



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA INHALACIÓN DE V_2O_5 SOBRE LOS
LINFOCITOS DE BAZO EN UN MODELO MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA ANGÉLICA MUÑIZ RIVERA CAMBAS



TUTORA:

M en C VIANEY RODRÍGUEZ LARA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Muñiz
Rivera Cambas
María Angélica
55368109
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304561991
2. Datos del tutor
M en C
Vianey
Rodríguez
Lara
3. Datos del sinodal 1
Dra
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes
4. Datos del sinodal 2
Dr
Mario Agustín
Altamirano
Lozano
5. Datos del sinodal 3
M en C
Martha Luz
Ustarroz
Cano
6. Datos del sinodal 4
M en C
Adriana Elizabeth
González
Villalva
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la inhalación de V_2O_5 sobre los linfocitos de bazo en
un modelo murino
63pp
2010

RECONOCIMIENTOS

Agradezco especialmente a los miembros del jurado por sus invaluable aportaciones al presente trabajo:

Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes

Dr. Mario A. Altamirano Lozano

M en C. Vianey Rodríguez Lara

M en C. Martha L. Ustarroz Cano

M en C. Adriana E. González Villalva

A los miembros del laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina UNAM, por el apoyo brindado. A la Téc. Verónica Rodríguez Mata, a la Téc. Judith Reyes Ruíz y a la Téc. Ráquel Guerrero Alquicira.

Del mismo modo agradezco al Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM a cargo del MVZ. Enrique Pinzón Estrada y sus colaboradores MVZ. Victor Manuel Salgado Alfaro y MVZ. Ismael Torres Saldaña.

Al Sistema Nacional de Investigadores y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada como Ayudante de Investigador.

Este proyecto fue financiado por el PAPIIT con la clave IN210409.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios: Por permitirme ser todo lo que soy y seré, por darme todo lo que necesito en mi vida para ser feliz, por permitirme el privilegio de conocerte y de ver la verdad más allá de lo evidente.

A mis padres: Por ser los ángeles que me han dado incondicionalmente todo lo que son, para que llegara hasta donde he llegado y hasta donde quiera llegar. Gracias por todas las herramientas y las enseñanzas que me servirán hoy y siempre, pero sobretodo gracias por amarme incluso antes de existir.

A mis hermanos: Por cada juego y cada pelea, por enseñarme a defenderme ante la vida y al mismo tiempo ser mis defensores. Por las enseñanzas y el ejemplo que trazaron en sus vidas abriéndome camino para trazar la mía.

A Karla: Por enseñarme la luz en mi vida, por escucharme y ayudarme a salir adelante en momentos tan cruciales en mi vida. Gracias por marcar y cambiar mi vida, gracias por adoptarme como hermana, por verme crecer y conocerme tanto como nadie más. Por ser incontables veces mi defensora, ángel guardián y consejera.

A Stephanie: Por ser un angelito y una luz tan brillante que hizo cambios hermosos en nuestras vidas con sólo nacer, pues nos enseñaste la belleza de la vida en algo tan simple como una sonrisa.

A Vianey: Por ser mi mentora e iniciadora en el arte de hacer ciencia,
por tu apoyo y también por los jalones de orejas,
por ser una mano firme pero gentil al mismo tiempo, por ser un gran
ejemplo a seguir, pero sobre todo gracias por tu amistad,
por poder siempre contar contigo, por enseñarme a separar la amistad
del trabajo. Empezaste siendo mi tutora y terminaste
siendo mi hermana.

A Olivia, mi madre espiritual y maestra: Simplemente por cambiar mi
vida, por permitirme renacer,
hoy no sería quien soy ni estaría donde estoy si no fuera por ti.
Gracias por ayudarme a descubrir el lado más hermoso de
la vida y sobre todo a darme cuenta que se encontraba frente a mis
ojos todo el tiempo.

Al muégano: Por ser uno de los principales pilares en mi carrera,
gracias por tantos momentos llenos de aventura,
de risas e incluso de sustos. **Dinorah:** Por tantos momentos de risa y
de debraye, porque
siempre has sido un oído incansable y siempre has tenido la energía
para transmutarme, eres y siempre serás mi alma
hermana. **Vane:** Por tener la intuición de saber cuando necesitaba a
alguien y aparecer en momentos tan oportunos, por

enseñarme que existen muchas formas de ver la vida, por guiarme en mis despistes y cuidarme la espalda. **Nané:** Por enseñarme a ver el otro lado de la moneda y ayudarme a descubrir cosas tan diferentes en la vida y en mi, porque cada plática profunda contigo ha sido una manera muy intensa pero muy efectiva de crecer. Las amo con todo mi corazón.

A Lalo Franco: Por ser siempre tan honesto conmigo, por ser un gran amigo y aceptarme tal y como soy

A Alba: Por convertirte en un apoyo tan fuerte en una etapa tan crucial en mi vida, por permitirme ser parte de la tuya y enseñarme el mundo de la música desde un punto de vista tan original, la amistad.

