



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**“EFECTO DEL VANADIO EN LA
MEGACARIOPOYESIS Y SUS
CONSECUENCIAS EN LA FUNCION
PLAQUETARIA”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ADRIANA ELIZABETH GONZALEZ VILLALVA

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

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **GONZÁLEZ VILLALVA ADRIANA ELIZABETH** con número de cuenta 93599571 con la tesis titulada: **"EFECTO DEL VANADIO EN LA MEGACARIOPOYESIS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA FUNCIÓN PLAQUETARIA"** realizada bajo la dirección de la: **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**

Presidente: DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DR. HÉCTOR MAYANI VIVEROS
Secretario: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de febrero de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Gracias porque toda mi formación profesional ha sido en esta nuestra máxima casa de estudios. Soy orgullosamente... UNAM.

Al CONACyT, que me otorgó la beca CVU 42414 para la realización del Doctorado.

A PAPIIT por el apoyo IN-210409 para la realización del proyecto de investigación.

A mi tutora principal, la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes por sus sabios consejos, su apoyo y guía constante para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del Comité tutorial: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dr. Enrique I. Miranda Peralta, por el tiempo dedicado, por sus consejos y asesoría que enriquecieron este proyecto.

AGRADECIMIENTOS TECNICOS

A Verónica Rodríguez Mata del laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular de Facultad de Medicina.

A Carlos Castellanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la asesoría en el manejo del equipo de Citofluorometría.

A la M en C. Patricia Bizarro Nevares, al Biol. Francisco Pasos Nájera y al Biol. Armando Zepeda del Departamento de Biología Celular y Tisular, por su apoyo en la realización de este proyecto.

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

MVZ. Enrique Pinzón Estrada.

MVZ. Víctor Manuel Salgado Alfaro

MVZ. Ismael Torres Saldaña

Al M en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez por la elaboración de los dibujos de la megacariopoyesis y vías de señalización en la megacariopoyesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A ti, Paul... por impulsarme y apoyarme para perseguir mis metas y mis sueños. Gracias por estar en mi vida y compartir tu vida conmigo... porque hemos estado juntos en las buenas y en las malas... Gracias por el amor...

A Marifer y Sofi, ¡ustedes iluminan mi vida! Le dan sentido a mi existencia y me siento muy feliz y orgullosa de ambas... Ustedes son el regalo más maravilloso que me ha hecho la vida... Gracias por compartir conmigo mis logros y sé muy bien que ya me tocará a mí compartir los suyos... Las amo con todo el corazón!!!

A mis papás, Tela y Pablo, les agradezco infinitamente todo el amor que me han dado y me siguen dando... Gracias por todas sus enseñanzas, sobre todo con el ejemplo. Agradezco a Dios que me hayan tocado ustedes como papás... los quiero muchísimo!!!

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, en particular, a mis hermanos, Raúl, Pablo, Tely, Ramón, Rogelio, Fernando y Patty, gracias porque también su ejemplo de responsabilidad y dedicación han sido inspiradores para mi desarrollo académico... Gracias por compartir mis momentos buenos y ser tan solidarios cuando no son tan buenos. Los quiero mucho.

A mi suegra Lucy, por acogerme en su familia y tratarme como si fuese su propia hija... por darnos tanto amor... gracias por amar tanto a mis hijas...

A Tere, gracias por ser mi tutora durante ya tantos años... por apoyarme académicamente y abrirme los ojos para ver más allá y ampliar mis horizontes... Gracias porque, con tu ayuda, siento que he crecido mucho en los últimos años académicamente hablando...

A Lauris, Paty, Marce, Gaby, Nelly, Marthita, Armando, Paco, Carlitos, Rubén... me siento como en familia cuando estoy con ustedes... Gracias por ser mis amigos, por echarme porras... Gracias porque el tiempo que hemos compartido juntos me ha dejado ver lo maravillosos seres humanos que son... ¡Los quiero mucho!

A Shere, Vianey, Gumaro, mis compañeros de cubículo... gracias por compartir el espacio y muchas horas de conversación... gracias por todo.

A mis alumnos Vero, Dinorah, Fany... y ahora, Juan Carlos y Maribel... Gracias porque el trabajar con ustedes ha sido muy enriquecedor en lo académico y en lo personal... Espero poder dejar algo bueno en ustedes y espero que sigan su camino tanto en la ciencia como en lo personal con grandes logros y éxitos.

A Caro, Andy, Fátima, Stephanie, Alejandra, Mariel, Silvana, Nallely porque la convivencia con ustedes en el laboratorio ha sido muy agradable y también he podido aprender de ustedes en lo personal y de sus proyectos ...

I. INDICE

I. INDICE.....	7
II. ABREVIATURAS.....	9
III. RESUMEN.....	10
IV. ABSTRACT.....	12
V. INTRODUCCION	
1. CONTAMINACION AMBIENTAL.....	14
2. VANADIO.....	19
2.1 PROPIEDADES QUIMICAS.....	20
2.2 FUENTES DE CONTAMINACION.....	22
2.3 USOS DEL VANADIO.....	23
2.4 TOXICOCINETICA.....	23
2.5 TOXICIDAD POR EXPOSICION OCUPACIONAL.....	25
2.6 TOXICIDAD CELULAR.....	26
2.7 TOXICIDAD SISTEMICA.....	28
2.8 HEMATOTOXICIDAD.....	30
3. MEGACARIOCITOS Y MEGACARIOPOYESIS.....	34
4. PLAQUETAS.....	37
5. RECEPTOR MPL.....	40
6. VIA DE SEÑALIZACION JAK/STAT	42
VI. JUSTIFICACION.....	44
VII. HIPOTESIS.....	44
VIII. OBJETIVOS.....	45
1. OBJETIVO GENERAL.....	45
2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45

IX. METODO.....	46
X. RESULTADOS.....	49
1. EFECTO DEL VANADIO EN LA PRESENCIA DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA (MPL) EN LOS MEGACARIOCITOS.....	49
2. EFECTO DEL VANADIO EN LA PRESENCIA DE JAK2, STAT 3 Y STAT 5 FOSFORILADOS EN LOS MEGACARIOCITOS.....	50
3. ACTIVACION PLAQUETARIA.....	53
4. EFECTO DEL VANADIO EN LA AGREGACION PLAQUETARIA..	54
XI. DISCUSION.....	56
XII. CONCLUSIONES.....	68
XIII. PERSPECTIVAS.....	68
XIV. BIBLIOGRAFIA.....	69

II. ABREVIATURAS

AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
BFU-Meg	Unidad Formadora de Brotes Megacariocíticos
CTH	Célula Troncal Hematopoyética
ET	Trombocitemia Esencial
JAK	<i>Janus Kinase</i>
Mpl	Receptor de TPO (<i>Mieloproliferative Leukemia oncogen</i>)
PEM	Progenitora Eritroide/Megacariocítica
PMC	Progenitora Mieloide Común
PRP	Plasma Rico en Plaquetas
PST	Partículas Suspendidas Totales
PTP	Proteínas tirosina fosfatasas
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TPO	Trombopoyetina
V	Vanadio
V ₂ O ₅	Pentóxido de Vanadio
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

III. RESUMEN

El Vanadio (V) es un metal que ha adquirido gran importancia como contaminante en los últimos años debido a que se emiten grandes cantidades a la atmósfera sobre todo por fuentes antropogénicas, en la quema de combustibles fósiles. Entre los petróleos con más contenido de V está el mexicano y, en la ciudad de México, las concentraciones de este metal han ido en aumento. Aún se desconocen algunos aspectos de su toxicidad, pero en nuestro modelo murino de inhalación de V_2O_5 hemos encontrado un aumento en el número de plaquetas y de las células precursoras de las mismas, los megacariocitos, en la exposición subcrónica y crónica. Con estos antecedentes, y sabiendo que la principal hormona involucrada en la producción plaquetaria y en la maduración de los megacariocitos es la trombopoyetina (TPO) y su receptor Mpl que activa la vía JAK/STAT, en este estudio exploramos esta vía de señalización. Por otro lado, para saber si la alteración en la megacariopoyesis afecta la función plaquetaria y, además, debido a que la contaminación ambiental suele asociarse a trastornos de la hemostasia, en este trabajo se determinó también la función plaquetaria.

Se utilizaron 60 ratones CD1 divididos en un grupo control y un grupo experimental, este último fue expuesto a V_2O_5 inhalado al 0.02M por una hora dos veces a la semana, durante 8 semanas. Se tomaron los bazo de los ratones para su procesamiento a las 4, 6 y 8 semanas de exposición. Una parte del bazo fue procesada mediante la técnica histológica convencional para determinar la presencia de las proteínas JAK2, STAT3 y STAT5 fosforilados y Mpl en megacariocitos, y otra parte del bazo se utilizó para obtener células para determinar estas mismas proteínas mediante citofluorometría. Se obtuvieron muestras de sangre a las 4 y 8 semanas de exposición y 4 semanas después de finalizada la exposición. La función plaquetaria se determinó identificando marcadores de activación plaquetaria: P-selectina (CD62p) y conjugados monocito-plaqueta en sangre periférica, además de realizar estudios de agregometría en Plasma Rico en Plaquetas (PRP) y sangre entera. Se analizaron los resultados mediante Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey para comparar entre grupos.

Se encontró un aumento de JAK2 y STAT3 fosforilados en megacariocitos de los ratones a las 8 semanas de exposición a V. No se encontró diferencia estadísticamente significativa al analizar STAT 5. El receptor Mpl disminuyó también a las 8 semanas de exposición. Estos resultados fueron consistentes por inmunohistoquímica y citofluorometría. Los marcadores de activación plaquetaria se encontraron sin cambios durante toda la exposición, pero al dejar sin exposición a V, se encontró aumentada la presencia de CD62p. La agregometría en PRP mostró una inhibición de la agregación plaquetaria a las 4 semanas de exposición a V, misma que revirtió a las 8 semanas y en el periodo post exposición. La vía JAK/STAT se encuentra activada y está implicada en la proliferación de megacariocitos. Esta activación puede deberse a que el V es capaz de inhibir Proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), motivo por el que éstas proteínas permanecen fosforiladas y activadas. En este modelo se propone que la disminución del receptor Mpl al final de la exposición puede deberse a un mecanismo de regulación negativa. Los cambios en los megacariocitos y plaquetas y la activación de JAK2 semejan muchos de los hallazgos que se presentan en un trastorno mieloproliferativo, la Trombocitemia Esencial (ET), aun cuando el origen de esta enfermedad es diferente. Por otro lado, no se encontraron cambios en los marcadores de activación plaquetaria durante toda la exposición, pero sí en la post exposición, tal vez por efecto tardío del V, ya que el V se elimina muy lentamente del organismo. Además, se observó que la exposición a V tiene un efecto inhibitorio en la agregación plaquetaria a las 4 semanas, pero este efecto en las plaquetas revirtió posteriormente tal vez como un mecanismo de tolerancia por la exposición repetida. En este modelo no encontramos trastornos hemorrágicos debidos a la disfunción plaquetaria, sin embargo, en la exposición a V por diferentes vías, otros autores han reportado epistaxis e incluso hemorragias pulmonares. Este trabajo aporta nuevo conocimiento de los efectos del V y destaca la importancia de estudiar a los megacariocitos y las plaquetas como células blanco de los contaminantes y cuya alteración puede llevar a trastornos en la hemostasia puedan poner en riesgo la vida del individuo.

IV. ABSTRACT

Vanadium (V) is a metal that has become important as a pollutant because large amounts are emitted into the atmosphere mainly by anthropogenic sources as the burning of fossil fuels. Mexican oil has a high concentration of V and the atmosphere of Mexico City has increasing concentrations of this element.

There are still unknown aspects of V toxicity, but in our murine model of V₂O₅ exposure we have found an increase in the number of platelets and their progenitors, megakaryocytes, in subchronic and chronic exposure. With this background, and knowing that the main hormone involved in platelet production and maturation of megakaryocytes is Thrombopoietin (TPO) and its receptor Mpl that activates JAK/STAT pathway, we decided to explore the signaling pathway in this model. Furthermore, environmental pollution is often associated with hemostasis disorders and also to determine if alterations of megakaryopoiesis may affect platelet function, we determined this effect.

Sixty CD1-mice were divided into a control and experimental groups; the former group was exposed to V₂O₅ at 0.02M for an hour twice a week for an eight-week time period.. Spleens were taken for processing at 4th, 6th and 8th week. A sample of the spleen was processed for immunohistochemistry of Mpl and phosphorylated fractions of JAK2, STAT3 and STAT 5 and another sample was processed for cytofluorometry for the same proteins.

Blood samples were obtained at 4th and 8th week of exposure and four weeks after the exposure ceased. Platelet function was determined by identifying markers of platelet activation: P-selectin (CD62p) and monocyte-platelet conjugates in peripheral blood and we determined platelet aggregation with platelet-rich-plasma (PRP) or whole blood. Results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post test to compare between groups.

An increase of phosphorylated JAK2 and STAT3 in megakaryocytes of mice at eight weeks of exposure was found. No statistical significance difference was found on STAT 5. Mpl receptor decreased at eight weeks of exposure. These results were consistent with immunohistochemistry and cytofluorometry findings Platelet activation markers were unchanged throughout the exposure, but

CD62p was increased after the exposure ceased. There was platelet aggregation inhibition at four week of exposure that was reverted at eight week and in post exposure time. The JAK/STAT pathway is activated and is involved in megakaryocyte proliferation. This activation might be because V is able to inhibit protein tyrosine phosphatases (PTP), and so, these proteins remain phosphorylated and activated. Mpl decreased at the end of exposure probably as a negative regulator mechanism. Changes in megakaryocytes and platelets and JAK2 activation resemble some aspects of the myeloproliferative disorder, Essential Thrombocythemia (ET). On the other hand, there were any changes on the platelets markers of activation throughout the exposure, but until the post-exposure time, perhaps of vanadium's late effect, and its slow body's clearance. We observed the inhibitory effect on platelet aggregation at 4-week period, but this effect could be reversed by tolerance, because of repeated exposure. In this model we did not observe bleeding disorders due to platelet dysfunction, but other authors have reported epistaxis and even pulmonary hemorrhage. This work provides new knowledge about the V effects and emphasizes on the importance of studying the effects of pollutants on megakaryocytes and platelets, because its alteration can lead to hemostasis disorders that may affect the organisms physiology.

V. INTRODUCCION

1. CONTAMINACION AMBIENTAL

La contaminación ambiental es un problema que ha adquirido cada vez mayor importancia porque ha ido en incremento debido al crecimiento desordenado de las ciudades y su industrialización (Romero et al, 2006). Se entiende como contaminación, la presencia en el ambiente de sustancias o factores físicos, químicos o biológicos que perjudiquen o dañen la vida, la salud y el bienestar humano, la flora y la fauna, o degraden la calidad del aire, agua, suelo, de los bienes, de los recursos de la nación en general, o de los particulares. Un contaminante es toda materia o sustancia, que al incorporarse o adicionarse al ambiente pueda alterar o modificar sus características naturales; también se considera contaminante toda forma de energía, como calor, radiactividad y ruido que alteren el estado natural del ambiente (Gutiérrez et al, 1997).

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es considerada una megaciudad que presenta particularidades que la afectan negativamente al respecto de la contaminación: está situada a 2,240 metros sobre el nivel del mar y por esta altitud puede recibir mayor radiación solar y facilitar reacciones químicas en la atmósfera que generen más contaminantes; además, tiene 23% menos oxígeno comparada con las ciudades que se encuentran al nivel del mar, lo que da por resultado una combustión incompleta, se reduce la eficiencia de los motores de combustión interna, aumentando concentraciones de hidrocarburos en el aire, que favorecen a su vez la exposición a radiaciones capaces de transformar compuestos oxidantes como óxidos metálicos; es una cuenca cerrada al estar rodeada de montañas con altura mínima de 1000m,

que forman una barrera física natural para la circulación del aire. La ZMVM tiene cerca de veinte millones de habitantes, con más de 4.5 millones de automóviles que consumen 40 millones de litros diarios de gasolina, además de su industria generadora de contaminantes (Figura 1) (SEMARNAT 2008, 2005; Molina, 2002; Gómez y Danglot 1998).

Las fuentes de contaminantes ambientales son tanto naturales como antropogénicas, y son estas últimas las que han cobrado gran importancia por su gran incremento. Entre los contaminantes que participan en el deterioro de la calidad del aire, se encuentran: el bióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), bióxido de nitrógeno (NO_2), partículas suspendidas (PST), ozono (O_3) y metales. Otros contaminantes que se emiten a la atmósfera son los gases generadores de efecto invernadero y éstos son considerados importantes por sus efectos sobre el cambio climático; éstos son: bióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O). También como resultado de las actividades humanas se emiten las llamadas sustancias agotadoras de la capa de ozono estratosférico, como los clorofluorocarbonos, hidroclorofluorocarbonos y halones (SEMARNAT 2008, 2005).



Figura 1. La Zona Metropolitana del Valle de México, una megaciudad con grandes problema de contaminación. Una de las principales fuentes de contaminantes son los 4.5 millones de automóviles que circulan diariamente en la ciudad.

Dentro de los contaminantes atmosféricos, tienen gran relevancia las partículas suspendidas totales (PST), debido a que se han demostrado como causantes de efectos adversos a la salud humana. Estas partículas se originan como consecuencia de la combustión y se clasifican de la siguiente manera:

- Partículas gruesas PM10 (miden entre 2.5 y 10 micras), proceden de la erosión de los caminos, la industria, la agricultura, construcción y demolición, combustibles fósiles y generalmente contienen aluminosilicatos y óxidos de otros elementos (Figura 2).
- Partículas finas PM2.5 (miden menos de 2.5 micras), proceden de los vehículos, de combustibles fósiles, de quema de vegetación y del procesamiento de metales. En estas partículas se incluyen metales como plomo, cadmio, níquel, manganeso, carbono y vanadio. Estas partículas suelen ser más tóxicas que las gruesas (Figura 2).
- Partículas ultrafinas (menores de 1 micra) derivadas de la quema de combustibles fósiles e incendios forestales. Tienden a unirse con partículas más gruesas, por lo tanto, se encuentran aisladas en la atmósfera por periodos cortos (Holgate *et al*, 1999; Vallejo *et al*, 2003).

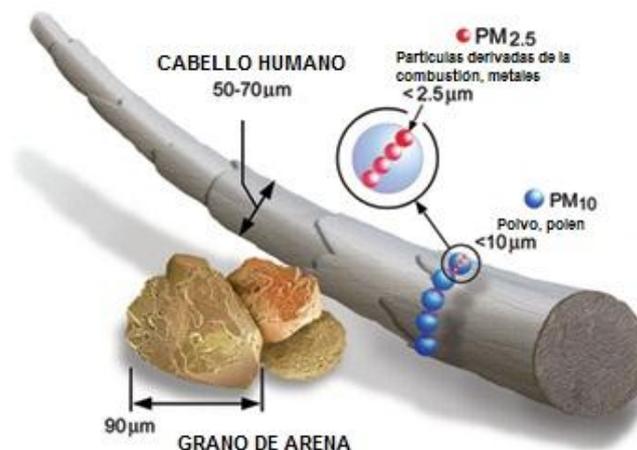


Figura 2. Tamaño de las partículas suspendidas con respecto al diámetro de un cabello o un grano de arena. Modificado de la página web de la EPA (*Environment Protection Agency*) (www.epa.gov)

Además de su composición, el tamaño de las partículas juega un papel importante en su comportamiento en la atmósfera: las partículas que miden menos de 10 micras, tendrán una vida de horas, suspendidas en la atmósfera, mientras que las partículas finas que tienen como diámetro de 1-0.1micras, tendrán una vida media de días a semanas (Mussali-Galante and Fortoul , 2008). Por otro lado, entre más grande es la partícula, menor será la posibilidad de que ingrese a la circulación sanguínea y al organismo en general. Las partículas más pequeñas penetran hasta el espacio alveolar, de hecho se ha demostrado que algunos metales potencialmente tóxicos entran al organismo al ser volatilizados en la combustión, al estar a altas temperaturas, recondensándose nuevamente en este tipo de partículas y se ha determinado que el pulmón es la principal vía de entrada al flujo sanguíneo para estos elementos tóxicos (Rivero Serrano *et al*, 1993).

