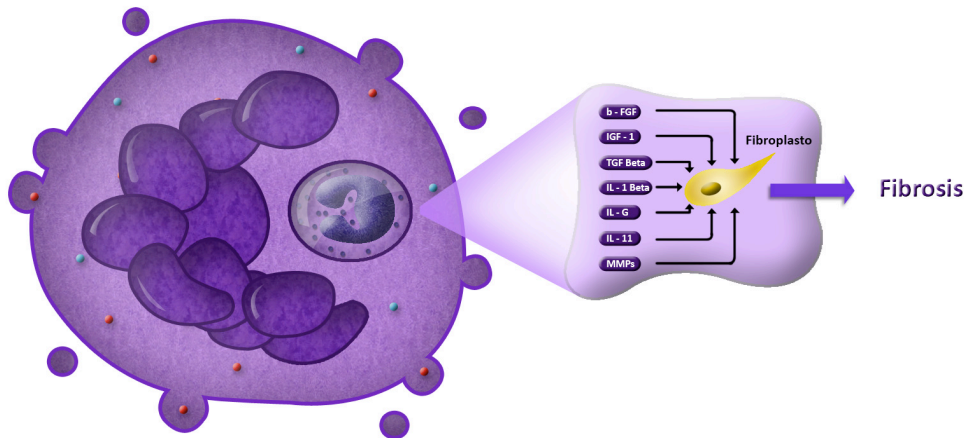
Se ha postulado la relación que existe entre el aumento en el número de plaquetas (trombocitosis), así como de sus progenitores, los megacariocitos (megacariocitosis) con la fibrosis, ya que se ha demostrado que al activarse las plaquetas o bien al presentar los Mks el fenómeno de emperipolesis, el cual consiste en internalizar otras células (principalmente neutrófilos), se da la

liberación de gránulos y su contenido, que entre otras cosas, contienen factores profibrogénicos, los cuales, en condiciones normales favorecen la cicatrización de heridas, pero en circunstancias patológicas provocan fibrosis en los sitios donde están presentes tanto las plaquetas como los Mks.

La relación megacariocitosis y fibrosis se ha asociado con dos patologías principalmente, una de ellas es la mielofibrosis (MF) idiopática, también conocida como MF primaria o metaplasia mieloide agnogénica; es un desorden mieloproliferativo caracterizado por fibrosis de médula ósea, hematopoyesis extramedular, esplenomegalia y un elevado número de precursores hematopoyéticos en sangre periférica (Ciurea et al, 2007), aquí, la fibrosis de médula ósea, se cree que representa una reacción hacia la proliferación clonal de células hematopoyéticas. Además, la progresiva acumulación de algunos linajes, especialmente megacariocitos, ha sido reconocido durante mucho tiempo en MF idiopática y en otros síndromes de hiperproliferación megacariocítica en humanos y ratones y frecuentemente asociados con fibrosis secundaria (Shivdasani, 2002). La segunda patología es la fibrosis pulmonar, ya que la presencia de Mks en pulmón ha sido evidenciada por muchos años, con la primera descripción reportada por Aschoff en 1893, sugiriendo que los Mks se originan en médula ósea, migran por el torrente sanguíneo y se quedan en el lecho capilar del pulmón, donde liberan plaquetas (Tachil, 2008; Yamauchi, 1996). Sin embargo la evidencia había sido de forma indirecta, hasta que Zucker-Franklin & Philipp, 2000 administrando TPO y realizando análisis estructural a muestras de pulmón de ratones, demostraron la presencia de Mks en pulmón así como la liberación de plaquetas en el mismo.

Debido a que los Mks y plaquetas son considerados las principales fuentes de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento transformante (TGF- β) y que poblaciones anormales de Mks han sido observadas en médula ósea de pacientes con mielofibrosis, con deposición en exceso de proteínas de matriz extracelular y colágeno, una anormal liberación de factores de crecimiento tales como TGF- β y PDGF pueden ser responsables del desarrollo de fibrosis medular (Schmitt et al, 2000), por otra parte en la MF, la fibrosis generalmente comienza a desarrollarse en la cercanía a grupos de Mks en proliferación atípica (Bock et al, 2002). Además de TGF- β y PDGF, también se existen otros factores relacionados como: factor de crecimiento de fibroblastos

básico (bFGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que han sido implicados en la generación de fibrosis de médula ósea (Ciurea et al, 2007). Al mismo tiempo, el aumento de Mks presentes en los pulmones, se puede considerar que contribuyen a fibrosis pulmonar en esclerosis sistémica, de una forma similar, a la observada en la mielofibrosis idiopática (Thachil, 2008) (Figura 4).



Robert Martinez Berg

Figura 4. Megacariocitos presentando emperipolesis, lo cual da lugar a la liberación de gránulos α y densos y su contenido, encontrándose entre otros, factores profibróticos. En condiciones patológicas dicha liberación provoca fibrosis, en lugares donde se encuentran presentes los Mks, como puede ser médula ósea, bazo y pulmón.

En un estudio llevado a cabo utilizando muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con Síndrome mielodisplásico con mielofibrosis (SMD-MF (+)) y pacientes con Síndrome mielodisplásico sin mielofibrosis (SMD-MF (-)), se observó mayor número de megacariocitos y de TGF- β en pacientes con SMD-MF (+), por lo que se postula una correlación entre la concentración de TGF- β y el grado de mielofibrosis (Akiyama *et al*, 2005).

En un modelo experimental de ratones con MF se demostró aumento de Mks y plaquetas en comparación de los ratones sin MF, relacionándose así dicho

aumento de Mks, plaquetas y liberación de gránulos α , con la activación de fibroblastos en exceso, que llevan a MF (Schmitt *et al*, 2000).

En otro estudio, utilizando cultivos de células CD34+ de sangre periférica de pacientes con IMF y voluntarios sanos y cultivando dichas células en presencia de factor de células madre (SCF) y TPO, se observó que las células de pacientes IMF generaron una cantidad 24 veces mayor de Mks que las células CD34+ control, además de un patrón de retraso de apoptosis y sobreexpresión de proteína antiapoptóticas bcl-xL. Así mismo los Mks de pacientes con IMF producen más TGF- β que los de donadores voluntarios (Ciurea *et al*, 2007).

Vannucchi *et al* 2005, demostró que la administración de TPO exógena produce megacariocitosis con mielofibrosis transitoria, asociada a un aumento de TGF- β , utilizando ratones a los que se les administró TPO, vía intraperitoneal por 5 días consecutivos (100 μ g TPO/kg de peso corporal) Además, en otro estudio se les inyectó a ratas (n=72) durante 5 días seguidos, 0.1 mg/kg de TPO, llamado también factor de desarrollo y crecimiento de megacariocito humano recombinante pegilado (PEG-rHuMGDF), lo cual aumentó los niveles de TGF- β 1 y PDGF en la médula ósea y el número de Mks, seguido de mielofibrosis y formación de hueso (Ide *et al*, 2002).

Como se ha descrito, varias son las proteínas producidas por los Mks en relación con la fibrosis, por lo que mencionaré las proteínas profibrogénicas más relevantes (TGF- β y VEGFR-2) y algunas con capacidad antifibrogénica (MMP-2 y MMP-9) que fueron elegidas para esta investigación.

2.3.4 Factores profibrogénicos

2.3.4.1 Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El TGF- β es una superfamilia de proteínas integrada por más de 35 citocinas dimericas que comprenden a las activinas, proteína morfogenética de hueso (BMP), factores de diferenciación y de crecimiento (GDFs), hormona anti-mulleriana y al factor de crecimiento transformante beta propiamente dicho, que regulan una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación,

migración y apoptosis en diferentes tipos celulares (Gálvez *et al*, 2004; Liur *et al*, 2010; Perera *et al*, 2010; Meulmeester *et al*, 2010).

En mamíferos se han descrito tres formas del TGF- β (-TGF- β_1 , - TGF- β_2 y - TGF- β_3) las cuales residen en diferentes cromosomas (19q13, 1q41 y 14q24 en humanos, respectivamente), pero poseen 80% de homología en secuencia de aminoácidos (Gálvez *et al*, 2004; Perera *et al*, 2010). Sin embargo ratones knockout para cada una de las isoformas del TGF- β muestran distintos fenotipos, lo que sugiere que cada isoforma tiene funciones específicas y que no se superponen *in vivo*. Las tres isoformas son expresadas por muchos tipos de células diferentes y cada célula en el cuerpo expresa receptores para TGF- β y es capaz de responder a él (Worthington *et al*, 2011).

El TGF- β es secretado en forma latente (anclado a superficie celular o a la matriz extracelular). Su activación es dada por varios factores, incluyendo pH extremo, altas temperaturas, proteólisis limitada o desglucosilación del péptido asociado a la latencia (LAP). También existe un mecanismo particular de activación, iniciado por la unión del complejo latente del TGF- β_1 a glicoproteína de matriz extracelular llamada trombospondina 1 (TSP-1) y evidencia reciente muestra un papel crucial de miembros de la familia de receptores de integrinas en controlar la activación de TGF- β (Perera *et al*, 2010; Worthington *et al*, 2011).

Se han descrito 3 tipos de receptores para que el TGF- β lleve a cabo su señalización (TGF- β RI, TGF- β RRII y TGF- β RRIII) (Gálvez *et al*, 2004). En cuanto a su señalización, en el espacio extracelular, el TGF- β se une al T β RRIII, el cual recluta al T β RRII y se autofosforila, o el TGF- β se une directamente al T β RRII anclado a membrana e induce la atracción del T β RI y su consecuente fosforilación. Esta fosforilación en el receptor tipo I activa a las cinasas en residuos de tirosina que fosforilan a los factores de transcripción Smad 2 y Smad 3; una vez fosforilados, forman un complejo con Smad 4 para trasladarse del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de una manera específica con otros factores de transcripción como, AP-1, regulando la transcripción de genes de respuesta al TGF- β para llevar a cabo sus funciones biológicas de diferenciación, control del crecimiento, apoptosis y síntesis de matriz extracelular, migración sobrevivencia y proliferación entre otras (Ciurea *et al*, ; Liu *et al*, 2010). También actúa como un quimioatrayente para fibroblastos,

monocitos y neutrófilos e inhibe la activación del sistema inmune por presentación antigénica o de interleucinas (IL).

Es considerado como una citocina multifuncional (pleiotrópica) debido a los efectos que tiene sobre los diferentes tipos celulares. Es el inhibidor más potente de proliferación en células mieloides, mesenquimales, epiteliales, linfoides, endoteliales y varios tipos de células malignas (Gálvez *et al*, 2004; Vilchis *et al*, 2003). Es un fuerte estimulador de la síntesis y depósito de proteínas de matriz extracelular por parte de fibroblastos, osteoblastos y células endoteliales; además, induce la expresión de integrinas y receptores que median las interacciones celulares con proteínas de matriz extracelular.

El TGF- β también juega un importante papel en la metástasis, ya que induce la expresión, tanto de matriz extracelular como de proteínas de adhesión celular, así como también decrece la producción de enzimas que degradan la matriz, o incrementa los inhibidores de dichas proteínas (Gálvez *et al*, 2004). Tiene un papel dual en la progresión del cáncer, ya que aunque es un potente supresor de tumores en estadios tempranos de cáncer y ha sido reportado que mejora el crecimiento del tumor y metástasis en estadios avanzados de cáncer. Además, el TGF- β también induce la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la motilidad celular (Ciurea *et al*, 2007; Perera *et al*, 2010).

Es un factor quimiotáctico y activador de macrófagos y fibroblastos. Estas actividades son benéficas y de duración limitada dentro del contexto de reparación de heridas. Sin embargo en algunas ocasiones existe un incremento incontrolado en la producción y/o activación del TGF- β , lo que lleva a la producción excesiva de tejido conectivo, como ya ha sido mencionado anteriormente. Este fenómeno, ha sido llamado “ el lado oscuro del TGF- β ” se presenta en una variedad de enfermedades como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar idiopática, mielofibrosis, escleroderma, glomerulonefritis, ciertas formas de artritis reumatoide y esquistosomiasis (Vilchis *et al*, 2003).

2.3.4.2 Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2 (VEGFR-2)

En 1989 Ferrera y Henzel describieron el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (García *et al*, 2009). Es el principal regulador clave de la angiogénesis, vasculogénesis y la hematopoyesis en el desarrollo, además de ser importante en la cicatrización de heridas y en mantener la homeostasis en organismos adultos. La familia de VEGF consiste de VEGF (VEGF-1), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y factor de crecimiento placentario (PIGF) (Cébe-Suarez *et al*, 2006; Roskoski *et al*, 2008; Takahashi *et al*, 2005).

Es una citocina multifuncional que ejerce la mayoría de sus funciones en células hematopoyéticas y células endoteliales (Cébe-Suarez *et al*, 2006) ya que actúa como factor de supervivencia y como inhibidor de apoptosis, es un potente mitógeno, induce migración y cambia la expresión génica dando lugar al aumento de expresión de diferentes proteínas como las metaloproteinasas, proteínas implicadas en la actividad fibrinolítica, o la sintasa endotelial del NO. (García-Manero *et al*, 2009).

Hasta el momento se han identificado receptores diferentes a los que se pueden unir los miembros de la familia VEGF. Tres de ellos, VEGFR₁ (Flt-1), VEGFR₂ (KDR/Flk-1), VEGFR₃ (Flt-4) son receptores tirosina cinasa (RTK) y dos co-receptores, neuropilina-1 y neuropilina-2 son proteínas transmembrana sin actividad tirosina quinasa. La mayoría de las acciones biológica del VEGFR tiene lugar tras la unión a VEGFR₂, el cual es el receptor que se encuentra presente en los megacariocitos (Cébe-Suarez *et al*, 2006; García-Manero *et al*, 2009; Roskoski , 2008; Takahashi *et al*, 2005).