A Marco: Por ser mi simplasa y enseñarme a ser la tuya, por ser ese amigo fiel en las buenas y en las malas.

A Axel: Por cada plática profunda, por escuchar mis debrayes emocionales y ser siempre tan honesto y apoyarme en mis ideales y sueños.

A Andrea: Por ser una parte tan importante de mi familia espiritual y en mi vida, por ser mi compañera y amiga de crecimiento y aprendizaje de una manera tan única. Por estar en momentos tan importantes en mi vida de la manera que sólo tú sabes estar, como un pequeño ángel guardián.

A Pau: Por ser en tantos momentos mi ángel, en otros mi guía, y en muchos otros mi espejo, pero siempre mi hermana del alma. Gracias por llegar a mi vida.

A Tania: Por apoyarme y brindarme tu amistad incondicional, por permitirme conocer la nobleza de tu alma.

A Cris: Por estar ahí para cuidarme, por escucharme y por enseñarme la facilidad para reír en la vida y por mostrarme la pureza de un corazón como el tuyo.

A Lalo González: por ser un gran hermano capaz de levantarme el ánimo de una manera tan sencilla, por cada sonrisa que me sacaste y que me diste, por ser un gran amigo, por escucharme y protegerme.

A Giovanni: Por ayudarme a recuperar la confianza en mí misma, por enseñarme la incondicionalidad de la amistad y por ser un gran hermano.

A mi amado coro: Por llenarme el alma de música y estar de manera tan incondicional, por ayudarme cada fin de semana a olvidar e incluso a hacer más pequeños los problemas. Por ser tan bella familia. Siempre serán para mí mis hermanos.

A Karen: Por esa gran amistad tan limpia que hay entre las dos, que estoy segura que durará por siempre, sin importar a donde nos lleve el destino

A Daniela: Porque nuestra amistad prevalece igual de fuerte sin importar los distanciamientos y los años.

A Gerardo: por ser mi primer maestro y mejor amigo. Por esta amistad tan bizarra y divertida, por ser mi espejo del lado masculino, por todo lo que me has enseñado.

A todos ustedes, los amo y amaré siempre. En mi siempre tendrán alguien en quien confiar porque es la única manera de agradecerles todo lo que me han dado.

A todos los amigos que han pasado por mi vida: Por dejar una huella en mi corazón que me enseñó una lección importante.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Introducción..... | 2 |
| 2.1 Contaminación atmosférica..... | 2 |
| 2.1.1 Contaminantes atmosféricos..... | 3 |
| 2.1.2 Contaminación atmosférica en la Ciudad de México..... | 5 |
| 2.1.3 Contaminación atmosférica y salud..... | 8 |
| 2.2 Vanadio..... | 10 |
| 2.2.1 Propiedades fisicoquímicas..... | 10 |
| 2.2.2 Usos..... | 11 |
| 2.2.3 Fuentes..... | 11 |
| 2.2.4 Vías de exposición..... | 14 |
| 2.2.5 Toxicocinética y toxicodinamia..... | 15 |
| 2.2.6 Efecto tóxico..... | 16 |
| Efecto tóxico a nivel celular..... | 16 |
| Efecto tóxico a nivel sistémico..... | 20 |
| 2.3 Bazo..... | 23 |
| 2.4 Ki-67..... | 27 |
| 3. Justificación..... | 29 |
| 4. Objetivos..... | 29 |
| 4.1 General..... | 29 |
| 4.2 Particular..... | 30 |
| 5. Hipótesis..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 6. Metodología..... | 30 |
| 6.1 Modelo de exposición a V ₂ O ₅ | 30 |
| 6.2 Obtención del bazo..... | 31 |
| 6.3 Inmunohistoquímica para Ki-67 | 31 |
| 6.4 Análisis y estadística..... | 33 |
| 7. Resultados..... | 35 |
| 8. Discusión..... | 40 |
| 9. Conclusiones..... | 48 |
| 10. Perspectivas..... | 49 |
| 11. Referencias bibliográficas..... | 50 |

1. RESUMEN

La contaminación atmosférica en las grandes ciudades como la de México, es un problema que se ha agravado con los años debido al aumento en la concentración de contaminantes como las partículas suspendidas totales (PST) y los metales adosados a éstas, entre ellos, el vanadio. Este metal de transición abunda en la atmósfera en su forma más tóxica (V_2O_5) debido a la quema de combustibles fósiles que resulta de la actividad vehicular e industrial. En modelos experimentales se ha observado que la exposición a este compuesto produce efectos adversos a nivel sistémico, por ejemplo en los pulmones, hígado, riñones, cerebro y en el sistema inmunológico. Este último ha sido poco estudiado, sin embargo en nuestro modelo se han reportado cambios en el timo como la pérdida de la relación corteza-médula y alteraciones ultraestructurales en los timocitos. En el bazo se ha observado esplenomegalia debida al crecimiento de la pulpa blanca perdiéndose la relación de esta con la pulpa roja; este fenómeno se debe principalmente al aumento en el número ciertos tipos celulares como los linfocitos, los cuales además presentan genotoxicidad y alteraciones nucleares. Debido a los cambios que presentan los linfocitos de bazo, es importante investigar si el vanadio favorece la proliferación de estas células. Para ello se utilizó un grupo de 36 ratones control y otro de 36 expuestos a V_2O_5 vía inhalada, que es la principal vía de absorción. Se sacrificaron 3 ratones de ambos grupos cada semana y se obtuvieron los bazos los cuales se procesaron para detectar por inmunohistoquímica la proteína Ki-67, un marcador de proliferación utilizado que se encuentra presente en todas las fases del ciclo celular excepto la fase G0. Nuestros resultados mostraron un aumento dependiente del tiempo de exposición en la proliferación de los linfocitos de bazo desde la primera semana. Debido a lo anterior, concluimos que el vanadio es un agente mitógeno para los linfocitos y probablemente para otras estirpes celulares. La proliferación de estas células podría alterar la homeostasis del sistema inmunológico y resultar en desórdenes de este sistema.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

