



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MECANISMOS DE LA INHIBICIÓN DEL
CRECIMIENTO TUMORAL EN EL MODELO DE
ADENOMAS PULMONARES INDUCIDOS POR
URETANO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

NELLY LÓPEZ VALDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR: DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **LÓPEZ VALDEZ NELLY** con número de cuenta **301728979**, con la tesis titulada **"MECANISMOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL EN EL MODELO DE ADENOMAS PULMONARES INDUCIDOS POR URETANO COMO CONSECUENCIA DE LA INHALACIÓN DE VANADIO."** realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: **DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**
Vocal: **DR. GONZALO CASTILLO ROJAS**
Secretario: **DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE**
Suplente: **DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA**
Suplente: **DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de diciembre de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

Agradecimientos Técnicos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Conacyt por el apoyo recibido como Becaria.

A los miembros del Comité Tutor por sus aportaciones a este trabajo:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Dr. Mario Altamirano Lozano

A la Facultad de Medicina, UNAM, por hacerme parte de ella enriqueciendo mi ejercicio profesional

A los miembros del Laboratorio de Microscopia del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

Biol. Armando Zepeda Rodríguez

Francisco Pasos Nájera

A los miembros del Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, por el apoyo que me brindaron en el desarrollo de este proyecto.

Tec. Raquel Guerrero Alquicira

Téc. Verónica Rodríguez Mata

Al personal del Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, a cargo del M.V.Z. Enrique Pinzón Estrad, así como sus colaboradores M.V.Z. Victor Manuel Salgado Alfaro y M.V.Z. Ismael Torres Saldaña.

Finalmente un agradecimiento especial al M. en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez, por su valiosa ayuda.

Agradecimientos y Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a aquellas personas que con su esfuerzo, apoyo, consejos, trabajo y compañía, hicieron posible que llegara hasta este momento.

Gracias a Tere, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por ser mi maestra, guía y apoyo en todo momento en que lo he necesitado. ¡¡¡Gracias!!!

A mi mamá y papá, porque con sus enseñanzas, ejemplo y dedicación hicieron de mi lo que ahora soy. Gracias por el apoyo que me brindaron para llegar hasta aquí, sin ustedes no habría sido posible.

A mis hermanos, Jorge y Andrea, simplemente por ser parte de mi vida, por acompañarme, por los momentos de risas y tristezas que hemos compartido, y que dan sabor a cada instante.

A Joel, por estar a mi lado, en cualquier circunstancia y bajo cualquier condición. Gracias porque durante este caminar, me dabas ánimo para seguir adelante, por ser un motor en mi vida e impulsarme a ser una mejor persona.

A Nayely porque con tu regreso hiciste más ligero este último tiempo en que no tenía ánimos para concluir. Fuiste un impulso en mi vida, gracias.

A Carlos, por ayudarme en mi desempeño, porque de ti aprendí cosas muy valiosas y que me han hecho crecer como persona. Gracias

A Paty, Laura, Adriana, Marce, Martha, Paco, Armando y Rubén, por sus consejos, apoyo, y tantas experiencias compartidas. Conocerlos ha sido un placer; tienen un lugar especial en mi corazón.

A todos mis compañeros del laboratorio Anaid, Sofía, Shere, Vianey, Dinorah, Fany, Stephany, Fátima, Diego, Itzel, Silvana, Marel, Fermin, Nayeli, Juan Carlos... todos han sido parte importante en mi crecimiento, aprendizaje. Es un gusto conocerlos y trabajar con ustedes.

Al reconocer a cada uno, me faltan palabras para expresar la gratitud por cada experiencia vivida. Cada momento compartido ha significado para mi crecimiento personal y profesional, madurez, y sobre todo, felicidad.

Finalmente, quiero agradecer muy especialmente a quien ha sido el sustento de mi vida. Gracias Dios por permitirme estar viva y lograr alcanzar los sueños que has puesto en mí. Gracias por todas las personas valiosas que están alrededor mío, por ser mi ayuda a través de ellos, y llenarme con abundancia de bendiciones a lo largo de mi camino.

Mecanismos de la inhibición del crecimiento tumoral en el modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano como consecuencia de la inhalación de vanadio.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Abstract.....	2
INTRODUCCIÓN	3
1. La contaminación ambiental.	3
1.1 La contaminación atmosférica.....	3
1.2 Las partículas suspendidas como contaminante ambiental.	4
1.3. Propiedades de las partículas suspendidas que intervienen en la generación de efectos adversos en el sistema respiratorio.....	5
2. El vanadio	6
2.1 Generalidades sobre el vanadio.	6
2.2 Toxicocinética y toxicodinamia del vanadio.	9
2.4 Exposición y toxicidad en el sistema respiratorio.	10
3. El cáncer pulmonar	11
3.1. Generalidades del cáncer pulmonar.....	11
3.2. El cáncer pulmonar asociado con la exposición a partículas suspendidas.....	12
3.3 La participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la activación de los mecanismos de apoptosis.....	13
3.3 Modelos de inducción química para el estudio del cáncer pulmonar.....	16
3.4 El modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano como herramienta útil para el estudio de la carcinogénesis pulmonar.....	17
3.5 Histología del pulmón.....	20
ANTECEDENTES	22
1. Distintos compuestos del vanadio y su relación con la carcinogénesis.....	22
2. Efectos del vanadio que influyen en su potencial anticarcinogénico.....	26
.JUSTIFICACIÓN	30
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
Hipótesis	31

Objetivos	31
Objetivo General	31
Objetivos Particulares.....	31
MÉTODO	33
Descripción de los Grupos Experimentales	33
1. Evaluación Morfométrica del tejido pulmonar	34
2. Cálculo de Índices de Proliferación en los adenomas pulmonares.	34
3. Marcadores de apoptosis en los adenomas pulmonares.	35
4. Técnica de TUNEL y cálculo de índices de apoptosis.	36
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS	38
1. La evaluación morfológica evidenció el desarrollo de adenomas pulmonares en los grupos tratados con uretano y uretano/V sin diferencias entre las dosis utilizadas.	38
2. El cálculo de índices de proliferación indica que la inhalación de vanadio no reduce la proliferación de los tumores.	40
3. Marcadores Pro y Anti-apoptóticos	41
3.1. Incremento de p53 por el tratamiento con pentóxido de vanadio, en el parénquima sano y en los tumores pulmonares, en el modelo de adenomas inducidos por uretano.	41
3.2. Incremento de Bax por el tratamiento con pentóxido de vanadio, en el parénquima pulmonar sano y en los tumores pulmonares, en el modelo de adenomas inducidos por uretano.	44
3.3. Incremento de Bcl2 por el tratamiento con uretano, en el parénquima pulmonar sano, en el modelo de adenomas inducidos por uretano.	47
4. El cálculo de los índices apoptóticos evidenció el incremento en la apoptosis en los tumores, de manera independiente a la dosis de pentóxido de vanadio inhalada.	49
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
CONCLUSIONES	57
PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS	58

Resumen

El cáncer pulmonar es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En la actualidad se ha encontrado que aproximadamente del 10 al 15% de los casos de cáncer pulmonar se presentan en no fumadores, y se asocian con factores ambientales. Uno de los elementos que ha cobrado importancia en las últimas décadas en el estudio de la carcinogénesis pulmonar es el vanadio, particularmente el pentóxido de vanadio (V_2O_5). Por un lado se conoce que este compuesto es un contaminante importante, que ha sido clasificado por la IARC como un posible carcinógeno en, aunque no existen datos contundentes al respecto.

En un estudio previo, encontramos que el V_2O_5 reduce el tamaño y el número de adenomas pulmonares inducidos por uretano en ratón. Esto sugiere que de alguna forma este compuesto desencadena mecanismos que disminuyen el desarrollo de estos tumores. Se sabe que ciertos compuestos de vanadio, principalmente sales, limitan la expresión de moléculas relacionadas con la proliferación celular (PCNA), así como inducen arresto del ciclo celular a través de la activación de p53, sobreexpresión de Bax, reducción de Bcl2 e incremento en la muerte por apoptosis. Estos efectos no han sido explorados con respecto al V_2O_5 .

El objetivo de este trabajo fue identificar los mecanismos por los que la inhalación de pentóxido vanadio en dos dosis distintas (0.01M y 0.02M) modifica la proliferación de tumores pulmonares, así como la presencia de marcadores proapoptóticos (p53, Bax) y antiapoptóticos (Bcl2), además de la muerte por apoptosis, en un modelo murino de adenomas pulmonares inducidos por uretano.

Los resultados observados demostraron que los tumores desarrollados fueron más grandes y abundantes en el grupo uretano que en los grupos que además de uretano inhalaron V_2O_5 . No se encontró diferencia significativa en cuanto a la proliferación (PCNA), pero se registró incremento de los marcadores proapoptóticos en los tumores. Bcl2 incrementó significativamente en los grupos de tratamiento simultáneo de uretano y vanadio únicamente en el parénquima pulmonar sano. En cuanto a la apoptosis, se registró incremento en los grupos tratados simultáneamente con uretano y vanadio. Para ninguno de los ensayos se detectaron diferencias en cuanto a las dosis utilizadas.

Es importante mencionar que este estudio evidencia el potencial del pentóxido de vanadio como agente proapoptótico y abre posibilidad de continuar siendo explorado como posible anticarcinogénico, al igual que otros compuestos del mismo metal. Cabe destacar que en otros estudios, el pentóxido de vanadio ha mostrado un potencial totalmente diferente, lo cual abre la posibilidad a seguir investigando los efectos de este compuesto para mostrar evidencias contundentes sobre el compuesto.

Abstract

Lung cancer is one of the first causes of death worldwide, and it has been associated to environmental exposure in no-smoking population, in 10 to 15% of the cases. Recently, vanadium pentoxide (V_2O_5) has been associated to lung carcinogenesis; this compound has been classified by IARC as a possible carcinogenic agent in animals but with not enough evidence for considering it as a human carcinogen.

In a previous study in urethane-associated adenomas in mice, we observed a decrease in the number and area of tumors in V_2O_5 exposed mice. That suggested vanadium induced mechanisms by which interferes with tumor's development. Some vanadium compounds restrict the expression of molecules associated to cell proliferation (PCNA) as well as increase apoptosis through p53 activation, Bax overexpression and Bcl2 suppression. In the case of V_2O_5 these mechanisms has not been clearly evaluated, and for this reason we decided to identify the mechanisms by which two concentrations of V_2O_5 [0.01M y 0.02M] decreased in mice, the urethane associated adenomas, also the expression of proapoptotic (p53, Bax), antiapoptotic (Bcl2), as well as apoptosis was studied.

Our results indicate that in the vanadium groups the tumor's size and area decreased compared with urethane treated mice. No differences were observed in PCNA, however, an increase in proapoptotic markers was evident. Bcl2 increment was noted only in the pulmonary parenchyma in vanadium-urethane groups. Apoptotic markers increased only in vanadium-urethane exposed groups. No differences among vanadium concentrations were recorded.

TUNEL assay indicate an increase in apoptotic cell death in urethane/vanadium groups adenomas, respect to control and urethane mice tumors.

Our results support the potential use of V_2O_5 , as well as other vanadium compounds, as pro-apoptotic agents and its possible use as an anticarcinogenic. Further studies are requiered to identify more vanadium compounds with this therapeutic potential, as well as the potential of vanadium pentoxide.

INTRODUCCIÓN

El planteamiento inicial del cual se originó este proyecto, surgió como una inquietud de evaluar el efecto de un contaminante ambiental de uso comercial en una patología que en últimas décadas ha sido relacionada con la contaminación.

En la introducción exponemos la relación entre la contaminación, el vanadio y el cáncer, con el fin de llevar al lector a la comprensión del papel de este interesante metal en el desarrollo de tumores pulmonares.

1. La contaminación ambiental.

1.1 La contaminación atmosférica

Los problemas de contaminación en la actualidad han adquirido mayor importancia dado que el deterioro ambiental que se observa se ha acentuado.

El Valle de México, Guadalajara, Monterrey, Toluca y Ciudad Juárez, entre otras, son claros ejemplos de metrópolis en las que el deterioro en la calidad del aire es uno de los principales problemas ambientales (Onursal y Gautam, 1997; Secretaria del Medio Ambiente, 2011). En cuanto al Valle de México, se considera que la **Zona Metropolitana** es una de las más contaminadas del mundo; esto debido a la gran cantidad de industrias y automóviles que circulan en ella, con el consecuente consumo de combustibles fósiles, así como sus condiciones geográficas (Riveros-Rosas et al., 1997; Rosales-Castillo, 2001; Espinosa et al., 2009).

La atmósfera corresponde a la mezcla de gases y pequeñas partículas líquidas y sólidas que envuelven a la tierra. Está formada por varias capas y sus principales componentes son el nitrógeno, el oxígeno y el agua. La contaminación del aire hace referencia a la presencia de cualquier materia o energía presente en la atmósfera que pueda causar un desequilibrio en la misma (Yang y Omaye, 2009). De acuerdo con la Ley Federal para el Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de 1988, la contaminación se define como “La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico” (Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, 1988).

Existen distintas clases de contaminantes atmosféricos, que, de acuerdo con su origen pueden ser naturales o antropogénicos. Los contaminantes naturales provienen de eventos como erupciones volcánicas, incendios accidentales y toda clase de procesos en los que el hombre no tiene intervención. Por otro lado, los contaminantes antropogénicos se originan directamente por actividades realizadas por el hombre (Onursal y Gautam, 1997; Jiménez-Cisneros, 2001).

Los contaminantes del aire son muy diversos, entre los que se incluyen: monóxido de carbono, compuestos de nitrógeno, hidrocarburos, compuestos de azufre, dióxido de carbono, cenizas y **partículas suspendidas**, entre otros (Secretaria del Medio Ambiente, 2011; Pérez et al., 2010).

De todos estos contaminantes, las partículas suspendidas son de importancia debido a la gran cantidad de efectos adversos que son capaces de producir en los organismos. Sobre esto se tratará más adelante.

1.2 Las partículas suspendidas como contaminante ambiental.

Las **partículas suspendidas** (PS) forman una mezcla compleja de materiales sólidos y líquidos, que pueden variar significativamente en tamaño, forma y composición, dependiendo fundamentalmente de su origen. Su tamaño varía desde 0.005 hasta 100 μm de diámetro aerodinámico (da). En conjunto se designan como Partículas Suspendidas Totales (PST) y al igual que cualquier contaminante, pueden originarse de fuentes naturales o antropogénicas. Las partículas que provienen de fuentes antropogénicas como la combustión y los procesos industriales son las que presentan la menor masa, pero las que provocan los efectos adversos más significativos en el organismo (Jiménez-Cisneros, 2001).

En cuanto a su tamaño, las partículas menores de 10 μm (PM10) son las que poseen la mayor capacidad de penetrar al sistema respiratorio (Jiménez-Cisneros, 2001) y se clasifican en fracciones: gruesa, fina y ultrafina. Especialmente las partículas de las fracciones **fina y ultrafina** son de importancia pues constituyen más de la mitad de la masa de las partículas que se encuentran suspendidas en la atmósfera (Brunekreef y Forsberg 2005), además de que pueden penetrar a lo largo del **sistema respiratorio**, y la región alveolar con gran eficiencia (Harrison y Yin, 2000). Estas partículas se emiten principalmente por la quema de combustibles como gasolina y diesel (Simkhovich et al., 2008).

La composición química de las PST es muy variable y depende de la fuente de emisión de estas. La fracción inorgánica de las partículas contiene hidrocarburos aromáticos, nitritos, sulfatos, fierro, plomo, y de manera importante, **metales de transición** (manganeso, zinc y vanadio) entre otros componentes. Por otra parte, la fracción orgánica corresponde esencialmente a un núcleo de carbono al que se adosan los elementos inorgánicos (Sorensen et al., 2005). Es de importancia enfatizar que la composición química de las partículas es un factor esencial que determina los efectos que estas producen en los organismos vivos (Harrison y Yin, 2000).

Distintos estudios demuestran la relación que existe entre la exposición a partículas suspendidas como parte de los contaminantes atmosféricos y el desarrollo de diversos efectos adversos en la población humana, principalmente en el sistema respiratorio y cardiovascular, con énfasis en el sistema respiratorio, por el ser el sitio de primer contacto con las partículas.

Las PS provocan la exacerbación de enfermedades respiratorias preexistentes tales como asma, bronquitis y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Brunekreef y Forsberg, 2005; Bonner, 2007). Por otro lado, en estudios recientes también se ha relacionado el riesgo de desarrollar **cáncer pulmonar** con la exposición a partículas suspendidas. Estudios epidemiológicos de cohorte realizados en Estados Unidos y Europa demuestran la relación entre la exposición prolongada a contaminación por partículas suspendidas finas (PM 10 y PM 2.5) y el incremento en la mortalidad por cáncer pulmonar, especialmente en combinación con otros factores de riesgo como son el tabaco y la exposición ocupacional a otros compuestos (Pope et al., 2002; Vineis et al., 2004; Gallus et al., 2008).

El sistema respiratorio es un sitio de interacción muy importante entre las partículas y el organismo. Publicaciones recientes han propuesto que el estrés oxidante y la inflamación inducida por el mismo, es una de las rutas principales por las cuales las partículas suspendidas inducen enfermedades respiratorias (Li et al., 2003, 2008), y estos efectos están ligados a las propiedades intrínsecas de las partículas, de lo cual se ahonda a continuación.

1.3. Propiedades de las partículas suspendidas que intervienen en la generación de efectos adversos en el sistema respiratorio.

Como se mencionó anteriormente, en distintos tipos de estudios, se sugieren diversas propiedades de las partículas suspendidas como factores que pueden influir sobre la toxicidad ejercida por las mismas. Las evidencias apuntan a que tanto el tamaño como la composición química de las partículas influyen en los efectos de éstas.

En cuanto al tamaño, los estudios toxicológicos apuntan hacia que entre más pequeña es la partícula, mayor será el potencial tóxico que posee (Harrison y Yin, 2000). Donaldson y McNee sugieren por ejemplo, que las **partículas ultrafinas** parecen poseer una mayor toxicidad y se puede explicar porque estas poseen una mayor capacidad de penetrar el intersticio pulmonar (Donaldson y McNee, 1998; Valavanidis et al., 2008). Los pulmones son capaces de retener hasta el 50% de partículas a las que se encuentran expuestos, del cual la mayor parte corresponde a partículas de la fracción fina y ultrafina y con ello, ser susceptibles a los efectos que estas puedan producirles (Valavanidis et al., 2008).

En cuanto a la composición química de las partículas finas y ultrafinas, que es muy variable, existe evidencia de que esta propiedad también es determinante en la toxicidad de éstas, y que los **metales de transición** son responsables de sus efectos tóxicos más importantes (Harrison y Yin, 2000; Valavanidis et al., 2008). Los metales de transición se encuentran adsorbidos en las cavidades de la superficie de las PS (Aust et al., 2002) y se considera que la biodisponibilidad y las propiedades oxido-reductoras de los mismos son importantes en la generación de los efectos tóxicos y el daño oxidante que provocan (Harrison y Yin, 2000; Aust et al., 2002; Valavanidis et al., 2008).

La exposición por inhalación a partículas y sus componentes es de especial importancia en las regiones altamente industrializadas y en donde existe una gran densidad de tráfico automotriz, dado que los combustibles fósiles de manera frecuente se componen de la mezcla de compuestos de carbono y metales (USEPA, 2004; Rodríguez-Salazar et al., 2011). Las partículas que proceden de la quema de combustibles fósiles como el petróleo y gasolina, contienen de manera más abundante metales de transición y otros como: el cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, vanadio, por mencionar algunos ejemplos.

Los breves antecedentes antes mencionados nos permiten identificar la relación que existe entre la exposición a los metales que forman parte de las partículas contaminantes y su relación con algunas patologías como el cáncer pulmonar.

En cuanto a estos metales, resalta el **vanadio** debido a que es un metal que está presente en los combustibles fósiles como el petróleo mexicano, por lo cual se libera a la atmósfera como parte de las partículas suspendidas surgidas de la quema de la gasolina, en forma de **pentóxido de vanadio (V₂O₅)**. Un estudio efectuado por Fortoul y cols. demostró la presencia de vanadio en tejido pulmonar de los habitantes de la Ciudad de México (Fortoul et al., 2002). Este estudio se retomará más adelante. Este metal es un importante compuesto al que estamos expuestos, y además ha cobrado interés en el área de la carcinogénesis por los efectos anti y pro carcinogénicos que ha mostrado, como se mencionará más adelante.

A continuación, describiremos las características del vanadio y el pentóxido de vanadio.

2. El vanadio

2.1 Generalidades sobre el vanadio.

El **vanadio (V)** corresponde a un metal de transición que se encuentra en la corteza terrestre con relativa abundancia (posición 22 entre los elementos de mayor abundancia). Es un micronutriente para numerosas especies marinas y terrestres, aunque para el ser humano no es así (Barceloux, 1999).

En la naturaleza, el vanadio no se encuentra en forma pura, dado que tiende a reaccionar con otros elementos. De manera natural, el vanadio se encuentra formando parte de diferentes minerales como la carnotita, patronita y vanadinita (Grayson 1983; ATSDR, 1997), además de ser un componente de rocas ricas en azufre y encontrarse en depósitos de petróleo crudo (ATSDR, 1997). Podemos encontrarlo en cuerpos de agua, en los que las concentraciones pueden variar dependiendo de la filtración que haya de las rocas hacia estos depósitos naturales de agua y de su cercanía con fuentes antropogénicas de este elemento (Barceloux, 1999).

Por otro lado, se encuentra también en pequeñas cantidades en ciertos alimentos como la pimienta negra, algunos hongos, espinacas y en mariscos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Existen entonces distintas fuentes de emisión de vanadio a la atmósfera, e incluyen fuentes naturales y antropogénicas (Figura 1). El reciclaje global de vanadio en la atmósfera implica su liberación a través de fuentes naturales y antropogénicas hacia el aire, el agua y el suelo (Barceloux, 1999).

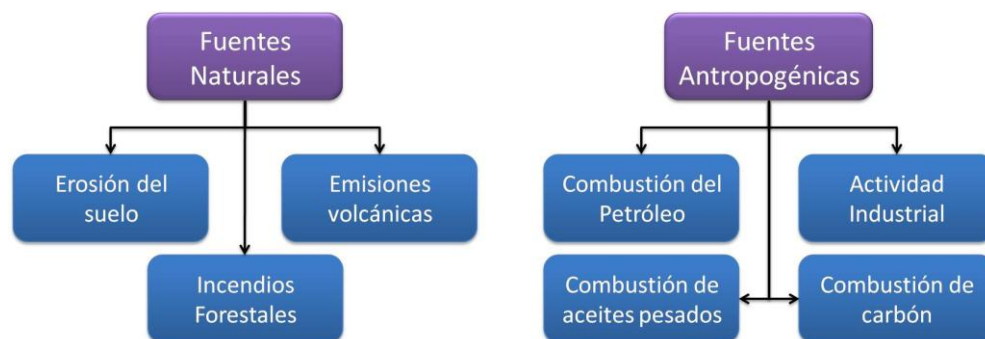


Figura 1. Las fuentes naturales incluyen la erosión del suelo, las emisiones volcánicas y los incendios forestales. Las fuentes antropogénicas, son las que constituyen la mayor emisión de vanadio a la atmósfera e incluyen la combustión de petróleo, aceites pesados y carbón, junto con la actividad industrial.

La liberación del vanadio a la atmósfera es principalmente consecuencia de la actividad humana, por lo que se puede considerar a este metal como un **contaminante ambiental**, principalmente en la forma de **pentóxido de vanadio**, que como ya se mencionó forma parte de las partículas

suspendidas. Se conoce que este metal está presente en los combustibles fósiles, como el petróleo. Los petróleos de América son los que contienen la mayor concentración de vanadio; en petróleos crudos provenientes de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1,180 $\mu\text{g/g}$, mientras que en la variedad maya de México, el contenido es de 243 $\mu\text{g/g}$ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Los niveles de vanadio en el ambiente dependen de las condiciones climáticas, la posición geográfica y el nivel de urbanización de la región, entre otros factores. En la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan 0.114 mg/m^3 en aeropartículas de 10 μm y 0.093 mg/m^3 en las de 2.5 μm (Gutiérrez-Castillo et al, 2006).

Por otro lado, existen reportes en los que se ha encontrado que la concentración de V ha incrementado, tanto en **muestras biológicas**, como en las **partículas suspendidas** en el aire que son retenidas en el tejido pulmonar de los habitantes de la Ciudad de México. En este estudio se reportan concentraciones de aproximadamente 1.38 $\mu\text{gV/g}$ de peso seco de pulmón en autopsias practicadas a residentes de la Ciudad de México que vivieron durante la década de los 90's, mientras que en la década de los 60's las concentraciones encontradas en los pulmones de los residentes de ese periodo fueron de 1.04 $\mu\text{gV/g}$ de peso seco de pulmón (Fortoul et al., 2002).

Desafortunadamente, en la actualidad, no existen datos que aporten más información sobre los niveles de vanadio a los que está expuesta la población mexicana.

Además de la exposición a este metal, y particularmente a pentóxido de vanadio, a través de las partículas suspendidas como forma de contaminantes ambientales, la exposición ocupacional es también importante. Se conoce que durante la limpieza de chimeneas, los trabajadores pueden estar expuestos a concentraciones de óxidos de vanadio (pentóxido) de hasta 50-100 mgV/m^3 que pueden llegar hasta una exposición a 500 mgV/m^3 , en las partículas que se liberan en el proceso (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999).

La OSHA (Occupational Safety and Health Administration) en Estados Unidos de Norteamérica ha establecido como límite permitido de exposición por inhalación a pentóxido de vanadio, concentraciones de 0.05-0.5 mg/m^3 , mientras que ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) también agencia norteamericana establece que el límite permitido es de 0.05 mg/m^3 - (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; OSHA, 2012). En México no existen límites de exposición permitidos para este compuesto.

Respecto de sus características químicas, este metal pertenece al grupo VB de la tabla periódica y sus estados de oxidación van desde -1 a +5 y generalmente pasa de un estado a otro a través de reacciones de óxido-reducción. Es de importancia resaltar que solo los tres estados con las valencias más altas (V^{+3} , V^{+4} y V^{+5}) tienen funciones biológicas reconocidas (Rehder, 2003; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Se sabe que un mayor estado de oxidación del vanadio en el compuesto, implica mayores efectos tóxicos causados por el mismo por lo que se considera al pentóxido de vanadio como el compuesto más tóxico. (Moskalyk y Alfantazi, 2003).