VEGFR-2 fue el segundo receptor del VEGF en ser identificado. Es una proteína de 230 KDa de la cual se conocen dos variantes funcionales, producto del procesamiento del RNAm. Este receptor de une a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y -D (Martínez-Ezquerro & Herrera, 2006).

Participa de manera crucial en la angiogénesis en el desarrollo y la hematopoyesis, siendo el mayor mediador de los efectos mitogénicos, angiogénicos y de aumento de la permeabilidad del VEGF. El VEGFR-2 se encuentra expresado principalmente en las células endoteliales, además de células madre hematopoyéticas, megacariocitos y células progenitoras retinales (Martínez-Ezquerro & Herrera, 2006). La unión de factores de crecimiento a su receptor, lleva a la dimerización de este, a la activación de proteína tirosina

cinasa, trans-autofosforilación e iniciación de la vía de señalización (Cébe-Suarez et al, 2006; Roskoski et al, 2008). Su activación por fosforilación vía el VEGF, resulta en la activación de las MAPKs por la fosforilación de las tirosinas de la vía del PI₃K-PLC- γ -PKC. La activación de este receptor es suficiente para la activación de transductores de señales involucrados en la mitogénesis y migración celular, así como en la maquinaria angiogénica y la permeabilidad y dilatación vascular (Cébe-Suarez et al, 2006; Martínez-Ezquerro & Herrera, 2006).

2.3.5 Factores antifibrogénicos

2.3.5.1 Metaloproteinasas de matriz (MMPs)

La familia de las metaloproteinasas (MMPs) comprende más de 20 proteasas, endopeptidasas dependientes de zinc, que degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC) por lo que juegan un papel central en la remodelación y degradación de tejidos (Bárcenas *et al*, 2004; Bock *et al*, 2006; Colín-Barenque *et al*, 2008; Jezierska & Motyl, 2009; Libra *et al*, 2009).

Teniendo en cuenta el dominio de la estructura y la afinidad al sustrato, se dividió en cuatro grupos mayores: colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13) rompen la región triple helicoidal de las colágenas intersticiales; estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11 y MMP-20) digieren la parte proteica de los proteoglicanos, a la fibronectina y la laminina; gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) tienen una afinidad por la membrana basal (colágeno tipo IV), colágeno desnaturalizado (gelatina), elastina y fibronectina por último las metaloproteinasas tipo membrana (MT₁, MT₂, MT₃ y MT₄-MMPS) que se caracterizan por la presencia de un dominio transmembranal que es una extensión terminal rica en residuos hidrofóbicos (Bárcenas *et al*, 2004; Malla et al, 2008; Pardo & Selman, 2003).

Esta familia de endopeptidasas comparte un conjunto de dominios, entre los que se encuentran:

1. Un dominio propeptídico responsable de la falta de actividad de las proenzimas. En este dominio existe un residuo de cisteína que forma un

-
- enlace coordinado con el Zn^{2+} , presente en el dominio catalítico y enmascara de esta manera el sitio activo de las proenzimas o zimógenos.
2. El dominio catalítico esencial para la actividad enzimática y que contiene el sitio de unión a Zn^{2+} y a Ca^{2+} .
 3. Una secuencia rica en prolina que funciona como bisagra.
 4. Un sitio carboxilo-terminal con un dominio tipo hemopexina (Jeziarska & Motyl 2009; Pardo & Selman, 2003).

Son sintetizadas como formas de proenzima latentes inactivas, que requieren ser activadas para que la proteólisis ocurra (Ciurea *et al*, 2007; Libra *et al*, 2009). La actividad de MMPs es regulada en diferentes niveles, incluyendo control en la transcripción, activación extracelular de proenzimas, inhibición de enzimas activas, así como por los inhibidores de metaloproteinasas α 2-macroglobulinas y los inhibidores de tejido de metaloproteinasas (TIMP), las cuales bloquean la actividad proteolítica de MMPs (Bárcenas *et al*, 2004; Chakarabarti & Patel, 2005). Las MMPs son inducidas por factores de crecimiento, citocinas inflamatorias, interacciones célula-matriz e interacciones célula-célula. Las MMPs son inhibidas por TGF- β , ácido retinoico y glucocorticoides (Bárcenas *et al*, 2004).

Las MMPs han sido implicadas en la promoción de la angiogénesis tumoral y la metástasis, además de que juegan un importante papel en la degradación de colágeno y movilización de CTH/CPH e incluso participan en la migración de los megacariocitos, que van del nicho osteoblástico al nicho vascular de la médula ósea para llegar a los capilares y liberar directamente las plaquetas en la circulación. Además, las MMPs están implicadas en la regulación de moléculas como son, factores de crecimiento y sus receptores, citocinas y quimiocinas, proteoglicanos de la superficie celular y una variedad de enzimas (Ciurea *et al*, 2007; Libra *et al*, 2009). Existen numerosas evidencias de que algunas MMPs participan en la remodelación aberrante de la matriz extracelular en la fibrosis pulmonar. Las MMPs desempeñan un papel esencial y complejo en varios procesos interrelacionados que suceden en la patogénesis de la fibrosis pulmonar idiopática, incluyendo la remodelación de la MEC, la ruptura de las membranas basales, la apoptosis, la migración celular y la angiogénesis (Pardo, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El vanadio es un contaminante ambiental el cual es capaz de generar alteraciones en las células del sistema hematológico, entre ellas los megacariocitos y plaquetas.

Se ha reportado que la exposición a vanadio causa aumento en el número de megacariocitos (megacariocitosis) en bazo y médula ósea. Los megacariocitos secretan diferentes factores profibrogénicos y antifibrogénicos y esto aunado a la megacariocitosis, se asocia, en otros modelos y en algunas enfermedades, a fibrosis en médula ósea y pulmón. Por otro lado, el aumento de TPO a nivel experimental resulta en aumento de megacariocitos y fibrosis transitoria en médula ósea.

Por lo tanto, dado que en este modelo experimental existe megacariocitosis y aumento de TPO, se evaluará la alteración en la presencia de estos factores pro y antifibrogénicos en megacariocitos de bazo de ratones expuestos a vanadio inhalado y la posible presencia de fibrosis. Así mismo, debido a la falta de estudios post-exposición para Mks de ratones expuestos a V y para comparar este resultado con el encontrado en otras células, se analizará el efecto al finalizar la exposición.

4. HIPOTESIS

Si el vanadio ocasiona aumento en el número de megacariocitos y plaquetas en bazo y médula ósea, y dicho aumento se ha relacionado con fibrosis al exponer a ratones machos a la inhalación crónica de V_2O_5 , habrá variación en la presencia de proteínas profibrogénicas y antifibrogénicas en los megacariocitos del bazo, y posible fibrosis en este órgano.

5. OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GENERAL:

Analizar la alteración en la presencia de proteínas (TGF- β , VEGFR-2, MMP-2 y MMP-9) producidas por los megacariocitos de bazo de ratones expuestos a V₂O₅ y la posible fibrosis en este órgano, durante tres meses de exposición y un mes posterior sin exposición.

5.2 Objetivos específicos:

- Identificar la presencia de TGF- β , MMP-2, MMP-9 y VEGFR-2 en megacariocitos de bazo, de ratones expuestos a V₂O₅ utilizando la técnica de inmunohistoquímica
- Observar la presencia de emperipolesis en los megacariocitos de los bazos estudiados.
- Analizar los posibles cambios fibrogénicos en bazo de los ratones expuestos a V₂O₅, utilizando tinción de Masson.

6. MÉTODO

Se utilizaron 28 ratones machos de la cepa CD1, de aproximadamente 35 gramos de peso y 1 mes de vida, los cuales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, así como en condiciones de luz-oscuridad 12:12. Se formaron 2 grupos, en el primero 8 ratones fueron el grupo control, el cual fue expuesto a la inhalación del vehículo (solución fisiológica) y el segundo grupo 20 ratones fueron el grupo expuesto a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02 M.

Cada grupo se colocó en una caja de acrílico transparente y cerrada, conectada a un ultranebulizador UltraNeb®99 con flujo de 10 L/min que contenía el compuesto indicado para cada grupo, durante 1 hora dos veces por semana, hasta completar 3 meses .

Para la obtención del bazo, cada mes en el transcurso de la exposición (3 meses) y un mes después de la exposición, se sacrificaron 5 ratones del grupo expuesto y 2 del grupo control, aplicándoles una dosis de pentobarbital sódico dosis letal. A continuación se extrajo el bazo y se introdujo en solución de formaldehído amortiguado al 4%, para posteriormente ser procesado por la técnica histológica ordinaria.

Una vez realizados los cortes, se realizó inmunohistoquímica para TGF- β , VEGFR-2, MMP-2 y MMP-9, siguiendo el protocolo estandarizado (Figura 5).

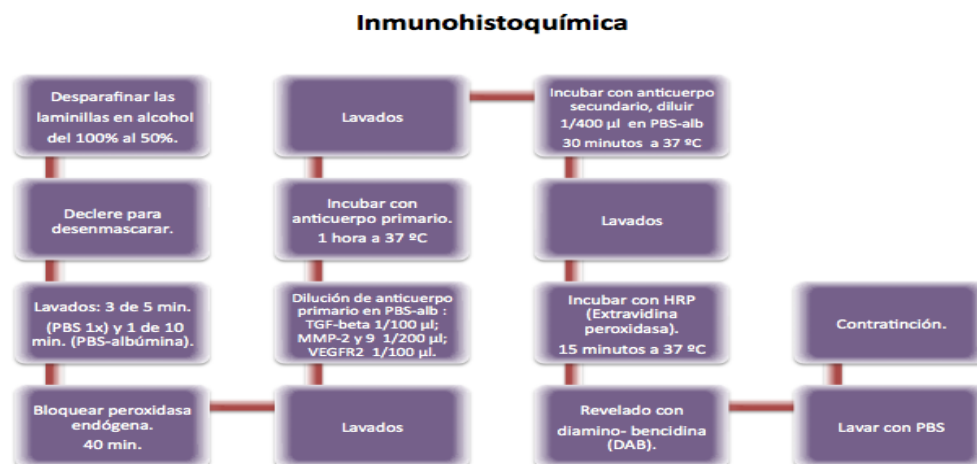


Figura 5. Pasos de la técnica de inmunohistoquímica.

Por otra parte, otros cortes se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson, para posteriormente observarse al microscopio de luz los cambios en el grosor de la cápsula del bazo y de las fibras de colágena del estroma.

Para el análisis estadístico se contó el total de megacariocitos marcados, independientemente de la intensidad de la marca, en grupos de 50, contando 2 grupos de megacariocitos por individuo en cada mes de inhalación por cada proteína marcada. Utilizando el programa estadístico Sigma Plot versión 10.0 se realizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba post hoc, Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados en cada tiempo de exposición, con respecto a los grupos control (Figura 6).

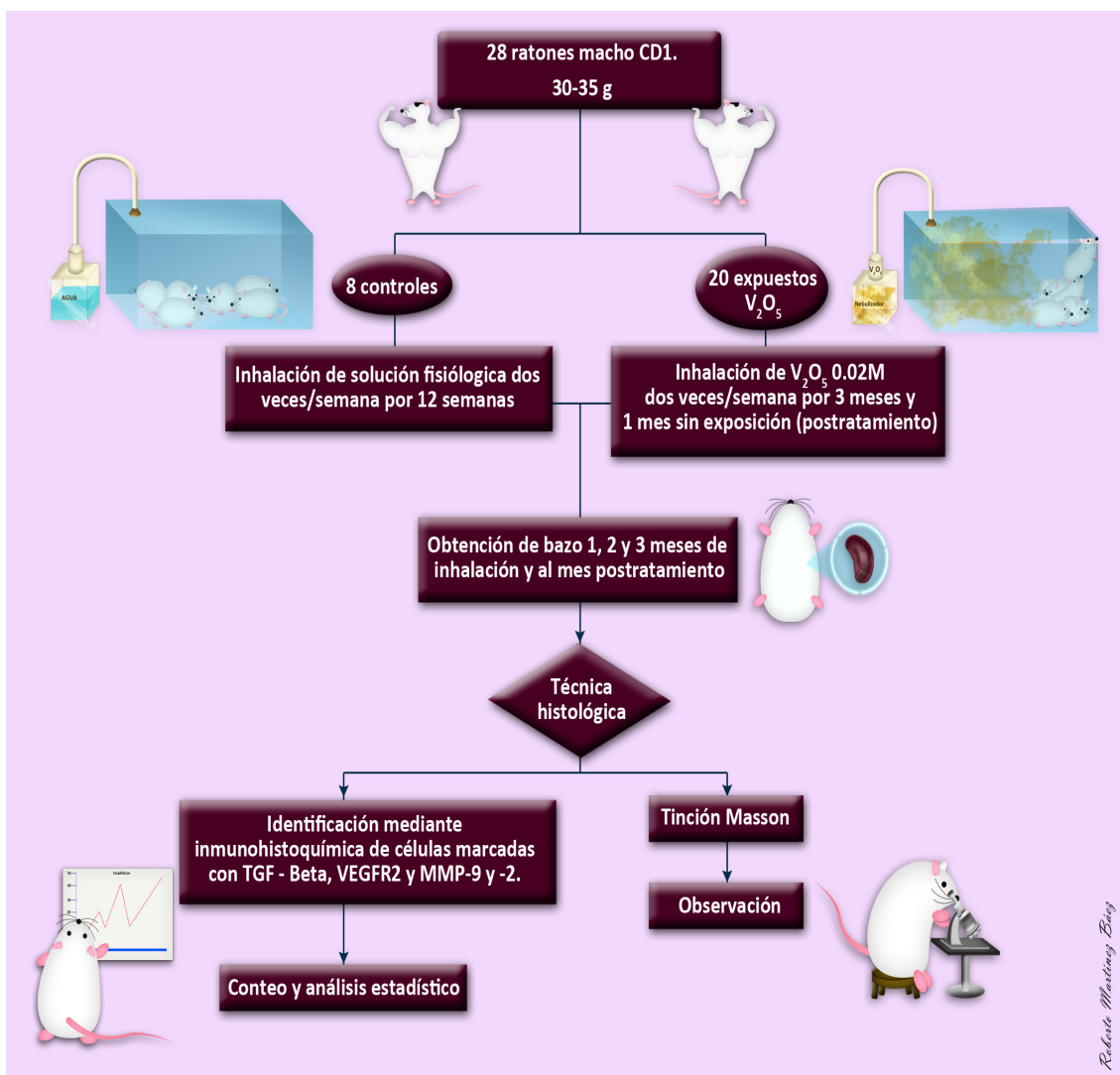


Figura 6. Método

7. RESULTADOS

Se encontraron alteraciones en la cantidad de megacariocitos marcados en bazo de grupo expuesto a V_2O_5 para las proteínas TGF- β , VEGFR-2, MMP-9 y MMP-2 con respecto a megacariocitos de bazo de individuos control.

a) Proteínas profibrogénicas

Para TGF- β no se observó aumento de megacariocitos marcados al mes 1, sin embargo para el mes 2 y el mes 3, el número de megacariocitos marcados aumentó de manera significativa y al mes post-exposición disminuyó al nivel del grupo control (figura 7 y 9.A).