La contaminación atmosférica es uno de los problemas más relevantes que involucran al mundo entero y particularmente a zonas urbanas como la ciudad de México. Esta causa diversos efectos en la salud, los cuales se han observado de manera importante principalmente en individuos que habitan ciudades contaminadas (Seoáñez CM, et al. 2002).

Una de las definiciones oficiales de la contaminación atmosférica es la de la Ley Federal para el Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de 1988 la cual la define como: “La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes (materia o energía) o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico” (Jiménez B.E, 2001).

Los contaminantes atmosféricos pueden ser emitidos por fuentes naturales, como emisiones volcánicas; y antropogénicas como la quema de combustibles en la actividad industrial y en el tráfico vehicular; estas últimas son las principales fuentes (Nebel B.J, Wright R.T. 1999).

Tres factores determinan el grado de contaminación atmosférica:

- La cantidad de contaminantes en el aire
- El espacio en el que los contaminantes se dispersan
- Los mecanismos que los eliminan del aire

(Nebel B.J, Wright R.T. 1999).

2.1.1 CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

Algunos de los principales contaminantes del aire son:

- Compuestos orgánicos volátiles
- Óxidos de carbono
- Óxidos de nitrógeno
- Óxidos de azufre
- Metales pesados.
- Ozono y otros oxidantes fotoquímicos.
- Partículas suspendidas totales

(Nebel B.J, Wright R.T. 1999).

Es fundamental considerar a las partículas suspendidas totales (PST) debido a que en la ciudad de México son, después del ozono los contaminantes más abundantes en el aire (Borja-Aburto V.H. et al. 1996). Además llevan consigo otras sustancias disueltas o adheridas a su superficie, como los metales, los cuales afectan la salud de los seres humanos (Ragosta M, et al. 2002; Morales, R.G.E. 2006).

Estas partículas son una mezcla compleja de sólidos y aerosoles que se encuentran suspendidos en el aire (Nebel B.J, Wright R.T. 1999). Su composición química es heterogénea: elementos orgánicos como residuos biológicos y microorganismos, e inorgánicos como el asbesto, carbón, plomo, aluminio, cromo, vanadio y otros metales (Rico Méndez et al. 2001). Las fuentes principales de emisión de las PST son los procesos de combustión, las cementeras, la formación fotoquímica de aerosoles con contenidos de nitratos y sulfatos y las tolvaneras (Jiménez B.E, 2001).

Pueden variar de tamaño entre 0.01 a 100µm, (Morales, R.G.E. 2006) y se clasifican en PM 2.5, para las partículas que presentan un diámetro aerodinámico

menor a 2.5 μm , PM10 para las que tienen uno menor a 10 μm , y PM100 para las que presentan un tamaño cercano a 100 μm , estas últimas, por ser de mayor tamaño no suelen permanecer mucho tiempo suspendidas en el aire y se depositan en el suelo rápidamente, por lo que no suelen ingresar a los organismos y no afectan a la salud (INE, 1999). Las PM10 y PM 2.5 son particularmente perjudiciales, pues entran al sistema respiratorio (Jiménez B.E, 2001). La EPA en 1987 determinó que estas últimas son las que causan efectos nocivos a la salud (Nebel B.J, Wright R.T. 1999).

Los metales son un buen ejemplo de contaminantes que se pueden adherir a dichas partículas. Estos manifiestan una elevada toxicidad cuando se dispersan en el medio ambiente. No obstante, es aún más importante la forma molecular en que se encuentra el elemento metálico y esto depende de las propiedades del elemento en cuestión (Domenech X, Peral J. 2006).

Algunas fuentes antropogénicas de los metales son: refinerías, actividades que emplean quema de combustibles fósiles y biomasa, el desgaste de la maquinaria, actividad minera y la fabricación de ladrillos. Originalmente, los metales provienen de los minerales (Morales, R.G.E. 2006).

Uno de estos metales es el vanadio, el cual es un metal de transición y es un marcador de contaminación atmosférica muy importante debido a su presencia en los combustibles, cuando estos se queman, la concentración de vanadio en la atmósfera aumenta (Wang *et al.* 1999; Dundar M.S. 2006).