El vanadio posee una característica excepcional como biometal que consiste en que puede participar en los procesos biológicos como anión y como catión. En condiciones fisiológicas, el V^{V} predomina como anión vanadato (H_2VO_4^-) y V^{IV} como catión vanadil (VO^{2+}), aunque pueden presentarse otras especies de aniones y cationes. En un pH cercano de 7, el V^{III} se encuentra

exclusivamente en forma de catión V^{3+} y en el ambiente celular en forma de complejos. En condiciones básicas predomina el ión ortovanadato (VO_4^{3-}) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Ciertos complejos de vanadio como el vanadato, adoptan la estructura tetraédrica y la distribución de carga atómica del ión fosfato, por lo que se considera que es bioequivalente al fosfato (Scior et al., 2005), lo cual puede observarse en la figura 2. Por esta característica que se ha descrito, el vanadato es capaz de mimetizar al fosfato, reemplazándolo en los centros activos de diversas enzimas, propiciando su activación o inhibición, desencadenando distintos efectos celulares (Scior et al., 2005; Goc, 2006). Por otro lado, al ser estructuralmente similar al fosfato, el vanadato es susceptible de ingresar a las células a través de transportadores de fosfato localizados en la membrana plasmática (Davidson et al., 2007).

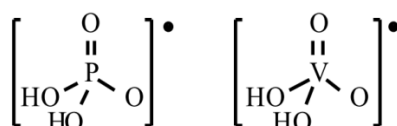


Figura 2. Geometría del fosfato, $H_2PO_4^-$ (izquierda) y del vanadato, $H_2VO_4^-$ (derecha).

Por ser un metal de transición el vanadio es capaz de producir especies reactivas de oxígeno que pueden contribuir a los efectos desencadenados por las partículas de carbono a las cuales se adosa. Dentro de las células se llevan a cabo reacciones que llevan a la formación de peroxovanadil, y vanadil hidroperóxido, además de radicales hidroxilo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

En cuanto a los usos comerciales generales que se le dan al vanadio, es utilizado en la industria metalúrgica y en la manufactura de aleaciones de alta resistencia; forma parte de las amalgamas con aluminio, cromo, níquel, entre otros. Se utiliza además en la preparación de vidrio, pinturas, colorantes para fotografía y cinematografía. En la agricultura se utiliza para fabricar insecticidas, fungicidas y como micronutriente en fertilizantes; se utiliza también en la producción de ácido sulfúrico y caucho sintético (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Respecto a usos farmacológicos, en la última década distintos compuestos orgánicos e inorgánicos de vanadio han adquirido importancia especial en esta área. Las sales de vanadio como el metavanadato de amonio, metavanadato de sodio, ortovanadato de sodio y vanadil sulfato, que se han probado como agentes insulino-miméticos y anticarcinogénicos en modelos experimentales, así como anabólicos (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999; Rehder, 2003; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Bishayee et al., 2010).

El **pentóxido de vanadio (V_2O_5)** es el compuesto de mayor uso comercial y que además se considera un contaminante ambiental, como ya se había mencionado con anterioridad (WHO, 2001; Piñon-Zarate et al., 2008). Se ha reportado que la exposición crónica a V_2O_5 puede ocasionar inflamación en diversas estructuras del sistema respiratorio como los bronquios y la tráquea, además de irritación de los ojos y la piel y edema pulmonar, entre otros efectos (Moskalyk y Alfantazi, 2003; Cooper, 2007), además de que la exposición a este compuesto se ha asociado con el desarrollo de adenomas y adenocarcinomas pulmonares (Ress et al., 2003), sobre lo cual se profundizará más adelante.

2.2 Toxicocinética y toxicodinamia del vanadio.

La presencia de vanadio en la atmósfera es resultado de la quema de combustibles fósiles y las principales rutas de exposición a este metal para la población general son la vía oral y la aérea, mientras que en los trabajadores ocupacionalmente expuestos a polvos y humos que se producen en la combustión de petróleo, carbón y aceites, la principal vía de exposición es la aérea (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999). La absorción de vanadio depende de la ruta de administración y de la solubilidad del compuesto. La principal ruta de absorción de este metal es a través de la vía aérea (~ 25%), mientras que la vía gastrointestinal (~ 5-10%) ocupa un lugar secundario. La piel es la menor ruta de exposición y absorción (Figura 3) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

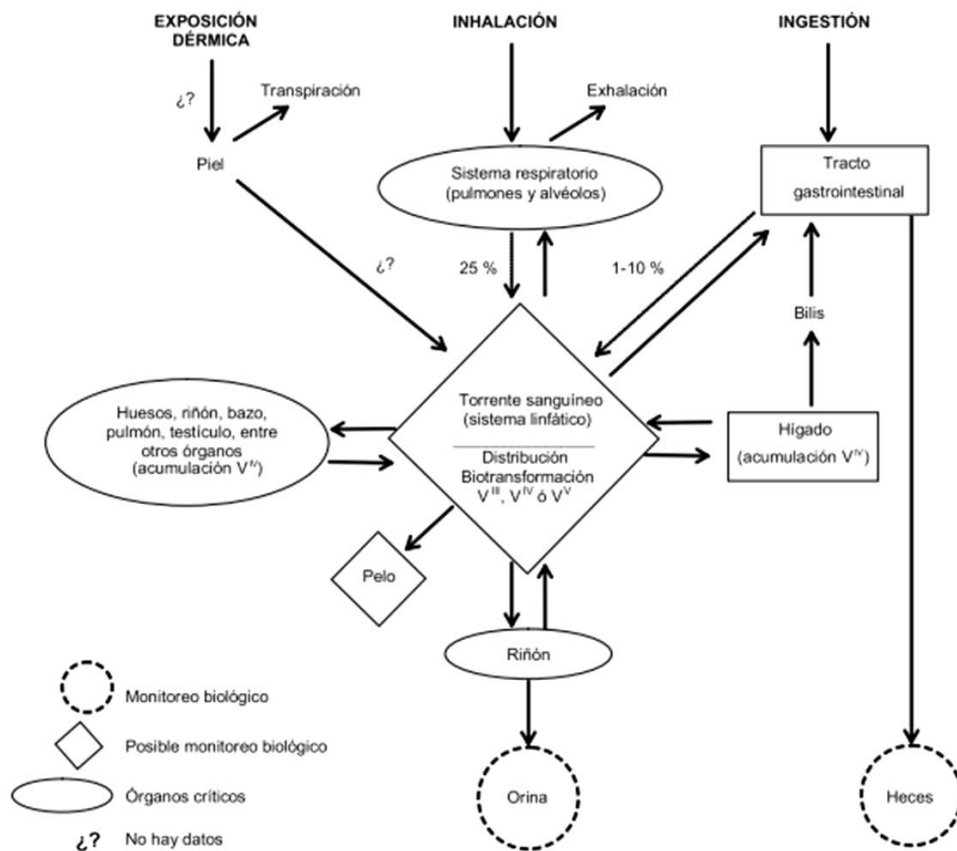


Figura 3. Toxicocinética del vanadio. La inhalación consiste en la ruta a través de la cual se absorbe la mayor parte del vanadio, seguida de la ingestión. La exposición dérmica constituye una vía en la que la absorción es despreciable. Tomada de Rodríguez-Mercado J.J, Altamirano-Lozano, M. 2006. Vanadio: Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad.

Se ha estudiado ampliamente la biocinética del vanadio en estados de oxidación IV y V, lo cual resulta muy útil para nuestro modelo, en el que el vanadio se administra en estado de oxidación V.

Una vez que el vanadio ha entrado en el organismo, es transportado a los tejidos a través del torrente sanguíneo. En el torrente sanguíneo, el 90% del vanadio que es absorbido, se une a

ciertas proteínas que lo transportan como la albúmina y la transferrina. Los complejos de vanadio se transforman, a través de reacciones de óxido-reducción, en iones **vanadil** y **vanadato** dentro de los tejidos y ambas formas (catiónica y aniónica, respectivamente) son distribuidas en el organismo, concentrándose en hueso, pulmones, riñones, bazo e hígado (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999; Goc, 2006).

El V^V , como se encuentra en el pentóxido de vanadio, es reducido a V^{IV} por el glutatión de los eritrocitos, o por el ácido ascórbico, las catecolaminas y otras sustancias reductoras del plasma (Redher, 2003). Se tiene bien establecido que el V^V entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico, principalmente por los canales de fosfato (Davidson et al., 2007). En el interior de la célula, el V^V puede ser nuevamente reducido a V^{IV} por el glutatión (Goc, 2006). Independientemente de la forma en que se administre, el vanadio se acumula como V^{IV} (VO^{2+}) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

La mayor parte del vanadio es eliminado a través de la orina y las heces, en dos fases (**eliminación bifásica**). Los estudios indican que el riñón elimina aproximadamente del 40-60% del vanadio absorbido dentro de los primeros tres días de absorción (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999). Esta primera eliminación corresponde a una fase de eliminación rápida inicial, que es seguida de una eliminación más prolongada dentro de los 40-50 días siguientes (Goc, 2006; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Existen reportes que indican que algunos órganos tardan más tiempo en remover el V y por lo tanto permanece más tiempo en ellos, prolongando los posibles efectos tóxicos que produce en ellos. Estos órganos son el hueso, los músculos y los pulmones (Elinder et al., 1988; French y Jones, 1993).

2.4 Exposición y toxicidad en el sistema respiratorio.

La vía aérea constituye una ruta muy importante en cuanto a la exposición y absorción de V, sobre todo de V_2O_5 que es el principal compuesto al que estamos expuestos a través de esta ruta, y que inhalamos adherido a las partículas (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Fortoul et al., 2011).

En la población humana, la exposición aguda a polvos de distintos compuestos de vanadio puede producir irritación nasal, rinitis, irritación de los ojos, irritación de la garganta, tos persistente, bronquitis y bronconeumonía (Toya et al., 2001). La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis (Bonner et al., 2000; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Trabajadores expuestos a concentraciones aproximadas de 0.05 y 5.3 mg/m^3 desarrollaron irritación severa en el tracto respiratorio con disnea, tos y dolor en el pecho. Pruebas posteriores de función pulmonar indicaron la posibilidad de un efecto obstructivo en las vías aéreas bajas (Levy et al., 1984).

En modelos experimentales *in vivo*, la exposición a compuestos de vanadio produce traqueítis, bronquitis, bronconeumonía, enfisema, edema pulmonar e inflamación (Toya et al., 2001).

Numerosos estudios han evaluado los efectos de la exposición a corto plazo a este compuesto en primates, roedores y humanos. Estos estudios demuestran que la exposición a este compuesto

produce alteración de la función pulmonar en monos, presencia de células inflamatorias en lavado bronquial de ratas y monos, además de cambios fibróticos en los pulmones de ratas expuestas a la inhalación o instilación de este compuesto (Knecht et al., 1985; Bonner et al., 1998, 2000).

En ratas y ratones expuestos por tres meses a concentraciones de aproximadamente 2 mg/m³ a 16 mg/m³ de pentóxido de vanadio, incrementa la inflamación y la hiperplasia epitelial, mientras que en ratas expuestas a 4 mg/m³ se presenta fibrosis (NTP, 2002).

Por otro lado, Ress y colaboradores reportaron en un estudio realizado para el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos de Norteamérica (NTP) el potencial carcinogénico del pentóxido de vanadio. Este estudio demuestra que después de una exposición crónica de 2 años, este compuesto propició el desarrollo de adenomas y carcinomas bronquioalveolares en los pulmones de ratas macho, y ratones macho y hembra (Ress et al., 2003). Además indujo lesiones inflamatorias y proliferativas en el tracto respiratorio (Tabla 1). En cuanto a este estudio, existen algunas incongruencias, respecto de las cuales se hablará en los antecedentes.

Tabla 1. Estudios en los que se evalúa el efecto pro-carcinogénico del Pentóxido de Vanadio.

Compuesto (s)	Dosis	Vía de exposición	Especie	Efecto identificado	Autor, año
Pentóxido de Vanadio (V ₂ O ₅)	0, 0.5 mg/m ³ en ratas 1, 2, ó 4 mg/m ³ en ratones	Inhalada	Ratas machos y hembras F344/N Ratones machos y hembras B6C3F 1	Desarrollo de adenomas y carcinomas bronquioalveolares en ratas macho y ratones hembra y macho. Lesiones proliferativas e inflamatorias en el tracto respiratorio de ambas especies.	Ress et al., 2003

Es claro, hasta este momento, que los efectos reportados ocasionados por el pentóxido de vanadio son adversos sobre el sistema respiratorio. De esta idea, surgió el interés por evaluar los efectos de este compuesto en el desarrollo de cáncer pulmonar, que nos llevo a obtener hallazgos interesantes en un estudio previo y del cual se originó el presente proyecto.

3. El cáncer pulmonar

3.1. Generalidades del cáncer pulmonar.

El cáncer pulmonar es uno de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. Antes del siglo XX, el cáncer de pulmón constituía una entidad patológica rara, pero a partir de la década de los 30's del siglo pasado su frecuencia ha incrementado (Samet, 1993; Youlden et al., 2008).

A nivel mundial, el cáncer pulmonar y de bronquios ocupa el primer lugar como causa de mortalidad en los hombres y el segundo lugar en mujeres (Jemal et al., 2011). De acuerdo con los últimos datos de mortalidad registrados por el Instituto Nacional de Estadística y de Geografía, los tumores malignos ocupan el tercer lugar como causa de mortalidad general en México. Los últimos registros epidemiológicos de la Secretaría de Salud señalan que la mortalidad general por tumores malignos tiene como primer exponente al tumor maligno de tráquea, bronquios y

pulmón, seguido por el de estómago y en tercer puesto el de próstata. Cabe destacar que esta patología presenta diferencias en cuanto a la mortalidad por género, en los hombres la mortalidad por cáncer de pulmón ocupa el segundo lugar, mientras que en mujeres ocupa el quinto lugar (INEGI, 2011; Secretaría de Salud, 2011).

En cuanto a la histopatología del cáncer pulmonar, los cuatro tipos más comunes de cáncer pulmonar son el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma, el carcinoma de células grandes y el carcinoma indiferenciado de células pequeñas. En las últimas décadas, el cáncer pulmonar ha presentado modificación en el tipo histológico más común. Distintos estudios reportan un incremento en la frecuencia de adenocarcinoma, siendo el tipo histológico más importante en la actualidad (Molina-Alavez et al., 2008). Es importante señalar que el adenocarcinoma corresponde al tipo de cáncer de pulmón más común que se presenta en personas no fumadoras (Suda et al., 2011; Yano et al., 2011).

El factor de riesgo más importante en el desarrollo de esta enfermedad es el tabaquismo, cuya relación con el cáncer pulmonar ha sido estudiada a lo largo de varias décadas. Sin embargo, no todos los casos de cáncer pulmonar están relacionados con este hábito, y es probable que en el futuro, el número de casos de cáncer pulmonar en no fumadores incremente considerablemente debido al incremento de la contaminación principalmente (Youliden et al., 2008). Se ha reportado que aproximadamente el 25% de los casos de cáncer pulmonar ocurren en no fumadores, implicando otros factores importantes en el desarrollo de la patología como factores genéticos, ocupacionales y/o ambientales (Samet et al., 2009; Rondini et al., 2010; Lee et al., 2011).

La relación entre los factores ambientales y la mortalidad por cáncer pulmonar se ha explorado ampliamente. Dentro de estos destacan la exposición pasiva al humo de tabaco, la exposición ocupacional a distintos compuestos como el radón, asbesto, arsénico, sílice, hidrocarburos aromáticos, exposición a contaminantes ambientales como las partículas suspendidas, entre otros (Sun et al., 2007; Samet et al., 2009; Clément-Duchêne et al., 2010).

Destacan las partículas suspendidas como parte de los contaminantes ambientales respecto de los cuales se encontrado evidencia epidemiológica de su relación con el incremento de la mortalidad por cáncer pulmonar. Diversos estudios sugieren que la exposición prolongada a niveles elevados de partículas suspendidas incrementa el riesgo y la mortalidad del cáncer pulmonar (Dockery et al., 1993; Barbone et al., 1995; Pope et al., 1995, 2002). Sobre este tópico profundizamos en la siguiente sección.

3.2. El cáncer pulmonar asociado con la exposición a partículas suspendidas.

El primer factor de riesgo con el que se relaciona al cáncer pulmonar es el tabaquismo. Sin embargo, en últimas décadas se sabe que en América, aproximadamente del 15 al 25% de los casos reportados de cáncer pulmonar se debe a otros factores, como la exposición a contaminantes, más que al hábito de fumar (Samet et al., 2009).

La contaminación atmosférica es una mezcla compleja de componentes, pero los principales contaminantes atmosféricos son sobre todo las partículas suspendidas (PS) provenientes de fuentes industriales y del transporte, como ya se ha mencionado con anterioridad (Omori y Katoh, 2011). Estas partículas son de particular importancia por la capacidad que poseen de penetrar

hasta las regiones más profundas del sistema respiratorio, y provocar efectos adversos en este (Dockery, 2009).

Con anterioridad enfatizamos algunos de los efectos adversos asociados a la exposición a partículas suspendidas que se han reportado en el sistema respiratorio: síntomas en las vías respiratorias altas como tos crónica, exacerbación de bronquitis crónica y asma, aparición de bronquitis crónica y EPOC, además de cáncer pulmonar (Pope et al., 1995; Kunzli y Tager, 2005; Valavanadis et al., 2008).

No es claro cuál de los componentes de las partículas suspendidas es responsable de sus efectos biológicos, dada la compleja mezcla de elementos que las componen, sin embargo se plantea que los metales de transición que forman parte de ellas son los principales responsables de estos efectos.

Las evidencias sugieren que estos metales de transición que constituyen a estas partículas que inhalamos, son capaces de inducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Becker et al., 1996; Prahalad et al., 1999; Sorensen et al., 2005; Lewtas, 2007). Estas mismas especies generadas en reacciones como la de Fenton, que implica la reducción del peróxido de hidrógeno por un metal de transición, con la consecuente generación de radicales hidroxilo, activan factores de transcripción que inducen la liberación de mediadores inflamatorios y provocan daño en el pulmón, lo cual puede contribuir al desarrollo de distintos factores adversos, entre los que podemos destacar la muerte de las células pulmonares (Upadhyay et al., 2003).

Al activar las vías de muerte celular, las especies reactivas podrían interferir con el desarrollo de la carcinogénesis. Este efecto se ha demostrado en estudios en los que las especies reactivas de oxígeno promueven la muerte celular por apoptosis de líneas celulares pulmonares cancerosas. Estos resultados se han asociado con la generación de ROS que alteran la función mitocondrial, y llevan a la muerte celular (Prahalad et al., 1999; Alfaro-Moreno et al., 2002; Upadhyay et al., 2003; Sydlik et al., 2006).

A continuación se trata más acerca de la activación de la apoptosis por efecto de las ROS producidas por las partículas suspendidas.

3.3 La participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la activación de los mecanismos de apoptosis.

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) son radicales libres (ej. radical hidroxilo y radical superóxido), así como otras moléculas que poseen electrones desapareados (ej. O_2^- y H_2O_2) que son altamente reactivas y pueden interactuar y reaccionar con macromoléculas como las proteínas y el DNA, modificando su estructura y función (Engel y Evens, 2006).

En el caso del pulmón, las fuentes de ROS son diversas, e incluyen a las células epiteliales pulmonares, células endoteliales y de manera muy importante las células inflamatorias, especialmente neutrófilos y macrófagos (Kinnula et al., 1991).

Diversos estudios reportan la muerte por apoptosis de células pulmonares por la exposición a partículas suspendidas. Por ejemplo, Alfaro-Moreno y colaboradores reportan que la exposición

de células alveolares de la línea A549 a partículas suspendidas colectadas de tres distintos puntos de la Ciudad de México incrementa la muerte por apoptosis de estas células (Alfaro-Moreno et al., 2002). Por otro lado, Hetland y cols. demuestran en un estudio que la exposición de células alveolares tipo II de pulmón de rata, a distintas fracciones de partículas suspendidas (burdas, finas y ultrafinas), propicia la apoptosis, de manera dosis dependiente. Este mismo efecto se reporta en el mismo estudio en la línea A549 de células alveolares humanas (Hetland et al., 2004). En este estudio se asocia la activación de la muerte en estas células con el daño propiciado por las células inflamatorias.

En otros estudios se relaciona la inducción de este tipo de muerte propiciado por la exposición a partículas suspendidas, con la generación de estrés oxidante. En estos estudios, se demuestra que las partículas suspendidas son capaces de inducir apoptosis en distintas células dentro del pulmón, y este efecto se plantea está relacionado con el estrés oxidante que producen (Pralhad et al., 1999; Upadhyay et al., 2003; Sydlik et al., 2006). Por ejemplo, Sydlik y colaboradores demostraron que la exposición de células epiteliales alveolares a partículas ultrafinas (ultrafine carbon black uFCB), induce la muerte por apoptosis por efecto del incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Sydlick et al., 2006).

Al hablar de la apoptosis, debe quedar claro que es un tipo de muerte celular altamente regulada, que desempeña un papel esencial en la prevención de crecimientos malignos en los distintos órganos (Uhal, 1997; Johnstone et al., 2002).

Existen dos vías a través de las cuales se regula la apoptosis: (a) la vía intrínseca regulada por la mitocondria y (b) la vía extrínseca inducida la activación de receptores de muerte a través de ligandos, tales como TNF- α o FasL y la consecuente activación de la caspasa 8 (Upadhyay et al., 2003).

La vía intrínseca inicia por la disrupción de la mitocondria, por ejemplo como una alteración en el potencial de la membrana, que resulte en la liberación del citocromo C al citoplasma (Desagher y Martinou, 2000; Danial y Korsmeyer, 2004). La liberación del citocromo C se requiere para el ensamblaje del apoptosoma que está formado por Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) y la procaspasa 9, que se activa posteriormente a caspasa 9. La disrupción de la mitocondria está regulada por proteínas de la familia BCL-2. La familia Bcl de proteínas antiapoptóticas (ej. Bcl-2 y Bcl-xl) intervienen a nivel de la membrana mitocondrial para prevenir la apoptosis a través de la inhibición del cambio en el potencial de la membrana y la subsecuente liberación de citocromo C hacia el citoplasma (Desagher y Martinou, 2000). Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas (ej. Bax, Bad y Bid) se translocan del citosol a la membrana mitocondrial, y se insertan en ella, formando poros, con la subsecuente liberación de citocromo C al citoplasma. Esta liberación induce la muerte celular por activación de caspasas (Eskes et al., 1998; Desagher y Martinou, 2000).

La vía extrínseca de activación de la apoptosis se activa a través de receptores específicos de membrana (receptores de muerte) como los receptores Fas/CD95, los cuales son activados por su ligando, para posteriormente reclutar moléculas de andamiaje y activar a la caspasa 8. La activación de esta caspasa, junto con la 9, activa a otras caspasas efectoras como la 3, 6 y 7, que efectúan el rompimiento de proteínas en la célula. La activación completa de la vía extrínseca requiere también de la activación de la vía intrínseca (Pore et al., 2010).

En cuanto a la relación de la activación de la apoptosis con la generación de especies reactivas de oxígeno, se ha demostrado que las ROS son capaces de actuar directamente sobre la mitocondria y/o activar receptores de muerte en la superficie de la célula, desencadenando la iniciación de la apoptosis (Li et al., 2003; Ozben 2006). El daño oxidante que ocurre como consecuencia de la exposición a partículas y sus componentes, constituye un potente estímulo de disfunción mitocondrial, con lo que se activa la vía intrínseca de la apoptosis. Esta disfunción se traduce como un cambio en el potencial de membrana de este organelo, seguido de la liberación de citocromo C del espacio intermembrana hacia el citoplasma (Pralhad et al., 1999; Knaapen et al., 2002). La disrupción del transporte de electrones en la mitocondria puede además promover el aumento en la producción de ROS, y amplificar el estímulo apoptótico (Desagher y Martinou, 2000, Engel y Evens, 2006).

Es interesante comentar que muchos estudios revelan, que comparadas con las células normales, las células cancerosas poseen niveles elevados de ROS (Toyokuni et al., 1995; Trachootham et al., 2009). Los niveles elevados de estrés oxidante en estas células puede promover la progresión de la carcinogénesis; sin embargo, también pueden ser tóxicos para estas células, haciéndolas vulnerables a los daños inducidos por agentes externos y llevarlas a la muerte (Pelicano et al., 2004). Los niveles de ROS están determinados por las tasas de generación y eliminación de las mismas, por lo que la acumulación de estas especies en las células cancerosas puede llevar a daño oxidante y la posterior activación de la muerte celular (Trachootham et al., 2009).

Estas especies reactivas no solo son generadas por las propias células cancerosas; el infiltrado de fagocitos inflamatorios que se encuentran generalmente alrededor de los tumores generan también grandes cantidades de especies reactivas que afectan a las células tumorales (Ozben, 2006).

Una de las proteínas centrales en la regulación de la apoptosis, además del mantenimiento de la integridad genómica es la proteína p53, cuya actividad es susceptible de ser modulada por los niveles de estrés oxidante (Liu et al., 2008; Trachootham et al., 2009). En respuesta a estrés celular que propicie el daño al DNA, p53 regula la transcripción de diversos genes relacionados con el arresto del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis. Se conoce que el estrés oxidante está asociado con la regulación del arresto del ciclo celular y la apoptosis dependiente de p53. En células de mamífero que no se encuentran bajo un estímulo de estrés, los niveles de esta proteína son bajos y se mantienen así por continua ubiquitinización de esta proteína, catalizada por Mdm2. Estudios recientes demuestran que los niveles hiperfisiológicos y fisiológicos de p53 producen distintos efectos en el estado redox de la célula, ya sea a través de la regulación directa de la expresión de genes pro-oxidantes o anti-oxidantes, o a través de la modulación del metabolismo celular; Consecuentemente, los niveles de ROS pueden modular la actividad de p53 de distintas maneras (Liu et al., 2008).