En la tabla 1 se muestran algunos contaminantes que la SEMARNAT reporta por día de la semana en la ZMVM, cabe destacar que las partículas al igual que otros contaminantes se emiten más durante los días hábiles.

Contaminante		Emisiones [ton/semana]	Emisiones [ton/día]		
			Día hábil	Sábado	Domingo
Partículas menores a 10 micras	PM ₁₀	450	67	63	54
Partículas menores a 2.5 micras	PM _{2.5}	100	15	14	13
Dióxido de azufre	SO ₂	129	21	14	11
Monóxido de carbono	CO	30,131	4,284	4,571	4,144
Óxidos de nitrógeno	NO _x	3,620	519	541	486
Compuestos orgánicos volátiles	COV	11,216	1,666	1,557	1,330

Nota: No se incluyen las emisiones de los incendios forestales y estructurales, así como las emisiones de partículas de la erosión eólica del suelo. La suma de los totales puede variar debido al redondeo de las cifras.

Tabla 1. Inventario de emisiones por día de la semana (SEMARNAT, 2008).

Es importante mencionar que la emisión de contaminantes presenta variaciones durante el día, ya que aumenta principalmente entre las 10 y las

16 horas, debido al aumento de la flota vehicular y la actividad industrial. Por otro lado, también la SEMARNAT reporta diferencias en la emisión de PST dependiendo de la época del año, es decir, hay un aumento en la época seca fría (noviembre a febrero), comparado con las emisiones en la época seca caliente (marzo a mayo) o en la época de lluvias (abril a octubre), como se observa en la tabla 2.

Temporada	Emisiones [ton/día]					
	PM ₁₀	PM _{2.5}	SO ₂	CO	NO _x	COV
Seca fría	92.0	17.2	18.3	4,292.5	514.5	1,611.5
Seca caliente	64.6	14.5	18.3	4,292.4	514.9	1,641.6
Lluvias	46.8	12.9	18.4	4,293.1	515.8	1,613.9

Tabla 2. Inventario de emisiones diario por temporada climática (SEMARNAT, 2008).

La generación de PST se debe principalmente al tránsito vehicular y al uso de vialidades sin pavimentar y, en total se emitieron más de 24,000 toneladas anuales de PM10 y se estiman aproximadamente 5,499 de PM2.5. Como se mencionó, los metales son contaminantes que pueden ingresar al organismo a través de las PST. Desde la antigüedad se sabe que los metales son capaces de afectar la salud humana y algunos metales como el arsénico, cromo, níquel y cadmio son carcinógenos comprobados (Rivero Serrano *et al*, 1993; Nriagu 1996). Algunos otros metales, como el vanadio, han adquirido importancia por el aumento en su emisión a la atmósfera y son objeto de investigación en la actualidad para determinar su grado de toxicidad (Assem y Levy, 2009; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Fortoul *et al*, 2002; Holgate *et al*, 1997; Amdur *et al*, 1991).

Las fuentes antropogénicas son la mayor causa de emisión de metales pesados y la mayoría de las partículas emitidas son PM2.5. Los metales de

origen antropogénico se encuentran en la atmósfera como óxidos. El hierro es el metal que se encuentra en mayor concentración, excepto en los residuos de combustión del petróleo, en donde hay mayor concentración de vanadio y níquel (Holgate *et al*, 1997).

Por otro lado, los metales con más de una valencia estable, como el vanadio, pueden participar en la transferencia de electrones y generan agentes oxidantes que son tóxicos para las células, además de que pueden acumularse en el organismo en diversas formas, tanto como compuestos inorgánicos como orgánicos, y permanecer en él por largos periodos, de ahí la importancia de estudiar los efectos derivados por su contaminación (Amdur *et al*, 1991).

2. VANADIO

El vanadio (V) es un metal de transición que, como se mencionó previamente, ha cobrado mayor importancia como contaminante ambiental y también en la exposición ocupacional, y aún se desconocen muchos de sus efectos tóxicos. El V ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Fue descubierto en México en 1801 por Andrés Manuel del Río, pero fue hasta 1830 que el sueco Sefström lo llamó Vanadium en honor a Vanadis, la diosa griega de la belleza, inspirado por la gama de colores de este metal en solución.

Se ha pretendido utilizar este metal en el tratamiento de algunas enfermedades como anemias, tuberculosis y diabetes mellitus. Desde 1899 se demostró que disminuía los niveles de glucosa en sangre y orina en pacientes diabéticos,

pero no fue hasta 1970 y principios de 1980 que se demostró que las soluciones de vanadato V^{5+} producían efectos parecidos a la insulina en ratas y adipocitos *in vitro*. Actualmente se continúan estudiando diferentes tipos de compuestos de V para utilizarlos en el tratamiento de diabetes y obesidad, así como anticonceptivos vaginales y, además, por sus propiedades moduladoras de la expresión de diversos genes, se han usado como agentes antineoplásicos (Morinville *et al*, 1998; Evangelou 2002, Mukherjee *et al*, 2004). De manera contrastante, la IARC lo ha declarado en 2006 como posible carcinógeno para humanos por lo que aún se continúa estudiando el efecto de los diferentes compuestos de vanadio para determinar su toxicidad y su posible utilidad terapéutica (IARC, 2006).

2.1 Propiedades químicas

El V es un elemento del grupo VB en la tabla periódica, número atómico 23, tiene varios estados de oxidación: -1, 0, +2, +3, +4 y +5. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, ya que se ha encontrado en todo tipo de ambientes, incluyendo rocas, suelo, agua, aire, plantas y tejidos animales (Barceloux, 1999).

La mayoría de sus compuestos tienen valencias +3, +4 (tetravalente) y +5 (pentavalente) (Nriagu, 1998; Barceloux, 1999). El compuesto más abundante es el V_2O_5 (pentóxido de vanadio). Su toxicidad aumenta conforme aumenta la valencia, por lo tanto, los compuestos pentavalentes son los más tóxicos (Barceloux, 1999).

Entre los compuestos más tóxicos, encontramos al pentóxido de vanadio (V_2O_5), el cual es el de mayor uso comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de $1750\text{ }^\circ\text{C}$ y punto de ebullición de $690\text{ }^\circ\text{C}$, es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de 0.05 mg/m^3 (ACGIH, 2009; Assem and Levy, 2009). Otros compuestos con interés toxicológico son: el metavanadato de amonio (NH_4VO_3), metavanadato de sodio ($NaVO_3$), ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), sulfato de vanadilo ($VOSO_4$), oxidicloruro de vanadio ($VOCl_2$) y tricloruro de vanadio (VCl_3) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

El vanadio puede actuar como anión o catión en los procesos biológicos; en condiciones fisiológicas, el vanadio pentavalente se encuentra en forma de anión vanadato ($H_2VO_4^-$) y el vanadio tetravalente, en forma de catión vanadilo (VO^{2+}). En condiciones ácidas, el ión vanadilo es muy estable, pero en condiciones básicas, es más estable el ión ortovanadato (VO_4^{3-}), que es muy similar al ión fosfato (PO_4^{3-}), como se observa en la figura 3 (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

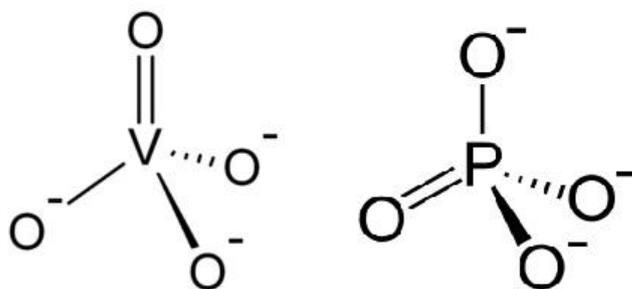


Figura 3. Semejanza en la estructura química del vanadato y el fosfato, relevante para explicar algunos efectos del V, debido a que se ha descrito que el vanadato puede ingresar a las células a través de canales de fosfato, e incluso puede tomar el lugar del fosfato en algunas proteínas.

El V ingerido es transformado en su mayor parte al catión vanadilo en el estómago y se puede oxidar al anión vanadato el cual se absorbe con mayor

facilidad a través de transportadores aniónicos inespecíficos (Mukherjee *et al*, 2004).

2.2 Fuentes de Contaminación

El V se encuentra en grandes cantidades en forma de complejos metálicos y organometálicos en todos los petróleos crudos y materiales de origen fósil. En especial se ha reportado que el petróleo crudo mexicano y el venezolano tienen concentraciones elevadas de este elemento. Hasta 91% del V atmosférico, procede de la combustión del petróleo, carbón y aceites utilizados en la generación de electricidad y calor y la mayoría del V es emitida en forma de óxidos de vanadio. El resto procede del polvo continental, aerosoles marinos, emisiones volcánicas e incendios forestales. (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Barceloux, 1999; Nriagu, 1998). También es emitido en el proceso de extracción de otros minerales (principalmente el hierro), así como es ingerido a través de los alimentos (Nriagu, 1998; IPCS, 2000).

La concentración de V en la atmósfera, depende de las condiciones geográficas, climáticas y las condiciones de urbanización. Se han reportado concentraciones en el aire que van de 0.15 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ y en áreas rurales cantidades menores a 0.024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; IPCS 2000). Para la Ciudad de México se han reportado valores que alcanzan 0.114 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM10 y 0.093 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM2.5 (Gutiérrez-Castillo *et al*, 2006). Riveros-Rosas y colaboradores en 1997 reportaron $23 \pm 12 \text{ ng}/\text{m}^3$, con mayores concentraciones en el área norte más industrializada de la Ciudad. Las inversiones térmicas en las grandes ciudades aumentan

considerablemente su concentración en aire. En la exposición ocupacional las concentraciones son mayores, incluso durante la limpieza de calderas se han encontrado concentraciones de hasta 500 mg/m^3 (Nriagu, 1998).

En la ZMVM se sabe que el V se ha incrementado en la atmósfera, al encontrarse un aumento del 23% en la concentración de V en tejido pulmonar de necropsias de personas que vivieron en la década de los 90's comparado con los 60's (Fortoul *et al*, 2002).

2.3 Usos del Vanadio

Se ha utilizado en la producción de herramientas, debido a que forma aleaciones de alta resistencia y baja corrosión con otros metales. Es catalítico para la producción de ácido sulfúrico, se utiliza en la industria del plástico y del vidrio, en realización de semiconductores, en la industria fotográfica, colorantes amarillos y pinturas para cerámica. En la industria agrícola se emplea para elaborar fungicidas e insecticidas y como micronutriente en fertilizantes. Se utiliza también en la fabricación de maquinaria aérea y en la tecnología espacial (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006; Barceloux 1999).

2.4 Toxicocinética

La vía enteral es la más expuesta al V, debido a que la mayoría de alimentos ingeridos por los humanos tienen ciertas concentraciones de este metal, pero a pesar de que es la mayor fuente de exposición, en el tracto gastrointestinal se absorbe muy poco, en rangos de 0.1 a 10% de la cantidad ingerida. Se ha reportado que una persona consume en la dieta promedio de 11-30 μg por día

y en el agua la concentración puede ser de 20 a 70 µg/ litro (Nriagu 1998; IPCS, 2000). Los alimentos con mayor concentración de V son los mariscos, el eneldo, la pimienta negra, entre otros.

La vía respiratoria es la principal vía de absorción y dependiendo del lugar y circunstancias, será el grado de exposición y absorción de V. La mayor exposición en los trabajadores ocurre a través de la inhalación de polvos y humos. Se ha reportado que el vanadio inhalado se absorbe desde un 25% hasta un 90% (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Nriagu 1998).

El V es absorbido a través de transportadores aniónicos inespecíficos, posteriormente en la sangre el V se une a proteínas plasmáticas. Puede estar en forma de vanadilo que se une a transferrina o vanadato que se puede unir a albúmina y transferrina. De ahí se distribuye a todos los órganos y tejidos en aproximadamente media hora a una hora, encontrándose concentraciones importantes en dientes y huesos, hígado, bazo, riñón y pulmón, además de que es capaz de cruzar la barrera hemato-placentaria (Mukherjee *et al*, 2004; Nriagu, 1998).

Su excreción es por heces (incluyendo la parte que no se absorbió y la parte eliminada por el hígado a través de la bilis) y principalmente por la orina, ya que en el riñón se elimina de una forma bifásica, la primera fase rápida en las primeras 10 a 20 horas y otra fase lenta entre los 40 y 50 días. Aproximadamente un 40 a 60% del V absorbido es excretado por riñón en los primeros 3 días (Barceloux, 1999, Nriagu, 1998).

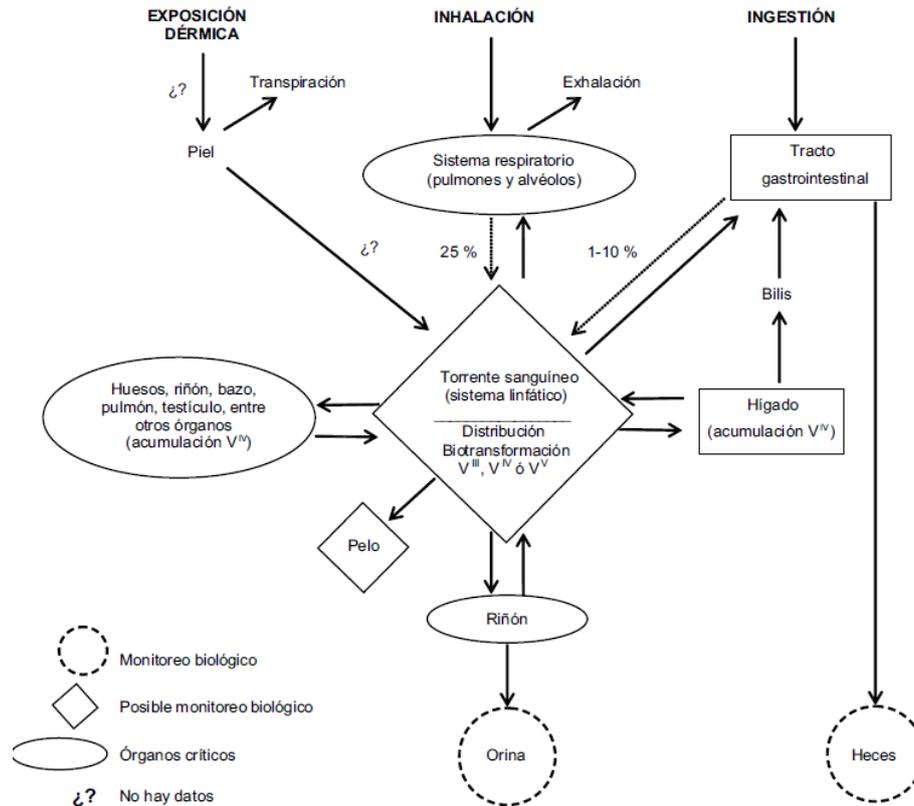


Figura 4. Toxicocinética del vanadio. Es importante señalar que la principal ruta de absorción es la inhalada. El V tiende a concentrarse en algunos órganos como huesos y bazo y su excreción es principalmente por la orina. (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

2.5 Toxicidad por exposición ocupacional

Los efectos respiratorios son los más ampliamente documentados sobre todo en humanos con exposición laboral aguda a V, en particular en aquellos que se dedican a la limpieza de calderas. En estos pacientes, se puede observar la lengua de color verde, refieren sabor metálico y pueden presentar dermatitis eczematosa. Las manifestaciones leves incluyen rinitis, estornudos, conjuntivitis y tos, pero pueden ser tan severas que condicionen la presencia de bronquitis y neumonitis (Cooper, 2007; Barceloux 1998, Nriagu 1998). Existe asociación entre la exposición a grandes concentraciones de vanadio de manera ocupacional y la presencia de bronquitis o asma (Musk and Tees,

1982; Irsigler et al, 1999). Vandenplas y colaboradores en 2002, reportaron que la inhalación aguda de grandes concentraciones de vanadio por personal ocupacionalmente expuesto ocasiona un síndrome caracterizado por fiebre y alveolitis neutrofílica, el cual ha sido descrito también por la inhalación de otros metales (Nemery, 1990).

Además, la OMS reporta síntomas neurológicos inespecíficos y alteraciones en el sistema cardiovascular, como vasoconstricción e hipertonía muscular que ocasionan hipertensión arterial y se han reportado arritmias y cambios en el electrocardiograma. Por otro lado, también se reportan alteraciones renales en exposición crónica porque el V tiende a acumularse en forma de vanadilo, el cual es un potente inhibidor de ATPasas, afectando la reabsorción de sodio y ocasionando acidosis tubular hipokalémica, con necrosis y fibrosis (Cooper, 2007; IPCS 2000).

2.6 Toxicidad celular

El V ejerce su efecto tóxico mediante diferentes vías: puede inhibir una variedad de enzimas, pero también tiene capacidad de estimular otras y participa en la generación de radicales libres. Entre las enzimas fuertemente inhibidas por el vanadio se encuentran la Na-K-ATPasa y la H-ATPasa, aunque también inhibe otras enzimas ATPasas como la Ca-ATPasa y Ca-Mg ATPasa (Nriagu, 1998). Entre las enzimas que estimula se encuentran: la adenilato ciclasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, NADPH oxidasa, tirosina fosforilasa, glucógeno sintetasa, lipoproteinlipasa, glucosa 6 fosfato

deshidrogenasa, tirosina cinasa C y ciclooxigenasa 2 y citocromo oxidasa (Barat *et al*, 2003; Erdmann *et al*, 1984; Nechay, 1984; Nechay *et al*, 1986).

El V interfiere con enzimas que contienen fosfato. Este es el caso de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP), que son fuertemente inhibidas por los compuestos de V, ya que actúa como análogo de fosfatos y oxida su dominio catalítico con lo que lleva a un aumento en la fosforilación celular, esto explica el efecto insulinomimético del V puesto que los receptores de insulina permanecen activados por esta inhibición. Las PTPs son importantes en la regulación del ciclo celular y su inhibición podría explicar algunos de los mecanismos de proliferación o muerte celular inducidos por este metal (Maihles *et al*, 2003; Morinville *et al*, 1998; Samet *et al*, 1999; Chen *et al*, 2001).

Muchos de los efectos tóxicos del V se atribuyen a la capacidad que tiene para contribuir en la generación de radicales libres, de la misma manera que otros metales, a través de la reacción de Fenton. Incluso la inhibición de PTPs puede estar mediada por especies reactivas de oxígeno como el H₂O₂ (Krejsa, 1997).