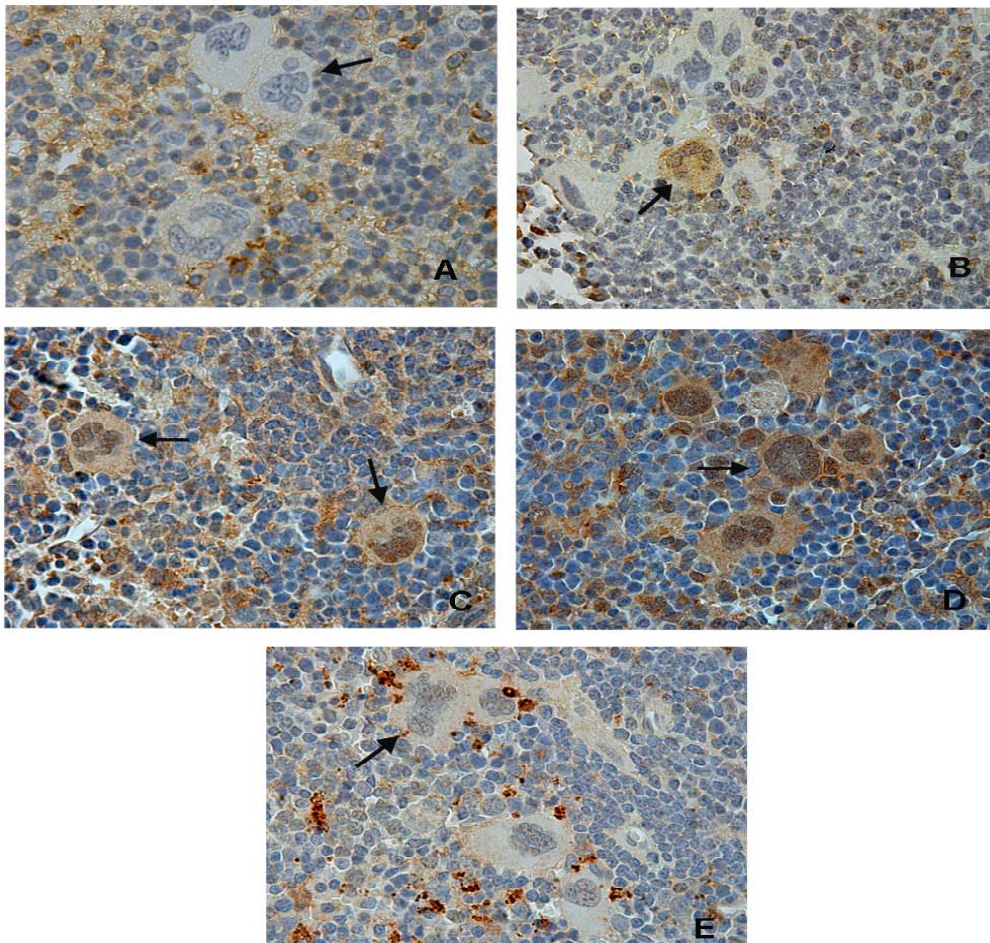


Figura 7. Inmunohistoquímica que indica número de megacariocitos marcados (TGF- β) de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 , marcados a diferentes tiempos de inhalación. 1000x. A) control, B, C y D) grupos expuestos a vanadio, 1, 2 y 3 meses respectivamente, E) 1 mes post-exposición. Se observa aumento en el número de Mks marcados al mes 2 y 3 de exposición con respecto al control.

Con respecto al VEGFR-2 la mayoría de los megacariocitos de individuos controles y los de individuos a un mes de exposición, se observaron sin marca, en cambio al mes 2 y al mes 3 se observó un aumento significativo en el número de megacariocitos marcados y al mes post-exposición disminuyó dicho número. Es importante señalar que no se midió la intensidad de la marca, la cual se ve aumentada al mes 2 y 3 con respecto al control (figura 8 y 9.B).

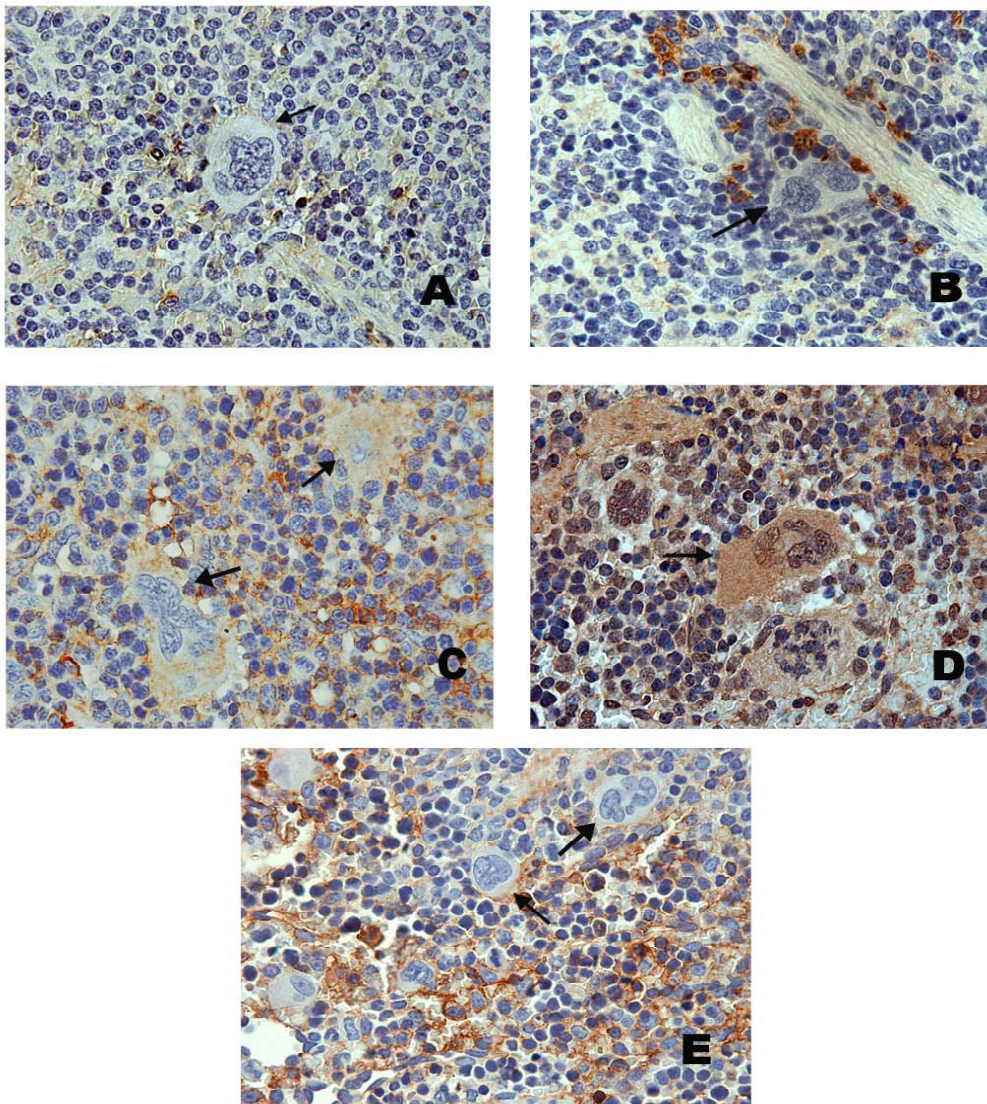
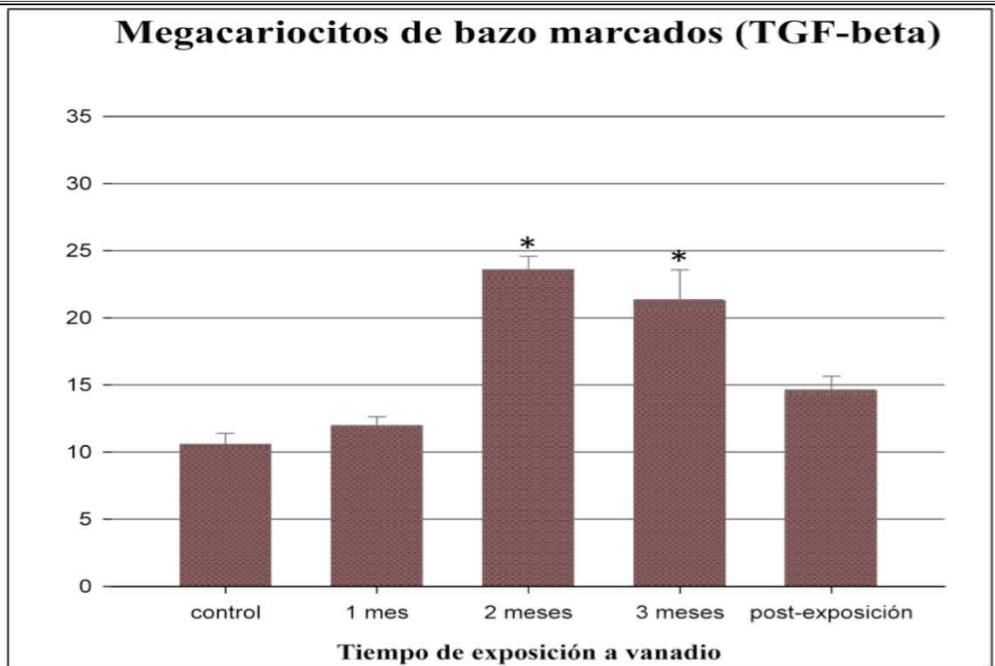
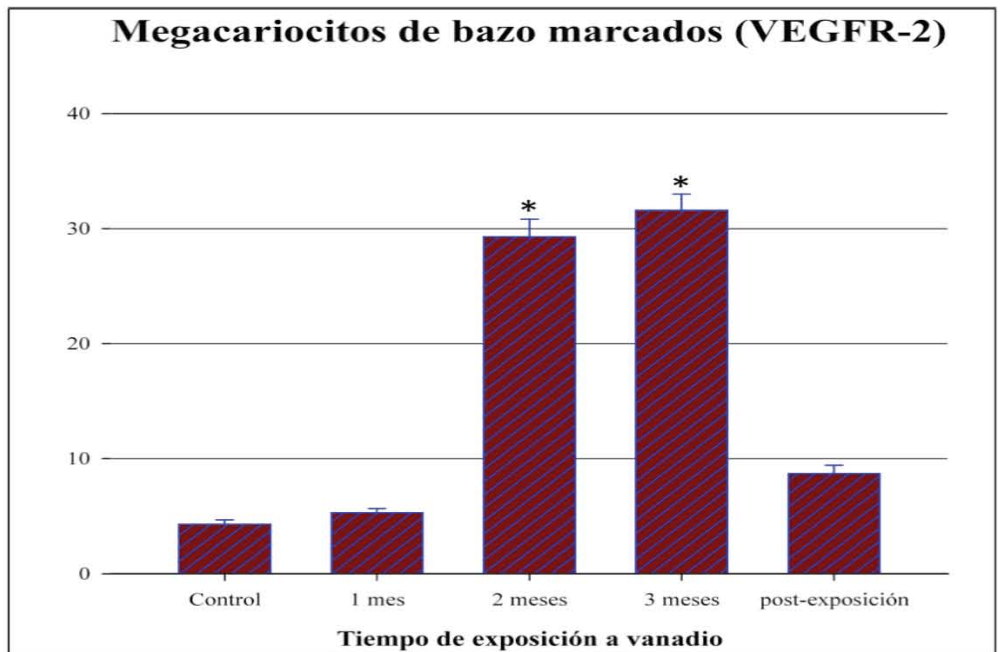


Figura 8. Mks de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 , marcados (VEGFR-2) mediante inmunohistoquímica 1000x. A) control, B, C y D) grupos expuestos a vanadio, 1, 2 y 3 meses respectivamente, E) 1 mes post-exposición. Se observa aumento en el número de Mks marcados al mes 2 y mes 3 de inhalación con respecto al control.



A

ANOVA $p \leq 0.01$ (Control vs. expuestos)



B

ANOVA $p \leq 0.001$ (Control vs. expuestos)

Figura 9. Efecto del V_2O_5 sobre la presencia de proteínas profibrogénicas de bazo. Se muestra un aumento significativo de Mks marcados tanto para TGF- β (A), como para VEGFR-2 (B) al mes 2 y 3 de exposición a vanadio. $P < 0.001$ ANOVA (TUKEY). (*) Diferencia significativa con respecto al control.

b) Proteínas antifibrogénicas.