Estos contaminantes tienen gran importancia a nivel mundial e igualmente en nuestro país, particularmente en la ciudad de México la cual es una de las zonas con mayores problemas de contaminación ambiental en el mundo (Télles-Rojo MM, *et al.* 1997).

2.1.2 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA EN LA CIUDAD DE MÉXICO

La ciudad de México se encuentra ubicada a 2240m sobre el nivel del mar, tiene una extensión aproximada de 7860 km² y se encuentra rodeada por cadenas montañosas que impiden la libre circulación del aire, lo cual empeora las condiciones ambientales (Télles-Rojo MM, *et al.* 1997).

La modernización e industrialización de la ciudad han resultado en un aumento de la infraestructura y el tamaño de la misma; esto se ha manifestado en un aumento importante en el número de habitantes y vehículos (Escobedo F y Chacalo A. 2008), Aunado a ello, la población de 3 millones de habitantes en 1950 aumentó a 8.7 millones en el año 2005, y se estimó la existencia de 354 vehículos motorizados por km² en circulación en 2002 (INEGI. 2005).

Lo anterior agrava el problema de la contaminación en la ciudad, aumentando los problemas de salud (OMS. 2008); esto se ve reflejado por ejemplo en el aumento en los ingresos hospitalarios y de visitas a salas de emergencia debido a la incidencia de enfermedades que afectan principalmente al sistema respiratorio. También se han encontrado asociaciones entre la contaminación atmosférica y el aumento de la mortalidad diaria en personas con enfermedades respiratorias o cardiovasculares (Secretaría de Salud. 2000).

Particularmente, las PST en esta ciudad, son uno de los contaminantes considerados de mayor importancia debido a su concentración en el aire, (Rosales CJA, *et al.* 2001), ya que son un problema para la salud (OMS. 2006) y se relacionan con un aumento en la mortalidad de la población urbana (Borja-Aburto V.H. *et al.* 1996).

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-1993 el límite de exposición para las PM10 en la Zona Metropolitana del Valle de México es de 150

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ en un día y de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en una media aritmética anual para la protección de la salud de la población.

Las PST han aumentado su concentración en la atmósfera en la ciudad de México y frecuentemente rebasan el límite permisible. En la figura 1 se muestra este comportamiento en el periodo desde 1995 al año 2000 (Capítulo 3 del Programa para Mejorar la Calidad del Aire ZMVM 2002-2010). En otras fuentes se ha documentado que su concentración media en 1996 fue de $73.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y de $50.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en 2006 (INEGI 2006). En el 2004 se reportó que por lo menos 1 día se excedió la norma de la calidad del aire para PM10 (INEGI 2004). Entre Abril de 2006 y Febrero 2007 el límite se rebasó hasta $82.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Estos datos se resumen en la tabla 1.

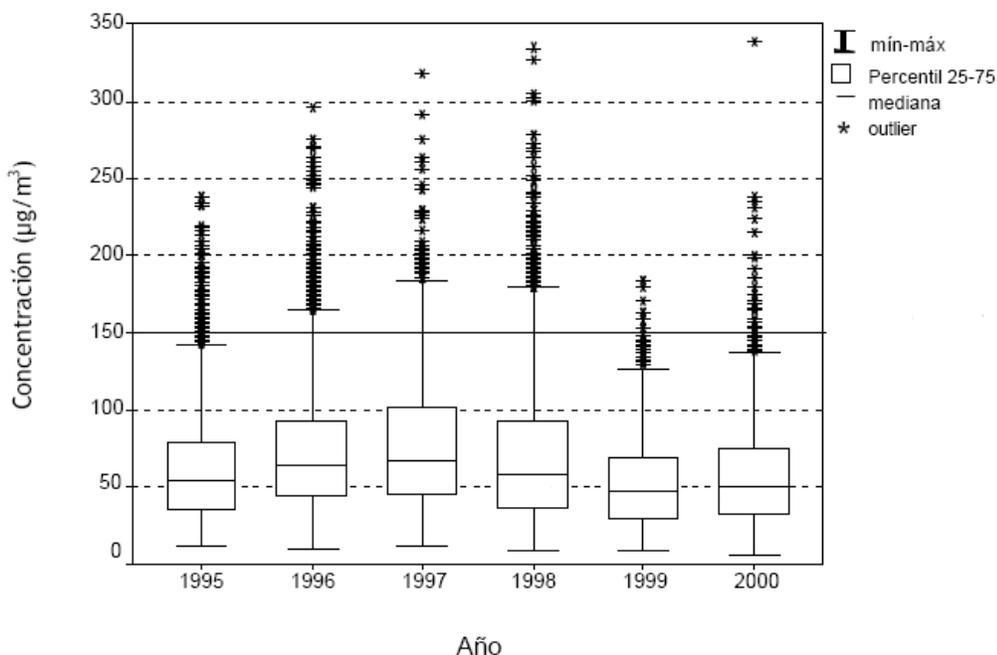


Figura 1: Variaciones en la concentración de PST en el periodo conformado entre los años 1995 y 2000. (Tomado del Capítulo 3 del Programa para Mejorar la Calidad del Aire ZMVM 2002-2010)