Bajo condiciones de estrés, incluyendo el oxidante, una fracción de p53 (~ 2%) se mueve hacia la mitocondria e inicia el proceso de apoptosis (Marchenko et al., 2000; Essmann et al., 2005). Una vez en la mitocondria, p53 se une a MnSOD inhibiéndola, desempeñando un papel directo en la promoción de la formación de ROS y desencadenando eventualmente la apoptosis (Zhao et al., 2005).

Existen diferentes vías que integran el estado redox de la célula con la señalización de p53, lo cual puede llevar a distintas respuestas finales en la célula, como las mencionadas con anterioridad. Esto es una herramienta muy útil en la eliminación de las células tumorales, por ejemplo la

generación excesiva de ROS en la mitocondria resulta del tratamiento con agentes quimioterapéuticos que lleva a la apoptosis (Liu et al., 2008; Trachootham et al., 2009).

En otros estudios se han implicado a las ROS en la fosforilación de p53 a través de la vía de las MAPK's como p38, ATM y ERK, lo cual activa a esta proteína para la transcripción de sus genes blanco (Bragado et al., 2007; Kurz y Lees-Miller, 2004). La activación de p53 induce la transcripción de numerosos genes entre los que destacan aquellos implicados directamente en el arresto y muerte celular:

- p21 que induce el arresto del ciclo celular a través de la inhibición de la actividad de CDKs (Cinasas Dependientes de Ciclinas). La activación de p53 mediada por daño en el DNA induce el arresto del ciclo celular en G1; si el daño no se puede reparar la célula entra en apoptosis (Ozben, 2006).
- PUMA, BAX, BAK y receptores de muerte que son productos de genes pro-apoptóticos, que pueden activar tanto la vía intrínseca como extrínseca (Zuckerman et al., 2009). Estos genes además se consideran pro-oxidantes porque inducen el desacople de la mitocondria, resultando en una mayor producción de ROS (Sablina et al., 2005).

Todos lo que hemos mencionado en este apartado nos permite darnos cuenta de la estrecha relación entre la inducción de la muerte por apoptosis y la generación de estrés oxidante, a través de p53 como el principal regulador de este tipo de muerte, tanto en células normales como en cancerosas. Por otro lado queda en evidencia la compleja regulación de este mecanismo a través de la participación de distintas proteínas, cuya expresión puede ser modificada, alterando los resultados finales en las células.

3.3 Modelos de inducción química para el estudio del cáncer pulmonar.

Los modelos de cáncer pulmonar en animales, y sobre todo en roedores, son de gran utilidad en el estudio de esta patología. Los adenomas producidos en modelos murinos se han usado de manera importante como una forma de aproximación a los modelos de adenocarcinomas pulmonares humanos, dado que proveen una herramienta útil en el estudio de los eventos moleculares implicados en la carcinogénesis (Mason et al., 2000).

Los tumores que se originan en los ratones son similares en características morfológicas, histopatológicas y moleculares, a los adenocarcinomas humanos. Por esta razón, los modelos en ratón constituyen un instrumento útil, no solo para el entendimiento de la biología básica del tumor, sino también en el desarrollo y validación de nuevas estrategias de intervención e identificación de marcadores para un diagnóstico temprano (Meuwissen y Berns, 2005).

En la actualidad se utilizan distintos tipos de modelos animales en el estudio del cáncer pulmonar. Estos modelos incluyen tumores inducidos químicamente, modelos de animales transgénicos, modelos con cepas susceptibles a desarrollar tumores espontáneos y xenógrafos de tumores humanos (Hahn et al., 2007; Wakamatsu et al., 2007; Liu y Johnston, 2009).

Los modelos de tumores espontáneos e inducidos químicamente son los que representan de una manera más próxima las características clínicas de la patología. La ventaja de estos modelos es que se pueden reproducir los eventos naturales que llevan al desarrollo del cáncer pulmonar. Muchos de los estudios que se llevan a cabo con este tipo de modelos en ratas y ratones son muy similares en sus características histológicas y moleculares al cáncer pulmonar humano (Meuwissen y Berns, 2005; Liu y Johnston, 2009).

Las cepas de ratones que se utilizan para los distintos estudios presentan susceptibilidades distintas a desarrollar tumores, y esto constituye incluso una herramienta útil para estudiar el efecto de ciertos carcinógenos y promotores de la carcinogénesis. Las cepas A/J y SWR son cepas altamente susceptibles a desarrollar tumores espontáneos y su respuesta a la inducción química es también muy alta. Existen cepas de susceptibilidad intermedia como las O20, BALB/c y CD1; otras cepas presentan cierta resistencia (CBA y C3H), mientras que existen algunas completamente resistentes (C57BL/6 y DBA) (Meuwissen y Berns, 2005).

La inducción de tumores pulmonares por medio de carcinógenos químicos en estas cepas se puede reproducir de manera sencilla, con la obtención de resultados casi invariables en adenomas y adenocarcinomas (Shimkin y Stoner, 1975; Malkinson, 1989; Meuwissen y Berns, 2005).

Los carcinógenos más potentes probados en estos modelos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas y el etil carbamato (uretano). Luego del tratamiento con el carcinógeno se presenta una disminución transitoria de la proliferación de las células de Clara y las células alveolares tipo II. Posteriormente, el número de células se recupera y pronto sobrepasa el número de células. En una fase inicial se detectan focos hiperplásicos en los bronquiolos y los alveolos (Foley et al., 1991). Muchos de estos focos, aunque no todos, se desarrollan como adenomas que finalmente, después de varios meses, serán adenocarcinomas *in situ*. La latencia y el número de tumores desarrollados dependerá de la susceptibilidad de la cepa de la que se trate (Miller et al. 2000).

Las características moleculares de los tumores espontáneos e inducidos por carcinógenos revelan varias alteraciones genéticas comunes que consisten en la activación de oncogenes como K-Ras y C-Myc (Re et al. 1992; Li et al., 1994), así como la inactivación de genes supresores de tumores como Trp53, APC, Rb, Mcc, Cdkn2a y Fhit (Malkinson, 2001).

3.4 El modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano como herramienta útil para el estudio de la carcinogénesis pulmonar.

El etil carbamato (EC), también conocido como uretano, es un producto que se forma de manera espontánea durante la fermentación del vino por parte de las levaduras. En este proceso, se forma urea, la cual puede ser liberada de la célula y después reabsorbida por esta misma para utilizarla como fuente de nitrógeno. Al ser reabsorbida, la urea lleva a cabo una reacción con etanol, la cual resulta en la producción de EC (Forkert, 2010).

Diversos alimentos y bebidas, tales como el yogurt, el pan, la salsa de soya, los brandies (de frutas como cerezas y melocotón), los vinos de mesa y la cerveza contienen pequeñas cantidades de uretano. En todos los casos las cantidades de EC son de nanogramos, aunque en los brandies frutales las cantidades pueden variar hasta 20.2 mg/g y constituyen una vía de exposición importante a este compuesto, aunque no la única (IARC, 2010; Forkert, 2010).

En décadas pasadas, el etil carbamato fue utilizado en el tratamiento de venas varicosas, leucemia y mieloma múltiple (IARC, 1974). Desde la década de los 50's hasta los 70's del siglo pasado, el uretano se administró también como cosolvente en fármacos sedantes y analgésicos (Nomura, 1975; Miller, 1991). Comercialmente este compuesto se ha utilizado como cosolvente en plaguicidas, fumigantes y cosméticos (Benson y Beland, 1997). El etil carbamato es además un constituyente del tabaco en concentraciones que van desde los 310 a 375 ng/g (Forkert et al., 2007).

Se ha demostrado que este compuesto es capaz de producir tumores, tanto benignos como malignos, en distintos órganos. En ratones es capaz de producir adenomas en pulmón, piel, hígado, mama y tejido linfoide (Nettleship et al., 1943; Salaman y Roe, 1953; Tannenbaum, 1964). El pulmón ha mostrado ser un órgano con una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores inducidos por este compuesto, ya que el periodo de generación de los mismos en este órgano es de 2 a 6 meses, mientras que en otros tejidos toma hasta un periodo de un año (Mirvish, 1968; Shimkin y Stoner, 1975).

La carcinogenicidad del EC ha sido probada además en distintas especies como ratas, ratones, hámsteres y monos, por lo que se considera como un compuesto carcinógeno bien establecido en animales. La IARC lo ha clasificado como "probable carcinógeno en humanos", dentro del grupo 2A (IARC, 2010), el Programa Nacional de Toxicología (NTP) de los Estados Unidos lo considera como "razonablemente anticipado a ser un carcinógeno en humanos" (NTP, 2000).

Por sus características, este compuesto ha sido muy utilizado en la generación de adenomas pulmonares con la finalidad de describir características bioquímicas, genéticas y sobre mecanismos de la carcinogénesis pulmonar (Mason et al., 2000). Se considera que la activación metabólica del EC es un requisito para inducir el desarrollo de tumores (Hoffler et al., 2003). El metabolismo del uretano ha sido bien estudiado en modelos animales como el ratón, en donde se ha establecido que se lleva a cabo a través de dos vías principales:

La primera vía del metabolismo del uretano es catalizada por una esterasa, lo que lleva a la formación de dióxido de carbono (CO_2), etanol y amoníaco (NH_3). La segunda vía es a través del metabolismo oxidativo por medio de varias enzimas de la superfamilia citocromo P450 (CYP450) y corresponde a la ruta de bioactivación de este compuesto (Figura 4).

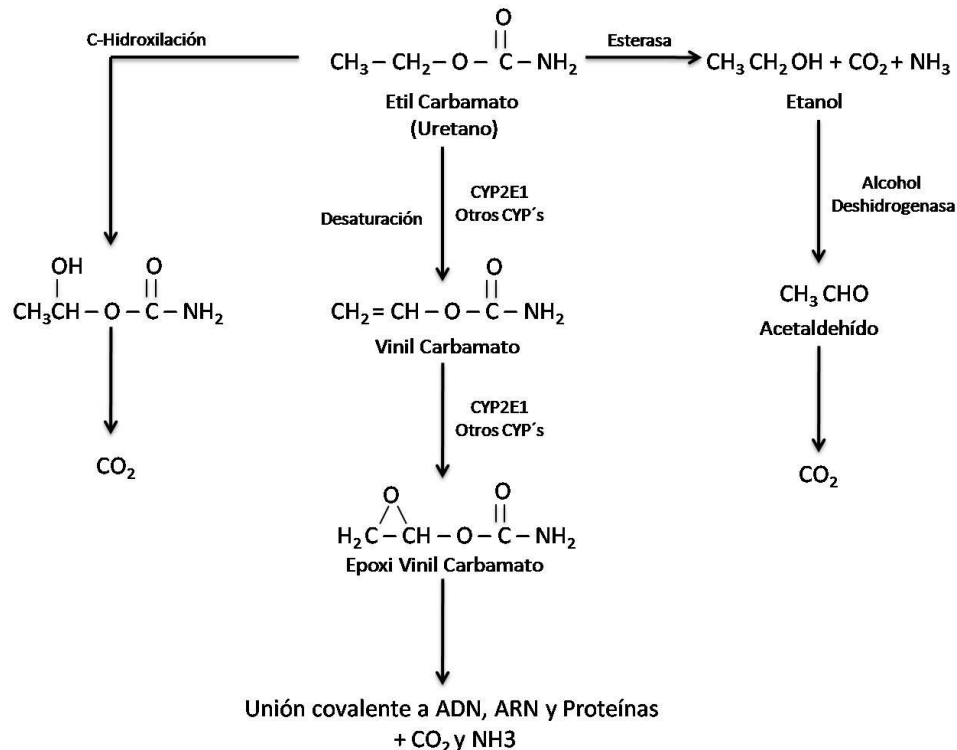


Figura 4. El metabolismo del etil carbamato puede tomar dos vías principales.

El principal citocromo que se ha encontrado como responsable de la bioactivación del uretano es el CYP2E1. El uretano (etil carbamato) sufre una primera reacción de desaturación a través del CYP2E1 (96%) y otros citocromos (3%), lo que lleva a la formación de vinil carbamato, que posteriormente es transformado en vinil carbamato epóxido a través de las mismas enzimas (Hoffler et al., 2003; Ghanayem, 2007).

El vinil carbamato epóxido es el último metabolito que se produce por esta vía de metabolismo del etil carbamato y es altamente reactivo con el DNA y se considera como el metabolito carcinogénico del uretano.

Por otro lado, se han realizado algunos estudios en pulmón humano, en los que se han encontrado datos consistentes con los encontrados en el ratón, por lo cual este último resulta ser un modelo relevante en la evaluación de los efectos del etil carbamato en el humano (Forkert, 2010).

Los adenomas que se desarrollan en este modelo, lo hacen a partir de neumocitos de tipo II y de células bronquiolares no ciliadas o Células de Clara.

Por todo lo descrito anteriormente, este modelo resulta útil para nosotros en cuanto a que es un modelo de resultados fácilmente reproducibles, accesible en su aplicación y muy valioso para evaluar los efectos de nuestro compuesto en el desarrollo de los adenomas pulmonares que estamos evaluando.

A continuación describimos brevemente la estructura histológica del pulmón con el fin de introducir la información básica para entender las imágenes que manejaremos a lo largo del estudio.

3.5 Histología del pulmón

El sistema respiratorio constituye la principal vía de exposición a los contaminantes de la atmósfera. Diariamente, respiramos aproximadamente 10,000 litros de aire, que contiene gases y partículas que pueden dañar el sistema respiratorio a través de distintos mecanismos (Samet, 2004). Es importante conocer la histología normal del pulmón, para una posterior comparación. Por ello, se hace una breve descripción de la misma.

Bronquio

La tráquea se divide en dos ramas que forman los bronquios principales (primarios). Una vez que se introducen en el pulmón, estos bronquios principales se dividen en bronquios lobares (secundarios). Debido a que cada pulmón tiene diferente número de lóbulos, los bronquios se dividen en un número de ramas diferentes. El bronquio derecho se divide en tres ramas, una para cada uno de los tres lóbulos del pulmón derecho; el izquierdo se divide en dos ramas, una para cada lóbulo del pulmón izquierdo. Los bronquios lobares se dividen posteriormente en bronquios segmentarios o terciarios (Ross et al., 2007).

La estructura de los bronquios extrapulmonares es similar a la de la tráquea. La mucosa, compuesta por epitelio pseudoestratificado ciliado con células mucoproducidas (Epitelio Respiratorio) y una lámina propia con fibras elásticas; una submucosa compuesta por tejido conectivo denso; una capa cartilaginosa compuesta por anillos de cartílago en forma de "C", y finalmente una adventicia de tejido conectivo (Gartner y Hiatt, 2008).

Una vez que los bronquios se introducen en el pulmón, su estructura histológica se modifica. Los anillos de cartílago se reemplazan por placas que se distribuyen alrededor de la circunferencia de la pared bronquiolar. Conforme los bronquios siguen ramificándose y disminuyendo de tamaño, las placas de cartílago se reducen, hasta desaparecer en los bronquiolos (Ross et al., 2007).

En cuanto al músculo, en los bronquios intrapulmonares este forma una verdadera capa muscular, alrededor de su circunferencia. El epitelio de los bronquios intrapulmonares es respiratorio, y la submucosa presenta glándulas.

Bronquiolos

La subdivisión de los bronquios segmentarios origina a los bronquiolos que miden 1 mm o menos. Estos bronquiolos se llaman terminales, que al ramificarse dan origen a los bronquiolos respiratorios. Al conjunto de un bronquiolo terminal con los bronquiolos respiratorios y alvéolos que reciben aire de él se les llama acino pulmonar (Ross et al., 2007).

En la figura 5 se muestra un corte de pulmón de ratón, en el que se observa un bronquiolo terminal. Los bronquiolos de mayor tamaño poseen un epitelio respiratorio. Este se transforma, de forma gradual, en un epitelio cilíndrico ciliado simple, que al llegar al bronquiolo terminal es

cúbico ciliado simple. Las células caliciformes desaparecen en los bronquiolos terminales. La pared de los bronquiolos posee también una capa de músculo liso.

Al epitelio de los bronquiolos terminales se incorpora un nuevo tipo celular, correspondiente a la célula de Clara. Estas se encuentran entre las células ciliadas de los bronquiolos y poseen una prominencia en la superficie apical. Su función es la secreción de un agente tenso activo que impide la adhesión luminal; además secreta una proteína (proteína de célula de Clara) que es un componente de la secreción de la vía aérea (Gartner y Hiatt, 2008).

Las paredes de los bronquiolos se ven interrumpidas por alvéolos, que están en toda su longitud, hasta que estos sustituyen completamente la pared del bronquiolo. En los alvéolos ocurre el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre.

Alvéolos

El epitelio alveolar está constituido por varios tipos celulares: los neumocitos tipo I y II, como se observa en la figura 5.

Los neumocitos tipo I o células alveolares tipo I son células planas, que revisten la mayor parte de la superficie de los alvéolos. Estas células forman parte de la barrera hematogaseosa, junto con el endotelio de los capilares, a través de la cual se da el intercambio gaseoso. Los neumocitos tipo II o células alveolares tipo II son células secretoras. Su citoplasma posee unos cuerpos llamados cuerpos laminares, ricos en una mezcla de lípidos y proteínas, que son secretadas al espacio alveolar y funcionan como agente tensoactivo, conocido como surfactante (Ross et al., 2007).

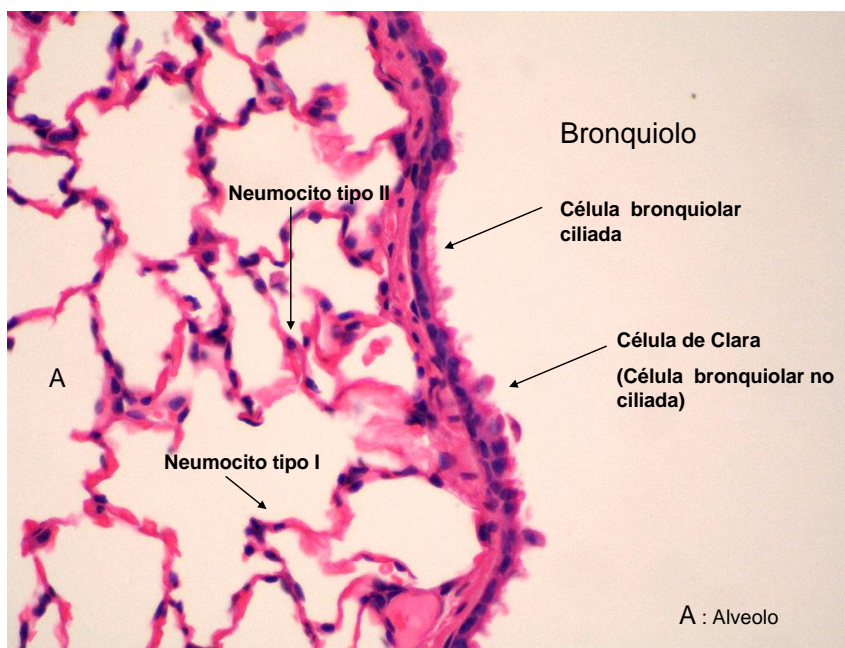


Figura 5. Histología normal del pulmón de ratón. Los alvéolos se constituyen de neumocitos tipo I (epitelio plano) y neumocitos tipo II (células cúbicas). En el extremo derecho se observa la luz del bronquiolo, con los dos tipos celulares que lo distinguen: la célula de Clara y la célula bronquiolar ciliada.

A continuación presentamos los antecedentes directos relacionados con este trabajo con el fin de sentar las bases de los objetivos a explorar.

ANTECEDENTES

El presente proyecto surgió con la idea de dar continuidad a un trabajo previo (López-Valdez, 2008), en el que se encontraron hallazgos interesantes sobre los efectos de la inhalación de pentóxido de vanadio en el modelo de adenomas antes descrito. En el inicio de esta línea de investigación se planteó la posibilidad de que la inhalación de este compuesto promoviera la carcinogénesis en este modelo, con base en algunos antecedentes del compuesto y su efecto en el pulmón. Sin embargo los resultados que obtuvimos nos indicaron el posible papel anticarcinogénico del compuesto de interés, por lo que decidimos continuar explorando el modelo en ese sentido.

1. Distintos compuestos del vanadio y su relación con la carcinogénesis.

El vanadio ha cobrado importancia desde hace varias décadas, dado que se ha identificado que puede ejercer efectos negativos en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por otro lado, existen pocos estudios en los que se evalúa el potencial carcinogénico del vanadio y sus diferentes compuestos. En cuanto a la evaluación del potencial anticarcinogénico, los estudios son más amplios.

Respecto de los efectos pro-carcinogénicos, Ress y colaboradores reportaron en un estudio realizado para el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos de Norteamérica (NTP) el potencial carcinogénico del pentóxido de vanadio. Este estudio plantea que después de una exposición crónica de 2 años, este compuesto propició el desarrollo de adenomas y carcinomas bronquioalveolares en los pulmones de ratas macho, y ratones macho y hembra. Además indujo lesiones inflamatorias y proliferativas en el tracto respiratorio (Tabla 1) (NTP, 2002; Ress et al., 2003).

Este estudio es la evidencia principal que soporta la subsecuente clasificación del pentóxido de vanadio como un posible carcinógeno humano, de acuerdo con la IARC (Grupo 2B) (IARC, 20006). Sin embargo, respecto a este estudio existen controversias e incongruencias.

Se puede verificar en los archivos de la NTP que respectan al estudio antes mencionado, que la exposición de los animales no se caracterizó apropiadamente.

En principio, se detalla que el compuesto utilizado a lo largo del estudio no fue siempre el mismo. A lo largo del estudio se presentan en el reporte descripciones distintas respecto del color del compuesto utilizado, que va desde el violeta hasta el amarillo; este último color se espera del pentóxido de vanadio (Archive Documents, Chem Task CHEM00568, CHEM00592) (NTP, 2002). Estas diferencias en el color de los compuestos sugieren cambios químicos que podrían tener consecuencias toxicológicas, que no fueron tomadas en cuenta.

Debido a este aspecto que se detalla anteriormente, se evidencia que la caracterización de la exposición al aerosol del supuesto pentóxido de vanadio, tampoco fue satisfactoria, debido a la falla para identificar con claridad el compuesto que inhalaban los animales.

Estos pequeños detalles nos sugieren la necesidad de continuar explorando el efecto real de la inhalación de pentóxido de vanadio, caracterizando de manera adecuada el compuesto, ya que las fallas en el estudio del NTP dejan dudas acerca de la interpretación de los datos obtenidos.

En otro estudio Rondini y cols., evaluaron el papel del V_2O_5 como agente promotor del desarrollo de neoplasia pulmonar en cepas de ratones con distinta susceptibilidad al efecto de carcinógenos químicos. Las cepas utilizadas en este estudio fueron A/J (ratones con alta susceptibilidad), BALB (susceptibilidad intermedia) y B6 (resistentes). Los resultados de este estudio sugieren que el V_2O_5 puede actuar como agente promotor de tumores pulmonares, cuyo efecto es distinto de acuerdo con la susceptibilidad genética de la cepa de la que se trate (Rondini et al., 2010).

En este estudio se observó el desarrollo de neoplasias en los pulmones de los ratones de susceptibilidad alta e intermedia, a través de un esquema de administración de pentóxido de vanadio por aspiración orofaríngea.

Estos dos estudios citados anteriormente constituyen la principal evidencia del efecto pro-carcinogénico del pentóxido de vanadio (Tabla 1).

Tabla 2. Estudios en los que se evalúa el efecto pro-carcinogénico del pentóxido de vanadio.

Compuesto (S)	Dosis	Vía de exposición	Especie	Efecto identificado	Autor, año
Pentóxido de Vanadio (V_2O_5)	0, 0.5 mg/m ³ en ratas 1, 2, o 4 mg/m ³ en ratones	Inhalada	Ratas machos y hembras F344/N Ratones machos y hembras B6C3F 1	Desarrollo de adenomas y carcinomas bronquioalveolares en ratas macho y ratones hembra y macho. Lesiones proliferativas e inflamatorias en el tracto respiratorio de ambas especies.	Ress et al., 2003
3 metilcolantreno (MCA)	10 µg/g de peso del animal	Inyección intraperitoneal	Ratones machos A/J, BALB/cj (BALB), C57BL/6J (B6)	Promoción del desarrollo de tumores pulmonares en las cepas susceptibles A/J y BALB en un modelo de carcinogénesis inducida por MCA.	Rondini et al., 2010
Pentóxido de Vanadio (V_2O_5)	4 mg/kg de peso del animal	Aspiración Orofaringea			

Por otro lado, con respecto a los efectos anti-carcinogénicos, el primer intento por explotar el potencial farmacológico del vanadio en la investigación del cáncer fue publicado en 1965 (Bishayee et al., 2010), y posteriormente el estudio de los efectos antitumorales de este metal, así como los mecanismos bioquímicos y moleculares que implican se han explorado ampliamente *in vitro*. En estos estudios se han utilizado distintos tipos de líneas celulares malignas que incluyen células de linfoma de células B y leucemia de células T, hepatoma, osteosarcoma, así como carcinoma testicular, de mama, ovárico, renal, pulmonar, nasofaríngeo y de laringe (Evangelou, 2002; Ray et al., 2006(a); Klein et al., 2008; Kostova, 2009).

Los estudios *in vitro* abrieron la posibilidad de realizar estudios *in vivo*, que constituyen una herramienta poderosa en el conocimiento, dado que es posible estudiar los efectos de los compuestos en el organismo completo.

Diversos estudios realizados *in vivo* han mostrado que ciertos compuestos de vanadio son efectivos en la prevención y/o reducción de lesiones preneoplásicas o neoplásicas inducidas químicamente, en distintos órganos. Estos reportes incluyen modelos animales de carcinogénesis de mama, de hígado, de colon y de tejido conectivo (Bishayee et al., 2010).

La primera evidencia de que el vanadio podía ejercer efectos antineoplásicos fue aportada por Thompson y cols. en un modelo de carcinogénesis mamaria inducida por MNU-1 (1-metil-1-nitrosurea) en ratas hembra Sprague–Dawley, en donde se observó la reducción en la incidencia de tumores mamarios (Thompson et al., 1984) (Tabla 2). Posteriormente, se ha explotado el potencial anticarcinogénico de otros compuestos de vanadio tales como el monovanadato de amonio, metavanadato de amonio, vanadil sulfato y ortovanadato entre otros compuestos (Tabla 2).

En el caso del pentóxido de vanadio, los posibles efectos anticarcinogénicos no han sido explorados en ningún modelo de cáncer.