Los resultados para las proteínas antifibrogénicas son los siguientes: para la MMP-9 se observó disminución significativa en el mes 1, mes 2, mes 3 y mes post-exposición con respecto al control, en el número de megacariocitos de bazo, marcados para esta proteína, (figura 10 y 12A).

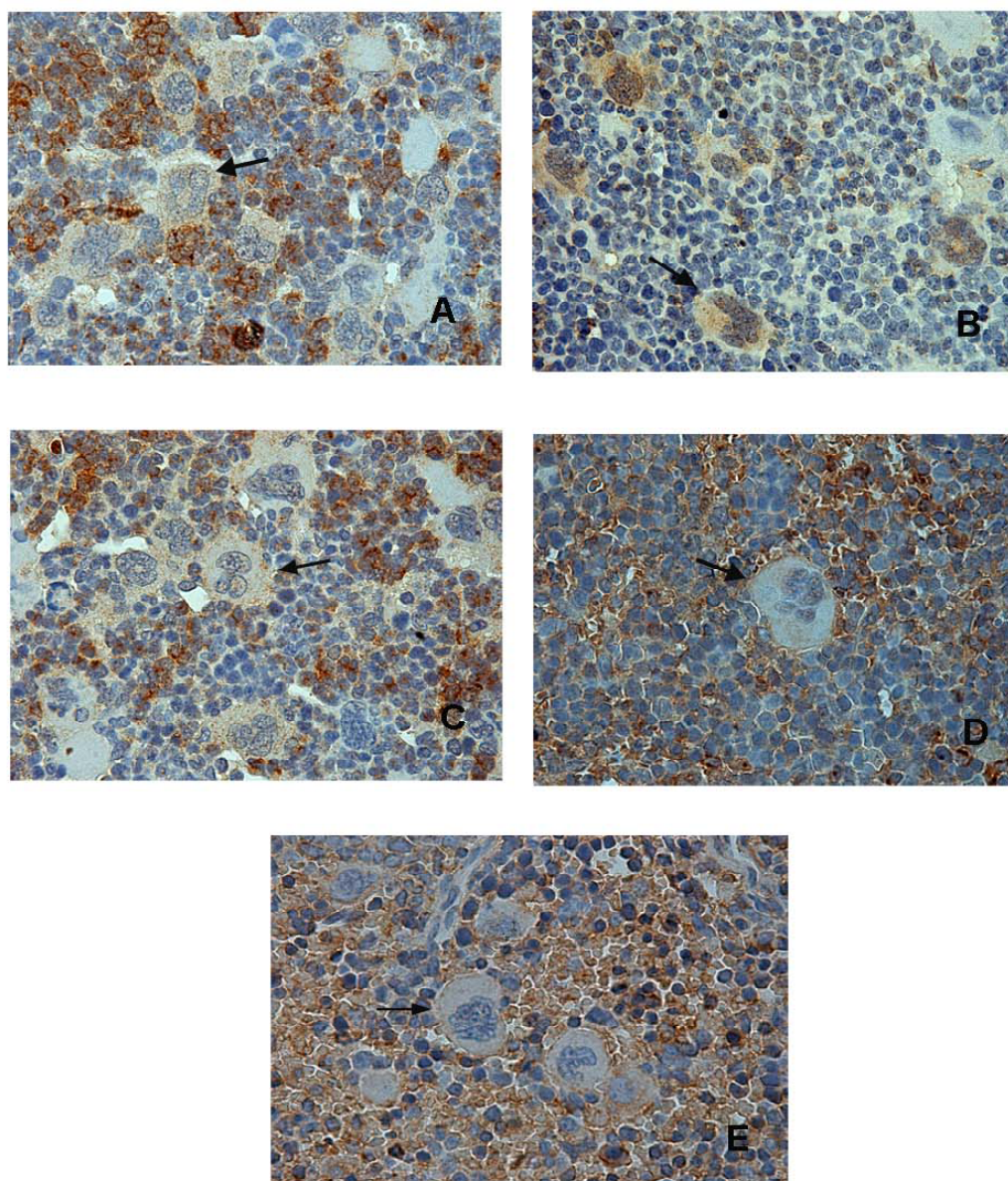


Figura 10 Mks de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 , marcados (MMP-9) mediante inmunohistoquímica 1000x. A) control, B, C y D) grupos expuestos a vanadio, 1, 2 y 3 meses respectivamente, E) 1 mes post-exposición. Se observa disminución del número de Mks marcados conforme avanza el tiempo de inhalación.

En los cortes de bazo con megacariocitos marcados para MMP-2 se observó aumento significativo, únicamente al mes 2 de exposición a V_2O_5 con respecto al control (figura 11 y 12B).

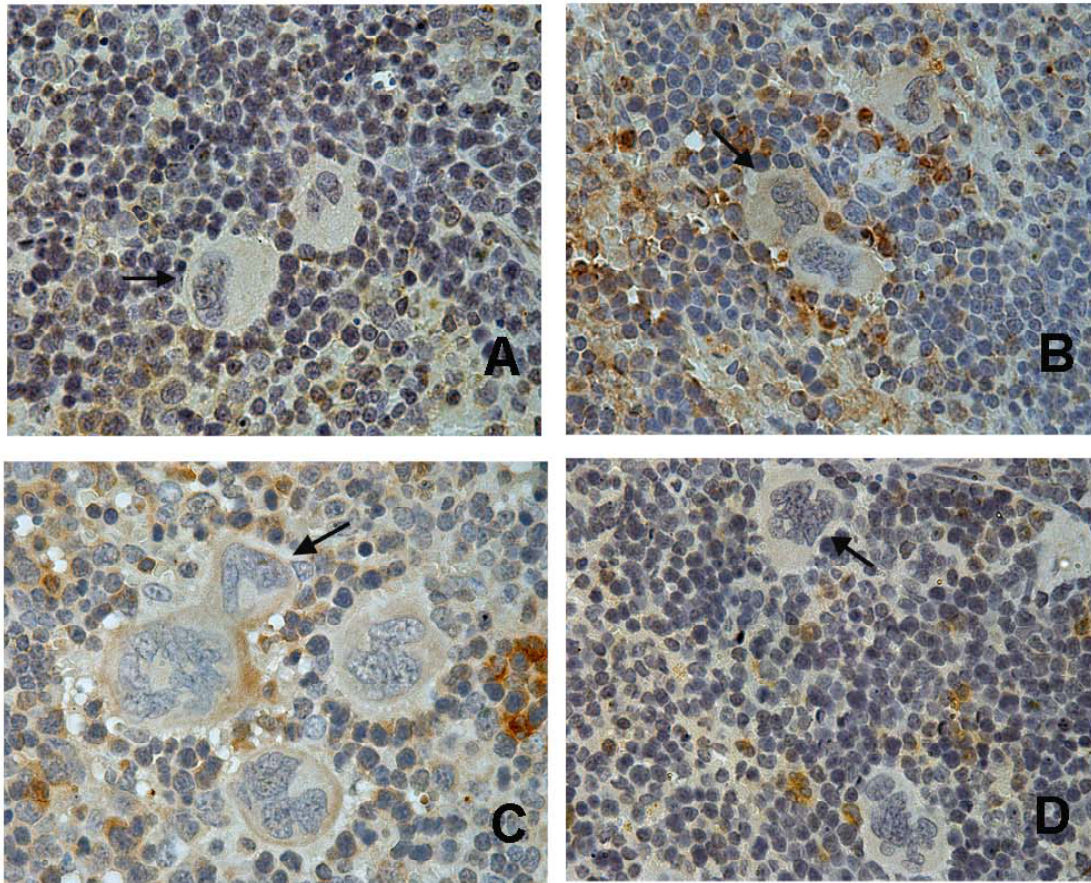
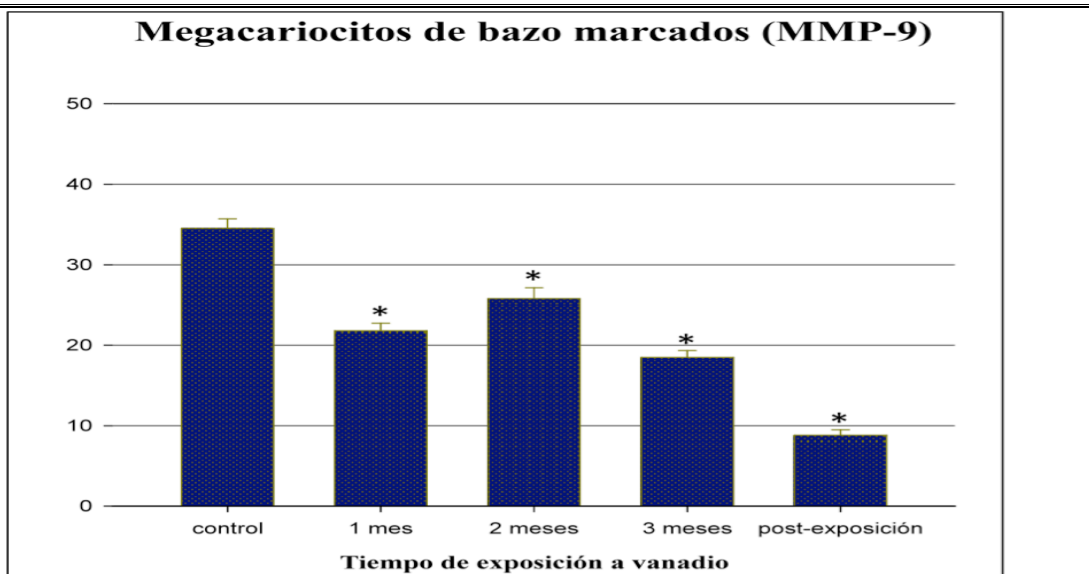


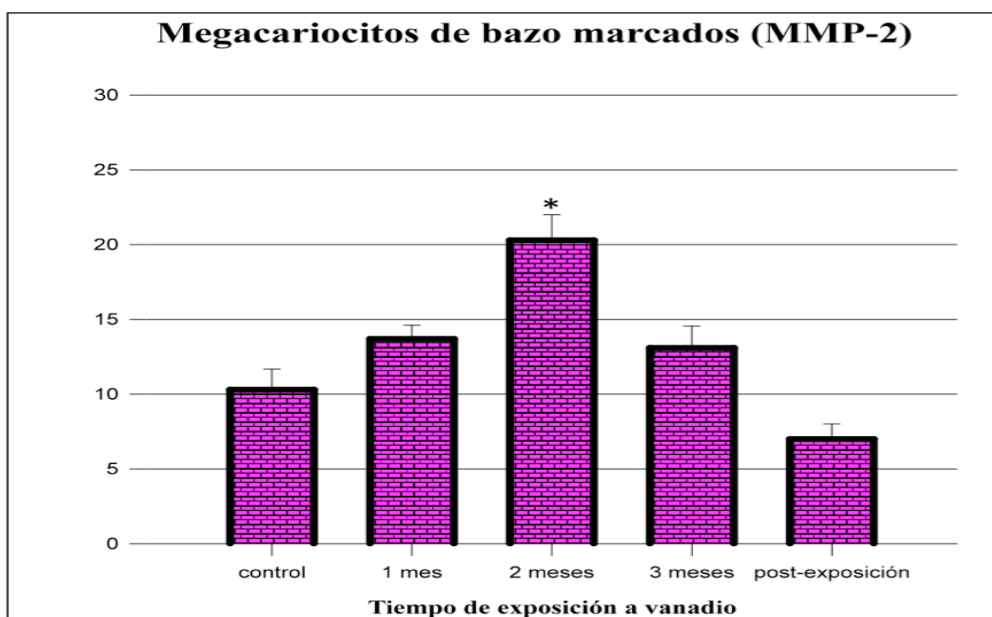
Figura 11. Mks de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 , marcados (MMP-2) mediante inmunohistoquímica 1000x. A) control, B, C y D) grupos expuestos a vanadio, 1, 2 y 3 meses respectivamente. Se observa aumento del número de Mks marcados únicamente en el mes 2 de exposición.

Es importante señalar que no se observó emperipolesis, aún buscándola intencionalmente en las muestras observadas a ningún tiempo de inhalación. La localización de la marca fue siempre citoplasmática para cada una de las proteínas a cada tiempo de exposición.



ANOVA $p \leq 0.001$ (Control vs. expuestos)

A



ANOVA $p \leq 0.01$ (Control vs. expuestos)

B

Figura 12. Efecto del V_2O_5 sobre la presencia de proteínas antifibróticas de Mks de bazo. Se muestra una disminución de Mks marcados para MMP-9 (A), en todos los tiempos de exposición a vanadio, a diferencia de Mks marcados para MMP-2 (B) donde solamente hay aumento significativo al mes 2 de exposición a vanadio. $P < 0.001$ ANOVA(TUKEY). (*) Diferencia significativa con respecto al control.

En cuanto a los cortes teñidos con Masson para determinar la cantidad de tejido conectivo presente en bazo, después de la exposición a V_2O_5 , no se encontró diferencia, con respecto al grupo control, en la cantidad del estroma (cápsula, trabécula, fibras de colágena internas, etc.) y debido a que se analizaron el total de cortes teñidos con Masson, no se realizó un análisis cuantitativo posterior (Figura 13).