| Periodo | Concentración ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | Fuente |
|----------------------------------|---|---|
| 1996-1997 | > 50 | Capítulo 3 Programa para Mejorar la Calidad del Aire ZMVM 2002-2010 |
| 1997-1998 | > 50 | Capítulo 3 Programa para Mejorar la Calidad del Aire ZMVM 2002-2010 |
| 1998-1999 | > 50 | Capítulo 3 Programa para Mejorar la Calidad del Aire ZMVM 2002-2010 |
| 2006 | 50.7 | INEGI |
| Época calida de sequía 2007-2008 | 73.3 | Valle-Hernández 2010 |
| Época fría de sequía 2007-2008 | 82.1 | Valle-Hernández 2010 |

Tabla 1: Concentración excedida de PST según la Norma Oficial Mexicana en la ciudad de México en diferentes periodos

La concentración de metales en la atmósfera está relacionada con la de las PST debido a que pueden estar adheridos a estas, (Ragosta M, et al. 2002; Morales, R.G.E. 2006), por lo tanto son importantes no solo por esta relación con dichas partículas sino por sus efectos en la salud y por su concentración en la atmósfera de la ciudad de México (Riveros-Rosas et al. 1997; Mugica V. et al. 2002).

Riveras-Rosas y cols. (1997), reportaron que las personas que pasaban más tiempo en lugares abiertos estaban más expuestas a la contaminación atmosférica y por lo tanto presentaron una mayor concentración de metales como el plomo, zinc, manganeso, cromo y vanadio en los filtros que llevaban en su ropa, comparado con el grupo que pasaba más tiempo en lugares cerrados. Sin embargo ambos grupos estuvieron expuestos a aire contaminado con metales.

Por lo tanto, como resultado del deterioro ambiental de la ciudad de México, la población se ha visto afectada por la mortalidad prematura debido a la

exposición al aire contaminado, particularmente por PST y los metales de transición como el vanadio (IDRC, 2003).

2.1.3 CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y SALUD

Muchos efectos en la salud causados por la contaminación atmosférica se han relacionado con las PST y los metales que transportan, las PM10 y las PM2.5 entran en las vías respiratorias y penetran en las regiones intratorácicas (tráquea y bronquios) y transportan metales y otras sustancias que llegan a los alvéolos pulmonares, teniendo contacto directo con la sangre (Rico Méndez et al. 2001). Por ello el efecto de estas partículas depende de la composición química, aunque en general, se considera que producen irritación de las vías respiratorias, exacerbando la respuesta asmática y favorecen enfermedades cardiovasculares; pueden servir como superficie de adsorción para gases tóxicos. Pueden entonces causar el deterioro de la función respiratoria a corto plazo, pero a largo plazo contribuyen a generar enfermedades crónicas como el cáncer de pulmón (Jiménez B.E, 2001).

Rosales-CJA y cols. (2001) reunieron diversos estudios, de los años 80 y 90, en donde se muestran los efectos en la salud relacionados a las PM10, particularmente en las vías respiratorias. Fueron 34 estudios en América, 15 en Europa, 2 en Asia y 1 en Oceanía. En la tabla 2 se resumen estos estudios y se observa el aumento en diversos efectos en la salud a causa del incremento en la concentración de PM10.

| Efecto en la salud | Incremento en los efectos en la salud (%) por 10 µg/m³ de PM10 |
|--|--|
| Efecto agudo sobre la mortalidad total | 0.96 |
| Efecto agudo sobre la mortalidad por causas respiratorias | 1.82 |
| Efecto agudo sobre la mortalidad por causas cardiovasculares | 1.32 |
| Hospitalización por asma | 3.02 |
| Hospitalización por neumonía | 0.6-1.4 |
| Hospitalización por problemas cardio y cerebrovasculares | 1.22 |
| Visitas a salas de urgencia por asma | 4.5 |
| Ataques de asma | 7.87 |
| Tos sin flemas (niños) | 4.54 |
| Tos con flemas (niños) | 3.32 |
| Otros síntomas en vías respiratorias altas | 4.39 |
| Otros síntomas en vías respiratorias bajas | 6.85 |
| Bronquitis | 11 |

Tabla 2: Porcentaje de incremento en efectos en la salud sobre el sistema respiratorio de la población humana causado por el aumento en la concentración de PM10. (Modificado de Rosales-CJA et al. 2001)

La mayor fuente de contaminación atmosférica en muchos países es el tráfico vehicular. En la ciudad de México, por ejemplo, se han observado efectos crónicos a raíz de la contaminación atmosférica, tales como la reducción en la condición física, daño permanente en los pulmones y enfisemas (IDRC, 2003).