Tabla 3. Estudios *in vivo* en los que se demuestra el potencial anticarcinogénico de distintos compuestos de vanadio en diferentes modelos de carcinogénesis

Compuesto (S)	Dosis	Vía de exposición	Especie	Efecto identificado	Autor/año
1-metil-1-nitrosurea (MNU1)		Inyección intraperitoneal	Ratas hembra Sprague–Dawley	Reducción en la incidencia y promedio del número de tumores por animal.	Thompson et al., 1984.
Vanadil Sulfato	25 p.p.m	Oral (alimento)			
Dietilnitrosamina (DENA)	200 mg/ Kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratas macho Sprague–Dawley	Reducción en la incidencia, multiplicidad y tamaño de nódulos persistentes en el parénquima hepático.	Bishayee y Chatterjee, 1995.
Metavanadato de amonio (NH ₄ VO ₃)	0.5 ppm (4.27 μmol/L)	Oral (agua de bebida)			
Ortovanadato (VO ₄ ³⁻)	500 μg/ animal/día	Subcutánea	Ratones hembra DBA/2j	Disminución en el crecimiento tumoral en organismos inyectados con células tumorales MDAY-D2 (tumor linforecticular).	Cruz et al., 1995.
1,2-Dimetilhidrazina (DMH)	20 mg/kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratas macho Sprague–Dawley	Disminución en el desarrollo de adenomas y carcinomas inducidos por DMH en un modelo de carcinogénesis colorectal.	Kanna et al., 2003.
Monovanadato de amonio (NH ₄ VO ₃)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			

bpV[4,7-dimetil-1,10 fenantrolina-bisperoxo-oxovanadio] bpV[Me2Phen]	20 mg/ Kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratones balb/c	Inhibición del crecimiento tumoral en ratones inyectados con células de carcinoma mamario murino DA3.	Scrivens et al., 2003.
7,12 dimetilbenz(α) antraceno (DMBA)	0.5 mg/100 g de peso	Inyección en la vena caudal	Ratas hembra Sprague–Dawley	Supresión de la hiperplasia mamaria inducida por DMBA.	Ray et al., 2004
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
2 Acetilamino fluoreno (2-AAF)	0.05%	Oral (alimento)	Ratas macho Sprague–Dawley	Inducción de apoptosis a través del incremento de p53 y disminución en la formación de nódulos premalignos en el hígado.	Chakraborty et al., 2005
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
Dietilnitrosamina (DENA)	200 mg/ Kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratas macho Sprague–Dawley	Reducción en la expresión de PCNA, reducción del daño genotóxico producido por el carcinógeno.	Chakraborty et al., 2006a
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
2 Acetilamino fluoreno (2-AAF)	0.05%	Oral (alimento)	Ratas macho Sprague–Dawley	Reducción en la expresión de PCNA, supresión de aberraciones cromosómicas, disminución de la incidencia de nódulos hepáticos hiperplásicos.	Chakraborty et al., 2006b
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
7,12 dimetilbenz(α) antraceno (DMBA)	0.5 mg/100 g de peso	Inyección en la vena caudal	Ratas hembra Sprague–Dawley	Inducción de apoptosis, retardo en la proliferación y reducción en la incidencia de tumores mamaros, a través del aumento en la expresión de p53 y Bax, durante el proceso de preneoplasia mamaria.	Ray et al., 2006
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
Dietilnitrosamina (DEN)	200 mg/ Kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratas macho Sprague–Dawley	Supresión de la hiperplasia nodular hepática en un modelo de carcinogénesis inducida por DEN.	Chakraborty et al., 2007
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			

1,2-Dimetilhidrazina (DMH)	20 mg/kg de peso	Inyección intraperitoneal	Ratas macho Sprague–Dawley	Disminución en los niveles de metilación del DNA, y reducción del desarrollo de focos preneoplásicos y tumores en el colon.	Samanta et al., 2008
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			
7,12 dimetilbenz(α) antraceno (DMBA)	0.5 mg/100 g de peso	Inyección en la vena caudal	Ratas hembra Sprague–Dawley	Reducción de los rompimientos de DNA, disminución del número de tumores mamarios y de la proliferación celular.	Manna, et al., 2011
Monovanadato de amonio (NH_4VO_3)	0.5 ppm	Oral (agua de bebida)			

Debido a las incongruencias en el estudio de Ress y colaboradores, además de que no existen otros trabajos en donde se evalúe el efecto del pentóxido de vanadio en el cáncer pulmonar, decidimos plantear nuestro proyecto inicial.

Los resultados de ese estudio nos mostraron que la inhalación de pentóxido de vanadio a una dosis de 0.02 M redujo el área ocupada por los tumores, además del número de tumores desarrollados en los ratones (López-Valdez, 2008) de manera significativa, aunque habíamos planteado la hipótesis inicial de que el vanadio promovería un mayor desarrollo de adenomas e incrementaría su área.

Los hallazgos demostraron un efecto anticarcinogénico (reducción del número y área de los tumores), por lo que decidimos continuar explorando estos resultados, verificándolos y estudiando los mecanismos por los cuales el pentóxido de vanadio estaría propiciándolos. De esta última idea surgió el actual proyecto.

En este nuevo estudio, decidimos valorar el efecto diferencial de dos dosis de pentóxido de vanadio en el mismo modelo, además de evaluar marcadores que nos permitan comenzar a dilucidar de qué manera el compuesto está reduciendo el tamaño y número de tumores.

2. Efectos del vanadio que influyen en su potencial anticarcinogénico.

Los efectos anticarcinogénicos y los mecanismos desencadenados por los compuestos de vanadio (Metavanadato de amonio, bpV[Me2Phen], vanadocenos, vanadato, peroxovanadatos, por mencionar algunos), han sido investigados en una amplia variedad de líneas celulares malignas, en las que se ha detectado que estos compuestos poseen la capacidad de propiciar efectos en estas células, que son esenciales para que pueda considerarse como un posible agente antineoplásico. Estas propiedades incluyen la reducción de la tasa de crecimiento celular (efecto antiproliferativo), efectos citotóxicos y/o citostáticos (necrosis, apoptosis), reducción y/o la inhibición del potencial metastásico de las células malignas e incremento en la sensibilización de las células cancerosas, reduciendo la resistencia a distintos fármacos (Evangelou et al., 2002).

A continuación se describen algunos efectos ya reportados sobre distintos tipos de vanadio y su posible papel en la inhibición y/o disminución en el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Estos efectos han sido explorados tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo ninguno versa sobre los efectos del pentóxido de vanadio en este sentido

a) Efectos del vanadio en la proliferación celular. Los complejos de vanadio han mostrado ser capaces de ejercer efectos antiproliferativos, o, en algunos casos, efectos proliferativos en varios tipos de células. Los efectos antiproliferativos de los compuestos de vanadio en células normales y malignas se lleva a cabo principalmente a través del arresto del ciclo celular.

Por ejemplo, Faure y cols. reportaron que los peroxovanadatos bloquean, a dosis bajas y altas, la transición del ciclo celular de G2 a M en células cancerosas, lo que lleva a la reducción en la tasa de crecimiento (Faure et al, 1995), sin embargo, las vías por las cuales se presenta este efecto no se exploraron.

Uno de los principales mecanismos que se ha propuesto para explicar el arresto del ciclo celular mediado por el vanadio es la inhibición de fosfatasa (PTPs) como cdc25C, que tienen como acción desfosforilar subunidades de los complejos de ciclinas (Scrivens et al., 2003).

Otro mecanismo es el de la activación de proteínas cinasas como las MAP cinasas (MAPK) y su vía de señalización. En un estudio Zhang y cols. demostraron que el vanadato es capaz de inducir el arresto del ciclo celular en la transición G2/M, y regular enzimas relacionadas con la progresión del ciclo a través de la activación de MAPKs y producción de ROS (Zhang et al., 2003). Se observó que la activación de ERK y p38 está implicada en la inducción del arresto del ciclo por acción del vanadato; la activación de estas dos proteínas induce la expresión de p21 y fosfo-cdc2, y la degradación de cdc25C. CDC2 es una cinasa que permite a las células entrar a la mitosis, y que es inhibida de manera importante a través de la fosforilación de algunos residuos. Por otro lado, cdc25C es la fosfatasa responsable de remover los fosfatos de los residuos de cdc2 (Peng et al., 1997). En el mismo estudio se indica que la activación de ERK y p38 es desencadenada por las ROS.

La activación de las MAPKs puede desencadenar otras vías que lleven a la transcripción de genes relacionados con la progresión del ciclo y de la apoptosis. Por ejemplo, se sabe que el vanadil sulfato activa a p38 (MAPK) en células epiteliales bronquiales humanas, induciendo la transcripción del Factor de Transcripción Nuclear κ B (NF- κ B), que corresponde a un factor implicado tanto en la progresión del ciclo celular como en la apoptosis (Japers et al., 2000).

En otro estudio se reporta el retardo en la progresión del ciclo en la transición de la fase G1 a S en células humanas de carcinoma mamario, lo cual se evidencia por el incremento en la cantidad de DNA hipoploide luego del tratamiento con NH_4VO_3 . (Ray et al., 2006a).

Los compuestos de vanadio pueden ejercer efectos antiproliferativos y citotóxicos también a través de la interacción con el DNA. Los vanadocenos interactúan con el DNA a través de los grupos fosfato de los nucleótidos que lo conforman, constituyendo complejos vanadoceno-DNA (Toney et al., 1986; Harding y Moksdi, 2000). Otros compuestos de vanadio inducen la ruptura del DNA tanto *in vitro* como *in vivo* (Sakurai, 1994; Sakurai et al., 1995; Rojas et al., 1996; Altamirano-Lozano et al., 1999).

Numerosas evidencias indican que el V^{IV} y el V^{V} inducen ruptura en el DNA, no como consecuencia de la reacción directa con los componentes de esta macromolécula, sino a través de la acción de

especies reactivas de oxígeno generadas en las células como el radical hidroxilo (Sakurai, 1994; Evangelou, 2002).

b) Efectos del vanadio en la apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que se requiere para el desarrollo normal y el mantenimiento de la homeostasis en los tejidos. Se conoce que este proceso es inducido por una gran variedad de estímulos intracelulares y extracelulares que regulan vías de señalización que la desencadenan. Los estudios señalan que los distintos compuestos de vanadio pueden activar distintas vías que llevan a la muerte como consecuencia de la activación de distintos genes pro-apoptóticos.

Evidencias sugieren que el vanadio está implicado en la activación de NF- κ B en células normales y malignas, a través de la activación de la vía de señalización de las MAPKs, lo cual desencadena la apoptosis (Pandey et al., 1995; Zhao et al., 1996; Samet et al., 1998). En las células epiteliales pulmonares, el vanadio activa a p38 (MAPK) desencadenando la activación de NF- κ B en el citoplasma. Se sabe que el V^{IV} induce la translocación de este factor de transcripción al núcleo en células epiteliales pulmonares humanas (Japers et al., 1999, 2000). Se sugiere que la activación es inducida por el estrés oxidante a través de la inducción de otras vías que convergen para modular la actividad transcripcional de NF- κ B (Jaspers et al., 2000).

Existen otras vías de señalización activadas por el vanadio que pueden llevar a la apoptosis. La producción de especies reactivas de oxígeno por el vanadio en el citosol o en la mitocondria, puede resultar en daño mitocondrial con la consecuente liberación de citocromo C que activa la vía de las caspasas. Las caspasas activadas, como la caspasa 3 y caspasa 8, provocan también daño en la mitocondria y activan otras proteínas implicadas en la vía de muerte apoptótica (Green y Reed, 1998; Desagher y Martinou, 2000).

Distintos compuestos de vanadio como el VOSO₄, NaVO₃ y el citrato de vanadio (VOcit) pueden provocar la muerte por apoptosis induciendo la apertura del PTP (Permeability Transition Pore), liberando el citocromo C al citoplasma. Esta activación la llevan a cabo a través de la inducción de estrés oxidante con la consecuente disrupción de la membrana mitocondrial (Zhao et al., 2010).

Huang y cols. reportaron que el vanadato produce ROS, las cuales median la activación de p53 (un supresor de tumores implicado en la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis) y producen daño mitocondrial, con la subsecuente muerte por apoptosis. La exposición *in vitro* de las células a vanadato, resultó en el incremento de la actividad de p53, la generación de ROS y una disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, así como el incremento en la apoptosis (Huang et al., 2000). Ray y cols. demostraron *in vitro* que el tratamiento con NH₄VO₃ induce la apoptosis y arresto del ciclo celular en células MCF7 de carcinoma mamario humano (Ray et al., 2006a).

En otro estudio, Wang y cols., reportan que el V^V es capaz de inducir la infiltración de células inflamatorias y propiciar la muerte celular en el pulmón de ratón, en un modelo de instilación de V *in vivo*. Los resultados sugieren que la infiltración de neutrófilos y la apoptosis de las células epiteliales pulmonares son fenómenos que requieren de la generación de ROS (Wang et al., 2003).

Molinuevo y cols., observaron efectos antitumorales en osteoblastos en cultivo, así como en células de osteosarcoma, por efecto del tratamiento con dos compuestos derivados del vanadil (Nap-VO y GluVO). En este estudio se demuestra que ambos compuestos poseen la capacidad de

inducir apoptosis y necrosis en ambas líneas osteoblásticas, que se propone esta mediada por la peroxidación lipídica inducida por ROS (Molinuevo et al., 2004).

En modelos *in vivo* de distintos tipos de carcinogénesis se ha demostrado también la capacidad de los compuestos de V para desencadenar la muerte de las células tumorales. En distintos estudios se reporta la disminución en la expresión de marcadores anti-apoptóticos como Bcl2 y el incremento en la expresión de marcadores pro-apoptóticos como Bax y p53 por efecto de la exposición a V. Esta modificación se traduce en el incremento en la apoptosis (Chakraborty et al., 2005; Ray et al., 2006(b); Samanta et al., 2008(a, b); Manna et al., 2011).

c) Potencial antimetastásico de los compuestos de vanadio. La fosforilación de proteínas inducida por los compuestos de vanadio, puede influir en la capacidad de invasividad y el potencial metastásico de las células tumorales, a través de la regulación de la adhesión celular al sustrato (Takenaga, 1996), o en el contacto célula-célula, y propiciando cambios en el citoesqueleto de actina (Matsuyoshi et al., 1992). Las proteínas adhesivas (célula-célula o célula-matriz) están involucradas en la metástasis e invasión de células cancerosas (Behrens et al., 1993; Kumar y Weaver, 2009). Narla y cols. reportan que el tratamiento de células NALM-6 (leucemia de células B) con METVAN [bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatooxovanadio (IV)] inhibe su capacidad de adhesión a laminina, fibronectina y colágena. Además, se observó que el mismo compuesto es capaz de reducir la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) en las todas las líneas celulares de leucemia evaluadas (Narla et al., 2001).

El pervanadato es capaz de inhibir la inducción de proteínas intracelulares de adhesión tales como ICAM-1, V-CAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales. Esta inhibición podría estar inducida a través de la inactivación de PTPs y la consecuente regulación a la baja del factor de necrosis tumoral (TNF), que es uno de los principales inductores de varias moléculas de adhesión en las células endoteliales humanas (Evangeluo, 2002). El tratamiento sostenido de células de carcinoma gástrico que expresan E-cadherinas mutadas, con pervanadato, desencadena la pérdida de contactos célula-célula e induce cambios en el citoesqueleto de actina. Estos efectos se explican por la fosforilación de los componentes de los complejos de adhesión celular (Luber et al., 2000).

d) Resistencia a fármacos y los compuestos de vanadio. Se ha reportado que el vanadato es capaz de destruir los filamentos de actina del citoesqueleto de células resistentes a múltiples fármacos, esto sugiere que este compuesto puede ser utilizado como adyuvante en la quimioterapia de tumores sólidos por el efecto que produce sobre el citoesqueleto de células malignas (Capella et al., 2000).

Por otro lado, existe evidencia de que distintos compuestos de vanadio son capaces de sensibilizar a distintas líneas celulares malignas a los efectos citotóxicos de diversos agentes antineoplásicos a través de la inhibición de la actividad de la ATPasa. Este último efecto afecta el flujo de salida de los fármacos aplicados a las células (Evangelou, 2002).

La resistencia de células de leucemia murina y de adenocarcinoma de colon humano a la actividad citotóxica de la talimustina (FCE 245517) se reduce por el tratamiento con compuestos de vanadio y otros inhibidores de fosfatasas, y decrece por la actividad de inhibidores de cinasas de proteína (Ciomei et al., 1995). Por el contrario, en otras células tumorales, el ortovanadato de sodio inhibe la actividad de fosfatasas, protegiéndolas del efecto citotóxico de TNF (Mishra et al., 1994).

Las evidencias anteriores sugieren que los efectos del vanadio sobre las células resistentes a múltiples fármacos, en relación a la quimioterapia, depende del tipo célula y del agente antineoplásico del que se trate.

JUSTIFICACIÓN

El incremento de la mortalidad por cáncer pulmonar se ha asociado en las últimas décadas con el aumento en la contaminación atmosférica, siendo este un problema de salud que ocupa un lugar importante entre las causas de mortalidad en nuestro país. Dada la importancia de esta patología, se han establecido distintos modelos animales para su estudio y utilizando estos se ha explorado el efecto de distintos compuestos y sus efectos sobre el desarrollo de la patología.

Los compuestos de vanadio han sido objeto de estudio en los últimos años por los efectos contradictorios que producen en distintos modelos de carcinogénesis, siendo de particular interés el pentóxido de vanadio, que es además considerado un contaminante ambiental. Un estudio previo sugiere el efecto anticarcinogénico de este compuesto sobre el desarrollo de tumores inducidos por uretano en un modelo murino, por lo que resulta interesante continuar explorando este efecto así como los mecanismos implicados en los mismos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El pentóxido de vanadio es capaz de reducir el número y el tamaño de los adenomas pulmonares inducidos por uretano, modificando la expresión de distintas proteínas relacionadas con la proliferación celular, o incrementando la muerte por apoptosis.

Objetivos

Objetivo General

Identificar los mecanismos por los que la inhalación de pentóxido de vanadio modifica la proliferación de los tumores inducidos por uretano.

Objetivos Particulares

- Identificar el efecto del pentóxido de vanadio sobre los adenomas pulmonares a dosis distintas (0.01 y 0.02 M).
- Evaluar el efecto del vanadio sobre la proliferación celular de las células tumorales pulmonares, mediante el cálculo de índices de proliferación (PCNA).
- Identificar por inmunohistoquímica, el efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio sobre algunos marcadores de apoptosis importantes como Bax, p53 y Bcl2 en las células tumorales pulmonares y del parénquima sano, en cada uno de los tratamientos.

- Valorar la participación de la muerte por apoptosis de los distintos tratamientos, en la disminución del tamaño de los tumores inducidos por uretano al inhalar vanadio, mediante la técnica de TUNEL y determinación de los índices de apoptosis.

MÉTODO

Descripción de los Grupos Experimentales

Se utilizaron 80 ratones macho de la cepa CD-1 de 30-35 g de peso. La cantidad total de ratones se dividió en dos grupos, dado que para cada dosis de pentóxido de vanadio, V_2O_5 , (0.01 M y 0.02 M) se formaron cuatro subgrupos. A continuación se describen estos subgrupos:

Grupo I

Tabla 4. Descripción de los subgrupos y los tratamientos aplicados.

Nombre del Subgrupo	Número de animales utilizados	Tratamiento aplicado
Control	10 animales	Inhalación de solución fisiológica al 9%, una hora/dos veces por semana durante ocho semanas.
Pentóxido de vanadio 0.01 M (V 0.01 M)	10 animales	Inhalación de V_2O_5 [0.01 M], una hora/dos veces por semana, durante ocho semanas.
Uretano (Uret)	10 animales	Inyección intraperitoneal de uretano. Dosis 1mg/g de peso del animal, una sola dosis.
Uretano/ Pentóxido de vanadio 0.01 M (Uret/V 0.01 M)	10 animales	Inyección intraperitoneal de uretano (1mg/g de peso del animal) e inhalación de V_2O_5 [0.01 M] una hora/dos veces por semana, durante ocho semanas.

Grupo II: Se utilizó el mismo esquema de subgrupos anterior, con la variación en la concentración de la solución de pentóxido de vanadio. Para este grupo la concentración de V_2O_5 fue 0.02 M.

La generación de los tumores se afectó de acuerdo con estudios previos de Mirvish, (1968) y Shimkin y Stoner (1975). En estos estudios se indica la aplicación de la dosis de 1mg/g de peso del animal.

La concentración de pentóxido de vanadio 0.02 M (1.4 mg/m³) ha sido ampliamente utilizada en nuestro grupo de trabajo. De acuerdo con distintos hallazgos, esta dosis es equiparable a los que podríamos encontrar en personas ocupacionalmente expuestas por la misma vía (0.05-500 mg/m³), lo cual nos permite tener resultados comparables (Fortoul et al., 2011).

El esquema de inhalación de una hora, 2 veces por semana se efectuó así con el fin asegurar la presencia del compuesto en los tejidos en los ratones. Como se mencionó en la introducción, el pentóxido de vanadio presenta una eliminación inicial de tres días aproximadamente, y este esquema es adecuado para mantener el compuesto presente en el organismo (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Los animales de todos los grupos fueron sacrificados a las ocho semanas de tratamiento, tiempo en el que se registra un desarrollo evidente de adenomas pulmonares (Forkert et al., 2010).

El sacrificio se llevó a cabo por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. Los pulmones fueron insuflados por vía intratraqueal con solución salina al 9% y paraformaldehído al 4%, se

extrajeron y procesaron por la técnica histológica habitual para microscopía óptica. Posteriormente, se efectuaron las evaluaciones que se describen enseguida con los distintos grupos experimentales.

1. Evaluación Morfométrica del tejido pulmonar.

Se realizó la evaluación cualitativa del tejido pulmonar en todos los grupos experimentales, con el fin de identificar cambios morfológicos asociados a la exposición a uretano y vanadio.

La evaluación morfométrica incluyó también la medición del área y el número de adenomas desarrollados en los grupos experimentales uretano, uretano/ V_2O_5 0.01 M y uretano/ V_2O_5 0.02 M. Los pulmones completos se evaluaron en cortes seriados, utilizando tinción de Masson.

El área de los adenomas se determinó con el programa Motic Images Plus 2.0, (Multifunctional and Multilenguaje Microscopy Software, Motic Group) realizando un promedio del área ocupada por estos en los pulmones.

2. Cálculo de Índices de Proliferación en los adenomas pulmonares.

El cálculo de Índices de Proliferación se realizó utilizando como marcador a PCNA para evidenciar a las células tumorales que se encuentran en proliferación y determinar el efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio en la proliferación de los adenomas.

PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen) corresponde a una proteína que desempeña una función importante en el metabolismo de los ácidos nucleicos, dado que interactúa con diversas proteínas que están involucradas en la replicación y la reparación del DNA. La expresión de PCNA correlaciona con las distintas fases del ciclo celular: Se ha demostrado que la expresión de la proteína surge durante la fase G1, alcanza la máxima expresión durante S, disminuye de manera importante durante G2 alcanzando el nivel más bajo durante la mitosis. En las células que no están ciclando sus niveles son indetectables (Czyewska et al., 2009). Diversos estudios realizados en diferentes tipos de cáncer, demuestran PCNA se encuentra dentro de los marcadores de proliferación más utilizados (Griffey et al., 1999; Czyewska et al., 2009).

La evaluación de los índices de proliferación se realizó en los pulmones de los grupos uretano, uretano/ V_2O_5 0.01 M y uretano/ V_2O_5 0.02 M, a través de la técnica de inmunohistoquímica descrita a continuación:

El paso inicial consistió en desparafinar los tejidos con calor (56°C durante 20 minutos en estufa) y xilol, y posteriormente rehidatarlos a través de pases en un tren de alcoholes a concentraciones graduales (100%, 95%). Los tejidos rehidatados se colocaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para proceder a la recuperación antigénica.

Inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de Santa Cruz para tejidos incluidos en parafina (Immunoperoxidase Staining protocol) con algunas modificaciones en cuanto a los reactivos utilizados (solución de recuperación, bloqueador de peroxidasa, anticuerpo secundario y complejo HRP-estreptavidina).

Se procedió a realizar la recuperación antigénica por presión y calor, con una solución de reactivo de recuperación [10X] (Diva Decloaker, 20X, Biocare). Las muestras fueron sometidas a 15psi en una olla de presión por 3 min, y posteriormente se colocaron en una cámara húmeda. Una vez en la cámara húmeda, las muestras de tejido pulmonar se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos y tritón (PBS-tritón).

El siguiente paso consistió en inhibir la peroxidasa endógena, lo cual se llevó a cabo colocando las muestras en una solución de peróxido de hidrógeno 3% (peróxido de hidrógeno 30%, J.T. Baker) por 5 min.; la reacción se detuvo con lavados de PBS-tritón.

Posteriormente se procedió al reconocimiento del antígeno. El anticuerpo (Ac) primario para ratón anti-PCNA (Abcam ab92552) se preparó utilizando una dilución 1:100; se incubaron los tejidos con el anticuerpo durante 30 min a temperatura ambiente, y posteriormente se lavaron los tejidos con PBS tritón.

Luego del reconocimiento del antígeno PCNA se procedió a la amplificación de la reacción con un anticuerpo secundario universal biotinilado (Biotinylated Link, LSAB+ System-HRP, Dako). Las muestras fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente, y lavadas posteriormente con PBS. Posteriormente se realizó la incubación de las muestras con un sistema HRP-estreptavidina (Estreptavidin-Horse Radish Peroxidase, LSAB+ System-HRP, Dako) por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron las muestras con PBS.

El paso final del experimento consistió en revelar las muestras con 3, 3'-diaminobencidina (DAB) utilizando un kit de revelado (Liquid DAB-Plus Substrate Kit, Invitrogen). Las muestras se incubaron con la solución preparada de acuerdo a lo indicado por el proveedor, hasta que se evidenció la marca café característica y la reacción se detuvo con agua desionizada por 5 min.