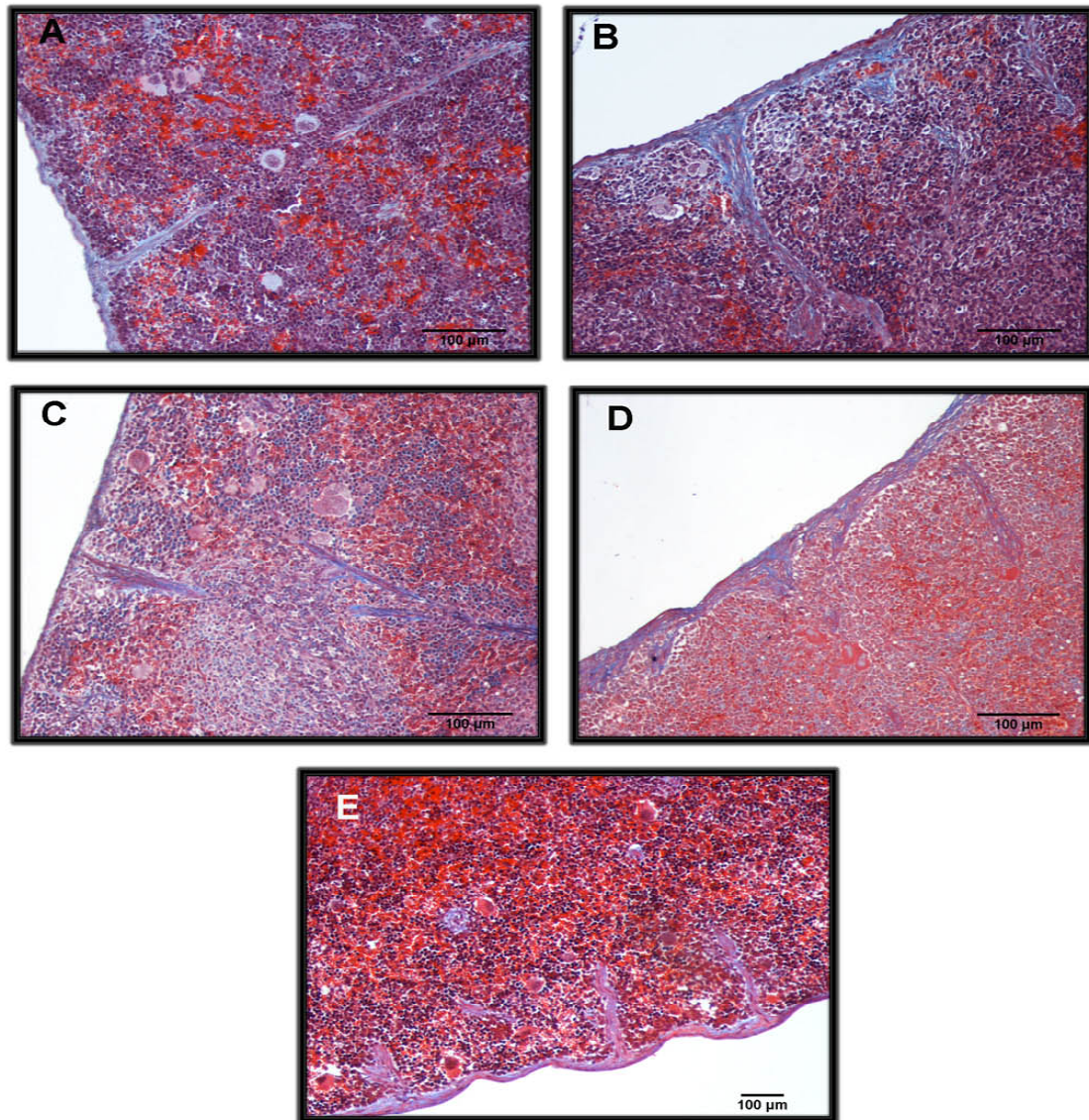


FIGURA 13. Tejidos de bazo de ratón, expuestos a la inhalación de V_2O_5 , teñidos con Masson 200x. A) Control, B, C y D) grupos expuestos a vanadio, 1, 2 y 3 meses respectivamente, E) 1 mes post-exposición. No se observa diferencia en la presencia de tejido conectivo que indicara fibrosis en bazo a diferentes tiempos de exposición a V_2O_5 .

8. DISCUSIÓN

Los metales contenidos en las partículas suspendidas, uno de los principales contaminantes atmosféricos, son considerados como un peligro para la salud (Fernández-Espinosa et al, 2002); uno de esos metales es el vanadio, el cual entre sus múltiples efectos encontrados en nuestro modelo experimental de inhalación, ocasiona aumento en el número de megacariocitos en médula ósea y bazo, además de aumento en el número de plaquetas circulantes (González-Villalva et al, 2006; Fortoul et al, 2008). La megacariocitosis (Mks), en otros modelos experimentales, ha sido relacionada como causa de fibrosis pulmonar y de médula ósea (Akiyama et al, 2005; Ciurea et al, 2007; Kuter et al, 2007; Schmitt et al, 2000; Tachil, 2008; Vannucchi et al, 2005), motivo por el cual decidimos explorar la posibilidad de fibrosis y alteración en las proteínas pro y antifibrogénicas en los megacariocitos de ratones expuestos a vanadio.

En este estudio, encontramos que, a pesar de que existe aumento en la presencia de proteínas profibrogénicas (TGF β y VEGFR $_2$), así como una disminución de la proteína antifibrogénica MMP-9, no hay presencia de fibrosis en el bazo de los ratones expuestos a V. Esto correlaciona con el hecho de que en este mismo modelo, se encontró que el vanadio estimula ligeramente el aumento de fibras de colágeno en hígado pero sin desarrollar fibrosis al administrarse solo, pero presenta un efecto antifibrogénico al administrarlo junto con un tóxico que ocasiona fibrosis hepática, el tetracloruro de carbono (Cano-Gutiérrez, et al 2011).

Por otro lado, también en este modelo, se ha encontrado aumento de las MMPs 2 y 9 en diferentes estructuras del SNC, lo cual fue relacionado con alteración de la barrera hematoencefálica, pérdida de espinas dendríticas y muerte neuronal (Colín-Barenque et al, 2008), por lo que podemos observar que el vanadio tiene diferentes efectos en estas proteínas dependiendo del órgano al que afecta.

En otros estudios de exposición a vanadio (V $_2$ O $_5$ por diferentes vías como son, instilación intratraqueal, inhalado y aspiración intranasal, así como haciendo uso de cultivos celulares de fibroblastos) se ha reportado fibrosis

pulmonar, situación que no se ha encontrado en nuestro grupo de trabajo (Bonner *et al*, 2000; Ingram *et al*, 2007; Ress *et al*, 2003; Turpin *et al*, 2010).

En los experimentos en los que se relaciona al vanadio con la fibrosis, se ha comprobado que el V no estimula directamente el crecimiento de fibroblastos y la deposición de colágeno, sino que estas células son estimuladas por factores de crecimiento provenientes de otros tipos celulares, que promueven su replicación y el depósito de colágena llegando a fibrosis (Antao-Menezes *et al*, 2008).

Sobre la relación que existe entre la megacariocitosis y la presencia de fibrosis, se ha propuesto, que al ser los megacariocitos y las plaquetas productores de factores profibrogénicos es muy posible que desencadenen dicha enfermedad en los órganos donde se encuentran presentes, como son médula ósea, bazo y pulmón. La proliferación de megacariocitos anormales morfológicamente, es una característica de algunos trastornos mieloproliferativos. Se ha propuesto que estos megacariocitos están relacionados en la patogénesis de fibrosis en este tipo de enfermedades, por liberación local de citocinas, así como síntesis de citocinas fibrogénicas de forma autócrina (Bock *et al*, 2005; Hemavathy *et al*, 2005).

En nuestro modelo, hemos visto cambios en la morfología de los megacariocitos sugerentes de una enfermedad mieloproliferativa llamada Trombocitemia Esencial, hipótesis que buscamos comprobar. Esta enfermedad es ocasionada por una mutación en la proteína JAK2, que la activa constitutivamente y, aunque no hemos estudiado esta mutación, los megacariocitos de ratones expuestos a vanadio tienen aumentada la activación de ésta proteína (datos aún no publicados). Cabe mencionar que esta enfermedad, la Trombocitemia Esencial, en sus estadios finales, en algunos pacientes puede cursar con fibrosis de médula ósea. Además se ha encontrado aumento en la producción de Trombopoyetina (TPO) (Díaz-Fuentes, 2009), situación que a nivel experimental se ha relacionado con mielofibrosis (Kakumitsu *et al*, 2005; Hemavathy *et al*, 2005)

Un ejemplo claro en la relación megacariocitosis, trombocitosis y fibrosis es un trabajo realizado por; Ciurea *et al*, 2007 trabajando con cultivos de células CD34+, de pacientes con mielofibrosis idiopática (IMF) e individuos saludables, encontró que, igual número de células CD34+ de pacientes con IMF generaron

mayor cantidad de Mks, que células CD34+ normales, *in vitro*. Esta capacidad de las células CD34+ para generar mayor número de Mks se sugiere que contribuye a la hiperplasia de Mks en IMF. Por otra parte se ha mostrado que la sobreexpresión de la proteína antiapoptóticas bcl-xL, da como resultado, el aumento en el número de Mks y disminuye la apoptosis.

Existen dos modelos que imitan la mielofibrosis humana y que han sido descritos, uno se debe a la sobreexpresión de la TPO (ratones TPO^{high}) y otro se debe a la baja expresión de GATA-1 (ratones GATA-1^{low}) (Varriocchio *et al*, 2009; Komura *et al*, 2005), en ambos casos ocurre un aumento en el número de megacariocitos y fibrosis. Por otra parte se ha propuesto unificar una ruta patobiológica para el desarrollo de fibrosis, en esta ruta, TPO, GATA-1 y TGF-β1 se encuentran relacionados, presentando un contenido reducido de GATA-1 en Mks, ya sea como resultado de tratamiento con TPO y de mutaciones en ratones, donde hay GATA-1^{low} o por mecanismos post-transcripcionales no identificados en humanos, bloqueo de la maduración de los Mks, resultando en la localización de P-selectina en el sistema de membranas de demarcación (SMD).

En condiciones normales, la p-selectina tiene como función facilitar la formación de agregados leucocito-plaqueta en sangre, importantes en la hemostasia, en este caso, la p-selectina aumenta en la superficie de los megacariocitos, así que los neutrófilos se adhieren a ellos y entonces sucede la emperipolesis, la cual se define como el paso aleatorio de una célula a través del citoplasma de otra célula, sin consecuencias fisiológicas para ninguna de las dos células; es particularmente frecuente en megacariocitos (Centurione *et al*, 2004; Schmitt *et al*, 2000); cuyas consecuencias patológicas específicas, son el resultado de la liberación de enzimas de neutrófilos (mieloperoxidas, lisozima, defensinas, elastasa, etc) (Borregaard & Cowland, 1997) en el citoplasma de los Mks. Estas enzimas disuelven los gránulos α y liberan TGF-β1, VEGF entre otros, en el microambiente a través de los canalículos de el SMD (Vannucchi *et al*, 2005), provocando proliferación de fibroblastos y desencadenando fibrosis (Centurione *et al*, 2004; Schmitt *et al*, 2000). Este mecanismo también es postulado para la fibrosis pulmonar, recordando que se ha descrito al pulmón como sitio de trombopoyesis, es decir, un sitio donde se encuentran megacariocitos productores de plaquetas. (Tachil, 2009).

En este trabajo, se marcaron por medio de la técnica de inmunohistoquímica, proteínas profibrogénicas y antifibrogénicas producidas y almacenadas por los megacariocitos, obteniéndose para la proteína TGF- β aumento significativo a los 2 y 3 meses de inhalación de V₂O₅, para VEGFR-2 se observó aumento al mes 2 y mes 3 de inhalación, disminución significativa en todos los tiempos de inhalación para la proteína MMP-9 y finalmente aumento significativo al mes 2 de inhalación para la proteína MMP-2. Por otro lado utilizando tinción tricrómica Masson se observó que bazo de ratones expuestos a vanadio, no presentaban fibrosis y, cabe mencionar que los megacariocitos no presentaron emperipolesis. Es importante señalar que después de un mes sin exposición con vanadio, la presencia de proteínas se encontró nuevamente sin diferencia con respecto al control, excepto la proteína MMP-9, que se mantuvo disminuida. El objetivo del análisis un mes después de finalizada la exposición, fue observar una posible reversión del efecto causado por el vanadio, la cual si se observó.

En lo que respecta a TGF- β , los megacariocitos y plaquetas se han propuesto como la mayor fuente celular de TGF- β , presentes en sus gránulos- α (Fava *et al*, 1990) y poblaciones anormales de Mks se han observado en pacientes con mielofibrosis (Schmitt *et al*, 2000). Existen al menos tres isoformas de TGF- β de las cuales TGF- β -1 parece estar implicada en fibrogénesis en mayor porcentaje (Bock *et al*, 2005; Evrard *et al*, 2011). Se ha comprobado que una liberación anormal de factores de crecimiento tal como TGF- β puede ser responsable del desarrollo de fibrosis de médula (Komura *et al*, 2005; Ide *et al*, 2002). En un estudio realizado por Komura *et al*, 2005, se mostró que la activación espontánea de la vía de señalización NF- κ B puede regular la secreción de TGF- β 1 en megacariocitos de mielofibrosis idiopática, directa o indirectamente, vía otros mediadores a nivel post-transcripcional, por interferir con la traducción o con mecanismos de secreción.

Varios reportes asocian la toxicidad del vanadio con un aumento en la producción de ROS, lo cual activa NF- κ B. IL-1 β activa NF- κ B y MAPKs (Colín *et al*, 2008). Este posible aumento de NF- κ B por la acción del vanadio, pudiera ser un mecanismo importante en el aumento de TGF- β en este modelo.