Por otro lado, varios grupos han reportado poliploidías, aneuploidías, formación de micronúcleos y otros tipos de daño genotóxico inducidos por varios compuestos de V en linfocitos in vitro (Roldán y Altamirano-Lozano 1990; Altamirano-Lozano *et al*, 1993 y 1999; Rojas *et al*, 1996; Migliore *et al*, 1999; Rodríguez Mercado *et al*, 2003). Además, se ha reportado que el V afecta el citoesqueleto, por ejemplo, en cultivos de linfocitos a los cuales se les

administró V_2O_5 (0.001 a 0.1 μM), se encontró inhibición de la polimerización de la tubulina, la despolimerización de la misma y alteración en la formación del huso mitótico lo que ocasiona células aneuploides o poliploides (Ramírez et al, 1997).

2.7 Toxicidad sistémica

En modelos animales se han reportado efectos tóxicos en diversos órganos y sistemas. En algunos órganos incluso se ha estudiado si el efecto revierte al dejar sin exposición a V de uno a tres meses, pero parece depender del órgano y tipo celular si el daño revierte o no. En nuestro grupo, utilizando V_2O_5 inhalado (0.02M) en un modelo murino, se han encontrado alteraciones en vías respiratorias similares a los cambios encontrados en asma, con aumento en citocinas inflamatorias (IL-6, TNFalfa) y disminución de la luz de los bronquiolos (Fortoul et al, 2011; Falcón-Rodríguez 2007).

También se ha reportado neurotoxicidad, con daño en las células del bulbo olfatorio (con alteración en la función olfatoria), hipocampo (con deterioro en la memoria), daño en corteza motora, así como alteraciones en la sustancia negra y ruptura de la barrera hematoencefálica con modificaciones en las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Avila-Costa *et al*, 2004, 2005, 2006; Colín-Barenque et al, 2008; Fortoul et al, 2011). En el caso del bulbo olfatorio, se ha observado daño morfológico y alteración en la función olfatoria al mes de exposición, los cuales tuvieron una recuperación al nivel del control a los dos meses de post exposición (Moscoso Caballero, 2010).

Por otro lado, se han evaluado parámetros de genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en leucocitos y células de médula ósea y con ensayo de micronúcleos en eritrocitos encontrando que existe mayor daño a mayor tiempo de exposición y que los ratones machos tienen más daño, en comparación con las hembras. En el caso de la presencia de micronúcleos, además se encontró que no revirtió el daño incluso a los 90 días de post exposición (Fortoul et al, 2011; Rojas Lemus, 2009; Pérez de Gante, 2008).

Además, hemos encontrado alteraciones testiculares, como disminución en la gamma tubulina y, en menor grado, disminución en actina, así como núcleos de forma irregular, con seudoinclusiones (Fortoul et al, 2011; Mussali-Galante et al, 2005). De la misma forma, se han encontrado en sangre, médula ósea, en bazo y timo linfocitos binucleados y con núcleos irregulares y con seudoinclusiones que sugieren afección en algunos componentes del citoesqueleto como las láminas nucleares (González Villalva, 2004; Rodríguez Lara, 2008).

En este mismo modelo, se ha encontrado hepatotoxicidad, con aumento de enzimas hepáticas en sangre, peroxidación lipídica, necrosis, infiltrado inflamatorio y meganúcleos que sugieren actividad regenerativa (Cano-Gutiérrez et al, 2011). Otros autores también reportan hepatotoxicidad al encontrar elevación de enzimas transaminasas en sangre (Nriagu, 1998).

En la literatura se reportan alteraciones en la espermatogénesis y en la motilidad de los espermatozoides en ratones (Aragón et al, 2005; IPCS, 2000;

Altamirano-Lozano *et al*, 1993). Se ha demostrado necrosis linfoide en timo, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea de 1 a 4 días después de inyección subcutánea de metavanadato de amonio (15.5 mg/kg) (Al-Bayati *et al*, 1992). En un estudio realizado en ratones, utilizando concentraciones de 4, 8, 16 y 32 mg/m³ de V₂O₅ inhalado 6 horas al día por 5 días a la semana por 16 días, se encontró hiperplasia linfoide en los ganglios mediastinales corroborada histológicamente. En ratas utilizando las mismas condiciones, se encontró en el estudio hematológico a los 3 meses de exposición un aumento en el número de eritrocitos pero con disminución en su tamaño (eritrocitosis microcítica) en hembras y machos. Se realizó este mismo estudio a 2 años de exposición, utilizando concentraciones de 1, 2 y 4 mg/m³ de V₂O₅ en el cual se observó un aumento en la incidencia de neoplasias bronquiales y alveolares tanto en ratas como en ratones lo cual apoya que éste metal es potencialmente carcinogénico (National Toxicology Program, 2002).

2.8 Hematotoxicidad

En cuanto a la toxicidad hematológica existen controversias sobre los efectos del V, puesto que hay estudios que muestran cambios en los índices hematológicos y otros en los cuales no existen tales cambios. En la tabla 3 se resumen los principales estudios de hematotoxicidad por diferentes compuestos de V.

AUTOR	COMPUESTO/DOSIS	VIA DE ADMINISTRACION	EFEECTO
Zaporowska and Wasilewski, 1989, 1992 a,b.	Metavanadato de amonio (0.15 mg V/cm ³ en agua de bebida) Aprox. 23-29mg/kg por 2, 4 y 8 semanas	Oral. Rata Wistar	Disminución de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina. Aumento de reticulocitos. Leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis.
Dai and McNeill, 1994	Metavanadato de amonio 0.19mmol/kg/día por 12 semanas	Oral. Humanos	Sin alteraciones hematológicas.
Cohen et al, 1995	Vanadil sulfato 100mg diarios por 3 semanas.	Oral. Humanos	Disminución de hemoglobina y hematocrito.
Fawcett et al, 1997	Vanadil sulfato 0.5mg/kg/día por tres semanas.	Oral. Humanos	Sin alteraciones hematológicas.
Hogan, 2000	Vanadil sulfato, Ortovanadato de sodio y cloruro de vanadio, ajustados para dar 9.2mg/kg de vanadio. Dosis única.	Inyección intraperitoneal. Ratones hembra ICR	Disminución de eritrocitos circulantes y aumento de reticulocitos.
NTP 2002	Pentóxido de vanadio 4, 8, 16 y 32mg/m ³ por tres meses	Inhalado Rata F344/N Ratón B6C3F1.	Eritrocitosis microcítica
Aguirre et al, 2005	Ortovanadato de sodio 0.33mg/kg, dosis única.	Inyección intraperitoneal. Ratones hembra CF-1	Aumento de reticulocitos periféricos. Aumento de eritroblastos policromatófilos y ortocromáticos en médula ósea.

Tabla 3. Antecedentes de hematoxicidad reportados utilizando diferentes vías de exposición y diferentes compuestos de V en distintas especies. Se observan resultados contradictorios, en algunos estudios no se reporta toxicidad hematológica, pero los que encuentran alteraciones, coinciden en la disminución de hematocrito y hemoglobina.

En nuestro modelo de inhalación de V, en el que se alcanzan concentraciones (en la caja de nebulización en la que se exponen los ratones) de 1.436mg/m³ (superiores a la concentración de V ambiental, pero comparable a la exposición ocupacional), encontramos una anemia normocítica normocrómica desde las 8 hasta las 12 semanas de inhalación, así como leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis desde la primera semana y hasta la semana 12 de inhalación, que acompañado con el aumento en el fibrinógeno, nos indican que el V induce un estado inflamatorio constante (González-Villalva, 2004; González-Villalva et al, 2009). Estos hallazgos coinciden con los encontrados en otros estudios de

exposición a V (Zaporowska and Wasilewski 1986, 1992a, b; Cohen et al, 1995; Hogan, 2000).

Los estudios que reportan alguna alteración hematológica coinciden en la presencia de anemia, así que se han investigado los mecanismos mediante los cuales el V la induce. Se han realizado ensayos *in vitro* en eritrocitos de ratones y humanos en los cuales se reporta una acción hemolítica debida en parte a la inhibición de la Na/K ATPasa por el V (Zaporowska and Slotwinska, 1996; Nriagu, 1998), además de la generación de estrés oxidante y peroxidación lipídica que lleva a una mayor fragilidad de la membrana de los eritrocitos (Mukherjee et al, 2004), por lo que son eliminados prematuramente de la circulación. Esto es compensado por la médula ósea enviando formas inmaduras de eritrocitos, los reticulocitos, que también se encuentran aumentados en los experimentos *in vivo* (Zaporowska and Wasilewski 1986, 1992a, b; Hogan, 2000). En nuestro grupo de trabajo se están investigando los posibles mecanismos por los que el V induce anemia en este modelo.

Por otro lado, la contaminación, en particular el aumento de las partículas suspendidas totales (PST) se ha relacionado con un aumento en la incidencia de alteraciones en la hemostasia, principalmente trombóticas, tales como la enfermedad vascular cerebral (EVC), el infarto agudo del miocardio (IAM) y la tromboembolia pulmonar (Mills et al, 2009; Kettunen et al, 2007; Nemmar et al, 2003), pero también existen reportes de trastornos hemorrágicos relacionados con las partículas contaminantes (Yamazaki et al, 2007).

En este sentido, resulta particularmente relevante en nuestro modelo el hallazgo de trombocitosis (aumento en el número de plaquetas en sangre) en la exposición subaguda y subcrónica a V, con alteraciones en la morfología plaquetaria, ya que se encontraron plaquetas gigantes en sangre circulante (González-Villalva, 2004; González-Villalva et al, 2006, 2009). Estos cambios morfológicos nos llevaron a pensar en defectos en los megacariocitos, las células precursoras de plaquetas, por lo que analizamos la médula ósea y el bazo de los ratones expuestos y encontramos un aumento estadísticamente significativo en el número de megacariocitos en ambos órganos hematopoyéticos, con megacariocitos aparentemente más poliploides, puesto que son más grandes y con núcleos más lobulados (Fortoul et al, 2008). Se analizó la ultraestructura, corroborando estos hallazgos y además un aumento en los gránulos alfa y densos en los megacariocitos de los animales expuestos (Fortoul et al, 2009).

Posteriormente en este mismo modelo, se estudió la concentración de IL-6, trombopoyetina (TPO) y receptor para trombopoyetina (Mpl) en bazo, los cuales son muy importantes para estimular la megacariopoyesis (Kaser *et al*, 2001). La TPO se encontró sin cambios en bazo, pero con incremento en pulmones y en hígado (Díaz Bech, 2007; Díaz Fuentes, 2009). Cabe mencionar que el pulmón no participa de manera normal en la producción de TPO, pero sí se ha encontrado que es capaz de producir esta hormona en condiciones patológicas como la hipertensión pulmonar (Ibrahim et al, 2002). Además se determinó la presencia de IL-6 en bazo, la cual se eleva en la inflamación y es capaz de estimular la producción de TPO y la megacariopoyesis, pero no se encontraron cambios significativos. Por otro

lado, se determinó la presencia del receptor Mpl en los megacariocitos, encontrándose disminuido a los dos meses de exposición (Díaz Bech, 2007), por lo tanto en este trabajo se estudiaron otros factores relacionados con la proliferación de los megacariocitos.

3. MEGACARIOCITOS Y MEGACARIOPOYESIS

El megacariocito, célula precursora de plaquetas, es una célula muy grande, mide hasta 150µm de diámetro debido a que presenta un proceso llamado endomitosis, en el cual la célula duplica su material genético y tiene mitosis pero sin cariocinesis ni citocinesis por lo que es de gran tamaño y con núcleo poliploide, llega a tener hasta 64n de material genético, de hecho debe su nombre a esta característica (mega=grande; Karyo=núcleo). La poliploidía de la célula aparentemente es necesaria para la subsecuente acumulación de citoplasma para liberar una adecuada cantidad de plaquetas. Este citoplasma es muy granular, contiene gránulos alfa y densos que tienen sustancias importantes para la activación y agregación plaquetaria. El citoplasma del megacariocito se fragmenta para dar lugar a miles de plaquetas, se dice que cada megacariocito maduro puede dar lugar hasta 10^4 plaquetas (Kaushansky, 2005 a, b).

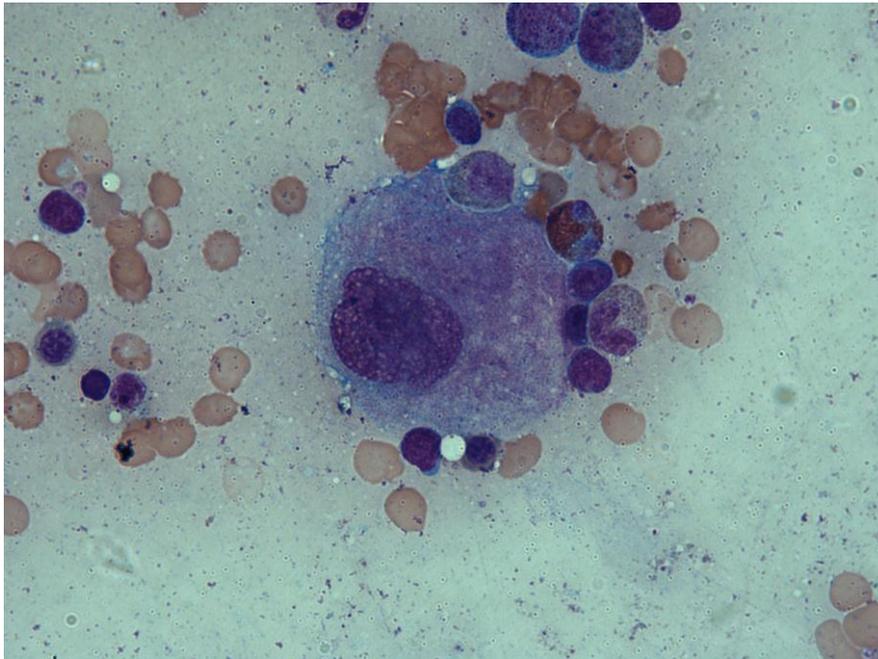


Figura 5. Megacariocito en un frotis de médula ósea. Se observa su gran tamaño en comparación con el resto de las células que lo rodean (González-Villalva, 2011 b).

Se llama megacariopoyesis al proceso de diferenciación de la línea megacariocítica y trombopoyesis al proceso de liberación de plaquetas a partir del citoplasma del megacariocito maduro. Cabe mencionar que algunos autores consideran estos dos términos como sinónimos. Estos procesos se llevan a cabo en médula ósea y en algunos mamíferos, como en el ratón, también en bazo, y algunos autores proponen al pulmón como uno de los sitios donde ocurre trombopoyesis (Zucker-Franklin *et al*, 2000). En la figura 6, se observa en la parte superior, con flechas, las citocinas y quimiocinas más importantes que activan el proceso de maduración y diferenciación de los megacariocitos y en la parte inferior, de color azul, los marcadores de superficie de acuerdo a la etapa de maduración de los megacariocitos. La célula troncal hematopoyética (CTH) da origen a la Progenitora Mieloide Común (PMC), que a su vez da origen a la Progenitora bipotencial Eritroide/megacariocítica (PEM) y posteriormente la Unidad Formadora de Brotes Megacariocíticos (BFU-Meg) (Mayani, *et al*, 2007).

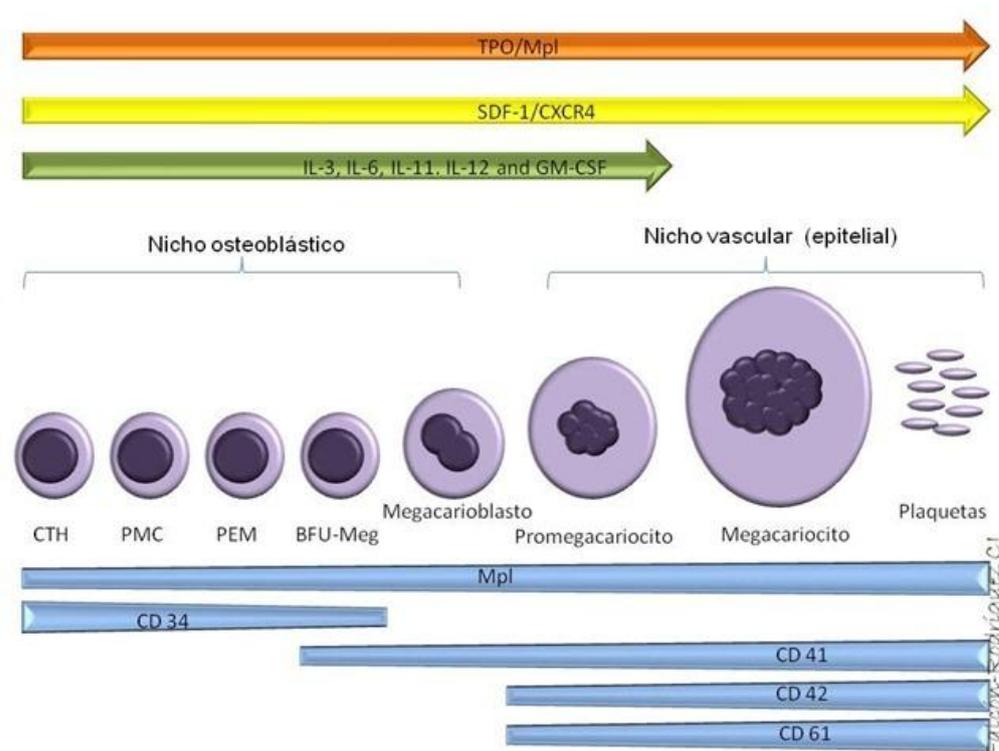


Figura 6. Megacariopoyesis. Se observan con flechas las citocinas importantes en la maduración de los megacariocitos. Al final, debe migrar del nicho osteoblástico al nicho vascular y extender sus prolongaciones dentro de los vasos sanguíneos donde liberará sus plaquetas. Abajo se ilustran los principales marcadores de superficie y cómo aparecen o desaparecen en la maduración (González-Villalva et al. 2010 b)

Se sabe que la principal hormona reguladora de la megacariopoyesis y, en consecuencia, de la producción plaquetaria, es la Trombopoyetina (TPO), la cual actúa a través de su receptor Mpl. Existen varias vías de señalización implicadas por debajo del receptor Mpl, siendo la más directa la vía en que se activa JAK2 que posteriormente activa STAT5 y STAT3 que son activadores de la transcripción de ciertos genes que tienen que ver con la supervivencia y la inhibición de la apoptosis. Otras vías también están implicadas como Ras, MAPK y la vía de PI3K, con activación de AKT, todo lo cual trae como consecuencia un efecto antiapoptótico y aumento de factores de sobrevivencia en los megacariocitos (Drachmann 1997; Geddis, *et al* 2002; Kaushansky, 2005 a). Además de la TPO, existen otras citocinas y quimiocinas involucradas en la regulación de la megacariopoyesis, como son IL-3, IL-6 e IL-11 (la IL-11 recombinante está aprobada para uso clínico en la trombocitopenia inducida

por quimioterápicos), el Factor Derivado del Estroma 1 (SDF-1) o CXCL12 que actúa a través de su receptor CXCR4 y que tiene gran importancia para que el megacariocito se traslade del nicho osteoblástico al vascular, madure y libere las plaquetas directamente en la circulación, entre otros que están siendo estudiados en la actualidad (González Villalva et al, 2010; Zheng *et al*, 2008). En la figura 7 se observan las principales vías implicadas en la megacariopoyesis, así como algunos sitios de regulación negativa.