Finalmente, concluida la inmunohistoquímica, las muestras de tejido se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

La evaluación cuantitativa de los índices de proliferación se hizo sobre fotomicrográficas a 40X, de los distintos grupos. Se evaluaron 5 cortes al azar por grupo, se contaron los núcleos positivos dentro de los tumores y el número de núcleos totales por tumor. La fórmula para calcular el índice fue la siguiente:

$$\text{Número de núcleos marcados/Total de núcleos X 100}$$

3. Marcadores de apoptosis en los adenomas pulmonares.

Para este estudio se realizó la evaluación sobre tres marcadores importantes de la vía de apoptosis:

P53. Corresponde a una proteína central en la regulación de la apoptosis, que además mantiene la integridad genómica. En respuesta a estrés celular que propicie el daño al DNA, p53 regula la transcripción de diversos genes relacionados con el arresto del ciclo celular, la senescencia o la apoptosis. Se considera una proteína supresora de tumores y un marcador pro-apoptótico. En este estudio se utilizó como marcador pro-apoptótico dada la relación que se ha encontrado entre la activación de su función, el incremento en la muerte por apoptosis y la disminución en el tamaño

de tumores en distintos modelos de carcinogénesis *in vivo* (Chakraborty et al., 2005; Ray et al., 2006(b); Samanta et al., 2008(a, b); Manna et al., 2011).

BAX. Se transloca del citosol a la membrana mitocondrial, y se insertan en ella, formando poros, con la subsecuente liberación de citocromo C al citoplasma. Se considera una proteína pro-apoptótica. La presencia y expresión de esta proteína, al igual que p53, se ha encontrado incrementada en modelos de carcinogénesis *in vivo*, y se ha relacionado con la prevención de la carcinogénesis (Chakraborty et al., 2005; Ray et al., 2006(b); Samanta et al., 2008(a, b); Pore et al., 2010; Manna et al., 2011), por lo cual se eligió como un marcador pro-apoptótico

BCL2. Interviene a nivel de la membrana mitocondrial para prevenir la apoptosis a través de la inhibición del cambio en el potencial de la membrana y la subsecuente liberación de citocromo C hacia el citoplasma. Esta proteína es producto del oncogén con el mismo nombre y es una proteína anti-apoptótica. Se conoce que la inhibición o disminución en su expresión puede interferir en el desarrollo de tumores propiciando la muerte celular de las células tumorales, disminuyendo la supervivencia de las mismas (Adams y Cory, 2007; Samanta et al., 2008 (a); Pore et al., 2010). Por las características descritas, se eligió a esta proteína como un marcador anti-apoptótico.

Para cada marcador se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el protocolo para tejidos en parafina descrito anteriormente, con algunas variantes. En este caso, se utilizó solución amortiguadora de fosfatos y albúmina 0.1 % (PBS-albúmina) en lugar de PBS-tritón.

Los anticuerpos primarios que se emplearon para cada marcador fueron los siguientes:

- Anticuerpo anti-ratón Anti-p53 (Abcam ab1431). Dilución 1:50
- Anticuerpo anti-ratón Anti-Bax (Abcam ab7977). Dilución 1:100.
- Anticuerpo anti-ratón Anti-Bcl2 (Abcam ab32124). Dilución 1:100.

La evaluación cuantitativa de los marcadores se efectuó mediante un análisis densitométrico de la marca con el programa Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA), sobre fotomicrografías a 40X de los distintos grupos (5 fotomicrografías por grupo experimental).

El análisis densitométrico se basa en medir la densidad óptica en cada región de una preparación histológica observada al microscopio (Lopez-Poveda, 2012) .

4. Técnica de TUNEL y cálculo de índices de apoptosis.

El ensayo enzimático de TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) se utiliza para evaluar el índice de apoptosis (o muerte celular programada). En el ensayo se incorpora la desoxiuridina biotinilada al extremo 3'OH de las cadenas generadas por la ruptura del DNA genómico en fragmentos de doble cadena de DNA de bajo peso molecular y fragmentos de una sola cadena de DNA de alto peso molecular, en células apoptóticas utilizando el enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase). La biotina actúa como señal y se detecta con estreptavidina marcada con la enzima HRP que se une a los nucleótios biotinilados, y se visualiza

utilizando el sustrato de la HRP, 3,3'-diaminobencidina (DAB). Los núcleos de las células apoptóticas se observan en un color marrón oscuro bajo la luz del microscopio (Loo, 2002).

El ensayo de TUNEL se realizó a través de un sistema colorimétrico (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System) para la detección de células apoptóticas *in situ*, de acuerdo con el protocolo indicado por el proveedor.

Posterior al ensayo, las muestras se contratiñeron los tejidos con verde luz y se montaron. Se eligió el verde luz para que la marca fuera evidente y no se enmascarara. Esta tinción contrasta únicamente los citoplasmas de las células, por lo que los núcleos se pueden evidenciar a través de una citoquímica para DNA (Sphyris y Harrison, 2005), o con la marca café revelada por diaminobencidina como en el caso de este estudio.

La evaluación cuantitativa de los índices de apoptosis se hizo sobre fotomicrografías a 40X de los distintos grupos. Se evaluaron 5 cortes al azar por grupo, se contaron los núcleos TUNEL positivos dentro de los tumores y el número de núcleos totales por tumor. La fórmula para calcular el índice fue la siguiente:

$$\text{Numero de núcleos marcados/Total de núcleos X 100}$$

El conteo total de los núcleos se realizó utilizando cortes seriados teñidos con Feulgen. Esta técnica histoquímica permite que el DNA sea teñido *in situ*, por lo que el núcleo se hace evidente (Chieco y Derenzini, 1999).

Análisis Estadístico

La prueba estadística utilizada para evaluar las diferencias en todos los casos fue un Análisis de Varianza (ANOVA) con prueba post hoc de Tukey. La medida de tendencia central que se comparó fue la media estadística, utilizando la desviación estándar como medida de dispersión.

Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si el valor de p fue < 0.05.

RESULTADOS

1. Se desarrollaron adenomas pulmonares en los grupos tratados con uretano y uretano/V sin diferencias entre las dosis utilizadas.

Se observó que los animales de los grupos Control, V 0.01 M y V 0.02 M no desarrollaron adenomas pulmonares luego de las ocho semanas de tratamiento, mientras que en los animales de los grupos Uretano, Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M se observan claramente los tumores. En bajos aumentos podemos distinguir los adenomas (→), ausentes en los grupos control, V 0.01 M y V 0.02 M (Figura 6). Los animales de los grupos V 0.01 M y V 0.02 M presentaron algunos focos inflamatorios peribronquiolares y perivasculares (→), al igual que los grupos que fueron tratados con uretano y pentóxido de vanadio simultáneamente a ambas dosis (Figura 7). Este infiltrado no se cuantificó.

La valoración cuantitativa del número de adenomas pulmonares demostró que los tumores se desarrollaron en mayor número en el grupo uretano que en los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M (Figura 8). Por otro lado, el análisis del área ocupada por los adenomas mostró que éstos fueron más grandes en el grupo Uretano, en comparación con los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M (Figura 9). Cabe resaltar que no se encontró diferencia en cuanto al número de adenomas desarrollados en los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M.

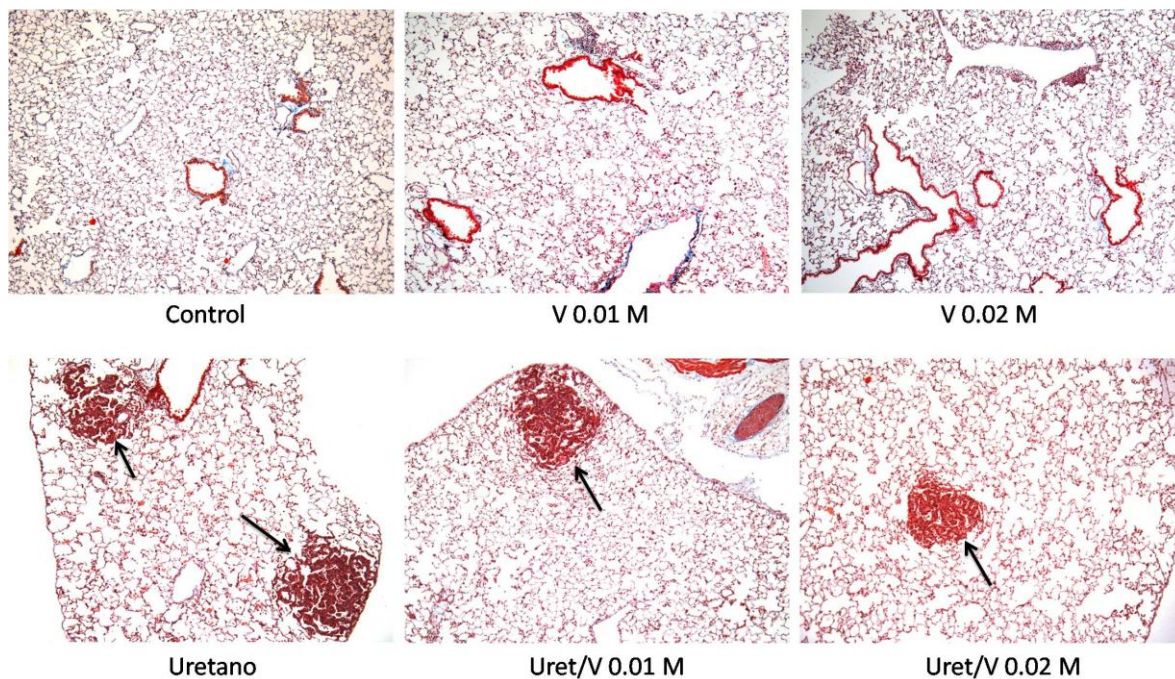


Figura 6. Fotomicrografías del parénquima pulmonar de los ratones expuestos a los distintos tratamientos. Se señalan los adenomas pulmonares (→). Masson, 400X.

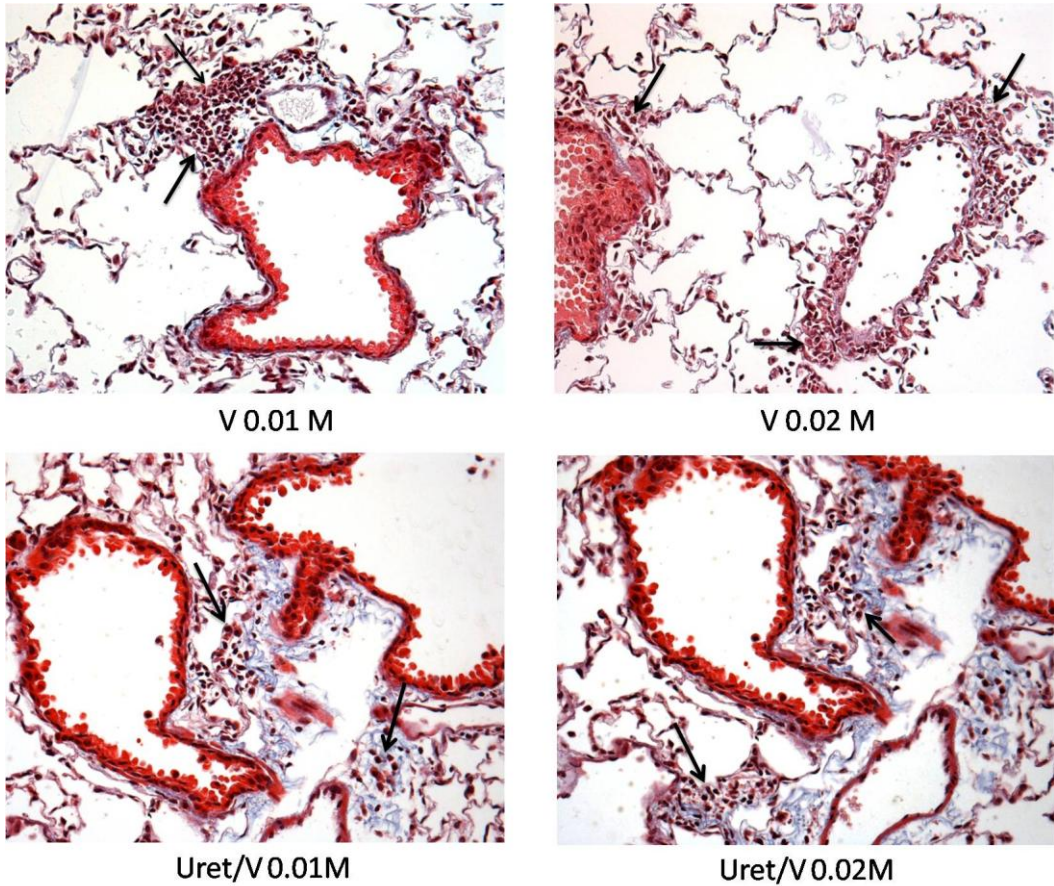
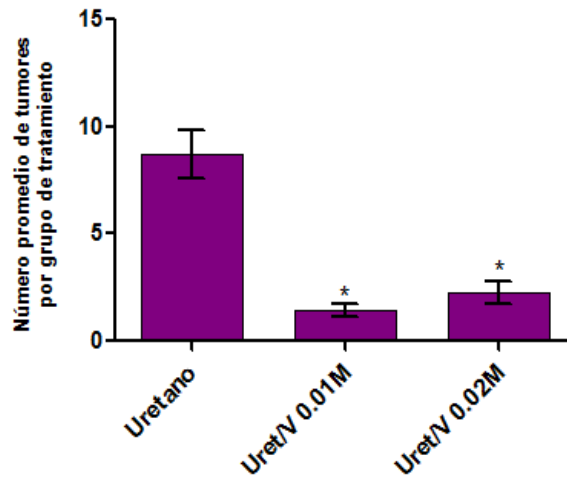
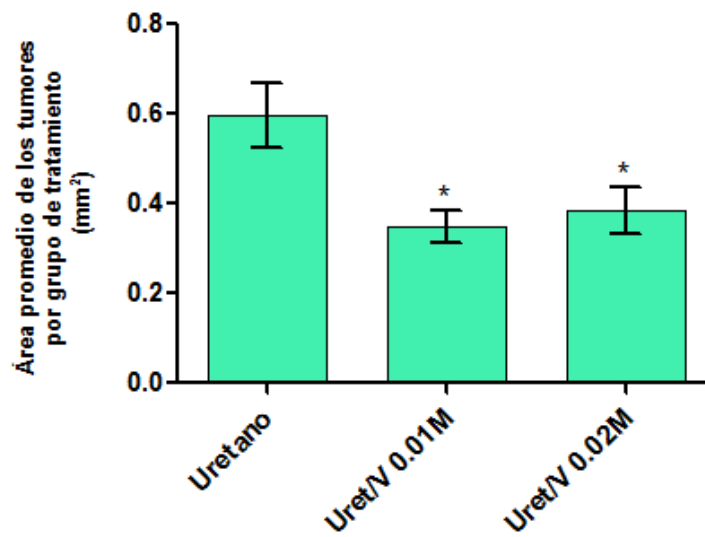


Figura 7. Fotomicrografías representativas en las que se observa la diferencia en la presencia de infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquiolar (→) en los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M, que no se presentó de manera importante en el grupo Uretano (este último no se muestra).



* $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey)

Figura 8. Efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio en el número de adenomas pulmonares inducidos por uretano. El número adenomas pulmonares en el parénquima pulmonar de los ratones fue mayor en el grupo tratado con uretano que en los grupos tratados simultáneamente con uretano y vanadio. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.



* $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey)

Figura 9. Efecto de la inhalación de vanadio sobre el área ocupada por los adenomas pulmonares inducidos por uretano. El área ocupada por los adenomas pulmonares en el parénquima pulmonar de los ratones fue mayor en el grupo tratado con uretano que en los grupos tratados simultáneamente con uretano y vanadio. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

2. La inhalación de vanadio no reduce la proliferación de los tumores.

En las fotomicrografías se observan adenomas pulmonares de los grupos Uretano, Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M. Para todos los grupos se presentaron núcleos positivos para el marcador de proliferación PCNA (Figura 10). Al realizar la evaluación cuantitativa de la proliferación se observó que el tratamiento con pentóxido de vanadio no disminuyó la proliferación dentro de los tumores (Figura 11).

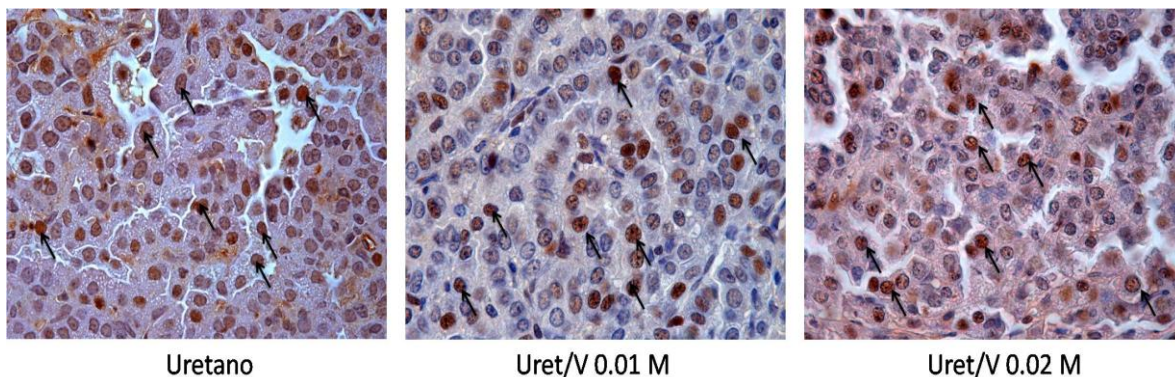


Figura 10. Los grupos Uretano, Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M presentaron núcleos positivos para PCNA (\rightarrow) dentro de los adenomas desarrollados. Inmunohistoquímica, 1000X.

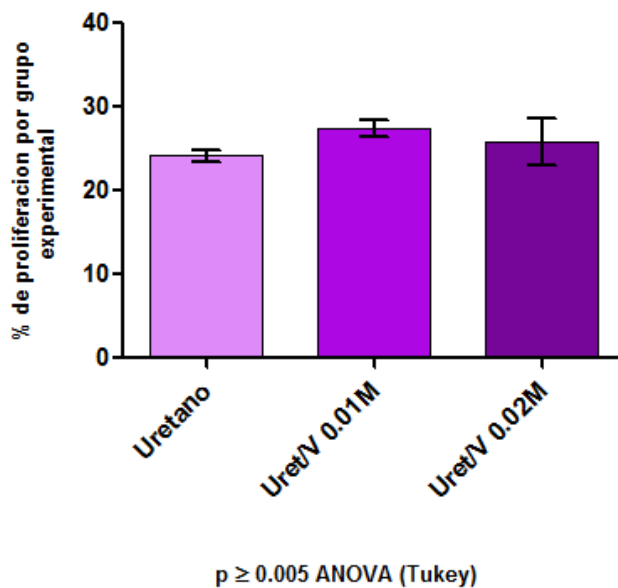


Figura 11. Efecto de la inhalación de vanadio sobre los índices de proliferación (PCNA). Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

3. Marcadores Pro y Anti-apoptóticos

Se consideró positiva la expresión de la proteína correspondiente en cada caso, la marca café, la cual hace evidente la presencia del marcador.

3.1. Incremento de p53 por el tratamiento con pentóxido de vanadio, en el parénquima sano y en los tumores pulmonares, en el modelo de adenomas inducidos por uretano.

La presencia de p53 en el parénquima pulmonar sano de los ratones se detectó en todos los grupos (marca color café). Los animales control presentaron marca para la proteína, principalmente en los alveolos pulmonares y en algunas células inflamatorias. Después del tratamiento con vanadio (V), la presencia de p53 se observó también en las células inflamatorias presentes alrededor de los bronquiolos, sin embargo no hay diferencia con el control respecto a la localización en los alvéolos y a las células inflamatorias. Los animales tratados con uretano presentaron marca para la proteína, principalmente en las células alveolares, igual que los controles (Figura 12).

En los animales de los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M la densidad de la marca fue mayor y con una localización en el pulmón distinta a los otros grupos. A diferencia de los grupos antes descritos, en los que la marca se presentó sobretodo en las células alveolares e inflamatorias, en los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M, pudimos observar la marca de la proteína en las células bronquiolares de manera importante, al igual que en las células inflamatorias. Cabe destacar que se presentó con mayor intensidad en el grupo Uret/V 0.01 M que en el grupo Uret/V 0.02 M, lo cual evidenció diferencia entre las dosis. En los tumores la marca fue más evidente en los grupos

Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M, en comparación con el grupo Uretano, destacando la presencia de algunos núcleos positivos, además de los citoplasmas (Figura 14).

El análisis estadístico de la medición de densidad demostró que la expresión de p53 en el parénquima sano de la proteína incrementó significativamente en los ratones tratados con uretano y vanadio, en comparación con el resto de los grupos (Figura 13). Este mismo patrón se mostró en las células tumorales, en las que la marca fue más intensa para los grupos de tratamiento simultáneo (Figura 15).

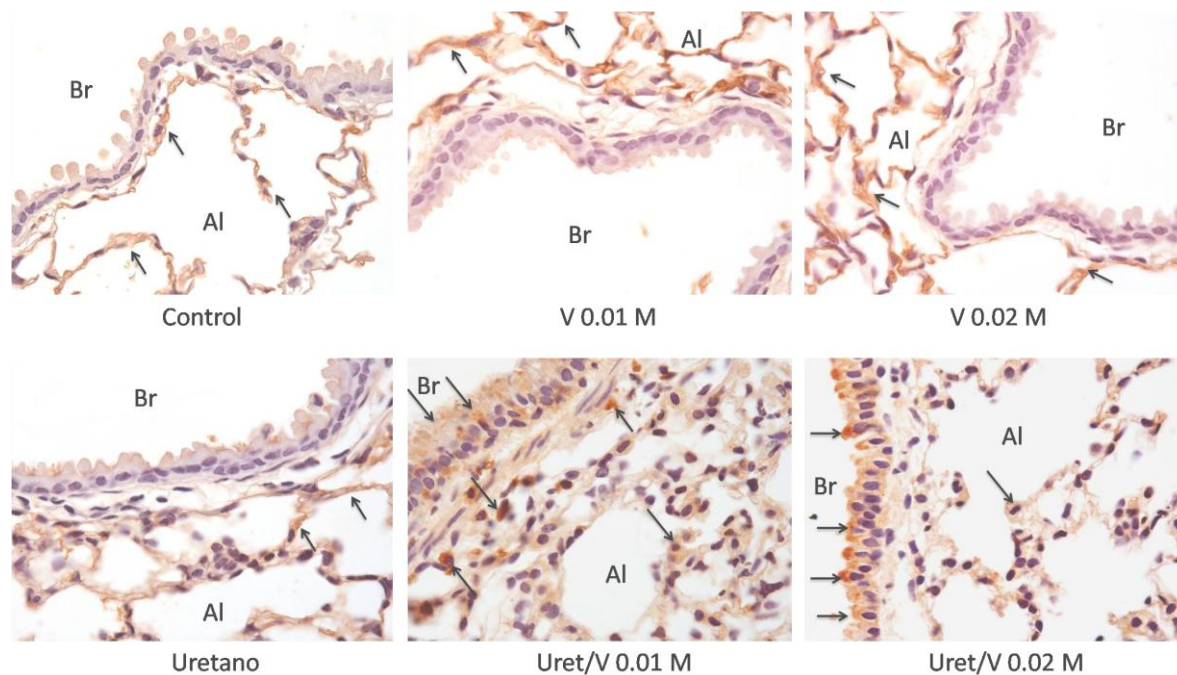


Figura 12. Presencia de la proteína p53 en el tejido pulmonar sano de ratones. Las flechas señalan algunas células positivas. Inmunohistoquímica, 1000X.

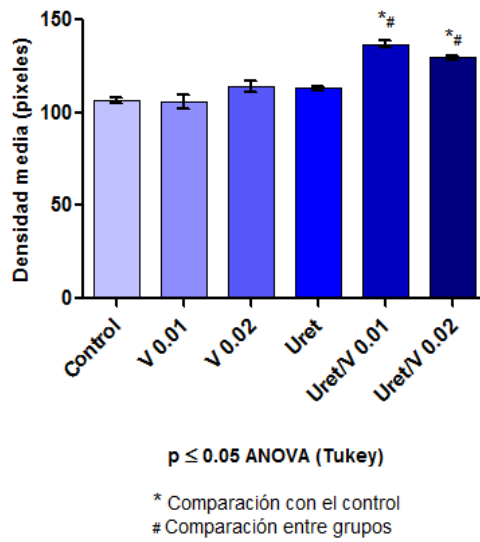


Figura 13. Expresión de la proteína p53 en el parénquima sano de ratones, determinada por densidad óptica. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

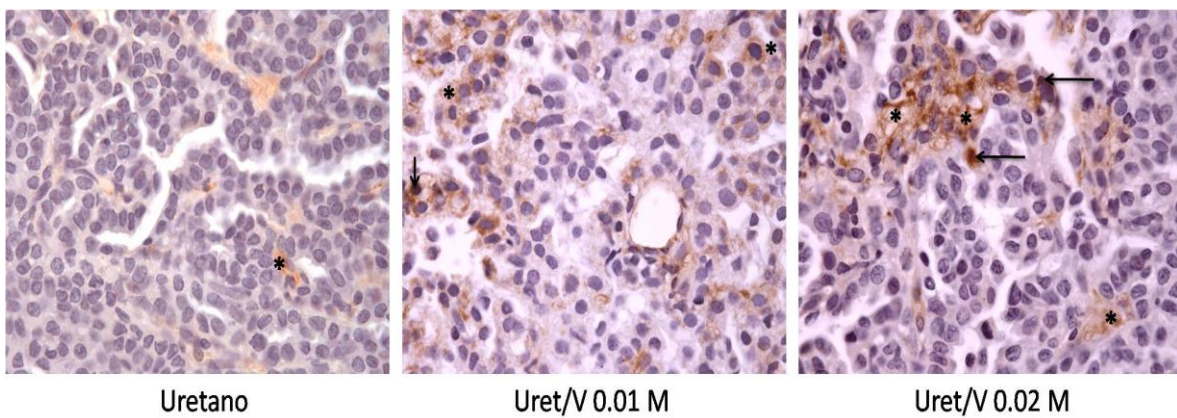
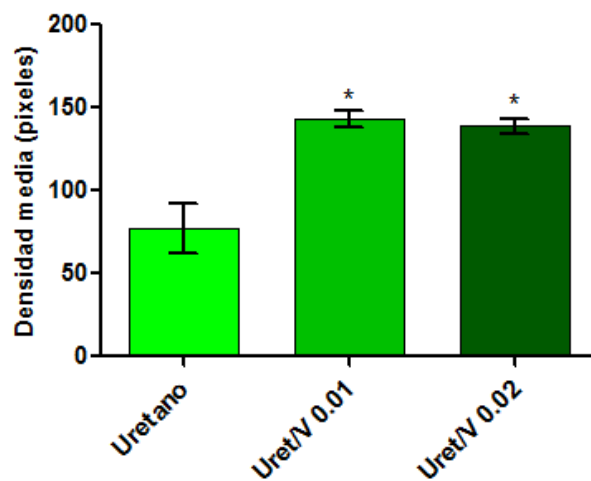


Figura 14. Presencia de la proteína p53 en los adenomas pulmonares de ratones. La presencia de p53 en los tumores fue más evidente en los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M, que en el grupo uretano. Las flechas señalan algunos núcleos positivos y los asteriscos los citoplasmas de algunas células en donde se observa la marca. Inmunohistoquímica, 1000X.