Sin embargo Campanelli *et al*, 2011 menciona que el aumento de TGF- β 1 no es suficiente para explicar la fibrosis. Estudió los niveles de TGF- β 1 en

enfermedades mieloproliferativas negativas para el cromosoma Filadelfia, evaluando pacientes con mielofibrosis primaria (PMF) que se caracteriza por el aumento en el número de células progenitoras circulantes y fibrosis de médula ósea y pacientes con policitemia vera (PV) o trombocitemia esencial (ET) que no presentan fibrosis de médula ósea. Encontraron que en pacientes con PMF, PV o ET tenían niveles más altos en plasma de sangre periférica y en plasma de médula ósea, tanto de TGF- β ₁ total y bioactiva respectivamente, a diferencia de los controles, sugiriendo que este aumento de TGF- β ₁ no es peculiar de pacientes con PMF, ya que también fue encontrado en pacientes con ET y PV, y que si los niveles alterados de TGF- β ₁ juegan un papel en la hematopoyesis, este no parece estar relacionado a la inducción de fibrosis en médula ósea; esta opinión es compartida por Bock *et al*, 2005. Este estudio apoya los resultados que obtuvimos, ya que aunque el TGF- β se encontró elevado durante la exposición a V, no fue suficiente para producir fibrosis.

Debido a que TGF- β y trombospondina-1 (TSP-1) se sintetizan y almacenan en gránulos α en los megacariocitos (Zaslavsky *et al*, 2010), la activación local patobiológica de TGF- β por acción de TSP-1 puede ocurrir y al ser el TGF- β la citocina más importante relacionada con el desarrollo de fibrosis, se puede presentar esta enfermedad en los órganos hematopoyéticos como son bazo y médula ósea. Sin embargo tanto Ahamed *et al*, 2009 y Evrard *et al*, 2011 han reportado que TSP-1 no es el mayor activador de TGF- β en un ambiente hematopoyético, pero si en fibrosis pulmonar y renal, haciendo notar que TGF- β puede ser regulada de manera diferente dependiendo el órgano de estudio.

Por otra parte, TGF- β estimula la producción de TPO por las células del estroma de la médula ósea, lo que a su vez, estimula a las células CD34+ a comprometerse al linaje megacariocítico y expresar receptores de TGF- β en un estadio intermedio; en este estadio, el mismo TGF- β es capaz de arrestar la maduración de unidades formadoras de megacariocitos (CFU-Meg) (Sakamaki *et al*, 1999); por lo anterior se puede decir que el TGF- β regula la megacariopoyesis (Jackson *et al*, 1994). Sin embargo, en nuestro modelo de inhalación se observó aumento de TPO y esto a su vez favorece el aumento en el número de Mks, por lo que al parecer predomina el efecto de TPO contra el de TGF- β .

Tanto TGF- β como VEGFR-2 son producidas por los megacariocitos y existe una relación estrecha entre ellas, ya que TGF- β 1 induce apoptosis y angiogénesis *in vitro e in vivo* a través de la activación autocrina o paracrina de VEGFR2 por VEGF (Ferrari et al, 2009). Por su parte VEGFR2 promueve la angiogénesis, la cual a su vez se ha asociado en la progresión a fibrosis. Los pacientes con trombocitemia esencial (ET) y elevada angiogénesis, progresan al estadio fibrótico de la enfermedad (Mesa *et al*, 2002).

Se ha encontrado relación entre el aumento de VEGFR-2 y la disminución de MMP-9, ambos eventos encontrados en este trabajo, ya que se mostró que VEGFR-2 activa STAT-1 y que este a su vez, juega un papel crítico en la supresión transcripcional del gen de MMP-9 en respuesta a interferones en varios sistemas celulares (Ugarte et al, 2010).

Siguiendo con lo relacionado a las metaloproteinasas, recordemos que tanto MMP-2 y MMP-9 se ha mostrado que juegan un papel importante en la angiogénesis, degradación de colágena y movilización de células HSC/HPC (Ciurea *et al*, 2007), además de que comparten una estructura básica (Cascales & Álvarez, 2010). A pesar de las similitudes que presentan MMP-2 y MMP-9 en cuanto a su estructura y tipo de sustrato, son reguladas de manera muy diferente la una de la otra a nivel de transcripción de genes, debido a distintos elementos regulatorios de los promotores (Ogawa *et al*, 2004); por ejemplo, MMP-9, 1 y 13 son regulados negativamente por INF- γ (Ma *et al*, 2005).

MMP-2 puede ser activada formando un complejo TIMP-2, MT-MMP-1 y pro-MMP-2, además de que trombina y APC también pueden activar MMP-2; en cambio MMP-9 es activada por otras MMPs como MMP-2 y MMP-3, así como por radicales libres (Malla *et al*, 2008).

Existe relación entre TGF- β y las MMPs (Nguyen *et al*, 2005); por un lado, varios investigadores han mostrado que TGF- β induce la expresión de MMP-2 en varias líneas celulares de cáncer humano, tales como próstata, mama, endometrial, oral, de ovario y en melanomas. En estos últimos la concentración en plasma de MMP-2 y TGF- β fueron significativamente más altos en pacientes con melanoma que en individuos control (Malaponte *et al*, 2010).

Por otro lado, TGF- β tiene efecto inhibitorio (Nguyen *et al*, 2005) en la expresión de varias MMPs, incluyendo MMP-1, MMP-3 y MMP-9 en fibroblastos. Se sabe que TGF- β regula la producción de MMP-9, así fue reportado por Ogawa *et al*, 2004, el cual también enfatizó la importancia de NF- κ B en la regulación negativa de la transcripción de MMP-9 por TGF- β . El aumento de TGF- β , además del aumento en VEGFR2 en este estudio, podría ser otra explicación para la disminución de MMP-9.

Un ejemplo donde se observa la regulación negativa que ejerce TGF- β en MMP-9, fue en el estudio de Ogawa y colaboradores, en 2004, en el que evaluaron el papel de TGF- β en regular la producción de MMP-9 en monocitos/macrófagos, donde analizaron la actividad de MMP-9 en el medio de cultivo de células MM6 de leucemia monocítica humana. Un grupo de células fueron tratadas solo con lipopolisacárido (LPS), (un potente estímulo inflamatorio, induce una variedad de MMPs) y otro grupo con LPS y TGF- β ; se midió la actividad enzimática de MMPs por zimografía. Las células tratadas con LPS aumentaron significativamente la actividad de MMP-9, mientras la actividad de MMP-2 no se vio afectada. Por otro lado las tratadas con TGF- β , disminuyeron la actividad de MMP-9 inducida por LPS. Al contrario, la actividad de MMP-2, aumentó en respuesta a TGF- β exógeno. En varios reportes MMP-2 se encuentra elevada en relación a enfermedades como fibrosis y cáncer (Pardo *et al*, 2008), concordando con el resultado obtenido en este trabajo, que muestra aumento de MMP-2 y la disminución de MMP-9.

En enfermedades como IMF, el aumento en la producción de MMP-9 activada por Mks, puede contribuir a la liberación de células progenitoras a la circulación, por degradar SDF-1 o su receptor CXCR-4 (Ciurea *et al*, 2007); sin embargo no se observó dicho aumento, sino disminución de MMP-9.

A nivel molecular, la disminución de MMP-9 parece obedecer la supresión transcripcional de su gen por la activación de STAT-1 α (por VEGFR2, IFN- γ o por IFN-b). Esta supresión transcripcional de MMP-9 obedece por un lado a la unión competitiva de STAT-1 α con proteínas CBP y p300 en el núcleo, dando como resultado una menor asociación de CBP y p300 al promotor de MMP-9; por otro lado STAT-1 α también suprime la acetilación de histonas y el reclutamiento de Pol II. Todos esto interfiere con el ensamble del complejo

transcripcional al promotor de MMP-9, para su transcripción (Ma *et al*, 2005). Las dos gelatinasas, MMP-2 y MMP-9, forman varios tipos de dímeros y complejos necesarios para su activación (Malla *et al*, 2008).

Se sabe que STAT-1 α puede interactuar con el coactivador CBP/p300 entre otros, el cual tiene actividad histona acetiltransferasa, por lo que puede afectar la transcripción de genes por modificar la estructura de la cromatina de genes blanco. Además STAT-1 α está asociado con CBP/p300 en la transcripción genética inducida por IFN- γ o INF- β (Ma *et al*, 2001). Para que la fibrosis se presente, es necesario que se lleve a cabo el proceso de angiogénesis, en el cual participan tanto VEGFR-2 como MMP-9 entre otras, por lo que, el vanadio al activar STAT-1 α y este a su vez disminuir la presencia de MMP-9 puede tener un efecto benéfico en enfermedades neurodegenerativas como son esclerosis múltiple o en varios tipos de cáncer.

También en un estudio realizado se muestra que la supresión de la transcripción de MMP-9 mediante IFN, ocurre a través del factor regulador del interferón 1 (IRF1) el cual compite con NF- κ B a el promotor de MMP-9, ya que se ha identificado a NF- κ B como el principal efector de la expresión genética de MMP-9 activado por la vía de señalización de TNF- α . El promotor de MMP-9 posee varios sitios funcionales de unión a elementos potenciadores, incluyendo tres sitios AP-1, un sitio NF- κ B, un sitio Ets, un sitio Sp-1 y un elemento de retinoblastoma (Sanceau *et al*, 2002). Coincidiendo con lo anterior otro estudio demuestra la supresión de la transcripción por TGF- β es mediado por una región promotora de MMP-9, conteniendo el sitio NF- κ B (Nguyen *et al*, 2005).

Se sabe que NF- κ B regula la expresión de numerosos mediadores inflamatorios, incluyendo IFNs tipo I. Por tanto, es posible que la activación de NF- κ B por Vanadio pueda contribuir a la inducción de IFNs tipo I y a la activación de STAT-1, y con ello la disminución de MMPs (Antao-Menezes *et al*, 2008).

Aunque el aumento en la presencia de megacariocitos marcados para TGF- β y para VEGFR-2 y la disminución de MMP-9 indicaban la posible presencia de fibrosis en bazo, esto no se observó, situación explicada en parte por la ausencia

de emperipolesis. Es importante recordar el papel que juegan los fibroblastos en la mediación de fibrosis, ya que se encargan de migrar a sitios de lesión, proliferar y secretar colágeno para formar tejido cicatrizal; pero además juegan un importante papel en la respuesta inmune innata al estrés oxidante inducido por la exposición a Vanadio, presentando síntesis de INF- β y activación de STAT-1, lo que causa un arresto en el crecimiento y aumento de los niveles de CXCL10, el cual es un potente factor antifibrótico. Este mecanismo se postula para contrarrestar el mecanismo profibrótico que sigue a la lesión causada por Vanadio, en un modelo *in vitro*, utilizando fibroblastos de pulmón de humano (Antao-Menezes et al, 2008).

Otro aspecto importante a considerar en la ausencia de fibrosis es el balance entre la actividad enzimática de las MMPs y la actividad inhibitoria de las TIMPs (Wang 2005); ya que se ha establecido que las MMPs degradan componentes de matriz extracelular y que su actividad es regulada por interacción inhibitoria de las TIMPs (Ogawa *et al*, 2000). Las plaquetas y los megacariocitos son ricas fuentes de TIMPs en órganos hematopoyéticos y las TIMPs derivadas de Mks y plaquetas son posibles contribuidores de procesos fibróticos en el estroma de la médula ósea (Murate *et al*, 1997; Villeneuve *et al*, 2009) y no fueron consideradas en este proyecto.

El análisis histológico e inmunohistoquímico en bazo, nos dió información importante y accesible para analizar. En este trabajo se pudo evidenciar la ausencia de fibrosis en bazo, y megacariocitos marcados para diferentes proteínas.

Como perspectiva de este trabajo, se podría además estudiar la alteración en la presencia de factores también importantes en la presencia de fibrosis como son, PDGF y FGF, ya que estos factores de crecimiento aumentan la expresión de TIMPs y también inducen la expresión de MMPs en fibroblastos (Wang, 2005). Aunque en contraste a PDGF y FGF los cuales son conocidos por ser mitógenos en la proliferación de fibroblastos, TGF- β es poderoso en la regulación de genes que son responsables de la síntesis de componentes de matriz extracelular (Bock et al, 2005). Otro punto a considerar es que no se estudiaron todas las metaloproteinasas descritas y que pudieran estar implicadas fuertemente en la presencia o no de fibrosis en bazo, ya que existen reportes que señalan a la

MMP-14 como una MMP con propiedades importantes, incluyendo, rompimiento directo de fibras de colágena, activación de otras MMPs (tal como MMP-13) e inducción de angiogénesis (Bock, 2006).

De este trabajo surgen interrogantes como son, si los inhibidores en vías como NF- κ B o bien inhibidores para TGF- β pudieron estar presentes en este experimento para que no se presentara fibrosis y, si estos pueden servir para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la fibrosis. Por otra parte, ya que se ha demostrado que la exposición a vanadio provoca aumento en el número de Mks y plaquetas en bazo y médula ósea y que esta alteración en número está relacionada con enfermedades mieloproliferativas, podemos pensar que las alteraciones en las proteínas profibrogénicas y antifibrogénicas estudiadas aquí, están relacionadas con dichas enfermedades.

Es importante darnos cuenta de los efectos adversos que causan los metales, como es el vanadio, en sistemas biológicos, pero también es importante retomar puntos clave de estudio, como son el papel de proteínas o parte de complejos de transcripción, en beneficio en el control de enfermedades como es la fibrosis en órganos hematopoyéticos. Así mismo hacer énfasis en la gran importancia que tiene continuar con el estudio de los megacariocitos, ya que son un libro apenas abierto, que nos puede aclarar varias interrogantes en sistemas biológicos.

9. CONCLUSIONES

-No existe evidencia de fibrosis en bazo en este modelo de inhalación de Vanadio

-No se encontró emperipolesis en los megacariocitos de bazo de los ratones expuestos a vanadio, lo que concuerda con la ausencia de fibrosis.