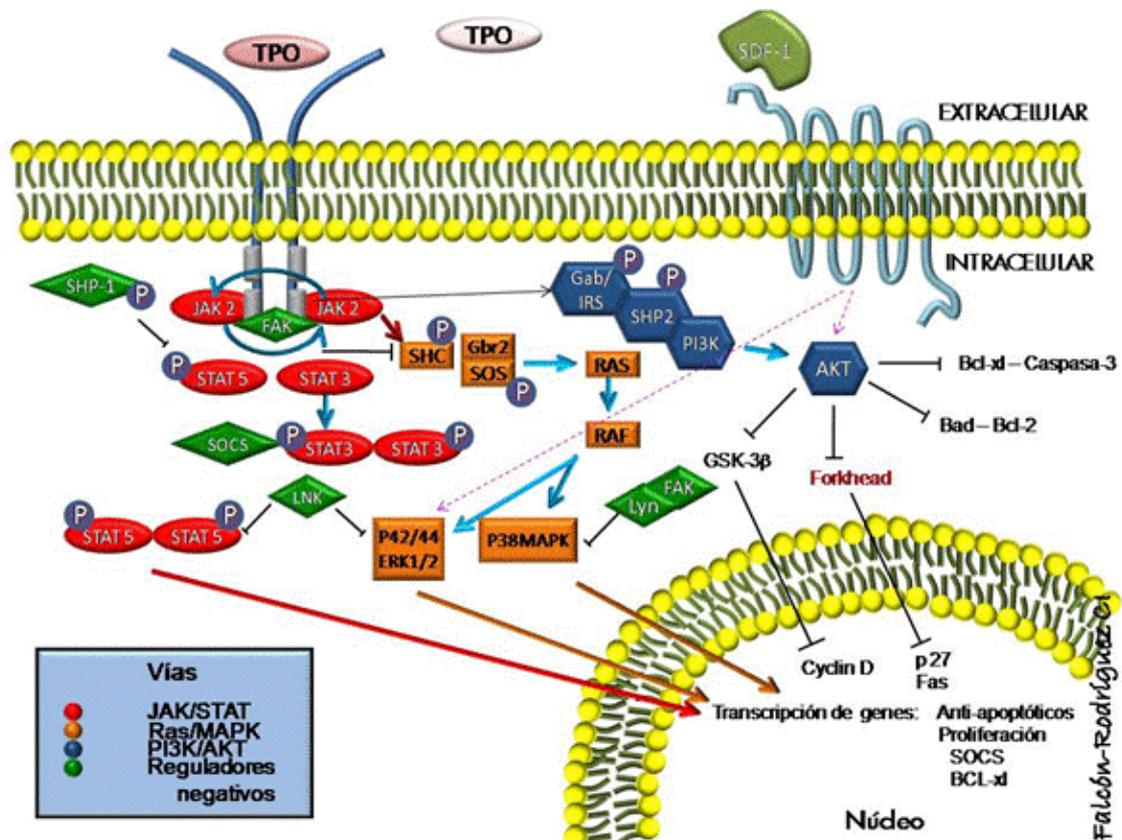


Figura 7. Al llegar la TPO a su receptor Mpl, éste se dimeriza y ocurre una transfosforilación de JAK2, ésta tirosina cinasa fosforila sitios en el receptor Mpl para que se unan otras moléculas como STAT y SHC. La misma JAK2 fosforila las STAT3 y STAT 5 que forman homodímeros, se translocan al núcleo y activan genes antiapoptóticos y de proliferación. De manera alterna se activan las vías de RAS/MAPK y PI3K/AKT. En color verde se ilustran algunos sitios de regulación negativa (González-Villalva et al, 2010 b).

4. PLAQUETAS

Las plaquetas son fragmentos del citoplasma del megacariocito. Tienen forma de disco en su forma inactiva y miden de 2 a 4 µm de diámetro, pero en su

forma activada extienden varias prolongaciones que le dan un aspecto estrellado, como se observa en la figura 8 (Jurk and Kehrel, 2005; González-Villalva 2008, 2010, 2011). La cuenta plaquetaria en humanos varía en un rango normal de 150 a 400×10^9 /L. La vida media de las plaquetas es de 7 a 14 días y, para mantener los valores normales en sangre, se producen en médula ósea aproximadamente 1×10^{11} plaquetas diariamente. En su superficie presentan marcadores como CD 41, CD 42 que son integrinas indispensables en la agregación y, solo cuando se activan cambian su conformación para volverse adhesivas y además, aparecen nuevos marcadores superficiales como CD62P o P-selectina (Andrews and Berndt 2004; Kaushansky 2005 a).

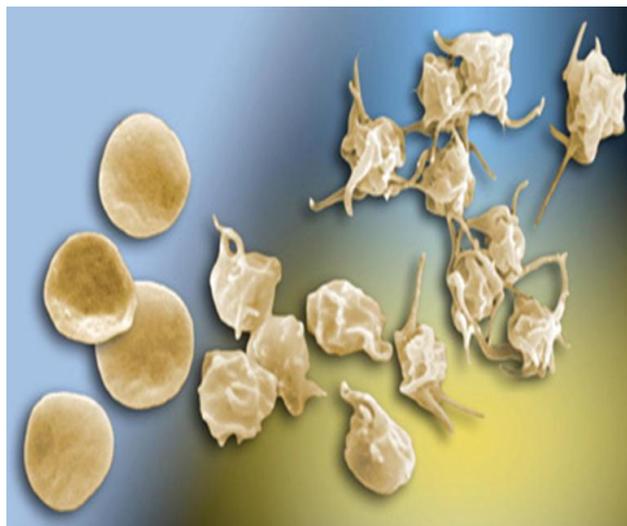


Figura 8. Micrografía electrónica de barrido que muestra el extraordinario cambio en la morfología plaquetaria durante la activación. En el lado izquierdo se observan plaquetas en reposo, en medio parcialmente activadas y en el lado superior derecho totalmente activadas con ADP, uno de los principales agonistas plaquetarios. (Michelson, 2007).

Las plaquetas son indispensables para el mecanismo de hemostasia, ya que son las encargadas de facilitar la reparación de las pequeñas rupturas que suceden a diario en los vasos sanguíneos de pequeño calibre y, en el caso de heridas más grandes, son totalmente indispensables para formar el coágulo primario que sirve para detener de manera inmediata la pérdida de sangre porque pueden adherirse a la colágena del subendotelio expuesto y agregarse

entre ellas (González Villalva, 2010, 2011). Además, su membrana lipídica sirve como base para que se anclen ahí los factores de coagulación, cuya activación culmina con la formación de fibrina que le da estabilidad al coágulo, lo que facilita la reparación del vaso sanguíneo dañado. Otras de sus funciones menos conocidas son su papel en la reparación de heridas, en la respuesta inmunológica innata y en la biología de las metástasis tumorales, ya que se ha demostrado que los pacientes con cáncer con mayores cuentas de plaquetas tienen más riesgo de metástasis (Klinger y Jelkman, 2002; Gupta y Massagué 2004).

Las alteraciones tanto en la cantidad como en la calidad plaquetaria dan lugar a patologías muy diversas que están ligadas con eventos trombohemorrágicos. Por ejemplo, la trombocitopenia, o disminución del número de plaquetas en sangre, cuyas causas pueden ser diversas, predispone a hemorragias sobre todo de piel y mucosas pero puede llegar a poner en riesgo la vida si las cuentas son muy bajas. Por otro lado, las trombocitosis, o aumento en el número de plaquetas en sangre, pueden aumentar el riesgo de eventos trombóticos. Las alteraciones en la calidad de las plaquetas también aumentan el riesgo de tener hemorragias (Beutler, 2001). Existen reportes en los cuales se asocian los altos índices de contaminación, principalmente por PST con hiperagregación plaquetaria y aumento de eventos trombóticos tanto en estudios epidemiológicos como en estudios experimentales en modelos animales (Mills *et al*, 2009; Kettunen *et al*, 2007; Nemmar *et al*, 2003; Seaton *et al*, 1999), motivo por el cual en este trabajo estudiamos el efecto de V en la función plaquetaria.

5. RECEPTOR MPL

El receptor Mpl se encuentra presente en todas las células de la megacariopoyesis, desde las Células Troncales Hematopoyéticas (CTHs) hasta las plaquetas, lo que difiere es el número de receptores por célula, ya que se ha demostrado que existen menos receptores en las CTHs y conforme avanza la diferenciación megacariocítica, también va aumentando el número de receptores Mpl (Figura 6), así la TPO tiene mayor efecto en estadios intermedios y tardíos de maduración, excepto en la formación de proplaquetas (Debili et al, 1995; Paulus et al, 2004).

Mpl es un receptor transmembranal de tipo I y forma parte de la superfamilia de receptores de citocinas hematopoyéticas. Tiene un dominio extracitoplásmico parecido a la cadena β común que tienen los receptores para IL-3, IL-5 y los receptores para el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Su módulo receptor de citocina tiene 4 residuos cisteína bien conservados y un pentapéptido: Trp-Ser-Xaa-Ser-Trp (WSXSW). Forma homodímeros después de la unión de su ligando, TPO (Vigon et al, 1992). No se ha demostrado que forme heterodímeros con los otros tipos de cadenas (β_c , γ_c o gp130). No tiene actividad de tirosina cinasa ni otra actividad enzimática y su acción depende de la homodimerización y la formación de sitios donde se pueden unir otras moléculas e iniciar la señalización (Kaushansky, 2009; Kaushansky y Drachmann 2002; Sabath et al, 1999).

Mpl es el único receptor para TPO, como lo han demostrado algunos experimentos en los que al administrar TPO exógena en células TPO^{-/-} logran

inducir la maduración megacariocítica, lo que no sucede en células $Mpl^{-/-}$ (de Sauvage et al, 1996).

En las plaquetas se han demostrado aproximadamente 220 sitios de unión a la TPO por plaqueta. Este hecho tiene un papel fundamental en la regulación de la concentración de TPO. Se ha visto que los pacientes y los animales experimentales trombocitopénicos, tienen elevadas concentraciones de TPO en sangre, esto se debe a que, en condiciones normales, las plaquetas pueden unir TPO a su receptor de superficie Mpl , internalizarlo y degradar la TPO como un mecanismo de regulación negativa. Así, en las condiciones en las cuales hay pocas plaquetas, también hay pocos receptores Mpl y las concentraciones de TPO libre aumentan, y esta TPO queda disponible para actuar sobre los megacariocitos y estimular su proliferación y así aumenta la producción plaquetaria (Kuter, 1995; Fielder et al, 1996).

Pero en la regulación de los niveles de TPO no solo es importante el Mpl plaquetario, sino también el Mpl de los megacariocitos, ya que pueden también internalizarlo y degradarlo e incluso se ha visto en condiciones en las que hay pocas plaquetas, pero abundantes megacariocitos, que los niveles de TPO están normales o disminuidos, como en el caso de la Púrpura Trombocitopénica Idiopática (enfermedad autoinmune con destrucción plaquetaria pero con elevadas cuentas de megacariocitos en médula ósea) o en los ratones Knockout para NF-E2 que tienen trombocitopenia pero megacariocitos aumentados (Fielder et al, 1996). Se ha estimado que los

receptores Mpl en megacariocitos maduros van de 2,000 a 12,140 aproximadamente (Wendling, 1999).

Las vías de señalización por debajo del receptor Mpl se mencionaron previamente al revisar la megacariopoyesis (Figura 7) y la que estudiamos en este trabajo es la vía JAK/STAT.

6. VIA DE SEÑALIZACION JAK/STAT

La vía JAK/STAT (*Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription*) es una vía de señalización pleiotrópica muy conservada, que se ha descrito en muchos grupos, desde insectos (moscas) hasta mamíferos. En mamíferos principalmente se utiliza en la señalización por citocinas y factores de crecimiento, por lo tanto participa en procesos de proliferación, diferenciación celular e inhibición de la apoptosis involucrados en hematopoyesis, sistema inmune, adipogénesis, entre otros. Por lo tanto, las mutaciones en esta vía que ocasionan inhibición, tienen consecuencias en los procesos mencionados, y su activación es capaz de ocasionar inflamación, gigantismo, enfermedades mieloproliferativas y leucemias (Rawlings et al, 2004).

En mamíferos se reconocen 4 JAKs: JAK 1, JAK2, JAK3 y Tyk2 y la mayoría de ellas miden de 120 a 130KD. Las JAKs comparten dominios muy conservados llamados JH (*JAK homology*) que van del JH1 al JH7, los cuales se enumeran del extremo C al N terminal. JH7 se encuentra en la región llamada Box 1 y se une al receptor de la citocina y JH1 es la parte que tiene la función de Tirosina

cinasa. La región JH2 es una pseudocinasa que tiene una función reguladora sobre JH1 (aquí se puede presentar una mutación que lleva a enfermedades mieloproliferativas, al cambiar una Valina por una fenilalanina en la posición 617). JH3 y JH4 presentan similitud con el dominio SH2. JH3 a JH7 son el dominio llamado FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) y es el sitio de unión al receptor y pueden existir interacciones con otras cinasas (Murray, 2007; Valentino and Pierre, 2006; Schindler, 2002) (Figura 9).

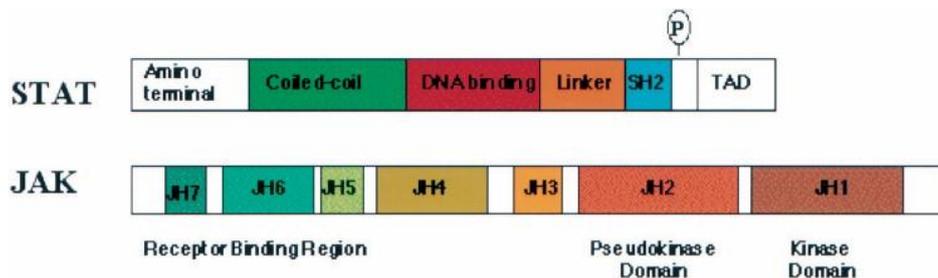


Figura 9. Estructura general de JAK y STAT. Las STATs tienen dominios muy conservados, como el amino terminal (NH₂), el cual es importante para su translocación al núcleo. El sitio de unión al DNA junto con el dominio *Linker* activan potenciadores de la familia GAS. El dominio mejor conservado es el SH2 que permite la dimerización de las STATs para su posterior translocación al núcleo. El dominio TAD es el dominio de activación de la transcripción. Las JAKs comparten los dominios de gran homología, JH1-JH7. El dominio JH1 de JAK es el que tiene función de tirosina cinasa y el JH2 es el que regula esta función de cinasa y su mutación se relaciona con enfermedades mieloproliferativas. JH3-JH7 corresponde al dominio FERM, de unión al receptor. Modificado de Schindler, 2002.

Existen siete STATs en mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT 6. Todas las STATs tienen un extremo amino terminal que es importante para que puedan translocarse al núcleo, el dominio de espiral enrollada (*coiled coil*) se ha reportado que es el sitio de unión de algunos reguladores como IRF-9. El sitio de unión con el DNA, *DNA binding domain*, tiene sitios de unión con potenciadores de la familia GAS (*γ-activated site family of enhancers*). El dominio *Linker* es importante para asegurar la estructura adecuada del dominio de unión al DNA. Todas las STATs conservan un residuo de tirosina cercano al extremo C-terminal el cual es fosforilado por JAK. Una vez fosforilados, pueden unirse a otra STAT por su dominio SH2 (*Src homology 2*) y formar homodímeros o heterodímeros que se

translocan al núcleo y ahí pueden activar o reprimir ciertos genes. Finalmente, en el carboxilo terminal, se encuentra el dominio TAD (*Transcriptional Activation Domain*), el cual varía considerablemente en tamaño y secuencia en las diferentes STATs, pero se ha visto una gran homología entre ratones y humanos. La activación constitutiva de STATs, sobre todo STAT3 y STAT 5 se ha involucrado en procesos de carcinogénesis (Valentino and Pierre, 2006). En la figura 9 se esquematiza la estructura general de JAK y STAT.

VI. JUSTIFICACION

Como se mencionó previamente, se encuentran altas concentraciones de V en los residuos de combustión del petróleo y es un hecho que las concentraciones en la ciudad de México han ido en aumento. En nuestro modelo murino de inhalación de V_2O_5 encontramos la presencia de trombocitosis y megacariocitosis con alteraciones morfológicas en ambas células.

Con este proyecto pretendemos explorar la vía JAK/STAT como una probable vía de señalización involucrada en el aumento de la megacariopoyesis y, por lo tanto, del aumento en el número de plaquetas en sangre inducidos por V.

Además, determinaremos si el V tiene un efecto en la función de las plaquetas y si este revierte al dejar cuatro semanas post exposición, lo cual estaría predisponiendo a los organismos a trastornos trombóticos o hemorrágicos según la alteración, ambos de consecuencias igualmente graves.

VII. HIPOTESIS

El aumento en el número de plaquetas y su alteración funcional, inducidos por la inhalación de V, son consecuencia de las alteraciones en la megacariopoyesis y en los factores relacionados con ésta (el receptor Mpl para TPO y la vía de señalización: JAK2, STAT 3 y 5).

VIII. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Analizar si la presencia de receptor Mpl, JAK2, STAT3 y STAT5 están involucrados en el aumento en la megacariopoyesis y aumento del número de plaquetas inducido por la inhalación de V, así como evaluar la función plaquetaria, en este modelo murino.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la presencia de receptor Mpl en megacariocitos de ratones expuestos a V mediante citofluorometría e inmunohistoquímica.
- Analizar la fracción fosforilada de JAK2, STAT 3 y STAT 5 en megacariocitos de ratones expuestos a V mediante citofluorometría e inmunohistoquímica
- Analizar la presencia de marcadores de activación plaquetaria como CD62p y los conjugados leucocito-plaqueta con marcadores CD 41 y CD14, mediante citofluorometría.
- Evaluar la función plaquetaria de los ratones expuestos a V inhalado y los posibles cambios al retirar la exposición al tóxico mediante agregometría.

IX. METODO

Se utilizaron 60 ratones machos de la cepa CD1 de 30 a 35g de peso, que se mantuvieron con ciclos luz/oscuridad 12:12 y alimentación *ad libitum*. El grupo expuesto fue sometido a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5) al 0.02M en una caja de acrílico cerrada conectada a un nebulizador en dos ocasiones por semana, cada una de una hora de duración, durante 8 semanas. Se utilizaron también ratones para el grupo control en las mismas condiciones que los expuestos, pero solo se expusieron a nebulizaciones con solución fisiológica. Se obtuvieron muestras de sangre de los ratones a las 4 semanas y 8 semanas. Posteriormente se dejaron sin exposición durante 4 semanas (post exposición) para tomar muestras de sangre y comparar los resultados. Las muestras de bazo se obtuvieron a las 4, 6 y 8 semanas de exposición (figura 10).