La hipótesis de que la contaminación atmosférica causada por el tráfico incrementa el riesgo de desarrollar cáncer durante la niñez fue investigada en Dinamarca donde en un estudio se relacionó el diagnóstico de leucemia y linfoma maligno en niños con la zona en la que vivían, se encontró que los niños que

viven en zonas con mayor tráfico vehicular, tienen un 25% más probabilidades de presentar linfomas (Ole R-N, et al, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, algunos de los contaminantes presentes en la atmósfera en zonas industriales y ciudades contaminadas, son los metales; estos se estudian y clasifican por diversas instituciones internacionales como la IARC (International Agency for Research on Cancer) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) por sus diversos efectos en la salud. Uno de ellos es el vanadio, el cual se encuentra principalmente en combustibles (Rodriguez MJ. Altamirano MA, 2006), y por lo tanto es parte importante de la contaminación atmosférica.

2.2. VANADIO

2.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El vanadio es un elemento cuyo número atómico es el 23. Tiene una masa atómica de 50.9 y una densidad de 6.11 g/mL. Pertenece al grupo VA, por lo que es un metal de transición. (Shaller K.H y Triebig G. 1994)

Su color varía de blanco grisáceo cuando se encuentra en polvos, a cristales amarillos y rojizos cuando está en minerales. Tiene la propiedad de ser blando y dúctil. (Barceloux DG 1999)

Sus estados de oxidación van de -1 a +5, los más comunes son +3, +4 y +5 (Barceloux DG 1999), por lo que se oxida fácilmente. Le confiere características alcalinas a las aleaciones con las que se forma, se puede combinar con elementos como oxígeno, sodio, azufre o con cloruro, y con otros

metales como el hierro (Barceloux DG 1999). El vanadio en forma de vanadato (VO_4) presenta propiedades similares al fosfato (Goodno CC. Y Taylor EW, 1982).

La variedad de sus usos se debe a las propiedades mencionadas anteriormente.

2.2.2 USOS

El vanadio se utiliza en forma de óxido de vanadio para fabricar un tipo de acero usado principalmente para automóviles (Barceloux DG 1999). También se usa como catalizador de producción de ácido sulfúrico. Tiene otros usos como la producción de semiconductores, reveladores fotográficos, luces fluorescentes, baterías, agentes colorantes particularmente amarillos en la manufactura de vidrio, cerámica y tintas (Irsigler G.B, et al. 1999; Rodriguez MJ. Altamirano MA. 2006). En menor proporción se utiliza para fabricar plástico, caucho y cerámica (García G.B. 2006).

En el área médica, se estudia ampliamente por su potencial como fármaco sustituto de la insulina en pacientes diabéticos debido a que mimetiza dicha proteína, sin embargo esto se encuentra aún en investigación (Thompson K.H et al. 1998). Asimismo el vanadio se considera como un posible antineoplásico (Chakraborty T. et al. 2006).

2.2.3 FUENTES

Es el 22° elemento más abundante en el planeta (García G.B. 2006). En la corteza terrestre se encuentra en concentraciones de 150 $\mu\text{g/g}$; las concentraciones en la tierra varían en un rango de 3-310 $\mu\text{g/g}$, en el agua dulce

varía de 0.2 a más de 100 µg/lit y en el agua salada de 0.2 a 29 µg/litro. (Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants, 1974; Waters, M.D. 1977; WHO. 2000). Además se encuentra en 68 minerales diferentes entre los cuales se encuentran la vanadinita, la patronita, la roscoelita y la roca fosfatada (Barceloux DG 1999).

Así mismo el vanadio se encuentra en algunos vegetales y organismos que son consumidos por los seres humanos, por ejemplo el pimienta negro, el eneldo, los champiñones, el perejil y las espinacas (Barceloux DG 1999). De igual forma algunos seres vivos lo presentan naturalmente como los invertebrados, los peces, los mejillones, los cangrejos, los camarones, las algas, las plantas y los hongos. En estos organismos, el vanadio es un elemento esencial para su metabolismo (Barceloux DG 1999; García G.B. 2006).

Por otro lado, el vanadio también se encuentra en la atmósfera, este se deriva de fuentes naturales como el polvo continental, los aerosoles marinos y en menor proporción las emisiones volcánicas (Barceloux DG 1999); o de fuentes antropogénicas como la combustión del petróleo, mediante el cual se emite la mayor proporción de vanadio, ya que el 90% de las 65,000 toneladas que se liberan anualmente a la atmósfera provienen de la quema de combustibles (García G.B. 2006; Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006). Se libera en forma de V_2O_5 el cual es el compuesto más tóxico y abundante del vanadio en la atmósfera (Barceloux DG 1999).

El petróleo contiene vanadio en forma de asfaltenos (Gómez T.M. et al. 2003) (compuestos químicos orgánicos derivados de la destilación del petróleo) como se muestra en la Figura 2. Las concentraciones de vanadio en el petróleo crudo y procesado varían de 1 a 1500 mg/kg (Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants. 1974). Particularmente en los combustibles crudos se encuentran trazas detectables de vanadio (<1 a 1600 mg/kg) y en el petróleo la concentración de éste es más importante: las cenizas de la combustión del petróleo contienen más de 80% de V_2O_5 . (García G.B. 2006).