-El aumento en el número de megacariocitos en bazo, resultado de la exposición a Vanadio, favorece una mayor producción de proteínas profibrogénicas como son TGF- β y VEGFR-2.

-Existe un aumento en la presencia de MMP-2 y disminución de MMP-9, sugiriendo un mecanismo de regulación diferente.-Es necesario analizar otras proteínas antifibróticas, para establecer su papel protector contra la fibrosis en este modelo de inhalación.

-Los cambios en las proteínas estudiadas, fueron revertidos al dejar un mes sin exposición (excepto en MMP-9).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta M. Figueroa L. González J. Cadmio. Efectos en la Salud y el Ambiente. *Informe Médico*. 2009; 11(11):597-605.

Ahamed J. Janczak CA. Wittkowski KM. Collier BS. In Vitro and In Vivo Evidence that Thrombospondin-1 (TSP-1) Contributes to Stirling- and Shear—Dependent activation of Platelet-Derived TGF- β . *Plos ONE*. 2009; 4(8): 1-10.

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

Assem FL & Levy LS. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2009; 12: 289-306.

Avila-Costa MR. Fortoul TI. Niño-Cabrera G. Colín-Barenque L. Bizarro-Nevares P. Gutiérrez-Valdez AL. Ordóñez-Librado JL. Rodríguez-Lara V. Mussali-Galante P. Díaz-Bech P. Anaya-Martínez V. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V_2O_5) promote memory deterioration. *Neurotoxicology*. 2006; 27: 1007-1012.

Amorim FA. Welz B. Costa AC. Lepri FG. Vale MG. Ferreira SL. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta*. 2007; 72: 349-359.

Akiyama T. Matsunaga T. Terui T. Miyanishi K. Tanaka I. Sato T. Kuroda H. Takimoto R. Takayama T. Kato J. Yamauchi N. Kogawa K. Sakamaki S. Hirayama Y. Kohda K. Niitsu Y. Involvement of transforming growth factor- β and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. *Leucemia*. 2005; 19: 1558-1566.

Antao-Menezes A. Turpin EA. Bost PC. Ryman-Rasmussen JP. Bonner JC. STAT-1 Signaling in Human Lung Fibroblasts Is Induced by Vanadium Pentoxide through an IFN- γ Autocrine Loop. *Journal of Immunology*. 2008; 180: 4200-4207.

Baran EJ. Vanadium detoxification: Chemical and biochemical aspects. *Chemistry & Biodiversity*. 2008; 5: 1475-1484.

Barceloux DG. Vanadium. *Clinical Toxicology*, 1999; 37(2):265-278.

Bárceñas Cuadros CM. Cano LE. Cooch AM. Martínez Pérez A. Restrepo Molina A. Expresión de metaloproteínas y sus inhibidores de tejido en un modelo murino de fibrosis pulmonary. *Med UNAB*. 2004; 7(19): 9-14.

Barrio DA. Etcheverry SB. Vanadium and bone development: putative signaling pathways. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2006; 84: 677-686.

Beaulieu LM. Freedman JE. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thrombosis Research*. 2010; 125(3): 205-209.

Bishayee A. Waghray A. Patel MA. Chatterjee M. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The *in vivo* evidence. *Cancer Letters*. 2010; 294: 1-12.

Blair P. and Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009; 23(4): 177-189.

Bluteau D. Lordier L. Di Stefano A. Chang Y. Raslova N. Debili N and Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of Thrombosis and haemostasis*. 2009; 7: 227-234.

Bock O. Loch G. Schade U. Wasielewski R. Schlué J. and Kreipe H. Aberrant expression of transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) per se does not discriminate fibrotic from non-fibrotic chronic myeloproliferative disorders. *Journal of Pathology*. 2005; 205: 548-557.

Bock O. Schlué J. Lehmann U. Von Wasielewski R. Länger F. and Kreipe H. Megakaryocytes from chronic myeloproliferative disorders show enhanced nuclear bFGF expression. *Blood*. 2002; 100: 2274-2275.

Bock O. Neuse J. Hussein K. Brakensiek K. Buesche G. Buhr T. Wise B. and Kreipe H. Aberrant Collagenase Expression in Chronic Idiopathic Myelofibrosis is Related to the Stage of Disease but not to the JAK2 Mutation Status. *The American Journal of Pathology*. 2006; 169(2): 471-481.

Borregaard N & Cowland B. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*. 1997; 89: 3503-3521.

Bortolini O. Conte V. Vanadium (V) peroxocomplexes: Structure, chemistry and biological implications. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2005; 99: 1549-1557.

Campanelli R. Rosti V. Villani L. Castagno M. Moretti E. Bonetti E. Bergamaschi G. Balduini A. Barosi G and Massa M. Evaluation of the bioactive and total transforming growth factor β_1 levels in primary myelofibrosis. *Cytokine*. 2011; 53: 100-106.

Cano-Gutiérrez G. Altamirano LM. Fortoul TI. Cano-Gutierrez A. Santamarina A. Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation participation of oxidative stress. *Toxicology and Industrial Health*. 2011; In press.

Cascales AM. Álvarez GJ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2010; 76(1): 59-84.

Cébe-Suarez S. Zehnder-Fjällman A. and Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63: 601-615.

Centurione L. Baldassarre AD. Zingariello M. Bosco D. Gatta V. Rana RA. Langella V. Virgilio AD. Vannucchi AM. and Migliaccio AR. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1^{low} mice. *Blood*. 2004; 104: 3573-3580.

Chakrabarti S. Patel KD. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 in pulmonary pathology. *Experimental Lung Research*. 2005; 31: 599-621.

Chandra AK. Ghosh R. Chatterjee A. Sarkar M. Effects of vanadate on male rat reproductive tract histology, oxidative stress markers and androgenic enzyme activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2007; 101(6): 944-956.

Chang R. *Química*. McGraw-Hill/ Interamericana S.A. 2006.

Ciurea SO. Merchant D. Mahmud N. Ishii T. Zhao Y. Hu W. Bruno E. Barosi G. Xu M. and Hoffman R. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007; 110(3): 985-993.

Cohen MD. Wei CI. Tan H. Kao KJ. Effecto of ammonium metavanadate on the murine immune response. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1986; 19: 279-298.

Colín-Barenque L. Martínez-Hernández MG. Baiza-Gutman LA. Avila-Costa MR. Ordóñez-Librado JL. Bizarro-Neves P. Rodríguez-Lara V. Piñón-Zarate G. Rojas-Lemus M. Mussali-Galante P. and Fortoul TI. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation. *J. Appl. Toxicol*. 2008; 28: 718-723.

COMETAH, Programa de Ordenación de la Zona Metropolitana del Valle de México, Comisión Metropolitana de Asentamientos Humanos, México 1998.

Cooper RG. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 2007; 11(3): 97-102.

Díaz Bech PM. Relación de la trombopoyetina, IL-6 y la expresión del receptor c-Mpl en la trombocitosis inducida por la inhalación crónica de vanadio. Modelo experimental en ratón. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. UNAM. 2007.

Díaz Fuentes P. “La participación del pulmón y el hígado en la producción de TPO en un modelo por inhalación de vanadio”. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM. 2009.

Ehrlich VA. Nersesyan AK. Hoelzl C. Ferk F. Bichler J. Valic E. Schaffer A. Schulte-Hermann R. Fenech M. Wagner KH. Knasmüller S. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: Results of a multiple end point study. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116(12): 1689-1693.

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

Evrard S. Bluteau O. Tulliez M. Rameau P. Gonin P. Zetterberg E. Palmblad J. Bonnefoy A. Villeval JL. Vainchenker W. Giraudier S. and Wagner-Ballon O. Thrombospondin-1 is not the major activator of TGF- β ₁ in thrombopoietin-induced myelofibrosis. *Blood*. 2011; 117(1): 246-249.

Fava RA. Casey TT. Wilcox J. Pelton RW. Moses HL. and Nanney LB. Synthesis of Transforming Growth Factor- β ₁ by Megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet α -granules. *Blood*. 1990; 76(10): 1946-1955.

Fernández-Espinosa AJ. Ternero-Rodríguez M. Barragán de la Rosa FJ. Jiménez-Sánchez JC. A Chemicals speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmospheric Environment*. 2002; 36(5):773-780.

Ferrari G. Cook BD. Terushkin V. Pintucci G. and Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β ₁) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF) – mediated apoptosis. *J Cell Physiol*. 2009; 219(2): 449-458.

Fortoul TI. Quan-Torres A. Sánchez I. López IE. Bizarro P. Mendoza ML. Osorio LS. Espejel-Maya G. Avila-Casado MC. Avila-Costa MR. Colín-Barenque L. Villanueva DN and Olaiz-Fernandez G. Vanadium in Ambient Air: Concentrations in Lung Tissue from Autopsies of Mexico City Residents in the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health*. 2002; 57(5):446-449.

Fortoul TI. Bizarro-Nevarés P. Acevedo-Nava S. Piñón-Zárte G. Rodríguez-Lara V. Colín-Barenque L. Mussali-Galante P. Avila-Casado MC. Avila-Costa MR. and Saldivar-Osorio L. Ultrastructural findings in murine seminiferous

tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. *Reproductive Toxicology*. 2007; 23: 588-592.

Fortoul TI *et al.* Vanadium as an air pollutant. Cap 1. In Vanadium: its impact on health. Nova Science Publisher, 2007

Fortoul TI. Piñón-Zarate G. Díaz-Bech ME. González-Villalva A. Mussali-Galante P. Rodríguez-Lara V. Colín-Barenque L. Martínez-Pedraza M. Montaña LF. Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histol histopathol*. 2008; 23: 1321-1326.

Fortoul TI. González-Villalva A. Piñón-Zarate G. Rodríguez-Lara V. Montaña LF. Saldivar-Osorio L. Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*. 2009: 1-6.

Gálvez GF. Sandoval RA. Armendáriz BJ. El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico. *Salud pública de México*. 2004; 46(4): 350.

García GB. El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent*. 2006; 14(2): 32-36.

García-Lestón J. Méndez J. Pásaro E. Laffon B. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International*. 2010; 36: 623-636.

García-Manero M. Olartecoechea B. Aubá M. Alcázar JL. López G. Angiogénesis y endometriosis. *Rev Med Univ Navarra*. 2009; 53(2): 8-13.

Garriz RA. Breve historia de la educación química en México. *Bol. Soc. Quím. Méx*. 2007; 1(2): 77-97.

González-Villalva A. Fortoul TI. Avila-Costa MR. Piñón-Zarate G. Rodríguez-Lara V. Martínez-Levy G. Rojas-Lemus M. Bizarro-Nevarez P. Díaz-Bech P. Mussali-Galante P. Colín-Barenque L. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V₂O₅ inhalation. *Toxicology and Industrial Health*. 2006; 22(3): 113-116.

González-Villalva A. Rodríguez-Lara V. Montaña LF. Lima-Melo A. Ramírez G and Fortoul TI. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Current Topics in Toxicology*. 2009; 6: 31-38.

González Villalva A. Falcón-Rodríguez CI. Fortoul TI. Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis. *Gac Méd Méx*. 2010; 146 (2): 136-143.

Gupta GP. Massagué J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J. Clin. Invest*. 2004; 114(12): 1691-1693.

Guzmán-Grenfell AM. Maldonado-Noriega LM. Mendoza-Atencio R. Hicks-Gómez JJ. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: participación en las enfermedades respiratorias. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex*. 2005; 18(3): 240-246.

Harrison RM. Jones AM. Multisite study of particle Lumber concentrations in urbana ir. *Environ. Sci. Technol*. 2005. 29: 6063-6070.

Hemavathy KC. Suppiah K. Hashmi G. Novetsky A. Wang JC. TPO/Mpl studies in Agnogenic Myeloid Metaplasia. *Cell Communication and Signaling*. 2005; 3:4

Hogan GR. Vanadium-Induced Leukocytosis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 2000; 64: 606-610.

Haznedaroglu IC. Atalar E. Oztürk MA. Ozer N. Ovünc K. Aksöyek S. Kes S. Kirazli S. Ozmen F. Thrombopoietin inside the pulmonary vessels in patients with and without pulmonary hipertensión. *Platelets*. 2002; 13: 395-399.

Ide Y. Yamanaka E. Namiki Y. Iijima R. Harada K. Ishi H. Kawahara J. and Doi K. Involvement of the TGF- β ₁ Derived from Megakaryocyte in the PEG-rHuMGDF-Induced Myelofibrosis and Bone Formation. *J Toxicol Pathol*. 2002; 15: 31-38.

Ingram JI. Antao-Menezes A. Turpin EA. Wallace DG. Mangum JB. Pluta LJ. Thomas RS and Bonner JC. Genomic análisis of human lung fibroblasts

exposed to vanadium pentoxide to identify candidate genes for occupational bronchitis. *Respiratory Research*. 2007; 8(1): 34.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds, World Health Organization, 2001. Ginebra, 29.

Italiano JE. Hartwig JH. Megakaryocyte development and platelet formation. En: Michelson AD, edito. *Platelets*. Second Edition. Canada: Academic Press. 2007. pp. 23-44.

Italiano JE. Patel-Hett S. Hartwig JH. Mechanics of proplatelet elaboration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007; 5 (Suppl.1): 18-23.

IARC. Vanadium Pentoxide. In : IARC Monogr. Eval. Carcinogen. Risk Hum Vol. 86: Cobalt in hard metals and cobalto sulfate gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2006: 227-292

Jacobson MZ. Atmospheric pollution. History, Science, and regulation. Cambridge. 2002. E.U.A. 50-116.

Jackson H. Williams N. Westcott KR. Green R. Differential effects of transforming growth factor- β_1 on distinct developmental stages of murine megakaryocytopoiesis. *Journal of cellular physiology*. 1994; 161: 312-318.