* $p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey)

Figura 15. Expresión de la proteína p53 en los adenomas pulmonares determinada por densidad óptica. Se observó el incremento significativo en la densidad de la marca de la proteína en los grupos tratados simultáneamente con uretano y vanadio, sin diferencia entre las dosis. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

3.2. Incremento de Bax por el tratamiento con pentóxido de vanadio, en el parénquima pulmonar sano y en los adenomas inducidos por uretano.

La presencia de Bax en el parénquima pulmonar sano se detectó en todos los grupos. Los animales control presentaron marca para la proteína, tanto en las células alveolares como las bronquiolares. El tratamiento con pentóxido de vanadio incrementó la expresión de Bax en este tejido. Por el contrario, el tratamiento con uretano, disminuyó la expresión con respecto al control y a los animales tratados con vanadio en el tejido pulmonar sano, observándose algunos núcleos positivos para la proteína.

En los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M la densidad de la marca en el parénquima sano, fue mayor que en los grupos control y uretano, pero menor que los tratados únicamente con inhalación de pentóxido de vanadio. La marca se presentó tanto en los alveolos pulmonares como en las células bronquiolares y las células inflamatorias; cabe resaltar que en ambos grupos se observó la localización nuclear de Bax en las células bronquiolares, alveolares e inflamatorias, con énfasis en el bronquiolo (Figura 16). No se mostró diferencia en la marca de la proteína en el tejido pulmonar sano, con respecto a las dosis utilizadas en estos dos grupos (Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M).

Dentro de los tumores, Bax se presentó en mayor cantidad cuando los animales fueron tratados simultáneamente con uretano y pentóxido de vanadio, en comparación con los tratados únicamente con uretano, con presencia evidente en los núcleos. No se presentó diferencia en cuanto a las dosis utilizadas (Figura 18).

El análisis estadístico demostró que el tratamiento con pentóxido de vanadio incrementó la expresión de esta proteína con respecto al control y con respecto al grupo uretano, en el tejido pulmonar sano (Figura 17). El mismo patrón se presentó dentro de los tumores en los que la expresión incrementó por el tratamiento simultáneo con uretano y pentóxido de vanadio, con respecto a los organismos tratados con uretano (Figura 19). En el análisis no se diferenció si la marca era citoplasmática o nuclear, la cuantificación se realizó por igual.

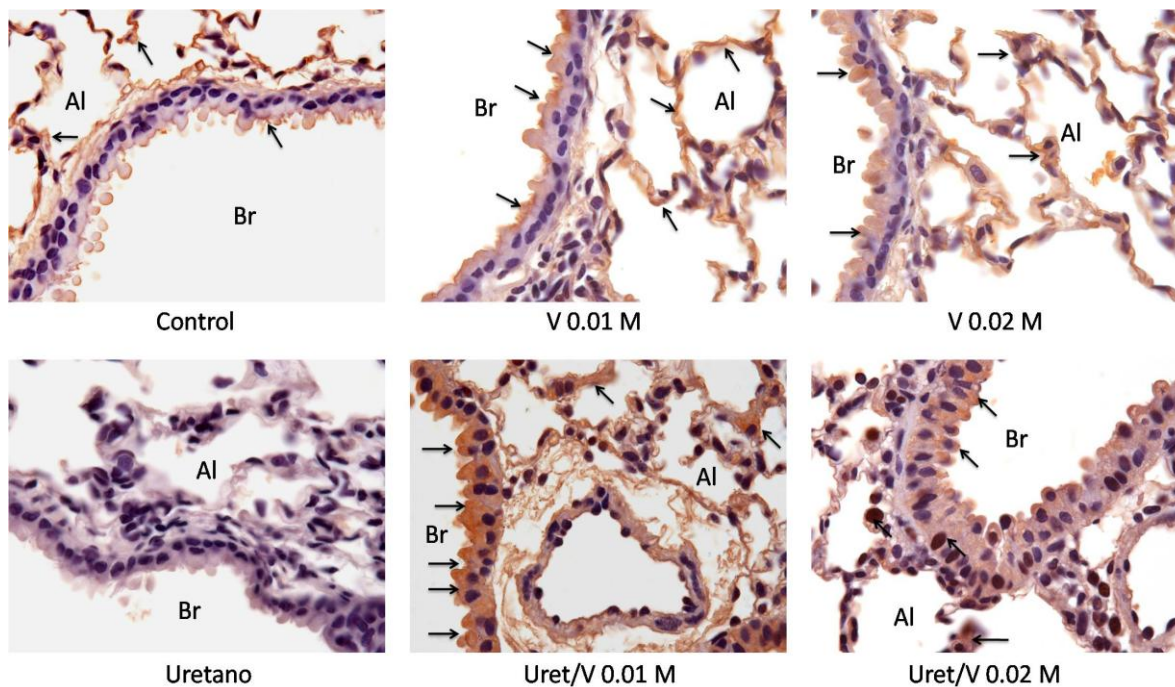
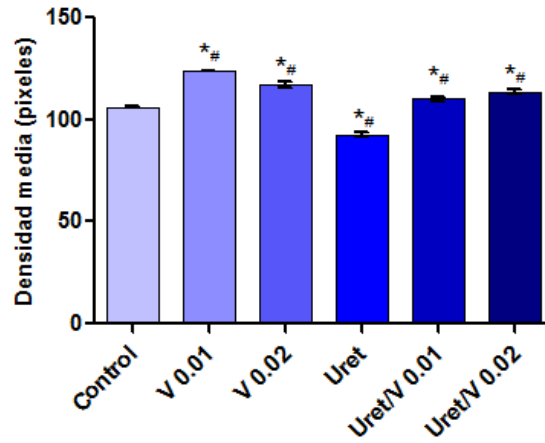


Figura 16. Presencia de la proteína Bax en el tejido pulmonar sano de ratones. La proteína Bax se presentó en todos los grupos experimentales, con una intensidad mayor en los animales tratados con vanadio. Se evidencian numerosos núcleos positivos. Inmunohistoquímica, 1000X.



$p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey)

V 0.02 vs Uret/V 0.02 no presentan diferencias estadísticas significativas
 Uret/V 0.01 Y Uret/V 0.02 no presentan diferencias estadísticas significativas

* Comparación con el control

Comparación entre grupos distintos al control

Figura 17. Expresión de la proteína Bax en el parénquima sano de ratones, determinada por densidad óptica. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

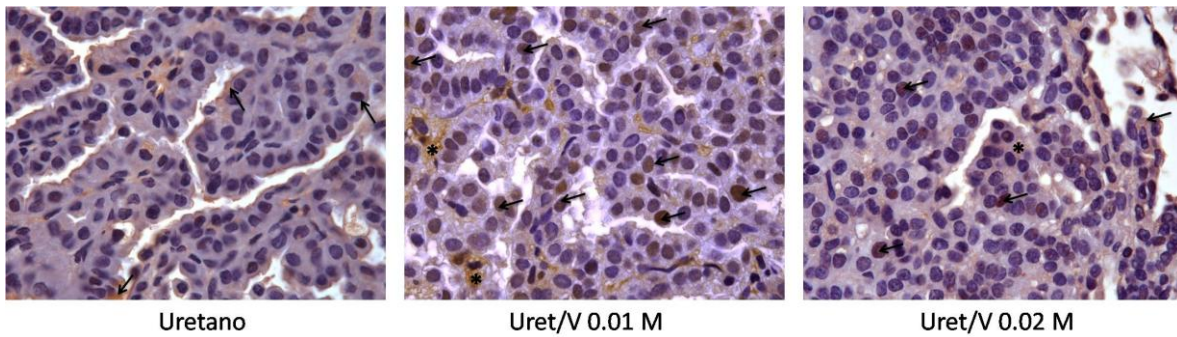


Figura 18. Presencia de la proteína Bax en los adenomas pulmonares. Pueden observarse zonas negativas para el marcador dentro de los tumores. Se observa marca citoplasmática y nuclear. Inmunohistoquímica, 1000X.

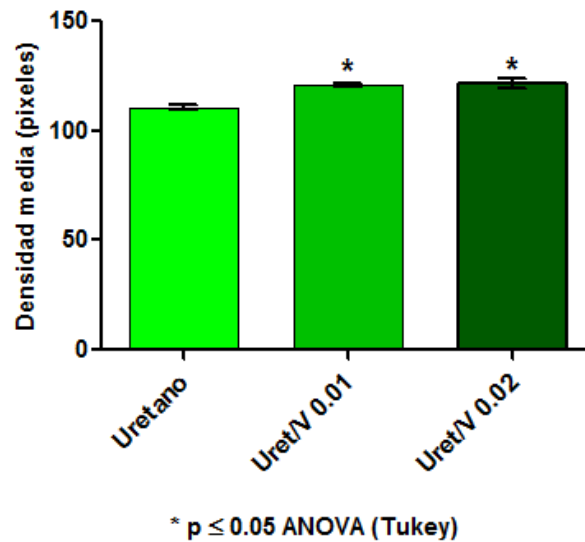


Figura 19. Expresión de la proteína Bax en los adenomas pulmonares determinada por densidad óptica. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

3.3. Incremento de Bcl2 por el tratamiento con uretano, en el parénquima pulmonar sano, en el modelo de adenomas inducidos por uretano.

El marcador Bcl2 se evidenció en los pulmones de los organismos de todos los grupos. Los organismos del grupo control presentaron una marca basal de esta proteína. El tratamiento con vanadio en ambas dosis, no incrementó de manera importante la presencia del marcador en el parénquima pulmonar. En el caso de los organismos tratados con uretano, se observó el incremento en la densidad del marcador en las células de los alveolos pulmonares y en las células bronquiolares, así como en las células inflamatorias, en el parénquima pulmonar sano. Con el tratamiento conjunto de uretano con pentóxido de vanadio la marca se presentó en niveles parecidos a los del control (Figura 20).

Se evaluó también la marca dentro de los tumores pulmonares, pero no se encontró diferencia en la densidad con respecto a los grupos y a las dosis utilizadas (Figura 22). En los tumores de los tres grupos la marca se presentó de manera citoplasmática como nuclear.

La evaluación estadística demostró que el único grupo en el que incrementó la expresión de Bcl2 fue el grupo de organismos tratados con uretano, en el parénquima pulmonar sano. Para el resto de los tratamientos, la expresión de la proteína fue similar al grupo control (Figura 21). En el caso de los tumores, la marca no mostró diferencia estadística significativa (Figura 23).

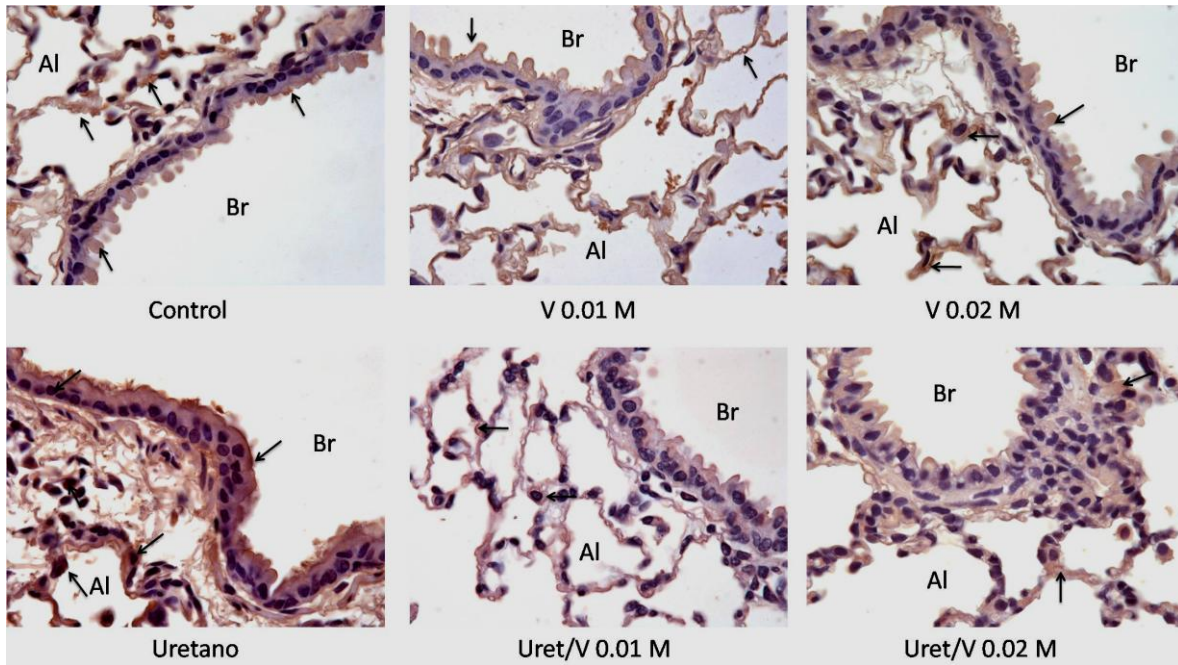


Figura 20. Presencia de la proteína Bcl2 en el tejido pulmonar sano de ratones. Se hizo evidente la marca en los pulmones de los ratones del grupo uretano. Inmunohistoquímica, 1000X.

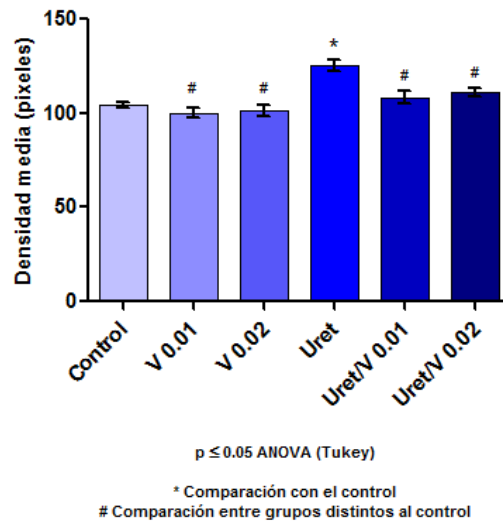


Figura 21. Expresión de la proteína Bcl2 en el parénquima sano de ratones, determinada por densidad óptica. Cada columna y barra indican media ± error estándar.

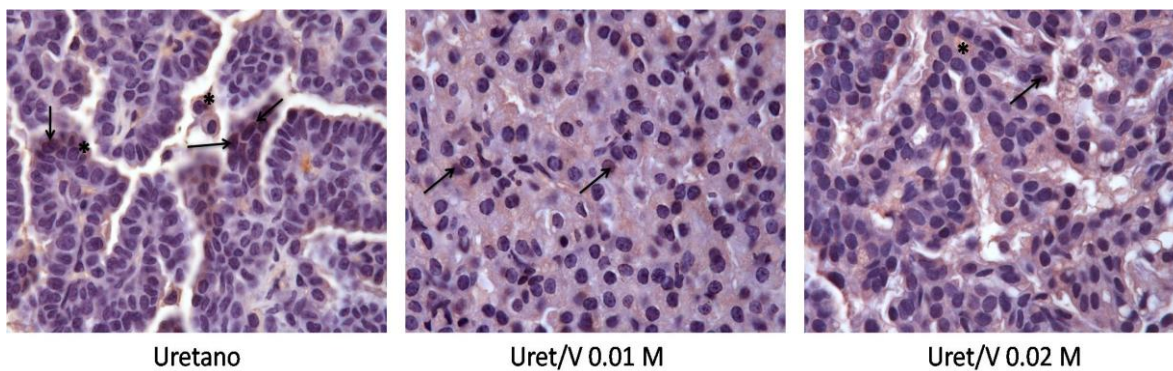


Figura 22. Presencia de Bcl2 en los adenomas pulmonares. Se pudo observar que dentro de los tumores la marca fue ligeramente evidente. Las flechas señalan algunos núcleos positivos mientras que los asteriscos demuestran los citoplasmas de células que presentaron la marca. Inmunohistoquímica, 1000X.

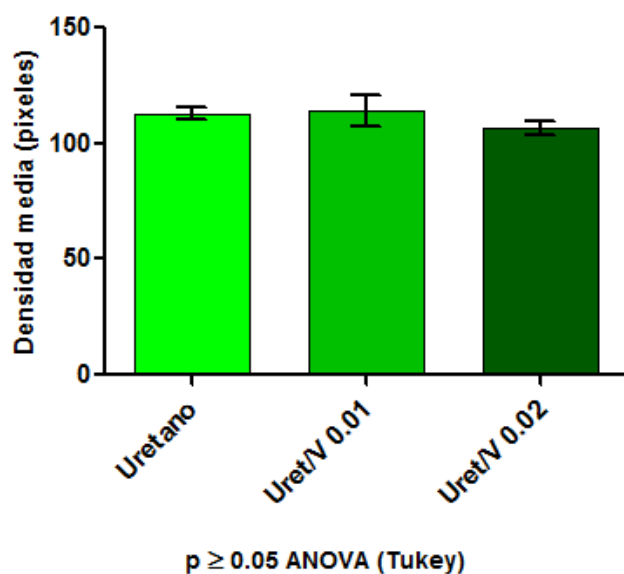


Figura 23. Expresión de Bcl2 en los adenomas pulmonares determinada por densidad óptica. Cada columna y barra indican media \pm error estándar.

Es importante mencionar que, aunque no se registró el número de células, una evaluación cualitativa nos indicó que el número de células por campo aparentemente no se modificó.

4. La inhalación de pentóxido de vanadio incrementó la apoptosis de las células tumorales.

La evaluación cualitativa del parénquima pulmonar mostró que en todos los grupos se presentaron núcleos TUNEL positivos. En el grupo control, las células positivas fueron células inflamatorias en los alveolos pulmonares. El tratamiento con vanadio a ambas dosis propicia la apoptosis de células inflamatorias y bronquiales (núcleos positivos). Los organismos del grupo uretano presentaron

células inflamatorias apoptóticas en el parénquima pulmonar sano, que son poco frecuentes (Figura 24).

Los resultados del ensayo mostraron una clara diferencia en la apoptosis entre los grupos en los que se desarrollaron tumores. Los índices de apoptosis se calcularon dentro de los adenomas, únicamente para los grupos uretano, Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M. Las fotomicrografías muestran los adenomas con núcleos TUNEL positivos (→), que fueron más numerosos en los tumores de los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M, en comparación con los del grupo Uretano (Figura 25). Sin embargo no se registraron diferencias entre los grupos Uret/V 0.01 M y Uret/V 0.02 M.

La estadística demostró que existe clara diferencia entre los grupos tratados simultáneamente con vanadio a ambas dosis con respecto al grupo tratado con uretano. La apoptosis dentro de los tumores fue mayor cuando los animales inhalaban pentóxido de vanadio (Figura 26).

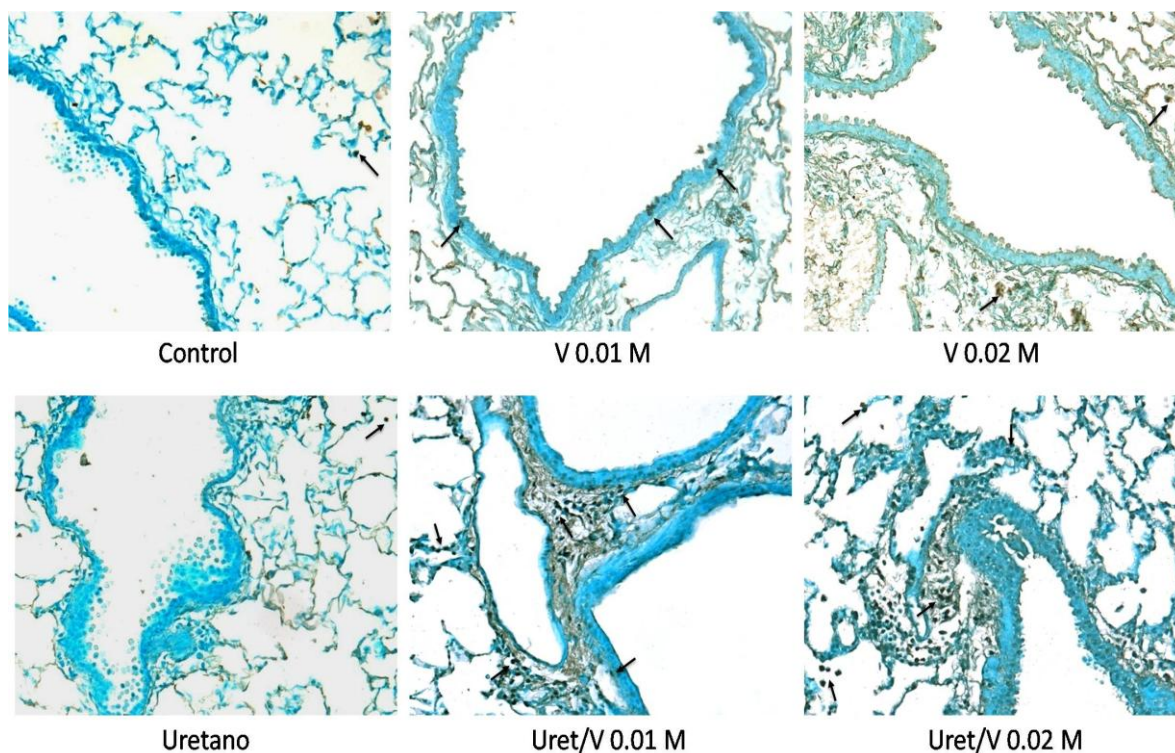


Figura 24. Ensayo de TUNEL para detectar células apoptóticas en el modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano. En todos los grupos se detectaron células TUNEL positivas en el parénquima pulmonar sano. Verde luz, 400X.

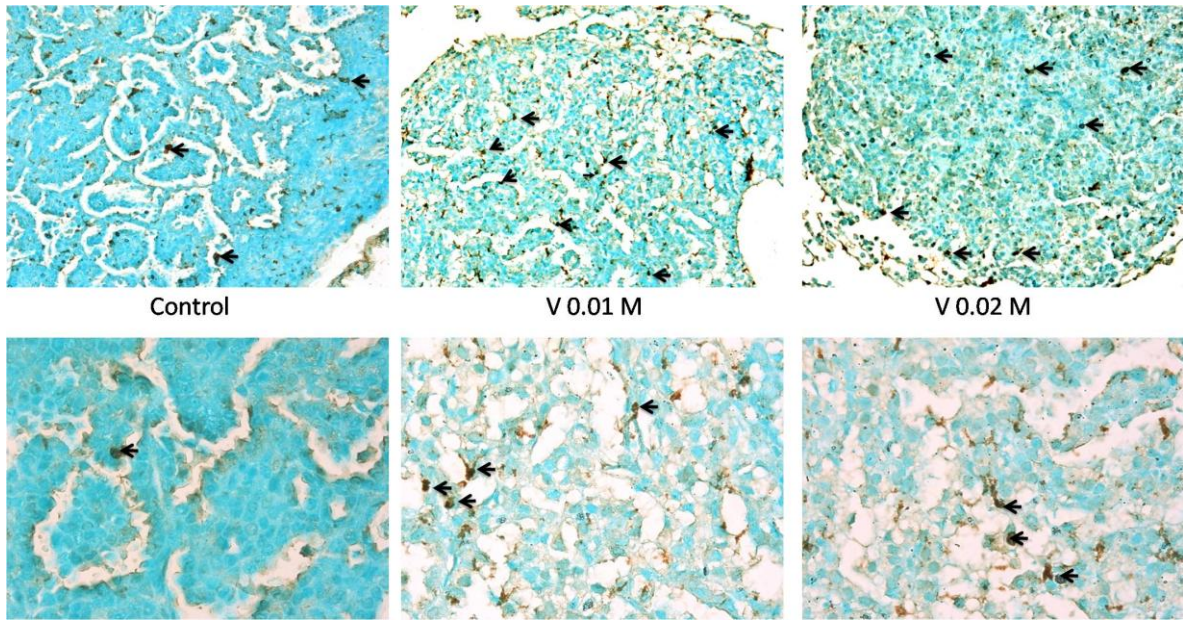
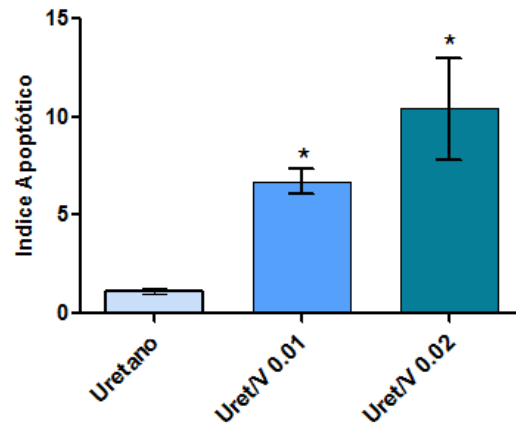


Figura 25. Ensayo de TUNEL para detectar células apoptóticas en los adenomas pulmonares. Los tumores mostraron células TUNEL positivas (→) que se presentan principalmente en los adenomas de los organismos tratados simultáneamente con uretano y vanadio, que en los tratados con uretano. Verde luz, 400X, 1000X.



$p \leq 0.05$ ANOVA (Tukey)

Uret/V 0.01 y Uret/V 0.02 no presentan diferencia significativa.