En el caso de México la concentración de vanadio en el petróleo es de 273 mg/kg (Fortoul T. 2007) y varía según el tipo de petróleo; el maya es el que presenta mayor concentración de vanadio (298.1 mg/kg), pero el olmeca y el istmo también presentan concentraciones importantes (8 y 52.7 mg/kg respectivamente) (Badillo Carrete A. 2004).

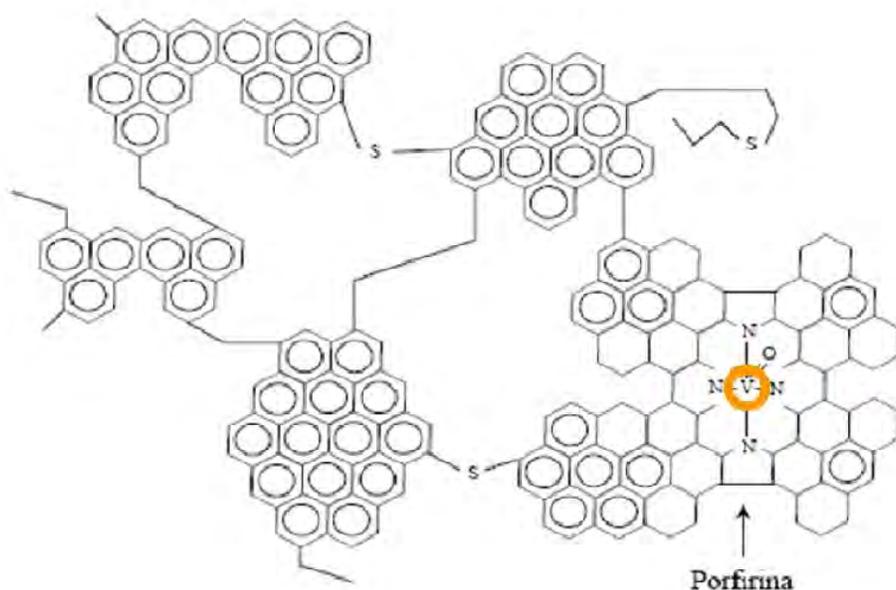


Figura 2: El vanadio en la estructura de los asfaltenos del petróleo. (Modificado de Gómez T.M. et al. 2003)

La concentración de vanadio en la atmósfera varía en las zonas urbanas y rurales (García G.B. 2006). Por ejemplo, en ciudades de Europa la concentración promedio es de 0.001-3 ng/m³ en áreas alejadas de las zonas urbanas, de 7-200 ng/m³ en áreas metropolitanas, y de 10-70 ng/m³ en áreas industriales (Lahmann E. et al. 1986, WHO. 2000).

En la ciudad de México, la concentración de vanadio en el aire es en promedio 23 ± 12 ng/m³. Otros estudios han determinado la concentración de vanadio en el aire mediante filtros colocados en la ropa de personas que pasan la mayor parte de su tiempo al aire libre y se encontró que la concentración de

vanadio es de $27.1 \pm 12.7 \text{ ng/m}^3$ y la de personas que pasan la mayor parte de su tiempo bajo techo es de $19.6 \pm 10.2 \text{ ng/m}^3$ (Riveros-Rosas et al. 1997). La concentración de este metal en las PST también se ha determinado siendo de $0.24 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ y de $0.13 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ en las PM10, medida entre los años 1996-1998 (Mugica V. et al. 2002).

Por otro lado, Fortoul y cols. (2002), encontraron por espectrometría de absorción atómica que la concentración de vanadio en necropsias de pulmón en habitantes de la ciudad de México aumentó de $1.04 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g/g}$ en los años 60 a $1.36 \pm 0.08 \text{ } \mu\text{g/g}$ en los años 90, por lo que la exposición a este metal por los habitantes de la ciudad de México ha ido en aumento.

2.2.4 VÍAS DE EXPOSICIÓN

Existen diferentes vías por las que podemos estar expuestos a este metal de transición: la vía dérmica, la oral y la inhalada. (Barceloux DG 1999).

La vía dérmica es la de menor riesgo debido a la baja liposolubilidad del vanadio; es decir, el vanadio difícilmente puede penetrar a través de la piel. (Barceloux DG 1999).

A la vía oral estamos expuestos por los alimentos que tienen vanadio, sin embargo esta vía es de poca importancia debido a que el nivel de absorción es mínimo ($< 1\text{-}2\%$) (Barceloux DG 1999).

La vía inhalada es la más importante no solo por la gran concentración de vanadio en el aire debido a las actividades antropogénicas, sino porque el porcentaje de absorción del vanadio por esta vía es mayor al de las otras dos (95%) (Barceloux DG 1999).

La manera en que el vanadio se absorbe en cualquiera de estas vías, junto con el proceso de distribución, metabolismo y excreción del vanadio en el ser humano se explica en seguida.