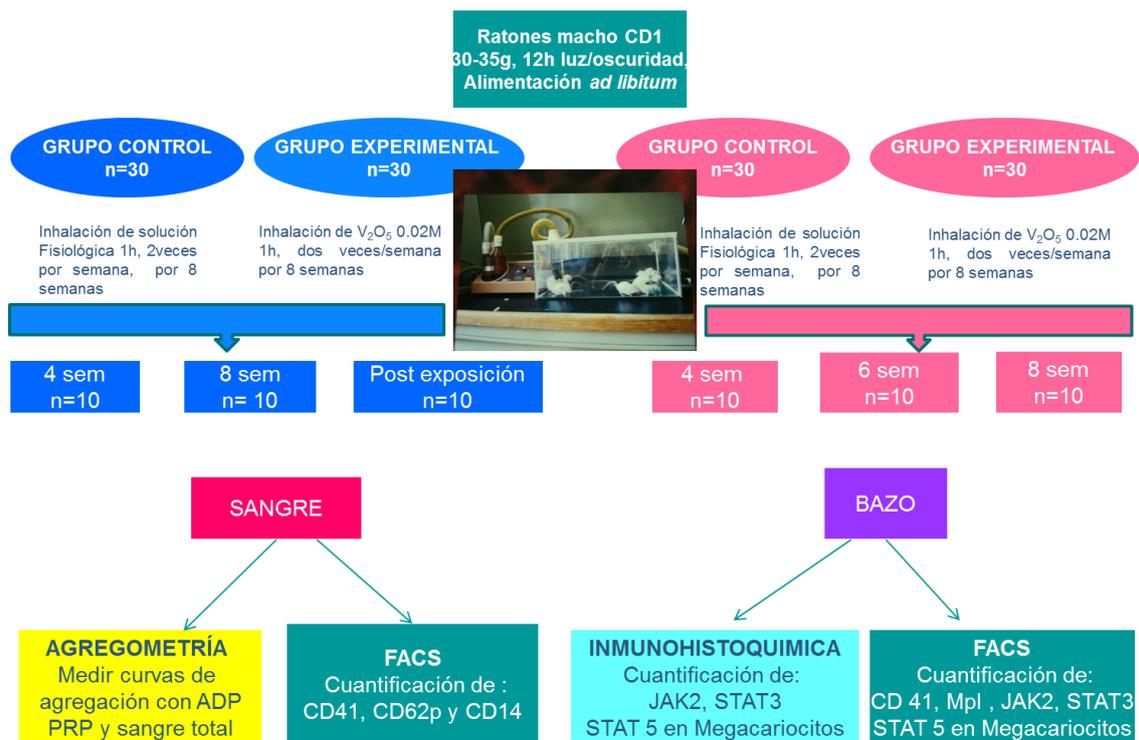


Figura 10. Método. Se utilizaron 60 ratones de la cepa CD-1. Se ilustra la cámara de nebulización en la que se llevó a cabo la inhalación de pentóxido de vanadio. Se obtuvieron muestras de sangre para realizar agregometría y citofluorometría para detectar marcadores de activación plaquetaria. También se obtuvo el bazo para realizar la determinación de las fracciones fosforiladas de JAK2, STAT3 y STAT5 en megacariocitos.

La sangre se tomó por punción en la aorta abdominal, previa anestesia con pentobarbital, y se colocó en tubos con citrato de sodio al 3.8% en una proporción 1:10. Para los estudios de agregometría, se obtuvo el plasma rico en plaquetas (PRP) mediante centrifugación a 1200rpm por 3 minutos y se separó utilizando una micropipeta. Posteriormente se obtuvo el plasma pobre en plaquetas (PPP) mediante centrifugación a 3,500rpm por 15 minutos. Se realizó un recuento plaquetario utilizando un Coulter, tanto en los controles como en los expuestos para ajustar el número de plaquetas a 250,000/ μ l. Se utilizó un agregómetro (ChronoLog 560 model, Havertown, PA, USA) con medición por luminiscencia y ADP como agonista a una concentración de 2.5 μ M (valor umbral).

A las 4 semanas se realizó agregometría en sangre total analizando los datos con el mismo agregómetro, pero midiendo la impedancia eléctrica entre dos electrodos que se sumergen en sangre total 5 minutos antes de agregar el ADP (5 μ M). Los resultados se reportaron en Ohms.

Las muestras de bazo se procesaron para microscopía de luz mediante la técnica histológica convencional: fijación en formol al 10%, deshidratación con alcoholes, aclaración con xilol, inclusión en parafina líquida y se realizaron cortes en blanco para realizar la técnica de inmunohistoquímica siguiendo los pasos: desparafinación, recuperación antigénica por presión y calor en buffer de citratos (Declere), inhibición de la peroxidasa, incubación con anticuerpo primario (anti Mpl, anti JAK2, anti STAT3 y anti STAT5) (Cell Signaling) e

incubación con anticuerpo secundario, incubación con el complejo HRP-estreptavidina, revelado con diaminobenzidina y contratinción con hematoxilina.

Para realizar el análisis de citometría, se tomaron muestras de bazo, el cual se maceró entre dos mallas para obtener las células. Se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos para obtener el botón celular, se colocó buffer de lisis para disminuir el número de eritrocitos y posteriormente se realizó inmunomarcaje utilizando como marcadores superficiales de megacariocitos el CD41 y Mpl. Se realizó permeabilización para poder marcar las proteínas intracelulares con anticuerpos anti JAK2, anti STAT3 y anti STAT5 (Cell Signaling) y posteriormente se incubaron con anticuerpos secundarios fluoresceinados (BD). Se colocaron en buffer de fijación y se guardaron en frío y oscuridad hasta su captura en el citómetro FACScalibur. En el caso de la sangre, se tomaron 30µl del tubo con citrato de sodio, en 300µl de buffer de tinción, se incubó con los anticuerpos anti CD 41 y anti CD 14 y anti CD 62p fluoresceinados (BD), se diluyó nuevamente 1:10 en buffer de tinción y posteriormente en buffer de fijación y se guardaron en frío y oscuridad para posteriormente analizarlos en el citómetro FACScalibur.

Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) para determinar el efecto de la inhalación de V₂O₅ sobre las diferentes variables. Posteriormente los análisis de ANOVA que registraron diferencias significativas fueron sometidos a un análisis de Tukey para comparar entre tratamientos.

X. RESULTADOS

1. EFECTO DEL VANADIO EN LA PRESENCIA DEL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA (MPL) EN LOS MEGACARIOCITOS.

Se realizó la identificación de los megacariocitos con el marcador CD 41 y en esta población se cuantificó el receptor Mpl. El receptor Mpl se encontró disminuído de manera estadísticamente significativa a las 8 semanas de exposición a V, como se muestra en las medias de fluorescencia del histograma en la figura 11.

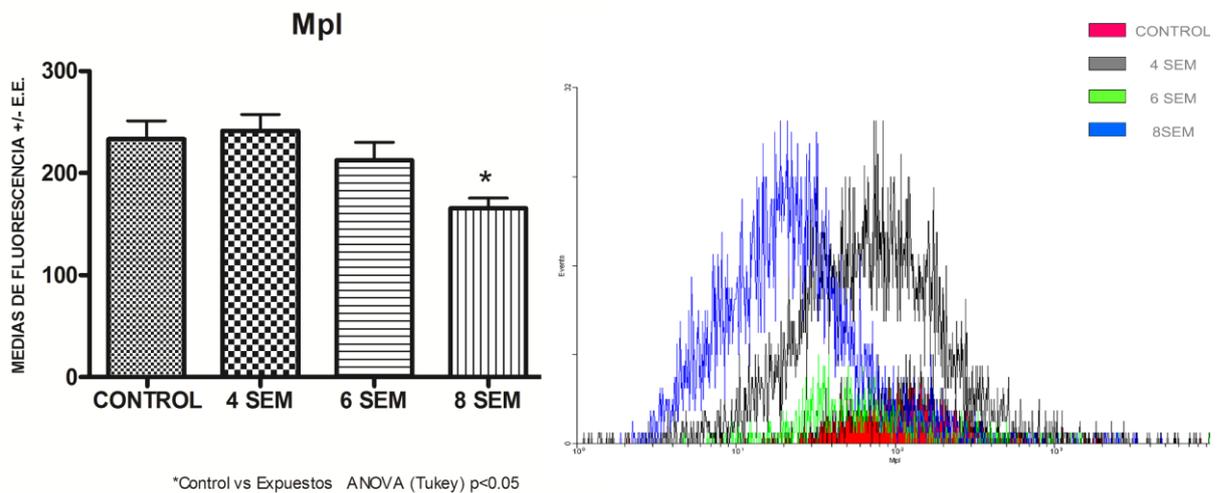
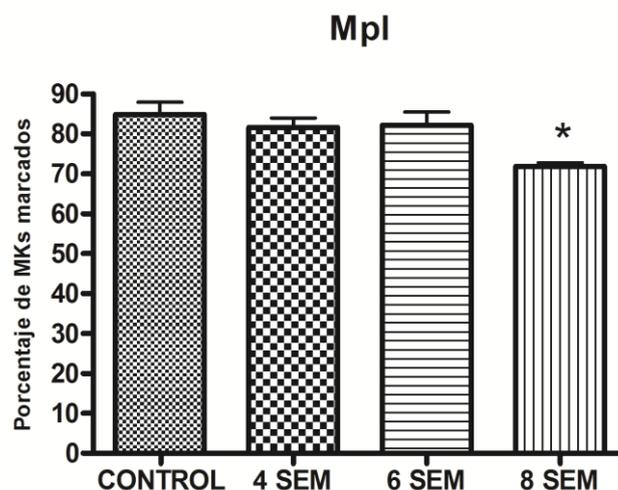


Figura 11. Cinética de la presencia del receptor Mpl en megacariocitos en los diferentes tiempos de exposición a V. Se observa una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia a las 8 semanas de exposición.

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para observar el efecto del vanadio en el receptor Mpl y se corroboró lo observado en citofluorometría, la disminución del receptor a las 8 semanas de exposición a V como se observa en las figuras 12 y 17. Cabe mencionar que la localización del receptor Mpl también cambió, en los controles se observa más en la membrana plasmática y en los megacariocitos de los ratones expuestos se observó sobre todo en el citoplasma (Figura 17).



*Control vs Expuestos ANOVA (Tukey) $p < 0.05$

Figura 12. La marca del receptor Mpl en megacariocitos, determinada por inmunohistoquímica, presentó una disminución estadísticamente significativa a las 8 semanas de exposición a V. Aproximadamente un 15% del total de megacariocitos en este tiempo de exposición no presentaron marca para Mpl.

2. EFECTO DEL VANADIO EN LA PRESENCIA DE JAK2, STAT 3 Y STAT 5 FOSFORILADOS EN LOS MEGACARIOCITOS.

Se identificaron los megacariocitos por citofluorometría utilizando CD41 y Mpl como marca superficial. Se abrió una ventana para analizar las proteínas JAK2, STAT3 y STAT 5 fosforiladas en esta población doble positiva.

Se encontró un aumento estadísticamente significativo en la presencia de las proteínas JAK2 fosforilada y STAT 3 fosforilada a las 8 semanas de exposición a V, como se muestra en las gráficas e histogramas de la figura 13 y 14. No se encontró diferencia en la presencia de STAT 5 (los datos no se muestran).

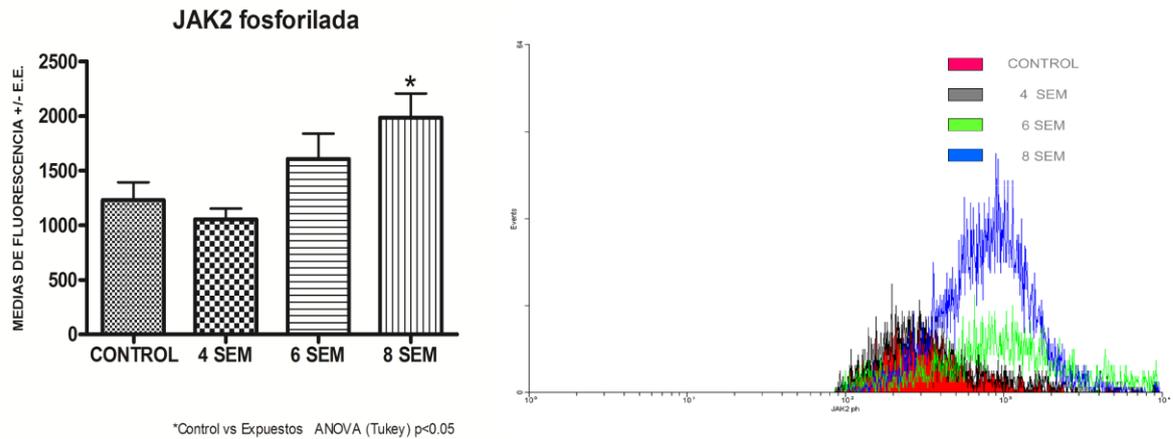


Figura 13. Presencia de la fracción fosforilada de JAK2 a lo largo del tiempo de exposición. Se observa un aumento estadísticamente significativo en la intensidad de fluorescencia de la marca a las 8 semanas de exposición.

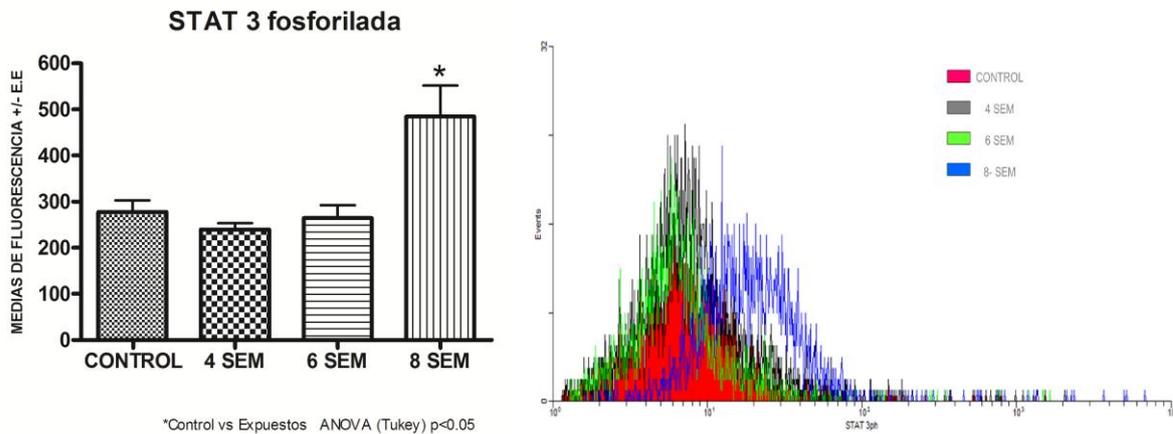


Figura 14. La intensidad de fluorescencia de la fracción fosforilada de STAT3 en megacariocitos de ratones expuestos a V presentó un aumento estadísticamente significativo a las 8 semanas de exposición.

Mediante inmunohistoquímica se realizó un conteo de megacariocitos para obtener un porcentaje de células inmunomarcadas, encontrando un aumento estadísticamente significativo de JAK2 y STAT3 a las 8 semanas de exposición, resultados que son consistentes con los obtenidos por citofluorometría (Figura 15 y 16). En la figura 17 se muestran fotomicrografías en donde se muestran estos resultados.

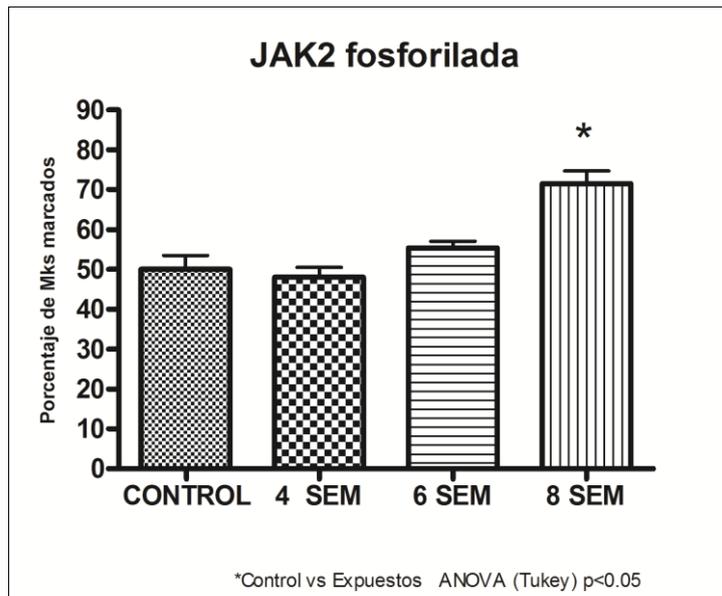


Figura 15. El porcentaje de megacariocitos con marca para JAK2 fosforilada determinada por inmunohistoquímica, aumentó de manera estadísticamente significativa a las 8 semanas de exposición.

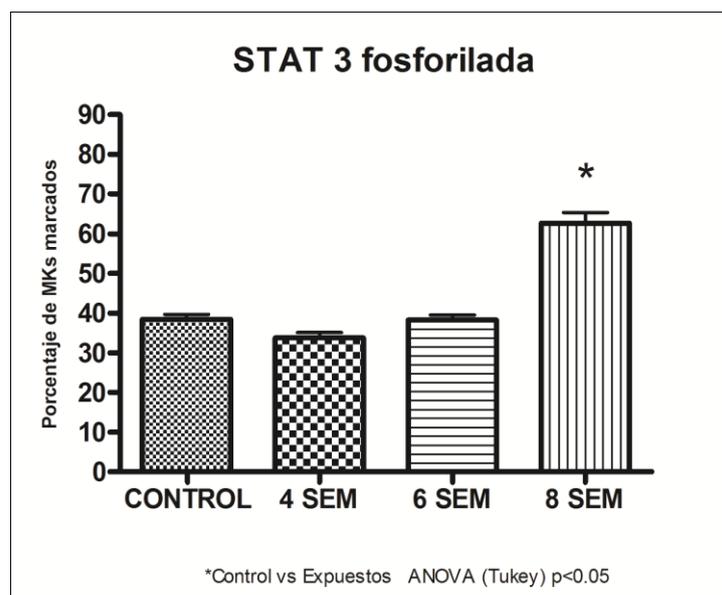


Figura 16. El porcentaje de megacariocitos con marca para STAT3 fosforilada por inmunohistoquímica, aumentó de manera estadísticamente significativa a las 8 semanas de exposición.