Figura 26. El cálculo de los índices apoptóticos dentro de los tumores evidenció un incremento en la muerte por apoptosis en los adenomas de los organismos tratados con uretano y vanadio, en comparación con los tratados únicamente con vanadio.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de nuestros experimentos demuestran que el vanadio es capaz de disminuir el tamaño y el número de los adenomas pulmonares inducidos con uretano a través de la activación de los mecanismos de apoptosis. Esto se evidencia con el incremento de los índices apoptóticos dentro de los tumores de los grupos Uretano/Vanadio, en cualquiera de sus dosis utilizadas, con respecto al tratamiento con uretano.

El tratamiento con vanadio propició en primera instancia, el incremento de la presencia de marcadores proapoptóticos (p53 y Bax) así como la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl2, lo cual correlaciona con el incremento en la apoptosis (ensayo de TUNEL) en los tumores y el tejido pulmonar sano (esto último solo se evaluó cualitativamente). Hallazgos similares se han reportado en otros estudios sobre los cuales se detallará más adelante.

Es importante mencionar que el incremento de los marcadores proapoptóticos se evidenció tanto en el tejido pulmonar sano como en el tumoral, a diferencia de Bcl2 (marcador antiapoptótico), que únicamente aumentó en el parénquima pulmonar, y no dentro de los tumores.

En cuanto a p53, como se espera se detectó tanto en el citoplasma de las células pulmonares sanas como en el de las tumorales, así como en los núcleos de algunas células. Se conoce que p53 es una proteína que se presenta en el citoplasma y puede translocarse al núcleo y la mitocondria durante la apoptosis, regulando a distintas proteínas como Bax, PUMA y Bak, entre otras (Moll y Zaika, 2001; Liu et al., 2008; Green y Kroemer, 2009). Esta proteína, como se había mencionado con anterioridad, es un importante regulador de la apoptosis, por lo que nuestros resultados demuestran que está implicada en la muerte inducida por la inhalación de pentóxido de vanadio en este modelo,

Un hallazgo interesante fue la presencia de Bax en el núcleo de las células, sobre todo las bronquiolares y tumorales. Normalmente Bax se encuentra en el citoplasma y en respuesta a estímulos pro-apoptóticos esta proteína cambia su localización celular y su patrón de dimerización. Cuando la proteína Bax forma homodímeros, adquiere la capacidad de unirse a la membrana, y se transloca a la mitocondria, induciendo la apoptosis por los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997; Gross et al., 1998).

Por otro lado, estudios en la última década han mostrado la translocación al núcleo de la proteína Bax durante la apoptosis, aunque su función en este organelo no ha sido establecida claramente (Wang et al., 1999; Salah-Eldin et al., 2003; Paixao et al., 2011). Es probable que esta proteína está implicada con la apoptosis en nuestro modelo, al igual que la función de su traslocación al núcleo y su relación con la muerte, lo cual queda por ser estudiado y establecido.

Por otro lado, en cuanto a los índices proapoptóticos, estos incrementaron dentro de los tumores y aparentemente se presentó un mayor número de células marcadas en el parénquima pulmonar sano (células bronquiolares e inflamatorias), aunque esto último no se registró, lo cual queda por estudiar.

A continuación, describiremos algunos estudios que nos sugieren ciertos mecanismos en los que el pentóxido de vanadio podría participar, como el caso de otros compuestos de vanadio que se han

probado. Es claro que el estado de oxidación de cada compuesto de vanadio es distinto; sin embargo, como se mencionó en la introducción, independientemente de la forma en la que se administra el vanadio, este se acumula en forma de V^{IV} (VO^{2+}) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006), por lo que algunos mecanismos y efectos pueden ser compartidos por varios compuestos del mismo metal.

Por décadas se ha identificado la capacidad de distintos compuestos de vanadio para propiciar la iniciación de la apoptosis en distintos tejidos y modelos. El grueso de los estudios sugieren la relación directa entre las ROS generadas por el vanadio y los distintos mecanismos de activación de la apoptosis.

Como se había mencionado en la introducción, el vanadio es capaz de participar en reacciones que involucran la formación de radicales libres, por ejemplo a través de las reacciones tipo Fenton y de Haber Weiss (Farber et al., 1990; Cortizo et al., 2000; Crans et al., 2004; Goc, 2006) y se conoce que las especies generadas a través de estas reacciones y/o durante la reducción intracelular de V^V a V^{IV} participan en la mayoría de los efectos inducidos por este metal (Capella, 2002).

Se conoce que al administrar pentóxido de vanadio, dentro de las células se llevan a cabo reacciones que llevan a la formación de peroxovanadil, y vanadil hidroperóxido, además de radicales hidroxilo. Estas especies reactivas tienen la capacidad de interactuar con el DNA, los lípidos y las proteínas, modificándolos, lo que puede llevar a la muerte celular como ya se ha reportado (Mussali-Galante et al., 2007). Esta producción de especies reactivas de oxígeno en el citosol o en la mitocondria, puede resultar también, en daño mitocondrial con la consecuente liberación de citocromo C que activa la vía de las caspasas. Las caspasas activadas, como la 3 y la 8, provocan un mayor daño en la mitocondria y activan otras proteínas implicadas en la vía de muerte apoptótica (Green y Reed, 1998; Desagher y Martinou, 2000).

Distintos compuestos de vanadio son capaces de desencadenar la muerte, tanto en células normales de distintos órganos, como en células malignas, y en algunos estudios se ha logrado identificar la relación con la producción de estrés oxidante.

Diversos estudios revelan el efecto, por ejemplo, sobre espermatozoides normales en los que la exposición a V induce la muerte de estas células. D'Cruz y colaboradores reportan que distintos vanadocenos poseen una potente actividad de espermicidas contra espermatozoides humanos, a través de la inducción de la apoptosis (D'Cruz et al., 1998). Este efecto se ha reportado también *in vivo*; ratones expuestos a vanadocenos presentan apoptosis de células germinales, además de atrofia de túbulos seminíferos e inhibición de la espermatogénesis (D'Cruz y Uckun, 2000). En otro estudio *in vivo* en ratas Wistar, la administración de vanadil sulfato, $VOSO_4$, (100 mg/kg de peso del animal, por día) en agua de bebida, se presentó degeneración de células espermatogénicas y disminución de células germinales post meióticas y espermatozoides, entre otros cambios. Estos se sugiere, pueden atribuirse a un incremento en la apoptosis de las células germinales (Jain et al., 2007).

Sobre la misma línea, Aragón y cols., reportan que el tratamiento de ratones con tetraóxido de vanadio aplicado por inyección intraperitoneal, induce el incremento en la apoptosis en células germinales testiculares en los estadios I-III y XII a dosis de 9.4 y 18.8 mg/kg (Aragón et al., 2005).

En otras células como las endoteliales también se han reportado efectos sobre el incremento de la muerte por apoptosis. La exposición de células endoteliales de vena umbilical humana (Human

Umbilical Vein Endothelial Cells- HUVECs) a V_2O_5 propicia el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico, así como la disminución de la proliferación; estos cambios son acompañados de cambios morfológicos y apoptosis (Montiel-Dávalos, et al., 2012).

En células de hígado de rata se demostró que el vanadil sulfato ($VOSO_4$), el metavanadato de amonio ($NaVO_3$) y el citrato de vanadio (VOcit) son capaces de provocar la muerte por apoptosis a través de otros mecanismos que afectan de manera directa a la mitocondria. Por ejemplo se sabe que inducen la apertura del PTP (Permeability Transition Pore), con la consecuente liberación de citocromo C al citoplasma, lo cual es necesario para la formación y funcionalidad del apoptosoma. Se sugiere que esta activación la llevan a cabo a través de la generación de estrés oxidante con la consecuente disrupción de la membrana mitocondrial (Zhao et al., 2010).

Se ha reportado también la generación e incremento de la apoptosis en distintos estudios hechos en tejido pulmonar, tanto *in vivo* como *in vitro*.

In vivo, Wang y cols. reportan que el V^V es capaz de inducir la infiltración de células inflamatorias y propiciar la muerte celular en el pulmón de ratones sanos, en un modelo de instilación de V. Los resultados sugieren que la infiltración de neutrófilos y la apoptosis de las células epiteliales pulmonares son fenómenos que requieren de la generación de ROS por parte de este metal (Wang et al., 2003).

In vitro, se ha observado que en células epiteliales pulmonares el vanadio estimula a p38 (MAPK) desencadenando la activación de NF- κ B en el citoplasma, con la consecuente muerte celular. Se sabe que el V^{IV} induce la translocación de este factor de transcripción al núcleo en células epiteliales pulmonares humanas (Japers et al., 1999, 2000). Se sugiere que el estrés oxidante induce vías que convergen para modular la actividad transcripcional de NF- κ B (Jaspers et al., 2000). La activación de NF- κ B en células normales y malignas por la exposición a vanadio desencadena la vía de señalización de las MAPKs, lo cual desencadena la apoptosis (Pandey et al., 1995; Zhao et al., 1996; Samet et al., 1998).

En otro estudio, Yoshida y cols. reportan la posible asociación entre la activación de p38 y JNK con el incremento de la muerte de células epiteliales de pulmones de pacientes con Fibrosis Pulmonar Idiopática (Yoshida et al., 2002).

Otra vía a través de la cual el vanadio incide en la iniciación de la apoptosis es a través de p53, que es una molécula que desempeña un papel central en la vía de señalización de este mecanismo. Huang y cols. reportaron que las ROS producidas por el vanadato median la activación de p53 y producen daño mitocondrial, con la subsecuente muerte por apoptosis. La exposición *in vitro* de células epidérmicas JB6 a vanadato, resultó en el incremento de la actividad de p53 y la disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, así como el incremento en la muerte (Huang et al., 2000).

En modelos *in vivo* de distintos tipos de carcinogénesis se ha demostrado también la capacidad de los compuestos de vanadio para desencadenar la muerte de las células tumorales, asociado a la activación de p53 y otras moléculas. En distintos estudios se reporta la disminución en la expresión de marcadores anti-apoptóticos como Bcl2 y el incremento en la expresión de marcadores pro-apoptóticos como Bax y p53 por efecto de la exposición a V. Esta modificación se traduce en el incremento en la apoptosis (Chakraborty et al., 2005; Ray et al., 2006(b); Samanta et al., 2008(a y b); Manna et al., 2011).

Los hallazgos sobre el incremento de estos marcadores proapoptóticos (p53 y Bax), así como la disminución de Bcl2, son similares a los encontrados en nuestro modelo; observamos el incremento de los marcadores pro-apoptóticos p53 y Bax, así como la disminución de Bcl2; este último incrementó solo en el parénquima pulmonar sano y no en los tumores. Esto nos muestra que p53 y Bax son proteínas que intervienen de manera importante en la disminución del tamaño de los adenomas, mientras que Bcl2 no mostró un efecto contundente en los tumores.

Las diferencias encontradas en el ensayo de TUNEL confirman las diferencias encontradas en estos marcadores, las cuales se tradujeron en diferencias en esta prueba, que mostró una clara diferencia entre los ratones tratados con uretano y los tratados simultáneamente con pentóxido de vanadio y uretano

Los efectos pro-apoptóticos que hemos descrito con anterioridad, no son los únicos que se ha propuesto como posibles mecanismos anticarcinogénicos del vanadio. En otros estudios se proponen mecanismos alternativos a través de los cuales los compuestos de vanadio son capaces de ejercer su potencial anticarcinogénico. Uno de estos efectos es la reducción del daño genotóxico en distintos modelos, al respecto de los cuales se discutirá ahora.

Chakraborty y cols. reportan que la administración de metavanadato de amonio en agua de bebida inhibe la formación de aductos (etilguaninas) de manera tejido-específico, además de disminuir la generación de 8-OHdGs (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) y rompimientos de cadena sencilla de DNA, en hepatocitos de ratas Sprague-Dawley, en un modelo de hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina (Chakraborty et al., 2007). Sobre la misma línea, Chakraborty y cols. refieren en un ensayo a corto plazo, que la administración continua de monovanadato de amonio suprime de la generación de cometas de DNA (rompimientos de cadena sencilla y doble) en hepatocitos de rata retados con dietilnitrosamina (Chakraborty et al., 2006a).

En estos estudios se propone el potencial del vanadio para limitar el evento de iniciación de la carcinogénesis hepática inducida por DEN en ratas, interfiriendo con la formación de aductos con el DNA y de otras lesiones subsecuentes.

La formación de aductos constituye un paso crítico en la iniciación de la carcinogénesis. La habilidad del vanadio para disminuir la formación de los mismos en el modelo anterior indica el potencial que posee para modular la formación de aductos, lo cual podría suceder también en nuestro modelo, dado que el uretano es un carcinógeno genotóxico al igual que la dietilnitrosamina. Esto podría contribuir a la formación de un menor número de tumores, lo cual queda por comprobarse en estudios posteriores.

Otro efecto que se ha descrito también en estudios *in vivo* es la capacidad del vanadio para limitar o disminuir la expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular. Chakraborty y cols. refieren y demuestran la disminución de la presencia del marcador PCNA durante las fases iniciales de la hepatocarcinogénesis inducida por dietilnitrosamina (DEN) en ratas (Chakraborty et al., 2006a). El mismo autor reporta la disminución de este marcador en un modelo de carcinogénesis hepática inducida por 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) (Chakraborty et al., 2006b). Estos hallazgos reflejan el potencial antiproliferativo del vanadio *in vivo*.

En otro estudio se reporta la disminución de la proteína Ki67, detectada por inmunohistoquímica, como consecuencia de la administración de monovanadato de amonio en un modelo de

carcinogénesis hepática en rata (Chakraborty et al., 2005). La expresión y presencia de Ki67 durante todas las fases del ciclo celular, excepto en células en reposo, lo constituyen un marcador de proliferación en las neoplasias (Ito et al., 1999), al igual que PCNA, marcador al que se hizo referencia anteriormente. En el mismo estudio se reporta el incremento en la presencia (detectada por inmunohistoquímica) de p53, al igual que un mayor índice apoptótico (Chakraborty et al., 2005).

La disminución en la presencia y expresión de ambos marcadores se considera como indicador de la disminución en la proliferación. Este decremento constituye uno de los mecanismos a través de los que los compuestos de vanadio ejercen su potencial antiproliferativo y anticarcinogénico. Sin embargo en nuestro estudio, no se presentó diferencia en la cantidad de células marcadas con PCNA.

Existen otros mecanismos que se han planteado, que resultan interesantes pero que no evaluamos en el presente trabajo. Podemos citar el bloqueo de la transición G2 a M en células cancerosas tratadas con peroxovanadatos (Faure et al., 1995; Zhang et al., 2003), el retardo en la progresión del ciclo en la transición de la fase G1 a S en células humanas de carcinoma mamario inducido por el tratamiento con metavanadato de amonio (Ray et al., 2006a).

Estos efectos del vanadio sobre el arresto del ciclo celular otra posible explicación para los resultados obtenidos, lo cual es factible de ser estudiado más adelante, considerando otros tiempos de exposición al compuesto, así como otras dosis del mismo. Nuestros resultados apuntan a que en el modelo, a las ocho semanas de exposición, no hay diferencia en cuanto a la proliferación de las células tumorales, por lo que la apoptosis contribuye de manera importante en la reducción del tamaño y número de los adenomas como consecuencia del tratamiento con pentóxido de vanadio.

Es importante destacar que nuestros resultados sugieren que al menos para este compuesto, y en este estudio no existe una clara diferencia de efectos relacionada con las dosis utilizadas; independientemente de la dosis aplicada, el efecto registrado fue el mismo. Sin embargo cabe la posibilidad de que al utilizar otras dosis, entre las cuales exista una mayor diferencia, los efectos registrados sean distintos, lo cual queda abierto a ser explorado.

Es importante mencionar que todos estos datos y reportes demuestran el gran potencial de los compuestos de vanadio para ser utilizados como agentes antiproliferativos y anticarcinogénicos. Este mismo potencial queda evidenciado para el pentóxido de vanadio, compuesto utilizado por nuestro grupo de estudio. Cabe destacar que en otras publicaciones, este compuesto ha mostrado un potencial totalmente diferente, lo cual abre la posibilidad a seguir explorando los efectos de este compuesto para mostrar evidencias contundentes sobre el compuesto y sus dosis.

Este estudio constituye una de las primeras evidencias de que el pentóxido de vanadio es, al igual que los compuestos que hemos mencionado ampliamente en este trabajo (metavanadato de amonio, peroxovanadatos, vanadocenos), factible de ser estudiado como un compuesto anticarcinogénico.

Por otro lado, se abre la posibilidad a continuar en esta línea de investigación, contribuyendo al conocimiento de este interesante metal y la versatilidad de sus compuestos, y queda en evidencia, el efecto que puede tener un tóxico al que estamos expuestos de manera cotidiana, en una patología de importancia hoy día.

CONCLUSIONES

- La inhalación de pentóxido de vanadio disminuyó el número y tamaño de los adenomas pulmonares inducidos con uretano; esta disminución fue independiente de las dosis del compuesto utilizadas.
- El tratamiento con pentóxido de vanadio no influyó en la proliferación de las células del adenoma.
- El pentóxido de vanadio incrementó la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular en los adenomas.
- El efecto del pentóxido de vanadio sobre los marcadores evaluados fue independiente de la dosis administrada.
- En el modelo, el pentóxido de vanadio indujo apoptosis de las células tumorales en los organismos tratados simultáneamente con uretano y pentóxido de vanadio.
- Nuestros resultados abren la posibilidad de explorar su efecto del pentóxido de vanadio como un agente anticarcinogénico en otros modelos.

PERSPECTIVAS

- Estudiar el efecto del pentóxido de vanadio sobre la muerte de líneas tumorales pulmonares *in vitro*.
- Evaluar el daño genotóxico producido por el carcinógeno (uretano) y su modificación por el tratamiento con pentóxido de vanadio.
- Analizar el efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio, de manera posterior al establecimiento del adenocarcinoma pulmonar.
- Evaluar la administración oral del vanadio en éste u otros modelos de carcinogénesis pulmonar.

REFERENCIAS

- Adams J.M., Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 26: 1324–1337.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1997. *ATSDR's Toxicological Profiles: Vanadium*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, CRC Press, Inc.
- Alfaro-Moreno E., Martínez L., García-Cuellar C., Bonner J.C., Murray J. C., Rosas I., Ponce de León Rosales S., Osornio-Vargas A.R. 2002. Biologic Effects Induced in Vitro by PM10 from Three Different Zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives*. 110:715–720.
- Altamirano-Lozano M., Valverde M., Alvarez-Barrera L., Molina B., Rojas E. 1999. Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide (V₂O₅) in male mice. II. Effects in several mouse tissues. *Teratog Carcinog Mutagen*. 19:243–255.
- Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I., Bizarro P., Altamirano-Lozano M. 2005. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reproductive Toxicology*. 20(1): 127-134.
- Aust AE, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. 2002. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. *Research Report Health Effects Institute*. 110:1–65.
- Barbone F., Bovenzi M., Cavallieri F., Stanta G. 1995. Air-Pollution and Lung- Cancer in Trieste, Italy. *American Journal of Epidemiology*. 141:1161-1169.
- Barceloux D.G, Barceloux D. 1999. Vanadium . *Clin Toxicol*. 37(2): 265–278.
- Becker S., Soukup J.M., Gilmour M.I., Devlin R.B. 1996. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol*. 141:637–48.
- Behrens J. 1993. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Research and Treatment* 24: 175-184.
- Benson R.W., Beland F.A. 1997. Modulation of urethane (ethyl carbamate) carcinogenicity by ethyl alcohol: a review. *International Journal of Toxicology*. 16:521–544.
- Bishayee A., Chatterjee M. 1995. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by Phenobarbital. *British Journal of Cancer*. 71: 1214-1220.
- Bishayee A., Waghay A., Patel M.A., Chatterjee M. 2010. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence. *Cancer Letters* 294: 1–12.
- Bonner, J. C., Lindroos, P. M., Rice, A. B., Moomaw, C. R., and Morgan, D. L. 1998. Induction of PDGF receptor- α in rat myofibroblasts during pulmonary fibrogenesis in vivo. *Am. J. Physiol*. 274: L72–L80.
- Bonner J.C ., Rice A.B., Moomaw C.R., Morgan D.I. 2000. Airway Fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol*. 278: L209 - L216.
- Bonner, J.C. 2007. Lung Fibrotic Responses to Particle Exposure. *Toxicologic Pathology*. 35:148–153.
- Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., Porras, A. 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 α MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12:1733–1742.
- Brunekreef B, Forsberg B. 2005. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J*. 26: 309–318.
- Capella L.S., Alcántara J.S., Maura-Neto V., Lopes A.G., Capella M.A. 2000. Vanadate is toxic to adherent-growing multidrug-resistant cells. *Tumor Biol*. 21:54–62.
- Capella L.S., Gefé M.R., Silva E.F., Affonso-Mitidieri O., Lopes A.G., Rumjanek V.M., Capella M.A.M. 2002. Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Arch Biochem Biophys*. 406: 65-72.
- Chakraborty T., Samanta S., Ghosh B., Thirumoorthy N., Chatterjee M. 2005. Vanadium Induces Apoptosis and Modulates the Expressions of Metallothionein, Ki-67 Nuclear Antigen, and p53 During 2-Acetylaminofluorene-Induced Rat Liver Preneoplasia. *Journal of Cellular Biochemistry*. 94:744–762.
- Chakraborty T., Chatterjee A., Dhachinamoorthi D., Srivastawa S., Panayappan L., Chatterjee M. 2006 (a). Vanadium Limits the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Inhibits Early DNA Damage During Diethylnitrosamine-Induced Hepatocellular Preneoplasia in Rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 47:603-615.

- Chakraborty T., Chatterjee A., Saralaya M.G, Dhachinamoorthi D., Chatterjee M. 2006 (b). Vanadium inhibits the development of 2-acetylaminofluorene-induced premalignant phenotype in a two-stage chemical rat hepatocarcinogenesis model. *Life Sciences*. 78: 2839 – 2851
- Chakraborty T., Chatterjee A., Rana A., Dhachinamoorthi D. , Kumar A.P, Chatterjee M. 2007. Carcinogen-induced early molecular events and its implication in the initiation of chemical hepatocarcinogenesis in rats: Chemopreventive role of vanadium on this process. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1772: 48– 59.
- Chieco P., Derenzini M. 1999. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol*. 111:345–358
- Ciomei M., Pastori W., Capolongo L., Geroni C., Melegaro G., Pennella G., Grandi M. 1995. Decreased tyrosine phosphorylation in tumor cells resistant to FCE 24517. *Br J Cancer*. 76:1504–1508.
- Clément-Duchêne C., Vignaud J., Stoufflet A., Bertrand O., Gislard A., Thiberville L., Grosdidier G., Martinet Y., Benichou J., Hainaut P., Paris C. 2010. Characteristics of never smoker lung cancer including environmental and occupational risk factors. *Lung Cancer* 67: 144–150.
- Cooper R.G. 2007. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*.11:97-102.
- Cortizo A.M., Bruzzone L., Molinuevo S., Etcheverry S.B. 2000. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicol*. 147: 89-99.
- Crans D.S., Smeets J.J., Gaidamauskas E., Yang L. 2004. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev*. 104: 849-902.
- Cruz T.F, Morgan A., Min W. 1995. In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate, *Molecular and Cellular Biochemistry*. 153: 161–166.
- Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Bandurski R. 2009. Immunohistochemical evaluation of Ki-67, PCNA and MCM2 proteins proliferation index (PI) in advanced gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. 47(2):289-96.
- Daniel N.N., Korsmeyer S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*. 116: 205–219.
- Davidson T., Ke Q., Costa M. 2007. Chapter 5. Selected Molecular Mechanisms of metal Toxicity and Carcinogenicity. : Nordberg, G., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T (Eds.). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Estados Unidos de América: Academic Press, Elsevier. pp. 79-100.
- D’Cruz O., Ghosh P., Uckun F.M. 1998. Spermicidal Activity of Metallocene Complexes Containing Vanadium(IV) in Humans. *Biology of Reproduction*. 58: 1515-1526
- D’Cruz O., Uckun F.M. 2000. Vanadocene-Mediated in Vivo Male Germ Cell Apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 166: 186-195.
- Desagher S., Martinou J. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*. 10: 369-377.
- Dockery D.W., Pope C.A. III, Xu X., Spengler J.D., Ware J.H., Fay M.E., Ferris B.G. Jr, Speizer F.E. 1993. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 329:1753-1759.
- Dockery D. W. 2009. Health Effects of Particulate Air Pollution. *Annals of Epidemiology*. 19 (4). pp. 257-263.
- Donaldson K., Li X. Y., MacNee W. 1998. Ultrafine (nanometre) particle mediated lung injury. *J. Aerosol Sci*. 29 (5): 553–560.
- Elinder, C.G. Gerhardsson L., Oberdoerster G. 1998. Biological monitoring of toxic metals-overview. En: *Biological monitoring of toxic metals*. W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg, R. Sanger (Eds). Plenum Press, Nueva York. pp. 1-71.
- Engel R.H., Evens A. M. 2006. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Frontiers in Bioscience* 11: 300-312.
- Eskes R., Antonsson B., Osen-Sand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A., Martinou J. 1998. Bax-induced Cytochrome C Release from Mitochondria Is Independent of the Permeability Transition Pore but Highly Dependent on Mg Ions. *The Journal of Cell Biology*. 143(1): 217–224.
- Espinosa G., Goltzari J.I., Ponciano-Rodríguez G., Gaso M.I., Mena M., Segovia N., Vazquez-Lopez C., Sajo-Bohus L. 2009. Population vulnerability due to the exposure to radon and airborne particulate matter (PM10), in Mexico City. *Radiation Measurements* 44: 1028–1031.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K., Janicke, R.U. 2005. Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J. Biol. Chem*. 280:37169–37177.