Järup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 2003;68:167-182.

Jeziarska A & Motyl T. Matrix Metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: A mini-review. *Med Sci Monit*. 2009; 15(2): 32-40.

Jung KJ. Lee EK. Yu BP. and Chung HY. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF-kB signaling in the inflammatory process and aging. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 47: 983-991.

Kakumitsu H. Kamezaki K. Shimoda K. Karube K. Haro T. Numata A. Shide K. Matsuda T. Oshima K. and Harada M. Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. *Leukemia Research*. 2005; 29: 761-769.

Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 3339-3347.

Kitchin KT and Conolly R. Arsenic-Induced Carcinogenesis - Oxidative Stress as a Possible Mode of Action and Future Research Needs for More Biologically Based Risk Assessment. *Chemical Research in Toxicology*. 2010; 23: 327-335.

Komura E. Tonetti C. Penard-Lacronique V. Chagraoui H. Lacout C. LeCouédic JP. Rameau P. Debili N. Vainchenker W and Giraudier S. Role for the Nuclear Factor κ B Pathway in Transforming Growth Factor- β 1 Production in idiopathic Myelofibrosis: Possible Relationship with FK506 Binding Protein 51 Overexpression. *Cancer Research*. 2005; 65: 3281-3289.

Kuter DJ. Bain B. Mufti G. Bagg A. Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *British Journal of Haematology*. 2007; 139: 351-562.

Li P. Feng X and Qiu G. Methylmercury exposure and health effects from rice and fish consumption: a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010; 7: 2666-2691.

Libra M. Scalisi A. Vella N. Clementi S. Sorio R. Stivala F. Spandidos DA. Mazzarino C. Uterine cervical carcinoma: Role of matrix metalloproteinase's (Review). *International Journal of Oncology*. 2009; 34: 897-903.

Liu J. Qu W. Kadiiska M. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009; 238: 209-214.

Liur T. Feng XH. Regulation of TGF- β signalling by proteína phosphatases. *Biochem. J*. 2010; 430: 191-198.

Ma Z. Qin H. Benveniste EN. Transcriptional supresión of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN- γ and IFN- β : critical role of STAT-1 α . *Journal of immunology*. 2001; 167: 5150-5159.

Ma Z. Chang MJ. Shah RC. Benveniste EN. Interferon- γ -activated STAT-1 α suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/300. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005; 78: 515-523.

Malaponte G. Zacchia A. Bevelacqua Y. Marconi A. Perrotta R. Mazzarino MC. Cardile V and Stivala F. Co-regulated expression of matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor-b in melanoma development and progression. *Oncology Reports*. 2010; 24: 81-87.

Malla N. Sjoli S. Winberg J. Biological and pathobiological functions of gelatinase Diners and complexes. *Connective Tissue Research*. 2008; 49: 180-184.

Martínez-Ezquerro JD & Herrera L. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología*. 2006; 1: 83-96.

Mayani H. Flores-Figueroa E. Pelayo R. Montesino JJ. Flores-Guzmán P. Chávez-González A. Hematopoyesis. *Cancerología*. 2007; 2: 95-107.

Meulmeester E. Dijke P. The diynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol*. 2010; 223: 205-218.

Mesa RA. Hanson CA. Li C. Yoon S. Rajkumar V. Schroeder G. Tefferi A. Diagnostic and prognostic value of bone marrow angiogenesis and megakaryocyte c-Mpl expression in Essentials thrombocythemia. *Blood*. 2002; 99: 4131-4137.

Munguía-Castro ME. and Pérez-Neria J. La contaminación atmosférica en el sur de la Zona Metropolitana del Valle de México. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2003;16(1):48-53.

Mukherjee B. Patra B. Mahapatra S. Banerjee P. Tiwari A. Chatterjee M. Vanadium – an elemento of atypical biological significance. *Toxicology Letters*. 2004; 150: 135-143.

Mussali-Galante P. Rodríguez-Lara V. Hernández-Tellez B. Ávila-Costa MR. Colín-Barenque L. Bizarro-Nevarez P. Martínez-Levy G. Rojas-Lemus M. Piñón-Zarate G. Saldivar-Osorio L. Díaz-Bech P. Herrera-Enríquez A. Tovar-Sánchez E. and Fortoul TI. Inhaled vanadium decrease gamma-tubulin of Mouse testes at different exposure times. *Toxicology and Industrial Health*. 2005; 21: 215-222.

Murate T. Yamashita k. Isogai C. Suzuki H. Ichihara M. Hatano S. Nakahara Y. Kinoshita T. Nagasaka T. Yoshida S. Komutsu N. Miura Y. Hotta T. Fujimoto N. Saito H. and Hayakawa T. The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. *British Journal of Haematology*. 1997; 99: 181-189.

Nguyen J. Knapnougel P. Lesavre P. Bauvois B. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 by interferons and TGF- β 1 through distinct signalings accounts for reduced monocyte invasiveness. *FEBS Letters*. 2005; 579: 5487-5493.

Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993, Salud Ambiental. Criterio para evaluar el valor límite permisible para la concentración de material particulado. Valor límite permisible para la concentración de partículas suspendidas totales PST, partículas menores de 10 micrómetros PM₁₀ y partículas menores de 2,5 micrómetros PM_{2,5} de la calidad del aire ambiente. Criterios para evaluar la calidad del aire

Ogawa K. Chen F. Kuang C. and Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor- β is mediated by a nuclear factor- κ B site. *Biochem. J*. 2004; 381: 413-422.

Ogawa M. Kawamoto M. and Yamanaka N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in human bone marrow tissues. *J Nippon Med Sch*. 2000; 67(4): 235-241.

Ombrello C. Block RC. Morell CN. Our Expanding View of Platelet Functions and Its Clinical Implications. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2010; 3: 538-546.

Pardo A. Selman M. Matriz extracelular. En: Jiménez L.F. & Merchant H (eds). *Biología celular y molecular*. Prentice Hall. 2003. 515-540

Pardo SA. Metaloproteasas de matriz en la remodelación aberrante de la fibrosis pulmonar. *Mensaje Bioquímico*, UNAM. 2008; 23: 39-48.

Peña CE. Carter DE. Ayala-Fierro F. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental. The University of Arizona. 2001.

Perera M. Tsang CS. Distel RJ. Lacy JN. Ohno-Machado L. Ricchiuti V. Samaranayake LP. Smejkal GB. Smith MG. Trachetenberg AJ. Kuo WP. TGF- β Interactome: Metastasis and Beyond. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2010; 7: 217-230.

Piñón-Zarate G. Rodríguez-Lara V. Rojas-Lemus M. Martínez-Pedraza M. González-Villalva A. Mussali-Galante P. Fortoul TI. Vanadium Pentoxide Inhalation Provokes Germinal Center Hyperplasia and Suppressed Humoral Immune Responses. *Journal of Immunotoxicology*. 2008; 5: 115-122.

Reed GL. Fitzgerald ML. Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood*. 2000; 96(10): 3334-3342.

Ress NB. Chou BJ. Renne RA. Dill JA. Miller RA. Roycroft JH. Hailey JR. Haseman JK. and Bucher JR. Carcinogenicity of Inhaled Vanadium Pentoxide in F₃₄₄/N Rats and B6C₃F₁ Mice. *Toxicological Sciences*. 2003; 74: 287-296.

Rodríguez-Mercado JJ. y Altamirano-Lozano MA. Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2006; 22(4): 173-189.

Rojas-Lemus M. Comparación por género y por edad de los efectos genotóxicos producidos por la inhalación de pentóxido de vanadio, cloruro

de manganeso y su mezcla. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. UNAM. 2009.

Rosales-Castillo JA, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH. Efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud pública de México*. 2001;43(6):544-555.

Rosin A. The long-term consequences of exposure to lead. *The Israel Medical Association Journal*. 2009;11:689-694.

Roskoski JR. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008; 375: 287-291.

Sancéau J. Boyd DD. Seiki M. Bauvois B. Interferons inhibit tumor necrosis factor- α mediated matrix metalloproteinase-9 activation via Interferon Regulatory Factor-1 binding competition with NF- κ B. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277 (38) : 35766-35775.

Sakamaki S. Hirayama Y. Matsunaga T. Kuroda H. Kusakabe T. Akiyama T. Konuma Y. Sasaki K. Tsuji N. Okamoto T. Kobune M. Kogawa K. Kato J. Takimoto R. Koyama R. and Niitsu Y. Transforming Growth Factor- β ₁ (TGF- β ₁) induces thrombopoietin from bone marrow stromal cells, which stimulates the expression of TGF- β receptor on megakaryocytes and, in turn, renders them susceptible to supresión by TGF- β itself with high specificity. *Blood*. 1999; 94(6): 1961-1970.

Shivdasani R. An animal model for myelofibrosis. *Blood*. 2002; 100: 1109-1110.

Schmitt A. Jouault H. Guichard J. Wendling F. Drouin A. Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*. 2000; 96: 1342-1347.

Smyth SS. Mcever RP. Weyrich AS. Morell CN. Hoffman MR. Arepally GM. French PA. Dauerman HL. Beckerss RC. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 7: 1759-1766.

Srivastava AK. Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabetic Medicine*. 2004; 22: 2-13.

SEMARNAT. ¿Y el medio ambiente? Problemas en México y el mundo. Cap.5 Contaminación, SEMARNAT, México, 2009.

SMA-GDF, Calidad del aire en la Ciudad de México. Informe 2009. Secretaria del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. Sistema de Monitoreo Atmosférico. México, 2009.

SMA-GDF, Inventario de Emisiones de la Zona Metropolitana del Valle de México 2004. Secretaria del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal, Dirección General de Gestión Ambiental del aire, Sistema de Monitoreo Atmosférico, 2005.

SMA-GDF, Inventario de emisiones. Gases de efecto invernadero. ZMVM 2006. Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. Ciudad de México, 2006.

SMA-GDF. Inventario de emisiones de contaminantes criterio de la ZMVM, 2008. Secretaria del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal (SMA-GDF). Ciudad de México, 2008.

Tachil J. The lung megakaryocytes and pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Medical Hypotheses*. 2009; 72(3): 291-293.

Takahashi H & Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*. 2005; 109: 227-241.

Turpin EA. Antao-Menezes A. Cesta MF. Mangum JB. Wallace DG. Bermudez E. Bonner JC. Respiratory syncytial virus infection reduces lung inflammation and fibrosis in mice exposed to vanadium pentoxide. *Respiratory Research*. 2010; 20: 1-11.

Ugarte-Benzal E. Redondo-Muñoz J. Eroles P. Hernández del Cerro M. García-Marco A. Terol MJ. García-Pardo A. VEGF/VEGFR₂ interaction down-

regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood*. 2010; 115: 846-849.

Urias Romero E. Una Alternativa de Inversion para El Sector Energético de México: Aplicación de los Mecanismos de Flexibilidad del Protocolo de Kyoto (1997-2005). Tesis para obtener el grado de Maestro en Economía. UNAM, 2006.

Valavanidis A, Fiotakis K and Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health Part C*. 2008; 26:339-362.

Vallejo M, Jáuregui-Renaud K, Hermosillo A, Márquez M, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003;139(1): 57-63.

Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F, Pancrazzi A, Torre E, Nishikawa M, Zingariello M, Baldassarre AD, Rana RA, Lorenzini R, Alfani E, Migliaccio G, and Migliaccio AR. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1 and TGF-beta 1 in the development of myelofibrosis. *Blood*. 2005; 105(9): 3493-3501.

Varriocchio L, Mancini A, Migliaccio AR. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their Niche revealed by Mouse models of primaty myelofibrosis. *Expert Rev Hematol*. 2009; 2(3): 315-334.

Vega-Bautista C. Recuperación de las alteraciones en la memoria espacial y en la citología del giro dentado, inducidas por la inhalación de V2O5. LIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, 2010.

Vilchis LM, Juárez P, López CF. Receptores y funciones del TGF-beta, una citosina crucial en la cicatrización. *Gac Méd Méx*. 2003; 139(2): 126-132.

Villeneuve J, Block A, Le Bousse-Kerdilès M, Lepreux S, Nurden P, Ripoché J, Nurden A. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in platelets and

megakaryocytes: A novel organization for these secreted proteins. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 849-856.

Wang JC. Importance of Plasma Matrix metalloproteinases (MMP) and Tissue Inhibitors of Metalloproteinase (TIMP) in development of fibrosis in agnogenic mieloide metaplasia. *Leukemia & Lymphoma*. 2005; 46(9): 1261-1268.

Worthington JJ. Klementowicz JE. and Travis MA. TGF- β : a sleeping giant awoken by integrins. *Trends in Biochemical Sciences*. 2011; 36(1): 47-54.

Yamauchi K & Shimamura K. Pulmonary fibrosis with megakaryocyte infiltration in agnogenic myeloid metaplasia with thrombocytosis. *European Journal of Haematology*. 1996; 57: 325-327.

Zaslavsky A. Baek KH. Lynch RC. Short S. Grillo J. Folkman J. Italiano JE. – Ryeom S. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*. 2010; 115: 4605-4613.

Zucker-Franklin D. Philipp CS. Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *American Journal of Pathology*. 2000; 157: 69-74.

ATSDR. Vanadium. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts58.pdf>. Consulta 20 septiembre, 2010.

OMS. El Mercurio en el Sector de la Salud. Documento de Política General. Organización Mundial de la Salud, 2005. www.who.int/entity/water_sanitation_health/medicalwaste/mercurio_es.pdf Consultado el 15 agosto 2010.

SER. Guía sobre la esclerosis sistémica. Sociedad Española de Reumatología. http://www.ser.es/pacientes/enfermedades_reumaticas/esclerosis_sistemica.php Consulta 5 noviembre 2010.