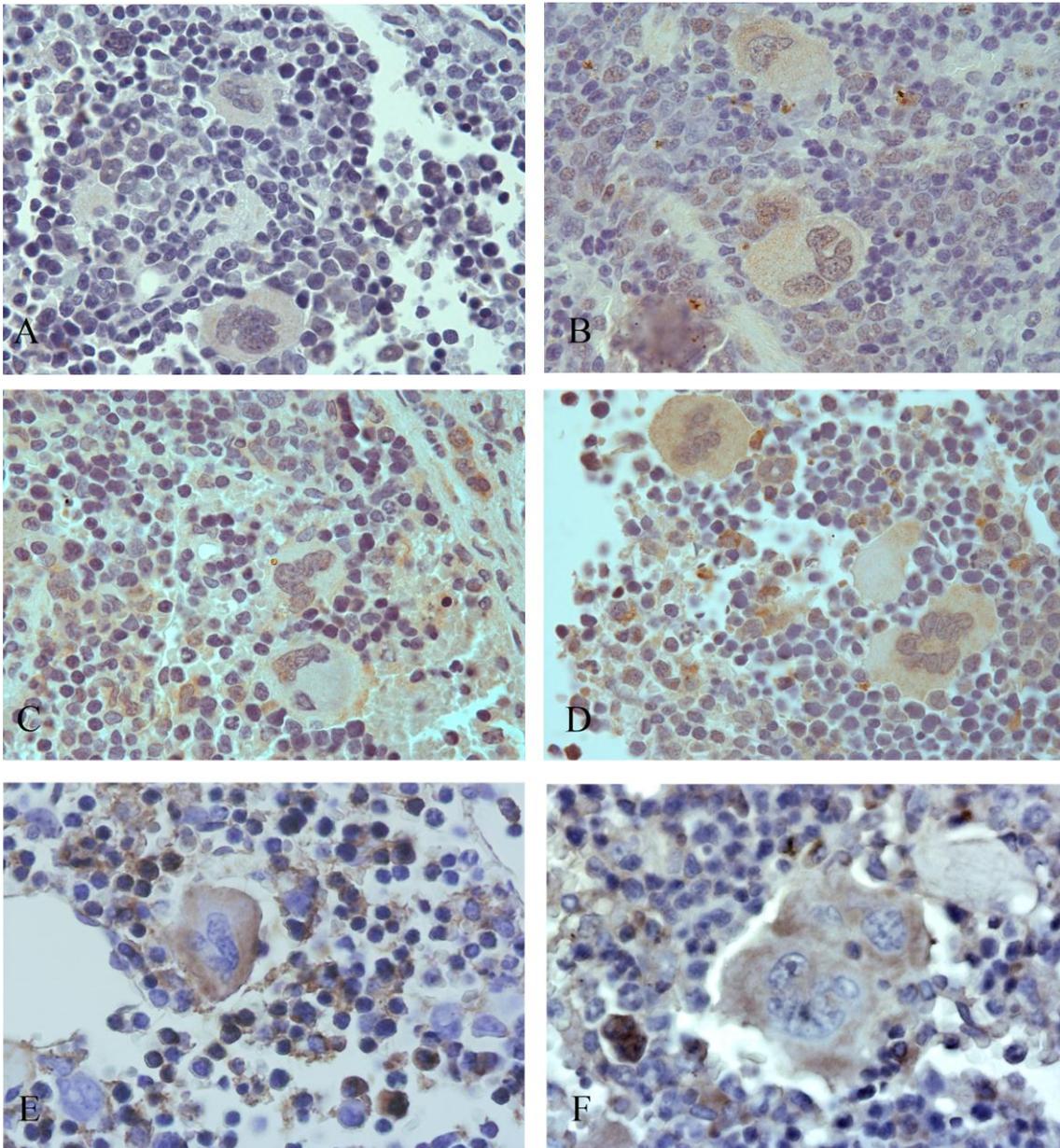


Figura 17. En esta fotomicrografía se pueden observar megacariocitos marcados para JAK2 en un animal control (A), se observa una mayor marca para esta proteína a las 8 semanas de exposición (B). En C, se observan megacariocitos marcados para STAT3 y nuevamente el aumento en la marca a las 8 semanas de exposición (D). En el caso del receptor Mpl, se observa un megacariocito representativo de los animales del grupo control con mayor intensidad de marca (E), comparado con la marca menos intensa a las 8 semanas de exposición, además de que la marca es citoplásmica más que membranosa (F). 400x

3. ACTIVACION PLAQUETARIA.

No se encontraron cambios significativos en el marcador de activación plaquetaria CD62p durante todo el tiempo de exposición a V, sin embargo, se

encontró un aumento estadísticamente significativo a las 4 semanas después de suspendida la exposición a este metal ($p < 0.05$). (Figura 18).

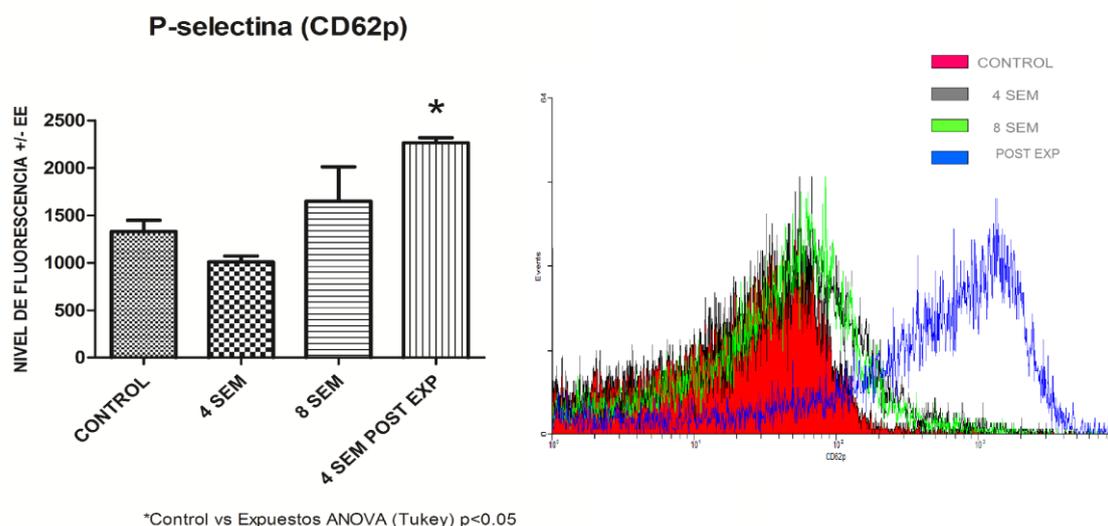


Figura 18. Cinética de la presencia de p-selectina (CD62p) en plaquetas. Se observa el aumento en la intensidad de fluorescencia estadísticamente significativo a las cuatro semanas de post exposición.

Por otro lado, no se encontraron cambios en los conjugados leucocito-plaqueta, medidos por citofluorometría ($p = 0.488$). No se muestran los resultados.

4. EFECTO DEL VANADIO EN LA AGREGACION PLAQUETARIA.

La inhalación de V inhibió significativamente la agregación plaquetaria utilizando PRP a las 4 semanas de exposición (media de 51.207% de inhibición), sin embargo la agregación plaquetaria regresó a valores normales a las 8 semanas de exposición y a las 4 semanas de post exposición. (Tabla 4 y figura 19). Se midió entonces la agregación plaquetaria en sangre total a las 4 semanas de exposición para compararla con los resultados de la agregación con PRP, encontrando que en sangre total no hubo cambios significativos con respecto al control. La media de la agregación plaquetaria de los ratones

control fue de 9.78 ± 0.94 ohms, comparado con los ratones expuestos, cuya media fue de 9.26 ± 0.88 ohms ($p=0.729$). Figura 20.

EFECTO DEL VANADIO EN LA AGREGACION PLAQUETARIA CON PRP		
	PORCENTAJE DE AGREGACION PLAQUETARIA (MEDIA)	DESVIACION ESTANDAR
CONTROL	100	4.23
4 SEMANAS DE EXPOSICION	48.79 *51.207 (porcentaje de inhibición)	12.08
8 SEMANAS DE EXPOSICION	92.727	15.3
POST EXPOSICION	104.392	9.2

Tabla 4. En esta tabla se muestran los porcentajes de agregación plaquetaria con PRP. Es evidente la disminución en la agregación plaquetaria a las 4 semanas de exposición, que se reporta también como porcentaje de inhibición con un *, indicando que fue una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).

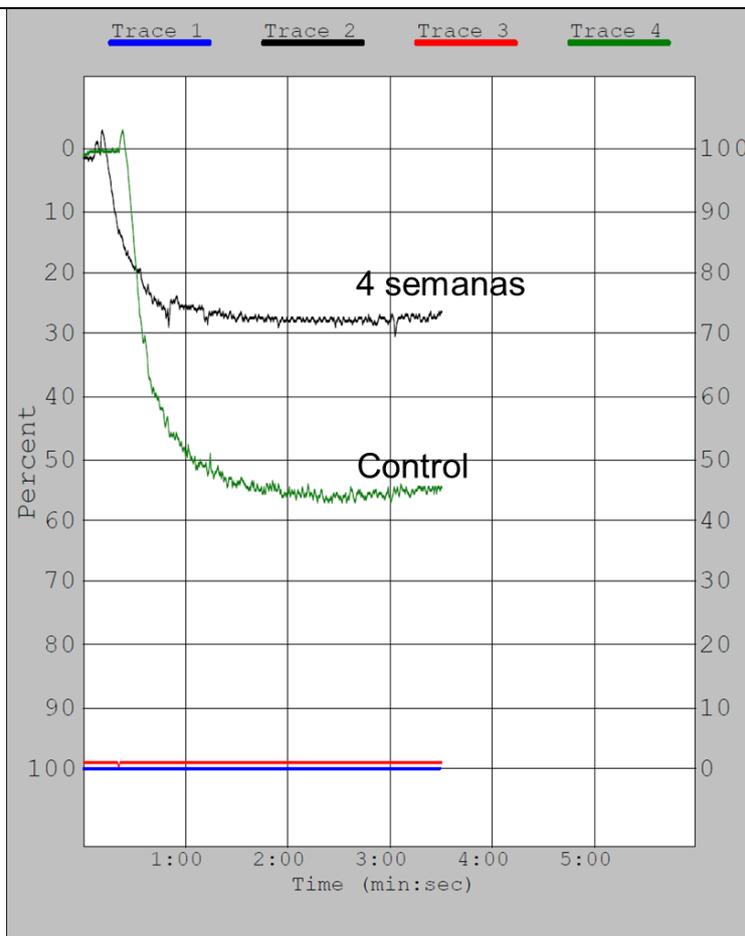


Figura 19. Se muestran las curvas de agregación de un animal control y uno expuesto a 4 semanas de inhalación de V, este último en color negro, con menor agregación que el control. Curvas representativas de las muestras de sangre de 10 ratones, cada muestra analizada por

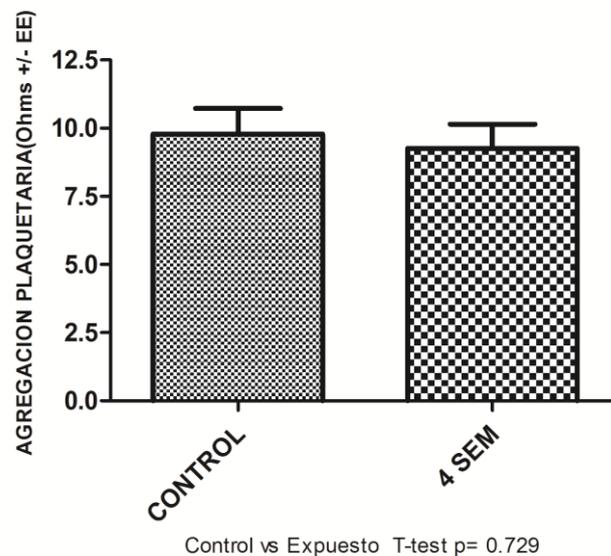


Figura 20. Agregometría en sangre total. No hay diferencia significativa entre el grupo control y el expuesto a 4 semanas.

XI. DISCUSION

Las concentraciones de V a la que son expuestos los ratones en este modelo alcanzan 1.436 mg/m^3 (González-Villalva et al, 2011), similar a los valores reportados para la exposición ocupacional (IARC, 2006; Kiviluoto 1979, 1980). Esta concentración es mayor al límite permisible establecido en 0.05 mg/m^3 por la ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) (ACGIH, 2009). Por otro lado, se ha medido la concentración de V en sangre y médula ósea en estos ratones, $27 \text{ } \mu\text{g/ml}$ y $22 \text{ } \mu\text{g/ml}$ respectivamente en la exposición subcrónica (octava semana), observando una diferencia significativa con el grupo control, en el cual no se detectó este metal (González Villalva et al, 2011). Estas mediciones comprueban que el V se acumula en estos tejidos, en los que residen las plaquetas y los megacariocitos, las cuales son células blanco para la toxicidad del V inhalado.

Nuestro grupo ha reportado trombocitosis, así como cambios en la morfología plaquetaria, como la presencia de plaquetas gigantes (González-Villalva et al, 2006). Estos hallazgos son sugestivos de posibles alteraciones en la megacariopoyesis, así que se analizó la medula ósea y el bazo y se encontró un aumento de megacariocitos en ambos órganos, así como cambios morfológicos como megacariocitos más grandes y poliploides y con mayor cantidad de gránulos alfa y densos (Fortoul et al, 2008, 2009). Hay algunos artículos que mencionan un aumento en el número de megacariocitos de bazo después de la inyección intraperitoneal de compuestos de V, pero los autores no discuten este hallazgo, debido tal vez a que no era parte de sus objetivos (Cohen et al, 1984, Al-Bayati et al, 1992).

La principal hormona reguladora de la proliferación de los megacariocitos y de la cuenta plaquetaria es la Trombopoyetina (TPO), que a través de su receptor Mpl es capaz de activar la vía JAK/STAT (González Villalva et al, 2010 b). En este trabajo se encontró un aumento en la presencia de la forma fosforilada de JAK2 y STAT3, la forma activa de estas proteínas y, por otro lado, se encontró una disminución del receptor Mpl en los megacariocitos a las 8 semanas de exposición a V.

Algunos estudios reportan que el V es capaz de inducir la activación in vitro de la vía JAK/STAT (Wang et al, 2003, Kita et al, 2003, Carballo et al, 1999, Bardgett et al, 1999). En particular, existe un estudio en el que exponen células HCD57 dependientes de eritropoyetina (EPO) a ortovanadato y se demuestra

la activación de JAK2, STAT1, STAT5 y PI3K sin activación del receptor de EPO (EPO-R), dando como resultado la inhibición de la apoptosis, pero no aumenta la proliferación de dichas células (Lawson et al, 2000). Estos autores proponen como mecanismo de acción principal del V la inhibición de proteínas tirosina fosfatasas (PTPs), de ahí que la activación del receptor no sea tan relevante.

Es bien conocida la acción inhibitoria del V sobre las PTPs por un efecto oxidante directo del V sobre el sitio catalítico de la enzima o como consecuencia del estrés oxidante provocado por el metal (Jung et al, 2009; Maihles et al, 2003; Samet et al, 1999; Imbert et al, 1994), y, por otro lado, como se mencionó previamente, también existen reportes de la activación de la vía JAK/STAT como consecuencia de la inhibición de PTPs por el V (Lawson et al, 2000; Carballo et al, 1999; Bardgette et al, 1999).

Como metal de transición, el V es capaz de generar especies reactivas de oxígeno y, cabe mencionar que estas especies reactivas de oxígeno, han demostrado la capacidad de activar la vía JAK/STAT también por oxidación de las PTPs (Simon et al, 1998; Abe et al, 1998).

Entre las PTPs involucradas en la regulación de la vía JAK/STAT en los megacariocitos se encuentran principalmente SHP-1 y SHP-2 (Yamada et al, 2003; Alexander, 2002). El posible mecanismo de acción que se propone en este trabajo es que estas PTPs son inhibidas por V, por lo tanto no existe este mecanismo de regulación negativa de esta vía y en consecuencia, JAK2 y

STAT3 permanecen fosforiladas y activadas estimulando la proliferación de los megacariocitos y el aumento de la cuenta plaquetaria en este modelo.

Por otro lado, algunos compuestos de V pueden inducir o reprimir ciertos genes, incluidos algunos de la familia JAK/STAT como se reporta en un estudio de fibroblastos de personas ocupacionalmente expuestas a pentóxido de vanadio, en los cuales se observó un aumento en la expresión de JAK2 y STAT1 (Ingram et al, 2007), aunque en este trabajo solo reportan el aumento en la expresión y no estudian la activación de la vía.

En la megacariopoyesis están involucradas otras vías de señalización que no han sido estudiadas en este trabajo y que podrían estudiarse como otro mecanismo de acción posible que pudiera estar alterado por la exposición de V. Tal es el caso de las MAPK que se sabe pueden ser activadas por diversos metales, incluyendo al V (Jung et al, 2009, Wang et al, 2003, Zhang et al, 2003). Además, la última fase de la trombopoyesis, la liberación de plaquetas a partir de los megacariocitos, depende de otros factores importantes y no tanto de la TPO y, debido a que en este modelo también se observa un aumento en la cuenta plaquetaria, se podría analizar posteriormente el factor de transcripción NF- κ B, involucrado en la formación de proplaquetas y en la liberación de plaquetas a la circulación (Fock et al, 2008).

La disminución del receptor Mpl puede ser un tipo de regulación negativa como consecuencia de la activación de la vía JAK/STAT. Existen reportes de que el receptor Mpl es internalizado, ubiquitinizado y degradado por proteosomas

tanto en megacariocitos como en plaquetas, como una forma de regular la señalización por TPO (Saur et al, 2010). Este tipo de regulación está asociada con una activación anormal de la vía JAK/STAT en una enfermedad mieloproliferativa llamada Trombocitemia Esencial (ET) en la cual existe disminución del receptor Mpl (Horikawa et al, 1997, Harrison et al, 1999; Teofilli et al, 2000, Royer et al, 2005, Moliterno et al, 2006). La ET es una enfermedad clonal en la cual se presenta: esplenomegalia, trombocitosis, plaquetas gigantes, megacariocitos displásicos, grandes y más poliploide, anomalías en la función de las plaquetas con mayor riesgo de eventos trombóticos o hemorrágicos (Schaffer 2004, 2002 and 2001) y todos los criterios mencionados los hemos encontrado en nuestro modelo (González-Villalva et al, 2006; Fortoul et al, 2008 and 2009). Recientemente se descubrió que la ET está asociada a una mutación en JAK2 en la cual cambia una valina por una fenilalanina en la posición 617 y por lo tanto se le dio el nombre de JAK2V617f (Schaffer, 2006; Kaushansky, 2005 b; Barbui, 2004). Debido a esta mutación en un sitio regulador, en la parte de pseudocinasa, la JAK2V617F está constitutivamente activada y estimula la proliferación megacariocítica, como ocurre en este modelo. Existen también mutaciones en el receptor Mpl que dan como consecuencia trombocitosis, pero no está clara la asociación entre este tipo de mutaciones y la ET (Vannucci and Guglielmelli, 2008).

En nuestro trabajo no se ha investigado si existe algún tipo de mutación en JAK2, aun cuando el V se ha reportado como genotóxico y mutagénico (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006) , debido a que es más factible que su efecto de activación en la vía JAK/STAT sea a través de la inhibición de

PTPs más que a nivel de daño al ADN ya que se reporta como mutagénico débil, además de que al suspender la inhalación de V, la cantidad de megacariocitos disminuye y su efecto en la producción de ciertas proteínas regresa al nivel de los controles (Martínez Baez, 2011). Aún necesitamos probar la hipótesis de que esta activación de la vía JAK/STAT en este modelo es debido a este mecanismo de inhibición.

Otra posible explicación del aumento de megacariocitos y plaquetas en este trabajo es que el V induce un estado inflamatorio que inicia en pulmón pero que puede generalizarse a otros órganos, como ha sido reportado por otros autores (Zaporowska and Wasilewski 1986, 1992a, b; Cohen et al, 1995; Hogan, 2000) y por nosotros mismos, ya que se ha encontrado inflamación pulmonar (Fortoul et al, 2011; Falcón Rodríguez 2008), además de leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis, así como aumento de fibrinógeno en sangre periférica en la exposición subaguda, subcrónica y crónica a V (González-Villalva et al, 2009). Este tipo de trombocitosis asociada a inflamación es llamada trombocitosis reactiva y se debe principalmente a que algunas citocinas inflamatorias como la IL-6 aumentan la producción de TPO por los hepatocitos, motivo por el cual está aumentada la proliferación megacariocítica y la cuenta plaquetaria (Kaser, 2001). Anteriormente, Díaz Bech en 2007 y Díaz Fuentes en 2009 encontraron un aumento en la TPO producida en hígado y pulmón, pero en estos trabajos no se encontró aumentada la IL-6, sin embargo solo fue medida en bazo, no en la circulación sistémica. En este mismo modelo, se midió IL-6 en pulmón encontrando un aumento en la cuarta semana de exposición (Falcón Rodríguez, 2008). Para poder probar esta hipótesis se

podrían medir citocinas inflamatorias en sangre para ver si son la causa del aumento de TPO y la proliferación de los megacariocitos.