- Evangelou A. M. 2002. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42: 249–265.
- Farber J.L., Kyle M.E., Coleman J.B. 1990. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.* 62: 670-679.
- Faure R., Vincent M., Dufour M., Shaver A., Posner B.I. 1995. Arrest of the G2/M transition of the cell cycle by protein tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *Journal of Cellular Biochemistry.* 389–401.
- French, R.J., Jones, J.H. 1993. Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif Sci.* 52: 339-346.
- Foley, J.F., Anderson, M.W., Stoner, G.D., Gaul, B.W., Hardisty, J.F., Maronpot, R.R. 1991. Proliferative lesions of the mouse lung: Progression studies in strain A mice. *Exp. Lung Res.* 17: 157–168.
- Forkert P., Kaufmann M., Black G., Bowers R., Chen H., Collins K., Sharma A., Jones G. 2007. Oxidation of Vinyl Carbamate and Formation of 1,N 6 -Ethenodeoxyadenosine in Murine Lung. *Drug Metabolism and Disposition.* 35(5): 713-720.
- Forkert P. 2010. Mechanisms of lung tumorigenesis by ethyl carbamate and vinyl carbamate. *Drug Metabolism Reviews,* 2010; 42(2): 355–378.
- Fortoul T.I, Quan-Torres A., Sánchez I., López I.E, Bizarro P., Mendoza M.L, Osorio L.S, Espejel-Maya G., Avila-Casado M. del C, Ávila-Costa M.R, Colin-Barenque L., Villanueva D.N, Olaiz-Fernandez G. 2002. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s *Arch Environ Health.* 57(5):446-449.
- Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., González-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutiérrez G., Ustarroz-Cano M., Colin-Barenque L., Montañó L. F., García-Peláez I., Bizarro-Nevares P., López-Valdez N., Falcon-Rodríguez C. I, Jimenez-Marínez R. S., Ruiz-Guerrero M. L., López-Zepeda L. S., Morales-Rivero A., Muñiz-Rivera-Cambas A. 2011. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2011: 1-11.
- Gallus S, Negri E, Boffetta P, McLaughlin JK, Bosetti C, La Vecchia C. 2008. European studies on long-term exposure to ambient particulate matter and lung cancer. *European Journal of Cancer Prevention.* 17:191–194.
- Gartner L.P., Hiatt J.L. 2008. Capítulo 15: Sistema Respiratorio. En *Texto Atlas de Histología.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. pp. 345-365.
- Ghanayem B. I. 2007. Inhibition of Urethane-Induced Carcinogenicity in Cyp2e1–/– in Comparison to Cyp2e1+/+ Mice. *Toxicological Sciences.* 95(2): 331–339.
- Goc A. 2006. Biological activity of vanadium compounds. *Cent Eur J Biol.* 1(3): 314–332.
- Grayson, M. 1983. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.* Vol 23. 3a ed. John Wiley & Sons. New York. 688-704.
- Green D.R., Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309–1312.
- Green D. R., Kroemer G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458; 1127-1130.
- Griffey S.M., Kraegel S.A., Madewell B.R. 1999. Proliferation Indices in Spontaneous Canine Lung Cancer:ProliferatingCellNuclearAntigen (PCNA), Ki-67 (MIB1) and Mitotic Counts. *Journal of Comparative Pathology.* 120 (4): 321- 332.
- Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. 1998. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 17:3878–85.
- Gutierrez-Castillo M.E., Roubicek D.A., Cebrián-García M.E., De Vizcaya-Ruiz A., Sordo-Cedeño M., Ostrosky-Wegman P. 2006. Effect of chemical composition on the induction DNA damage by airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* 47: 199-211.
- Hahn F.F., Gigliotti A., Hutt J.A. 2007. Comparative Oncology of Lung Tumors. *Toxicologic Pathology,* 35:130–135.
- Harrison R. M., Yin J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?. *Sci Total Environ.* 249: 85-101.
- Hetland a R.B., Cassee F.R., Refsnes M., Schwarze P.E., Lag M., Boere A.J.F, Dybing E. 2004. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicology in Vitro.* 18: 203–212.

- Hoffler U., El-Masri H. A., Ghanayem B. I. 2003. Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) Is the Principal Enzyme Responsible for Urethane Metabolism: Comparative Studies Using CYP2E1-Null and Wild-Type Mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 305 (2): 557–564.
- Hsu Y.T., Wolter K.G., Youle R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:3668–3672.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., Leonard S.S., Shen H., Leon B., Lu Y., Costa M., Rojanasakul Y., Castranova V., Vallyathan V., Shi X. 2000. Vanadate Induces p53 Transactivation through Hydrogen Peroxide and Causes Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (42): 32516- 32522.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1974. Urethane, in *Monographs on the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man: Some Antithyroid and Related Substances, Nitrofurans and Industrial Chemicals*. Lyon, France. 7:111–140.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).2006. *Iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide*. Vol. 86.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2010. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2010. Alcohol Consumption and Ethyl Carbamate. Lyon, France. 96: 1281-1307.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2011. Causas de defunción Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad, 2009. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.
- Jain G.C., Pareek H., Sharma S., Bhardwaj M., Khajja B.S. 2007. Reproductive Toxicity of Vanadyl Sulphate in Male Rats. *Journal of Health Science*. 53(1): 137-141.
- Jaspers I., Samet J.M., Reed W. 1999. Arsenite exposure of cultured airway epithelial cells activates kB-dependent Interleukin-8 Gene expression in the absence of nuclear factor kB nuclear translocation. *J Biol Chem*. 274:31025–1033.
- Jaspers I., Samet J.M., Erzurum S., Reed W. 2000. Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 23:95–102.
- Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J., Ward E., Forman D. 2011. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin*. 61:69–90.
- Jiménez-Cisneros, B. *La Contaminación Ambiental en México. Causas, efectos y tecnología apropiada*2001. México. Limusa. Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C. Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA.
- Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W. 2002. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*. 108: 153–164.
- Kanna P.S., Mahendrakumar C.B., Chakraborty T., Hemalatha P., Banerjee P., Chatterjee M. 2003. Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2-dimethyl hydrazine, *World J. Gastroenterol*. 9: 1020–1027.
- Kinnula V.L., Everitt J.I., Whorton A.R., Crapo J.D. 1991. Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endo-thelial cells. *American Journal of Physiology*. 261:84–91.
- Klein A., Holko P., Ligeza J., Kordowiak A.M. 2008. Sodium orthovanadate affects growth of some human epithelial cancer cells (A549, HTB44,DU145). *Folia Biol*. 56: 115–121.
- Knaapen M., Shi T., Borm P., Schins R. 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 234/235: 317–326.
- Knecht, E. A., Moorman, W. J., Clark, J. C., Lynch, D. W., and Lewis, T. R. 1985. Pulmonary effects of acute vanadium pentoxide inhalation in monkeys. *American Review of Respiratory Disease*. 132: 1181–1185.
- Kostova I. 2009. Titanium and vanadium complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*. 9: 827–842.
- Kumar S., Weaver V. M. 2009. Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer Metastasis Rev*. 28:113–127.
- Künzli N., Tager I.B. 2005. Air pollution: from lung to heart. *Swiss Medical Weekly*. 135: 697 –702.

- Kuo W.-H., Chen J.-H., Lin H.-H., Chen B.-C., Hsu J.-D., Wang C.-J. 2005. Induction of apoptosis in the lung tissue from rats exposed to cigarette smoke involves p38/JNK MAPK pathway. *Chemico-Biological Interactions* 155:31–42.
- Kurz, E.U., Lees-Miller, S.P. 2004. DNA damage-induced activation of Atm and Atm-dependent signaling pathways. *DNA Repair*. 3:889–900.
- Lee Y.J., Kim J., Kim S., Ha S., Mok T.S., Mitsudomi T., Cho B.C. 2011. Lung cancer in never smokers: Change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer*. 72: 9–15.
- Levy, B. S., Hoffman, L., and Gottsegen, S. 1984. Boilermakers' bronchitis. *J. Occup. Med.* 26, 567–570.
- Ley general del equilibrio ecológico y la protección al Ambiente. Texto vigente. Diario Oficial de la Federación el 28 de enero de 1988. Estados Unidos Mexicanos.-Presidencia de la República.
- Lewtas J. 2007. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research*. 636:95–133.
- Li, E.E., Heflich, R.H., Bucci, T.J., Manjanatha, M.G., Blaydes, B.S., Delclos, K.B. 1994. Relationships of DNA adduct formation, K-ras activating mutations and tumorigenic activities of 6-nitrochrysene and its metabolites in the lungs of CD-1 mice. *Carcinogenesis*. 15: 1377–1385.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111:455–460.
- Li N, Xia T, Nel AE. 2008. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 44:1689–1699.
- Liu B., Chen Y., St. Clair D.K. 2008. ROS and p53: A versatile partnership. *Free Radical Biology & Medicine* 44: 1529–1535.
- Liu J., Jonhston M.R. 2009. Experimental Animal Models for studying Lung Cancer. En: Venkateshwar K., Arenberg D., Kalemkerian G. *Lung Cancer Metastasis: Novel Biological Mechanisms and Impact on Clinical Practice*. Springer Science. Nueva York. pp. 241-266.
- Loo, D.T. 2002. TUNEL Assay. An Overview of Techniques. En: V. V. Didenko. *Methods in Molecular Biology*, vol. 203: In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. p.p. 21-30.
- López-Valdez. 2008. Efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio en el modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano: estudio en ratón. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2009/enero/0637802/Index.html>
- López-Poveda, E.A. 2012. Las técnicas de análisis de imagen tienen aplicaciones en astronomía, teledetección, y también en neurociencias. Universidad de Salamanca. p.p. 1-52. Disponible en: <http://web.usal.es/~ealopezpoveda/Documentos/Docencia/Master%20Neurociencias.pdf>
- Luber B., Candidus S., Handschuh G., Mentele E., Hutzler P., Feller S., Voss J., Höfler H., Becker K. 2000. Tumor derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun*. 7:391–408.
- Malkinson, A.M. 1989. The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. *Toxicology*. 54: 241–271.
- Malkinson, A.M. 2001. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 32: 265–279.
- Manna S., Das S., Chatterjee M., Janarthan M., Chatterjee M. 2011. Combined Supplementation of Vanadium and Fish Oil Suppresses Tumor Growth, Cell Proliferation and Induces Apoptosis in DMBA-Induced Rat Mammary Carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112:2327–2339.
- Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria: a potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 275:16202–16212.
- Mason R. J., Kalina M., Nielsen L. D., Malkinson A. M., Shannon J. M. 2000. Surfactant Protein C Expression in Urethane-Induced Murine Pulmonary Tumors. *American Journal of Pathology*. 156(1): 175-182.
- Matsuyoshi N., Hamagushi M., Tanigushi S., Nagafuchi A., Tsukita S., Tackeishi M. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by the v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol*. 118:703–714.
- Meuwissen R., Berns A. 2005. Mouse models for human lung cancer. *Genes & Development*. 19:643–664.
- Miller, J. A. 1991. The need for epidemiological studies of the medical exposures of Japanese patients to the carcinogen, ethyl carbamate (urethane), from 1950 to 1975. *Jpn J Cancer Res*. 82:1323–1324.

- Miller, M.S., Gressani, K.M., Leone-Kabler, S., Townsend, A.J., Malkinson, A.M., O'Sullivan, M.G. 2000. Differential sensitivity to lung tumorigenesis following transplacental exposure of mice to polycyclic hydrocarbons, heterocyclic amines, and lung tumor promoters. *Exp. Lung Res.* 26: 709–730.
- Mirvish, S. S. 1968. The carcinogenic action and metabolism of urethan and N-hydroxyurethan. *Adv Cancer Res* 21:1–42.
- Mishra S., Mathur R., Hamburger A.W. 1994. Modulation of cytotoxic activity of tumor necrosis factor by protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Lymphokine Cytokine Res.* 13:77–83.
- Molina-Alavez A., Pimentel-Rentería A., Aldaco-Sarvide F., Torrecillas-Torres L., Cortés-E. P., Juárez-Ramiro A., Molina-Alavez P., Cervantes-Sánchez M.G. 2008. Prevalencia de cáncer pulmonar y subtipos histológicos en el Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” de 2002 al 2006. *GAMO.* 7(5): 169-173.
- Molinuevo M.S, Barrio D.A., Cortizo A.M., Etcheverry S.B. 2004. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53: 163–172.
- Moll U.M. , Zaika A. 2001. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Letters.* 493: 65-69.
- Montiel-Dávalos A., Gonzalez-Villava A., Rodriguez-Lara V., Montañó L.F., Fortoul T.I., López-Marure R. 2012. Vanadium pentoxide induces activation and death of endothelial cells. *J. Appl. Toxicol.* 32: 26–33.
- Moskalyk R.R, Alfantazi A.M. 2003. Processing of vanadium: a review. *Minerals Engineering.* 16: 793–805.
- Mussali-Galante P., Rodríguez-Lara V., Avila-Costa M.R., Fortoul T.I. 2007. Mechanisms of vanadium toxicity. En: *Vanadium: Its impact on Health.* Fortoul T.I., Avila-Costa (Eds.). Nova Science Publishers. pp.7-20.
- Narla R.K. Yanhong Dong, Klis D., Uckun F. M. 2001. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) Sulfatooxovanadium(IV) as a Novel Antileukemic Agent with Matrix Metalloproteinase Inhibitory Activity. 7: 1094 - 1101.
- National Toxicology Program. 2000. Report on Carcinogens. 9th ed. National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.
- National Toxicology Program (NTP) .2002 . Toxicology and Carcinogenesis Studies of Vanadium Pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Technical Report Series No. 507. NIH Publication No. 02-4441. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.
- Nettleship, A., Henshaw, P. S., Meyer, H. L. 1943. Induction of pulmonary tumors in mice with ethyl carbamate (urethane). *J Natl Cancer* 4:309–319.
- Nomura, T. 1975. Urethane (ethyl carbamate) as a co-solvent of drugs commonly used parenterally in humans. *Cancer Research.* 35:2895–2899.
- Omori H., Katoh T. 2011. Environmental Lung Cancer Epidemiology. *Encyclopedia of Environmental Health.* pp. 471-475.
- Onursal B., Gautam S. 1997. Vehicular Air Pollution: Experiences from Seven Latin American Urban Centers. World Bank Publications. 282 pages.
- Occupational Safety and Health Administration. (OSHA). 2012. Disponible en: <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/vanadiumpentoxidedust/recognition.html>
- Ozben T. 2006. Oxidative Stress and Apoptosis: Impact on Cancer Therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 96:2181–2196.
- Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK. 1995. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. *Mol Cell Biochem.* 153:69–78.
- Paixao J., Dinis T.C.P., Leonor M. Almeida. 2011. Dietary anthocyanins protect endothelial cells against peroxynitrite-induced mitochondrial apoptosis pathway and Bax nuclear translocation: an *in vitro* approach. *Apoptosis.* 16:976–989.
- Peng C., Graves P.R., Thoma R.S, Wu Z., Shaw A., Piwnica-Worms H. 1997. Mitotic and G2 Checkpoint Control: Regulation of 14-3-3 Protein Binding by Phosphorylation of Cdc25C on Serine-216. *Science.* 277: 1501-1505.
- Perez L., Rapp R., Künzli N.2010. The Year of the Lung: outdoor air pollution and lung health. *Swiss Med Wkly.* 140: E1-E7.
- Piñon-Zarate G., Rodríguez-Lara V., Rojas-Lemus M., Martínez-Pedraza M., González-Villalva A., Mussali-Galante P., Fortoul T.I. 2008. Vanadium Pentoxide Inhalation Provokes Germinal Center Hyperplasia and Suppressed Humoral Immune Responses. *Journal of Immunotoxicology,* 5:1–7.

- Pope C.A III. , Bates D.V., Raizenne M. E. 1995. Health Effects of Particulate Air Pollution: Time for Reassessment? *Environ Health Perspec.* 103 (5): 472-480.
- Pope C.A., Namboodiri M.M., Dockery D.W., Evans J.S., Speizer F.E., Heath C.W. 1995. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:669-674.
- Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of American Medical Association.* 287:1132-1141.
- Pore M. M., Hiltermann T.J.N., Kruyt F. 2010. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Letters.* Article in Press.
- Prahalad A.K., Soukup J.M., Inmon J., Willis R., Ghio A.J., Becker S., Gallagher J.E. 1999. Ambient air particles: effects on cellular oxidant radical generation in relation to particulate elemental chemistry. *Toxicol Appl Pharmacol.* 158:81-91.
- Ray R.S., Roy S., Ghosh S., Kumar M., Chatterjee M. 2004. Suppression of cell proliferation, DNA protein cross-links, and induction of apoptosis by vanadium in chemical rat mammary carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1675. 165-173.
- Ray R.S. , Rana B. , Swami B. , Venu V. , Chatterjee M. 2006 (a). Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line, *Chem. Biol. Interact.* 163: 239-247.
- Ray R. S., Ghosh B., Rana A., Chatterjee M. 2006 (b). Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int. J. Cancer.* 120: 13-23.
- Re, F.C., Manenti, G., Borrello, M.G., Colombo, M.P., Fisher, J.H., Pierotti, M.A., Della, P.G., Dragani, T.A. 1992. Multiple molecular alterations in mouse lung tumors. *Mol. Carcinog.* 5: 155-160.
- Rehder D. 2003. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorganic Chemistry Communications* 6: 604-617.
- Ress N. B., Chou B. J., Renne R. A., Dill J. A., Miller R. A., Roycroft J. H., Hailey J. R., Haseman J. K., Bucher J. R. 2003. Carcinogenicity of Inhaled Vanadium Pentoxide in F344/N Rats and B6C3F 1 Mice. *Toxicological Sciences.* 74: 287-296.
- Riveros-Rosas H., Pfeifer G.D., Lynamc D. R., Pedroza J.L, Julián-Sánchez A., Canales O., Garfias J. 1997. Personal exposure to elements in Mexico City air. *Sci Total Environ.* 198 (1): 79-96.
- Rodríguez-Mercado J.J, Altamirano-Lozano, M. 2006. Vanadio: Contaminación, Metabolismo y Genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (4): 173-189.
- Rodríguez-Salazar M.T, Morton-Bermea O., Hernández-Alvarez E. , Lozano R. , Tapia-Cruz V. 2011. The study of metal contamination in urban topsoils of Mexico City using GIS. *Environ Earth Sci.* 62:899-905
- Rojas E., Valverde M., Herrera L.A., Altamirano-Lozano M., Ostrosky-Wegman P. 1996. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophore-Sis in human lymphocytes. *Mut Res.* 359:77-84.
- Rondini Elizabeth, Walters D. M, Bauer A. K. 2010. Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner. *Particle and Fiber Toxicology.*
- Rosales-Castillo J.A., Torres-Meza V. M., Olaiz-Fernández G., Borja-Aburto V. H. 2001. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública Mex.* 43:544-555.
- Ross, M., Pawlina W. 2007. *Histología. Texto Atlas color con Biología Celular y Molecular.* 5ed. Editorial Médica Panamericana. pp. 828-893.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., Chumakov, P.M. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nature Medicine.* 11:1306-1313.
- Sakurai H. 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: Implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environmental Health Perspectives.* 3:35-6.
- Sakurai H., Tamura H., Okatani K. 1995. Mechanism for a new vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 206:133-137.

- Salah-eldin A., Inoue S., Tsukamoto S., Aoi H., Tsuda M. 2003. An association of bcl-2 phosphorylation and bax localization with their functions after hyperthermia and paclitaxel treatment. *International Journal of Cancer*: 103: 53–60.
- Salaman, M. H., Roe, F. J. C. 1953. Incomplete carcinogens: ethyl carbamate (urethane) as an initiator of skin tumour formation in the mouse. *Br J Cancer* 7:472–481.
- Samanta S., Chatterjee M., Ghosh B., Rajkumar M., Rana A., Chatterjee M. 2008 (a). Vanadium and 1,25 (OH)₂ vitamin D3 combination in inhibitions of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1780. 1106–1114.
- Samanta S., Swamy V., Suresh D., Rajkumar M., Rana B., Rana A., Chatterjee M. 2008 (b). Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon: Removal of O⁶-methylguanine DNA adducts, p53 expression, inducible nitric oxide synthase downregulation and apoptotic induction. *Mutation Research*. 650: 123–131.
- Samet J.M. 1993. The Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*. 103: 20-29.
- Samet J. M., Graves L.M., Quay J., Dailey L.A. et al. Devlin R.B., Ghio A.J., Wu W., Bromberg P. A., Reed W. 1998. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Pneumonol*. 275:551–558.
- Samet, J.M. 2004. Environmental Causes of Lung Cancer: What Do We Know in 2003? *Chest*. 125 (80): 80-83.
- Samet J.M., Avila-Tang E., Boffetta P., Hannan L.M., Olivo-Marston S., Thun M. J., Rudin C. M. 2009. Lung Cancer in Never Smokers: Clinical Epidemiology and Environmental Risk Factors. *Clin Cancer Res*. 15(18): 5626-5645.
- Scior T., Guevara-García A. , Bernard P., Do Q., David D., Laufer S. 2005. Are Vanadium Compounds Drugable? Structures and Effects of Antidiabetic Vanadium Compounds: A Critical Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 5: 995-1008.
- Scrivens P. J., Alaoui-Jamali M.A., Giannini G., Wang T., Loignon M., Batist G., Sandor V.A. 2003. Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. *Mol Cancer Ther*. 2:1053-1059.
- Secretaría del Medio Ambiente. Proyecto Piloto Retrofit en vehículos A Diesel en la Ciudad de México. Contaminación del aire y transporte vehicular en la ZMVM. México, 2011. Disponible en: www.sma.df.gob.mx/retrofit.
- Secretaría de Salud, Subsecretaría de prevención y promoción de la salud y Dirección general de epidemiologías. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD/Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. Junio, 2011. México, D.F.
- Shimkin, M. B., Stoner, G. D. 1975. Lung tumors in mice: application to carcinogenesis bioassay. *Adv Cancer Res* 21:1–58.
- Simkhovich B.Z., Kleinman M.T., Kloner R.A. 2008. Air Pollution and Cardiovascular Injury: Epidemiology, Toxicology, and Mechanisms. *J. Am. Coll. Cardiol*. 52(9): 719-726.
- Sorensen M., Schins R. P.F., Hertel O., Loft S. 2005. Transition Metals in Personal Samples of PM 2.5 and Oxidative Stress in Human Volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 5(14): 1340-1343.
- Sphyris N., Harrison D.J. 2005. p53 deficiency exacerbates pleiotropic mitotic defects, changes in nuclearity and polyploidy in transdifferentiating pancreatic acinar cells. *Oncogene*. 24: 2184–2194.
- Suda K., Tomizawa K., Yatabe Y., Mitsudomi T. 2011. Lung cancers unrelated to smoking: characterized by single oncogene addiction? *Int J Clin Oncol*. 16:294–305.
- Sun S., Schiller J. H., Gazdar A. F. 2007. Lung cancer in never smokers- a different disease. *Nature Reviews*. 7: 778-790.
- Sydlik U., Bierhals K., Soufi M., Abel J., Schins R. P. F., Unfried K. 2006. Ultrafine carbon particles induce apoptosis and proliferation in rat lung epithelial cells via specific signaling pathways both using EGF-R. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291: 725–733.
- Takenaga K. 1996. Suppression of metastatic potential of high metastatic Lewis lung sarcoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis*. 16:97–106.
- Tannenbaum, A. 1964. Contribution of urethane studies to the understanding of carcinogenesis. *National Cancer Institute Monograph*. 14:341–356.

- Thompson H.J., Chasteen D.N., Neeker L. 1984. Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 5:849–51.
- Toya T., Fukuda K., Takaya M., Arito H. 2001. Lung Lesions Induced by Intratracheal Instillation of Vanadium Pentoxide Powder in Rats. *Industrial Health*. 39: 8–15.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. & Hiai, H. 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 358: 1–3.
- Trachootham D., Alexandre J., Huang P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews. Drug Discovery*. 579-591.
- Uhal, B. D. 1997. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 272:1031–1045.
- Upadhyay D., Panduri V., Ghio A., Kamp D.W. 2003. Particulate Matter Induces Alveolar Epithelial Cell DNA Damage and Apoptosis Role of Free Radicals and the Mitochondria. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 29: 180–187.
- USEPA. 2004. Air Quality Criteria for Particulate Matter. EPA/600/P-99/002aF.
- Valavanidis A., Fiotakis K., Vlachogianni T. 2008. 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*. 26(4): 339-362.
- Vineis P, Forastiere F, Hoer G, Lipsett M. 2004. Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiological evidence. *International Journal on Cancer*. 111:647–652.
- Wakamatsu N., Devereux T.R., Hong H.I., Sills R.C. 2007. Overview of the Molecular Carcinogenesis of Mouse Lung Tumor Models of Human Lung Cancer. *Toxicologic Pathology*, 35:75–80.
- Wang L., Medan D., Mercer R., Overmiller D., Leonard S., Castranova V., Shi X., Ding M., Huang C., Rojanasakul Y. 2003. Vanadium-Induced Apoptosis and Pulmonary Inflammation in Mice: Role of Reactive Oxygen Species. *Journal of Cellular Physiology*. 195:99–107.
- Wang Z.H., Ding M.X., Chew-Cheng S.B., Yun J.P., Chew E.C. 1999. Bcl-2 and Bax proteins are nuclear matrix associated proteins. *Anticancer Research*. 19:5445–5449.
- Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 139:1281–92.
- World Health Organization (WHO) (2001). Vanadium Pentoxide and Other Inorganic Vanadium Compounds. *Concise International Chemical. Assesment Documents Document 29*.
- Yang W., Omaye S.T. 2009. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutation Research* 674: 45–54.
- Yano T., Haro A., Shikada Y., Maruyama R., Maehara Y. 2011. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative ‘non-smoking-associated lung cancer’: epidemiology and clinical features. *Int J Clin Oncol*. 16:287–293.
- Yoshida K., Kuwano K., Hagimoto N., Watanabe K., Matsuba T., Fujita M., Inoshima I., Hara N. 2002. MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol*. 198: 388–396.
- Youlden D. R., Cramb S. M., Baade P.D. 2008. The International Epidemiology of Lung Cancer Geographical Distribution and Secular Trends. *Journal of Thoracic Oncology*. 3(8): 819-831.
- Zhang Z., Leonard S., Huang C., Vallyathan V., Castranova V., Shi X. 2003. Role of reactive oxygen species and MAPks in vanadate-induced G2/M phase arrest. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 34, No. 10, pp. 1333–1342.
- Zhao Z, Tan Z, Diltz CD, You M, Fisher EH. 1996. Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*. 271:22251–22255.
- Zhao, Y., Chaiswing, L., Velez, J.M., Batinic-Haberle, I., Colburn, N.H., Oberley, T.D. 2005. p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 65:3745–3750.
- Zhao Y., Yeb L., Liu H., Qing Xia, Zhang Y., Yanga X., Wang K. 2010. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *Journal of Inorganic Biochemistry* 104: 371–378.
- Zuckerman V., Wolyniec K., Sionov R.V., Haupt S., Haupt Y. 2009. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J. Pathol*. 219: 3–15.