Por otro lado, las alteraciones en la megacariopoyesis pueden dar como resultado, anormalidades en la morfología y función plaquetarias, lo que puede aumentar el riesgo de eventos hemorrágicos o trombóticos, por lo tanto, en este estudio se analizó también la función plaquetaria.

Es bien conocida la asociación entre contaminación atmosférica y, en especial, contaminación por partículas suspendidas totales, con inflamación y trombosis (Nemmar et al, 2010, 2004, 2003; Mills et al, 2009; Rudez et al, 2009), por lo que se decidió iniciar este estudio plaquetario con la búsqueda de marcadores de activación plaquetaria. Se utilizó como marcador de activación plaquetaria en este estudio a la P-selectina, conocida también como CD62p, la cual es de gran utilidad para evaluar el riesgo de trombosis. La P-selectina se encuentra normalmente en la membrana de los gránulos alfa tanto de megacariocitos como de plaquetas, pero solo se expresa en la superficie de las plaquetas activadas, es decir, después de la degranulación en la que la membrana granular se integra a la membrana plasmática plaquetaria (André, 2004). En este estudio la P-selectina permaneció sin cambios durante toda la exposición a V, es decir, no hubo activación plaquetaria. Pero en la post exposición, a las 4 semanas después de suspender el V, se observó un aumento en este marcador de activación, lo cual correlaciona con una tendencia a la hiperagregación plaquetaria (la cual no fue significativa) a este mismo tiempo de exposición (González-Villalva et al, 2011). Es posible considerar este

cambio como un efecto tardío de la exposición a V, ya que la toxicocinética de este metal indica que tiene una fase de eliminación rápida de algunas horas y una fase de eliminación muy lenta que puede durar hasta 60 días, por lo que para este tiempo de post exposición, aún existen concentraciones de V en sangre y médula ósea (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano 2006; Barceloux, 1999, Nriagu, 1998).

Se evaluó también la presencia de conjugados monocito-plaquetas, los cuales permanecieron sin cambios durante todo el experimento. Este marcador generalmente se correlacionan con la presencia de P-selectina, ya que al activarse las plaquetas y expresar esta molécula en su superficie, permiten la adhesión con los leucocitos. Estos hallazgos en los marcadores de activación plaquetaria están de acuerdo a las características clínicas de los ratones de nuestro estudio, ya que aunque existe trombocitosis, no se han presentado fenómenos trombóticos a ningún tiempo de exposición (González-Villalva et al, 2011).

El estudio de agregación plaquetaria es útil para establecer la funcionalidad plaquetaria y para identificar el riesgo tanto de trombosis como de hemorragia. En este trabajo se encontró una disminución estadísticamente significativa de la agregación plaquetaria con PRP a las 4 semanas de exposición a V, la cual regresa a valores del control a las 8 semanas y en la post exposición incluso se observa una tendencia a la hiperagregación. Aunque no formó parte de los objetivos de esta tesis, se realizó también un ensayo de agregación en plaquetas humanas expuestas a V *in vitro*, en el cual se demostró el mismo

efecto que en las plaquetas de ratones, es decir, se observó una disminución en la agregación plaquetaria y este efecto fue dosis-respuesta (González-Villalva et al, 2011). Con estos resultados del ensayo in vitro en plaquetas humanas, es posible proponer que el efecto del V es directo sobre la plaqueta, de hecho, el mayor efecto inhibitorio fue a los 10 minutos de incubación, ya que se sabe que el V puede atravesar la membrana utilizando canales aniónicos y catiónicos (Goc, 2006; Barceloux, 1999; Nriagu, 1998) y en ese tiempo puede alcanzar concentraciones mayores en el interior de las células, en este caso, en el interior de las plaquetas. El mecanismo de acción del V para ocasionar inhibición de la agregación no fue estudiado en este trabajo, y aunque es difícil comparar nuestros resultados con los de otros autores porque utilizan diferentes compuestos de V y diferentes dosis, existen algunos reportes que apoyan estos resultados. Suenaga y Ueki en 2004, reportaron también inhibición de la agregación plaquetaria después de la exposición a ortovanadato in vitro, debido a un aumento en el AMPc que inhibe a la Fosfolipasa C, con lo cual se inhibe también la liberación de calcio y, debido a que el calcio es indispensable para la activación plaquetaria, no hubo activación ni agregación. Existen un estudio en el que se evalúa el efecto de diferentes metales en la agregación plaquetaria y se correlaciona siempre que el aumento del AMPc tiene como consecuencia la disminución de la agregación plaquetaria y su disminución ocasiona hiperagregación plaquetaria (Kumar et al, 2001). La razón por la que aumenta el AMPc es quizá porque el V puede activar a la enzima Adenilato Ciclasa (AC) y este efecto ha sido reportado por varios autores en diferentes tipos celulares utilizando distintos compuestos de V (Goc A 2006; Hayashi and Kimurat, 1994; Motoyashiki et al.,

1999; Nechay, 1984). Es posible explicar los resultados que se obtuvieron en el ensayo in vitro usando plaquetas humanas e incluso la inhibición en la agregación observada a las 4 semanas en nuestro modelo murino con este mecanismo de acción, ya que el tipo de curva de agregación es sugestiva de una inhibición en la liberación de calcio, sin embargo se requiere hacer mediciones de calcio y de AMPc para corroborar dicha hipótesis.

Tomando en consideración que el extraordinario cambio morfológico que sucede en la activación plaquetaria depende del citoesqueleto, se puede analizar posteriormente el efecto del V en citoesqueleto plaquetario como posible mecanismo de inhibición de la agregación, ya que en otras células se ha reportado que el V afecta algunos componentes del citoesqueleto (Fortoul et al, 2011; Rodríguez-Lara 2008; Mussali-Galante *et al*, 2005; González-Villalva 2004; Ramírez et al, 1997).

Existen otros reportes del efecto del V en plaquetas en los que se demuestra que algunos compuestos ocasionan activación y aumento en la agregación plaquetaria por el efecto inhibitorio del V en PTPs, ya que existen proteínas que permanecen activas en su forma fosforilada y son importantes en la activación plaquetaria (Pumiglia et al., 1992; McNicol et al., 1993) y, aunque en este trabajo se propone que este mecanismo es el más importante en el efecto del V sobre los megacariocitos, en las plaquetas este efecto parece ser sobrepasado por el aumento del AMPc y disminución del flujo de calcio que tiene como consecuencia la inhibición de la agregación.

Por otro lado, en este modelo murino se realizó la medición de la agregación plaquetaria en sangre total a las 4 semanas, en donde no hubo diferencia significativa con respecto al control. Esta diferencia en los resultados usando los dos métodos de agregación puede ser explicada en parte, porque las plaquetas gigantes tienden a sedimentar por la centrifugación y no forman parte del PRP y ha sido reportado que las plaquetas gigantes tienen una mayor activación que las normales (Rinder et al, 1998), así que su presencia en sangre podría ser la causa por la que se normaliza la agregación en sangre total. Además, en sangre total van otros componentes de la sangre y los eritrocitos y leucocitos son capaces de modular la función plaquetaria (Dyszkiewicz-Korpanty et al, 2005); en este modelo, como se mencionó anteriormente, existe leucocitosis con neutrofilia y linfocitosis (González Villalva et al, 2009), que aumenta la celularidad y viscosidad sanguínea y contribuye a la normalización de la agregación. Todos estos hallazgos concuerdan con la evidencia clínica de que en nuestros ratones no se presentaron eventos hemorrágicos, de hecho la disfunción plaquetaria se asocia a sangrados mucocutáneos (Simon et al., 2008; Nurden, 2005) que no se presentaron en estos ratones. Sin embargo, cabe mencionar que existen muy pocos estudios que evalúen la función plaquetaria en modelos in vivo, pero sí existen reportes de epistaxis y hemorragia pulmonar por toxicidad aguda después de instilación traqueal de polvos de V_2O_5 en ratas (Toya et al, 2001), o incluso después de administración subcutánea o intraperitoneal de algunos compuestos de V (Evangelou, 2002). Estos hallazgos podrían ser de interés en la exposición laboral debido a que no hay estudios de trastornos hemorrágicos en personas ocupacionalmente expuestas a este metal.

Por otro lado, la agregación plaquetaria en PRP regresó a niveles del control a las 8 semanas y en la post exposición, por lo que consideramos que las plaquetas deben ser capaces de implementar un mecanismo compensatorio o desarrollar tolerancia ante la exposición repetida, como se reporta en el aparato respiratorio en el estudio de Knecht y cols en 1992, en donde se observa una gran respuesta inflamatoria pulmonar en la exposición aguda y subaguda en monos expuestos a V_2O_5 , pero no en la exposición subcrónica.

Por otro lado, el efecto en las plaquetas puede ser debido a un efecto directo cuyo mecanismo se discutió antes, pero también puede ser en parte, como consecuencia de la alteración en los megacariocitos ya que, como fue planteado previamente, los hallazgos en este estudio son comparables a los de la ET, donde hay activación de JAK2 que ocasiona aumento en la megacariopoyesis y alteración en la función plaquetaria que predispone a los pacientes a trastornos hemorrágicos o trombóticos (Schafer, 2006; Tefferi and Gilliland, 2005; Adams et al, 2009; Elliott and Tefferi, 2004).

También es importante enfatizar la asociación epidemiológica y experimental entre la contaminación atmosférica, las partículas suspendidas y los padecimientos hemorrágicos (Yamazaki et al., 2007; Villeneuve et al., 2006; Tsai et al., 2003; Halinen et al., 1999) o la asociación más frecuente y mejor conocida aún, con trastornos trombóticos en muchas ciudades industrializadas (Mills et al., 2009; Kettunen et al, 2007; Nemmar et al, 2003).

Muchos de los elementos adsorbidos en las partículas suspendidas son metales como el V y han sido implicados como la causa de la mayoría de los efectos adversos de la contaminación atmosférica. Así que, las plaquetas y los megacariocitos son células muy importantes en las cuales se deben estudiar los efectos adversos de los contaminantes ambientales y los tóxicos presentes en la exposición ocupacional.

XII. CONCLUSIONES

El vanadio se encuentra como contaminante en la atmósfera y en la exposición ocupacional. En este modelo de inhalación, el V fue capaz de alterar las condiciones del microambiente hematopoyético para que se estimulara la proliferación de los megacariocitos mediante la activación de la vía JAK/STAT. El receptor Mpl disminuyó su presencia en los megacariocitos, quizá como una forma de regulación negativa. Esta alteración en los megacariocitos y el efecto directo del V en las plaquetas, tuvo como consecuencia una disfunción plaquetaria a las 4 semanas, que fue revertida posteriormente. Llama la atención que los marcadores de activación plaquetaria permanecieron sin cambios hasta que hubo una elevación de p-selectina muy tardía, lo que implica que el V se elimina muy lentamente y, quizá la exposición a V podría tener otro tipo de efecto a más largo plazo.

XIII. PERSPECTIVAS

- Comprobar la inhibición de PTPs por V en este modelo de exposición.
- Debido a que la exposición a V tiene como consecuencia trombocitosis y anemia, se puede analizar el efecto en la eritropoyesis e incluso en la

célula Progenitora Eritrocítica-Megacariocítica (PEM) para ver si se favorece la proliferación de las células de la vía megacariocítica inhibiendo el linaje eritrocítico, o corroborar si la anemia es ocasionada por un efecto hemolítico del V y no por alteración en la eritropoyesis.

- Medir la activación de la Adenilato Ciclasa por V en plaquetas y medir flujos de calcio para establecer el mecanismo de inhibición de la agregación plaquetaria.
- Identificar los cambios en la morfología plaquetaria por posibles alteraciones en su citoesqueleto como consecuencia de la exposición a V para identificar otro posible mecanismo de inhibición de la agregación plaquetaria.
- Existen muy pocas líneas de investigación en las que se evalúe el efecto de los contaminantes en megacariocitos y plaquetas, por lo que se pretende continuar analizando el efecto de otros contaminantes y tóxicos sobre estas células.

XIV. BIBLIOGRAFIA

Abe J, Berk BC. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999; 274, 21003–21010.

ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Vanadium pentoxide. In: *Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*, 7th ed. ACGIH, 2009 pp. 1–9.

Adams, B., Baker, R., López, A., Spencer, S. Myeloproliferative disorders and the hyperviscosity syndrome. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 2009; 27, 459–476.

Aguirre MV, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC. Characteristics of in vivo murine erythropoietic response of sodium orthovanadate. *Chemico-Biological Interactions*. 2005; 156: 55-68.

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

Altamirano-Lozano M., Alvarez-Barrera L and Roldán-Reyes E. Cytogenic and teratogenic effects of Vanadium pentoxide on mice. *Med Sci Res* 1993; 21: 711-713.

Altamirano-Lozano M. Valverde M., Alvarez-Barrera L, Molina B and Rojas E. Genotoxic studies of Vanadium Pentoxide (V_2O_5) in male mice II. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis, Carcinog Mutagen* 1999; 19: 243-255.

Amdur, Doull, Klaasen. *Toxicology. The basic science of poisons*. Fourth edition. Pergamon Press. USA 1991.

Andrews R and Berndt M. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research* 2004; 114: 447—453.

Aragón M.A., Ayala M.E., Fortoul T.I., Bizarro P. y Altamirano-Lozano M. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. *Reprod Toxicol* 2005; 20: 127-134.

Assem FL, Levy L. A review of current toxicological concerns on vanadium pentoxide and other vanadium compounds: gaps in knowledge and directions for future research. *J Toxicol Environ Health Part B* 2009; 12, 289-306.

Avila-Costa MR, Flores E.M, Colín-Barenque L, Ordoñez J.L, Gutiérrez A.L, Niño-Cabrera HG, Mussali-Galante P and Fortoul T.I. Nigrostriatal Modifications After Vanadium Inhalation: An Immunocytochemical and Cytological Approach. *Neurochem Res* 2004; 29(7): 1365-1369.

Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Zepeda-Rodríguez A, Antuna SB, Saldivar L, Espejel-Maya G, Mussali-Galante P, Avila-Casado MC, Reyes-Olivera A, Anaya-Martinez V and Fortoul TI. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation: A mice experimental model. *Neuroscie Letters* 2005; 381 (1-2): 21-25.

Avila-Costa MR, Fortoul TI, Niño-Cabrera G, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Gutiérrez-Valdez AL, Ordóñez-Librado JL, Rodríguez-Lara V, Mussali-Galante P, Díaz-Bech P and Anaya-Martínez V. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V_2O_5) promote memory deterioration. *Neurotoxicol* 2006; 27 (6): 1007-1012.

Barat C. Tremblay MJ. Treatment of human T cells with bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphatase inhibitors leads to activation of cyclooxygenase-2 gene. *J Biol Chem* 2003; 278(9): 6992-7000.

Barbui T. The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy or a combination of both? *Semin Hematol* 2004; 41, 15-17.

Barceloux DG. Vanadium. *Clin Toxicol* 1999; 37(2): 265-278.

Bardgette J, Abboud HE and Choudhury GG. Activation of Stat1 α by Phosphatase Inhibitor Vanadate in Glomerular Mesangial Cells: Involvement of Tyrosine and Serine Phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 1999; 19(5), 865-884.

Beutler E, Lichtman M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 6th edition. International edition. Mc-Graw-Hill companies. USA, 2001.

Cano-Gutiérrez G, Acevedo-Nava S, Santamaría A, Altamirano-Lozano M, Cano-Rodríguez MC, Fortoul TI. Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation. Participation of oxidative stress. *Toxicol Ind Health* 2011 doi: 10.1177/0748233711412424

Carballo M, Conde M, El Bekay R, Marín-Nieto J, Camacho MJ, Monteseirín, Conde J, Bedoya FJ and Sobrino F. Oxidative Stress Triggers STAT3 Tyrosine Phosphorylation and Nuclear Translocation in Human Lymphocytes. *J Biol Chem* 1999; 274(25), 17580–17586.

Cohen MD, Wei CI, Tan h and Kao KJ. Effect of ammonium metavanadate on the murine immune response. *J Toxicol Environ Health* 1984; 19(2), 279-298.

Cohen N, Halberstam M, Shlimovich P, Chang CJ, Shmoon H and Rossetti L. Oral vanadyl sulfate improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1995; 95: 2501-09.

Colin-Barenque L, Martinez-Hernandez N, Baiza-Gutman I. A, Avila-Costa MR, Ordonez-Librado JL, Bizarro-Nevarés P, Rodriguez-Lara V, Piñon-Zarate G, Rojas-Lemus M, Mussali-Galante P and Fortoul TI. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in central nervous system and their modification after vanadium inhalation. *J Appl Toxicol* 2008; 28 (6): 718-723.

Cooper RG. Vanadium pentoxide. *Indian J Occup Environ Med* 2007; 11(3): 97-102.

Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 183-188.

Dai S and McNeill JH. One year treatment of non-diabetic and STZ-diabetic rats with vanadyl sulfate did not alter blood pressure or haematological indices. *Pharmacol Toxicol* 1994; 74: 110-115.

Debili N, Wendling F, Cosman D, M Titeux, C Florindo, I Dusanter-Fourt, K Schooley, N Methia, M Charon and R Nador. The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. *Blood* 1995; 85: 391-401.

de Sauvage F, Carver-Moore K, Luoh S, Ryan A, Dowd M, Eaton D, Moore M. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; 183: 651-656.

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

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

Drachman J, Sabath D, Fox N and Kaushansky K. Thrombopoietin Signal Transduction in Purified Murine Megakaryocytes. *Blood* 1997; 89: 483-492.

Dyszkiewicz-Korpanty, A.M., Frenkel, E.P., Sarode, R. Approach to the assessment of platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2005; 11 (1), 25–35.

Elliott, M.A., Tefferi, A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br. J. Haematol.* 2004; 128, 275–290.

EPA. Environment Protection Agency. Particulate matter research. <http://www.epa.gov>

Erdmann, E. Werdam K, Krawietz W, Schmitz W and Scholz H. Vanadate and its significance biochemistry and pharmacology. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 (7): 945-950.

Evangelou A.M. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42: 249-265.

Falcón Rodríguez Carlos Iván. Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio : estudio comparativo en rata y ratón. Tesis para obtener el grado de Biólogo. UNAM. 2008.

Fawcett J, Farquhar S, Walker R, Thou T, Shand B. Oral vanadyl sulphate does not affect blood cells, viscosity or biochemistry in humans. *Pharmacol Toxicol* 1997; 80:202-206.

Fielder P, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, and de Sauvage F. Regulation of Thrombopoietin Levels by c-mpl-Mediated Binding to Platelets. *Blood* 1996; 87(6): 2154-2161.

Fock E, Yan F, Pana S and Chonga BH. NF-E2 -mediated enhancement of megakaryocytic differentiation and platelet production in vitro and in vivo. *Exp Hematol* 2008; 36(1), 78-92.

Fortoul TI, Rodríguez-Lara V, González-Villalva A, Rojas-Lemus M, Cano-Gutiérrez G, Ustarroz-Cano M, Colín-Barenque L, Montaña LF, García Peláez I, Bizarro-Nevarés P, López-Valdez N, Falcon-Rodríguez CI, Jiménez Martínez RS, Ruiz-Guerrero ML, López-Zepeda LS, Morales-Rivero A, Muñiz-Rivera Cambas A. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air suspended particles systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. Volume 2011, Article ID 951043, 11 pages. doi:10.1155/2011/951043.

Fortoul T.I., Gonzalez-Villalva, A., Piñón-Zarate, P., Rodriguez-Lara, V. Montaña, L.F. Ultrastructural Megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in Spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy* 2009; 58 (6): 375 – 380.

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

Fortoul T.I. Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health* 2002; 57(5): 446-49.

Geddis AE, Linden HM, Kaushansky K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2002; 13: 61-73.

Goc, A. Biological activity of vanadium compounds. *Cent. Eur. J. Biol.* 2006; 1 (3), 314–332.

Gómez Gómez Manuel, Danglot Banck Cecilia. Contaminación ambiental en el Valle de México. *Rev Mex Pediatr* 1998; 65 (6): 254-260.

González-Villalva A (a), Piñón-Zárate G, De la Peña-Díaz A, Flores-García M, Bizarro-Nevarés P, Rendón-Huerta Erika P, Colín-Barenque, Fortoul Teresa Imelda. The effect of vanadium on platelet function. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011; 32: 447-456.

González Villalva Adriana E. (b) Capítulo 11. Sangre. En: Fortoul van der Goes Teresa. *Guía de Biología Celular e Histología Médica*. Primera edición. México 2011. ISBN: 978-607-02-2094-4.

González Villalva Adriana (a). Capítulo 6. Sangre. En: Fortoul y Castell. *Histología y Biología Celular*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México 2010. ISBN: 978-607-15-0340-4.

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

González-Villalva A, Rodríguez-Lara V, Montaña Luis F, Lima-Melo A, Ramirez G, Fortoul TI. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Curr Topics Toxicol* 2009; 6: 31-38.

González Villalva Adriana, Castro Garcés Lisette y Kassak Ipiña Juan Julio. Una mirada a la sangre. En: Fortoul Teresa y Varela Margarita. Una mirada al mundo microscópico. Primera edición. Editorial Pearson Educación. México, 2008.

González-Villalva A, Fortoul Teresa I, Avila-Costa MR, Piñón-Zárate G, Rodríguez Lara V, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus Marcela, Bizarro Nevares P, Díaz Bech P, Mussali-Galante P and Colin-Barenque L. Thrombocytosis induced in mice after subacute and subchronic V₂O₅ inhalation. *Toxicology and Industrial Health* 2006; 22: 113-116.

González Villalva Adriana. “Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de Vanadio en Médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón”. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. 2004.

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

Gutiérrez JH, Romieu I, Corey G y Fortoul TI. Contaminación del aire. Riesgos para la salud. Editorial El Manual Moderno. Mexico 1997.

Gutiérrez Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García M, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutag* 2006; 47 (3): 199-211.

Halinen, A.J., Komulainen, H., Salonen, R.O., Ruotsalainen, M., Hirvonen, M.R., Diesel particles induce nitric oxide production in murine alveolar macrophages and rat airways. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 1999; 7, 11–18.

Harrison CN, Gale RE, Pezella F, Mire-Sluis A, MacHin SJ, Linch DC. Platelet c-mpl expression is dysregulated in patients with essential thrombocythaemia but this is not of diagnostic value. *Br J Haematol* 1999; 107, 139-147.

Hayashi, H., Kimurat, T., 1994. The effects of vanadium compounds on the activation of adenylate cyclase from rat adrenal membrane. *Biochem. Biophys. Acta* 1994; 869, 29–36.

Hogan GR. Comparative erythropoietic effects of three vanadium compounds. *Sci Total Environ* 2000; 256 (2-3): 185-189.

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

Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y and Kanakura Y. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 1997; 90, 4031-4038.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Vanadium pentoxide. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 2006; 86, 227–292.

Ibrahim C. Haznedaroğlu; Enver Atalar; M. Akif Öztürk; Necla Özer; Kenan Övünç; Serdar Aksöyek; Sirri Kes; Serafettin Kirazli; Ferhan Özmen. Thrombopoietin inside the pulmonary vessels in patients with or without pulmonary hypertension. *Platelets* 2002; 13 (7): 1369-1635.

Imbert V, Peyron JF, Farahi Far D, Mari B, Auberger P, Rossi B. Induction of tyrosine phosphorylation and T-cell activation by vanadate peroxide, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases. *Biochem J* 1994; 297, 163–173.

Ingram JL, Antao-Menezes A, Turpin EA, Wallace DG, Mangum JB, Pluta LJ, Thomas RS and Bonner JC. Genomic analysis of human lung fibroblasts exposed to vanadium pentoxide to identify candidate genes for occupational bronchitis. *Respir Res.* 2007; 8, 34-39.

IPCS. International Programme on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide and other inorganic vanadium compounds. World Health Organization. 2000.

Irsigler GB, Visser PJ, Spangenberg PA. Asthma and chemical bronchitis in vanadium plant workers. *Am J Ind Med* 1999; 35:366–74.

Jung KJ, Lee EK, Yu BP and Chung HY. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF-κB signaling in the inflammatory process and aging. *Free Radic Biol Med* 2009; 47, 983–991.

Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser W, Offner FA, Zoller H, Theurl I, Widder W, Molnar C, Ludwiczek O, Atkins M, Mier JW, and Herbert Tilg. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood* 2001; 98: 2720-25.

Kaushansky K and Drachman JG. The molecular biology of Mpl and TPO. *Oncogene* 2002; 21, 3359 -3367

Kaushansky K (a). The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005; 115, 3339-3347.

Kaushansky K (b). On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood* 2005; 105, 4187-90.

Kaushansky K. Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling. *Journal of Thromb and Haemost* 2009 7 (Suppl. 1): 235–238.

Kettunen J, Lanki T, Tiittanen P, Aalto P, Koskentalo T, Kulmala M, Salomaa V and Pekkanen J. Associations of Fine and Ultrafine Particulate Air Pollution With Stroke Mortality in an Area of Low Air Pollution Levels. *Stroke* 2007; 38:918-22.

Kita A, Uotani S, Kuwahara H, Takahashi R, Oshima K, Yamasaki H, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nagayama Y, Yamaguchi Y and Eguchi K. Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302, 805–809.

Kiviluoto, M., Rasanen, R.A., Rissanen, M. Effects on the respiratory tract of workers in a vanadium factory. *Scand. J. Work Environ. Health* 1979; 5, 50–58.

Kiviluoto, M., Pyy, L., Pakarinen, A. Clinical laboratory results of vanadium-exposed workers. *Arch. Environ. Health* 1980; 36, 109–113.

Klinger MH, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. [Review]. *J Interferon Cytokine Res* 2002; 22(9): 913-22.

Knecht, E.A., Moorman, W.J., Clark, J.C., Hull, R.D., Biagini, R.E., Lynch, D.W., Boyle, T.J., Simon, S.D. Pulmonary reactivity to vanadium pentoxide following subchronic inhalation exposure in a non-human primate animal model. *J. Appl. Toxicol.* 1992; 12 (6), 427–434.

Krejsa CM, Nadler SG, Esselstyn JM, Kavanagh TJ, Ledbetter JA, Schieven GL. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Redox independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 1997; 272 (17): 11541-9.

Kumar, S.V., Bose, R., Bhattacharya, S. Low doses of heavy metals disrupt normal structure and function of rat platelets. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2001; 20, 65–75.

Kuter DJ and Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995; 85: 2720-2730.

Lawson AE, Bao H, Wickrema A, Jacobs-Helber SM and Sawyer ST. Phosphatase inhibition promotes antiapoptotic but not proliferative signaling pathways in erythropoietin-dependent HCD57 cells. *Blood* 2000; 96, 2084-2092.

Mailhes JB, Hilliard C, Fuseler JW, London SN. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 2003; 538(1-2): 101-7.

Martínez Baez Verónica. Alteraciones en la presencia de proteínas TGF-beta, MMP-2 y MMP-9 y VEGFR2 en megacariocitos de bazo de ratones expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias UNAM. Noviembre 2011.

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

McNicol, A., Robertson, C., Gerrard, J.M. Vanadate activate platelets by enhancing arachidonic acid release. *Blood* 1993; 81, 2329–2338.

Michelson Alan D. Platelets. Second Edition. Academic Press. 2007.

Mills NL, Donaldson K, Hadoke P, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandström T, Blomberg A and Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2009; 6 (1): 36-44.

Migliore L, Zotti-Martelli L, Scarpato R. Detection of chromosome loss and gain induced by griseofulvin, estramustine, and vanadate in binucleated lymphocytes using FISH analysis. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34(1): 64-8.

Molina Luisa and Molina Mario. Air quality in the Mexico megacity. An integrated assessment. Kluwer Academic Publishers. 2002.

Moliterno A, Williams DM, Rogers O and Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood* 2006; 108, 3913-3915.

Morinville Anne, Maysinger Dusica and Shaver Alan. Review. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *TiPS* 1998; 19: 452-59.

Moscoso Caballero Fernando Filiberto. Recuperación funcional y citológica en bulbo olfatorio posterior al daño inducido por la inhalación a pentóxido de vanadio (V₂O₅) en un modelo murino. Diferencias por género. Tesis para obtener el grado de Biologo. FES Iztacala UNAM, 2010.

Motoyashiki, T., Miyake, M., Yoshida, A., Morita, T., Ueki, H. A vanadyl sulphate-bovine serum albumin complex stimulated the release of lipoprotein lipase activity from isolated rat fat pads through an increase in the cellular content of cAMP and myo-inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biol. Pharm.* 1999; 22, 780–786.

Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol Letters* 2004; 150: 135–143.

Murray PJ. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J Immunology* 2007; 178: 2623–2629.

Musk AW, Tees JG. Asthma caused by occupational exposure to vanadium compounds. *Med J Aust* 1982;1:183–4.

Mussali-Galante P and Fortoul TI. Atmospheric Pollution. Chapter 5. In: Environmental research progress. Edited by Florian P. Maes. Nova science publishers Inc. 2008.

Mussali-Galante P, Rodríguez Lara V, Hernández-Téllez B, Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Bizarro-Neves P, Martínez-Levy G, Rojas-Lemus M, Piñón-Zárate G, Saldívar-Osorio G, Díaz-Bech P, Herrera-Enríquez MA, Tovar-Sánchez E and Fortoul TI. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicol Ind Health* 2005; 21(7-8): 215-222.

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

Nechay BR, Nanninga LB, Nechay PSE, Post RL, GranthamJJ, Macara IG, Kubena LF, Tymothy DP, and Nielson FH. Role of vanadium in biology. *Fed Proc* 1986;45: 123-132.

Nechay, BR. Mechanisms of action of vanadium. *Ann Rev. Pharmacol Toxicol* 1984; 24: 508-524.

Nemmar, A., Al-Salam, A., Zia, S., Dhanasekaran, S., Shudadevi, M., Ali, B. Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Toxicol. Lett.* 2010; 194 (3), 58–65.

Nemmar, A., Hoylaerts, M., Hoet, P., Nemery, B., Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol. Lett.* 2004; 149, 243–253.

Nemmar A, Hoet P, Dinsdale D, Vermeylen J, Hoylaerts M, Nemery B. Diesel Exhaust Particles in Lung Acutely Enhance Experimental Peripheral Thrombosis. *Circulation* 2003; 107(8):1202-1208.

Nemery B. Metal toxicity and the respiratory tract. *Eur Respir J* 1990;3:202–19.

Nriagu, J O. Vanadium in the environment. A Wiley Interscience Publication. USA 1998.

Nriagu, J O. A History of Global Metal Pollution (Perspectives). *Science* 1996; 272(5259): 223-224.

Nurden, A.T. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J. Thromb. Haemost.* 2005; 3 (8), 1773–1782.

Paulus JM, Debili N, Larbret F, Levin J, and Vainchenker W. Thrombopoietin responsiveness reflects the number of doublings undergone by megakaryocyte progenitors. *Blood.* 2004; 104:2291-2298.

Pérez de Gante Carmen Licet. Efecto genotóxico del pentóxido de vanadio en células de médula ósea : comparación por género en un modelo murino de exposición por inhalación. Tesis para obtener el grado de Bióloga. UNAM. 2008

Pumiglia, K.M., Lau, L.F., Huang, Ch.K., Burroughst, S., Feinstein, M.B. Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hidroperoxide). *Biochem. J.* 1992; 286, 441–449.

Ramírez P, Eastmond DA, Laclette JP, Ostrosky-Wegman. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat Res* 1997; 386: 291-98.

Rawlings J, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT Signaling Pathway. *J Cell Science* 2004; 117: 1281-83.

Rinder, H., Schuster, Rinder, C.S., Chao Wang, Schweidler, H., Smith, B.R. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood* 1998; 91, 1288–1294.

Rivero Serrano O, Ponciano Rodríguez G y Fortoul TI. Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria. Fondo de Cultura Económica. México 1993.

Riveros-Rosas H, Pfeifer G, Lynam D, Pedroza JL, Julián-Sánchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in Mexico City air. *The Science of the Total Environment* 1997; 198: 79-96.

Rodríguez Lara Vianey. Alteraciones morfológicas del núcleo de linfocitos de ratones expuestos a la inhalación aguda, subaguda y crónica de V₂O₅ : participación de las láminas nucleares. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. 2008.

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

Rodríguez Mercado JJ, Roldán-Reyes E, Altamirano-Lozano M. Genotoxic effects of vanadium(IV) in human peripheral blood cells. *Toxicol Letters* 2003; 144: 359-369.

Rojas E, Valverde M., Herrera LA, Altamirano-Lozano M. Ostrosky-Wegman P. Genotoxicity of Vanadium pentoxide evaluated by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 359: 77-84.

Rojas Lemus Marcela. Comparación por género y por edad de los efectos genotóxicos producidos por la inhalación de pentóxido de vanadio, cloruro de manganeso y su mezcla. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. 2009.

Roldan RE, Altamirano-Lozano M. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to Vanadium pentoxide. *Mutat Res* 1990; 245: 61-65.

Romero Placeres Manuel, Diego Olite Francisca Mercedes y Alvarez Toste Mireya. La contaminación del aire. Su repercusión como problema de salud. *Rev Cubana Hig Epidemiol* 2006; 44 (2).

Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ and Constantinescu SN. Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *J Biol Chem* 2005; 280(29), 27251–27261.

Rudez, G., Janssen, N., Kilinc, E., Leebeek, F.W., Gerlofs-Nijland, M.E., Spronk, M., ten Cate, H., Cassee, F.R., de Maat, M.P.M. Effects of ambient air pollution on hemostasis and inflammation. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117, 995–1001.

Sabath D, Kaushansky K and Broudy VC. Deletion of the Extracellular Membrane-Distal Cytokine Receptor Homology Module of Mpl Results in Constitutive Cell Growth and Loss of Thrombopoietin Binding. *Blood* 1999; 94: 365 - 367.

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

Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K and Hitchcock IS. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 2010; 115(6), 1254-1263.

Schafer AI. Molecular basis of the diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2006; 107(11), 4214-22.

Schafer AI. Thrombocytosis. Current concepts. *N Engl J Med* 2004; 350, 1211-9.

Schafer AI. Thrombocytosis: too much of a good thing?. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2002; 113, 68-76.

Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Rev* 2001; 15(4), 159-166.

Schindler CW. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1133-1137.

Seaton A, Soltar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius M, Stout R. Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 1999; 54: 1027–1032.

SEMARNAT. Indicadores básicos del desempeño ambiental en México. SEMARNAT 2005.

SEMARNAT. Inventario de emisiones de contaminantes, criterio de la ZMVM. Gobierno del Distrito Federal-SEMARNAT 2008.

Simon, D., Kunicki, T., Nugent, D. Platelet function defects. *Haemophilia* 2008; 14, 1240–1249.

Simon AR, Rai U, Fanburg BL and Cochran BH. Activation of JAK/STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 275, 1640-1652.

Suenaga, A., Ueki, H. Effect of orthovanadate on platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27, 1859–1863.

Tefferi, A., Gilliland, D.G. The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin. Proc.* 2005; 80 (7), 947–958.

Teofili L, Pierconti F, Di Febo A, Maggiano N, Vianelli N, Ascani S, Rossi E, Pileri S, Leone G, Larocca LM and De Stefano V. The expression pattern of c-mpl in megakaryocytes correlates with thrombotic risk in essential thrombocythemia. *Blood* 2002; 100, 714-717.

Toya, T., Fukuda, K., Takaya, M., Arito, H. Lung lesions induced by intratracheal instillation of vanadium pentoxide powder in rats. *Ind. Health* 2001; 39, 8–15.

Tsai, S.S., Goggins, W.B., Chiu, H.F., Yang, C.Y. Evidence for an association between air pollution and daily stroke admissions in Kaohsiung, Taiwan. *Stroke* 2003; 34, 2612–2616.

Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 713:721.

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

Villeneuve, P.J., Chen, L., Stieb, D., Rowe, B.H., 2006. Associations between outdoor air pollution and emergency department visits for stroke in Edmonton, Canada. *Eur. J. Epidemiol.* 2006; 21, 689–700.

Vandenplas, Binard-van Cangh F, Gregoire J, Brumagne A and Larbanois A. Fever and neutrophilic alveolitis caused by a vanadium based catalyst. *Occup Environ Med* 2002;59:785-787.

Vannucci A and Guglielmelli P. Molecular pathophysiology of Philadelphia-negative myeloproliferative disorders: beyond JAK2 and MPL mutations. *Haematologica* 2008; 93(7), 972-976.

Wang Y, Ingram J, Walters D, Rice A, Santos J, van houten B and Bonner JC. Vanadium-induced stat-1 activation in lung myofibroblasts requires H₂O₂ and p38 MAP kinase. *Free Radic Biol Med* 2003; 35(8), 845–855.

Wendling F. Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production. *Haematologica* 1999; 84:158-166

Yamazaki S, Nitta H, Ono M, Green J and Fukuhara S. Intracerebral haemorrhage associated with hourly concentration of ambient particulate matter: case-crossover analysis. *Occup Environ Med* 2007; 64(1): 17-24.

Zaporowska H, Wasilewski W. Some selected peripheral blood and haemopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication. *Comp Biochem Physiol C*. 1989; 93(1): 175-80.

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

Zaporowska H, Wasilewski W. Haematological effects of vanadium on living organisms. *Biochem Physiol C* 1992; 102(2): 223-31.

Zaporowska H, Slotwinska M. Effect of vanadium on rat erythrocytes in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 1996; 34 Suppl 1: 99-100.

Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard SS, Lanciotti R, Butterworth L and Shi. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 2001; 392, 311-320.

Zheng C, Yang R, Han Z, Zhou B, Liang L, Lu M. TPO-Independent Megakaryocytopoiesis. *Crit Rev Onco Hematol* 2008; 65: 212–222.

Zucker-Franklin D and Philipp C.S, Platelet production in the pulmonary capillary bed: New ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol* 2000; 157: 69-74.