2.2.5 TOXICOCINÉTICA Y TOXICODINAMIA

El porcentaje de absorción de los compuestos de vanadio depende de la solubilidad de dicho compuesto y de la ruta de entrada (Barceloux DG 1999). En el caso de la vía oral, el vanadio se absorbe pobremente (< 1-2%) (Barceloux DG 1999). Otros reportes indican que por esta vía se absorbe solo el 10% del vanadio ingerido (Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006), en cualquier caso, el porcentaje de absorción es bajo, por lo que el daño tóxico es mínimo. (Barceloux DG 1999; Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006). Por otro lado, la vía dérmica es una menor ruta de exposición especialmente por la baja solubilidad que posee el metal (Barceloux DG 1999).

Por otro lado la vía inhalada constituye la mayor vía de exposición debido a que el vanadio se instala directamente en los pulmones y es absorbido hasta llegar al plasma de la sangre (Barceloux DG 1999). El 95% del vanadio inhalado se absorbe y posteriormente es transportado hacia diversos tejidos del cuerpo (Barceloux DG 1999). Este se acumula en el pulmón incrementándose con la edad del individuo (6.5 µg/g en personas mayores de 65 años) (WHO. 2000).

Una vez absorbido, el vanadio puede encontrarse en los estados de oxidación III, IV y V; el vanadio V es reducido a Vanadio IV o vanadil por el glutatión de los eritrocitos, el ácido ascórbico, las catecolaminas u otras sustancias reductoras del plasma (Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006). A su vez, parte de este compuesto se oxida *in vivo* de manera espontánea a vanadato (VO_4^{3-}) (Mukherjee B et al. 2004), la forma pentavalente que predomina en fluidos

corporales extracelulares, mientras que el vanadil (VO^{+2}), la forma cudivalente, es la forma intracelular más común (Barceloux DG 1999).

El transporte de este compuesto en el plasma, se lleva a cabo mediante la transferrina y la albúmina, mientras que el transporte de vanadato se lleva a cabo sólo por medio de la transferrina (Mukherjee B et al. 2004), estas proteínas llevan los compuestos de vanadio y favorecen su llegada a los órganos, principalmente a los riñones, el hígado y el bazo; además el 5% del vanadio presente en la sangre, se aloja en el cerebro, también se puede almacenar en dientes y huesos (Barceloux DG 1999, Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006, WHO. 2000). Una vez ahí el vanadio entra a las células mediante canales de fosfato, o por canales iónicos inespecíficos (Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006).

La excreción del metal es principalmente a través de la orina (Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006). Estudios en animales indican que a través del riñón se excreta del 40 al 60%. También indican que la eliminación es bifásica, es decir, la mayor parte de la excreción se da en las primeras 20 horas, y lo siguiente en los posteriores 40 a 50 días (Barceloux DG 1999). Solo una cantidad mínima ($< 10\%$) se excreta por heces (Barceloux DG 1999).

2.2.6 EFECTO TÓXICO

2.2.6.1 EFECTO TÓXICO A NIVEL CELULAR

El vanadio produce diversos efectos a nivel celular, por ejemplo, inhibe enzimas como: la Na^+/K^+ ATPasa, la dineina ATPasa, la Ca-ATPasa, la alcalin fosfatasa y la $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPasa, debido a su capacidad de competir con el fosfato (Singh J, et al. 1981; Tsiani E y Fantus I.G. 1997).

Además es capaz de inhibir procesos celulares como la fosforilación oxidativa, (Barceloux DG 1999) debido a que algunos de sus compuestos pueden tener como blancos potenciales estructuras celulares como las proteínas transportadoras de electrones (Aureliano M, Crans D.C. 2008) Asimismo el vanadio altera la membrana e inhibe el consumo de oxígeno. Esto sugiere que la mitocondria puede ser un blanco potencial para la toxicidad del vanadio (Aureliano M, Crans D.C. 2008).

Una de las principales causas de la toxicidad producida por vanadio es su capacidad oxidante mediante el aumento de la producción de radicales libres. En presencia de vanadio +2, +3 y +4; la producción del radical hidroxilo aumenta debido a la sobreproducción de este y al mismo tiempo a la inhibición de la mieloperoxidasa (MPO), que se encarga de disminuir su producción. Esto resulta en un aumento del radical hidroxilo, el cual es uno de los más dañinos producidos por los sistemas vivos. Debido a que el vanadio inhibe enzimas como la MPO, tiene un efecto altamente oxidante en las células. Esto se ha visto principalmente en neutrófilos (Fickl H, et al. 2006). El vanadio en forma de metavanadato de amonio inhibe otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la glutatión peroxidasa en el hígado y riñones de ratas (Ruslanov E. et al. 1994).

El vanadio además tiene la capacidad de formar radicales libres mediante reacciones de óxido reducción que se encuentran en la célula de manera natural; por ejemplo la reacción de Fenton en donde el vanadio sustituye al fierro transformando el compuesto H_2O_2 en dos radicales hidroxilo (OH^\cdot) y oxidándose de vanadil a vanadato. (Fortoul T, Ávila CMR. 2007). La producción excesiva de radicales libres ocasiona alteraciones en el ADN, lípidos y proteínas (Dreosti. I.E. 1991)

Se ha visto en algunos estudios que el vanadato puede modificar la síntesis de ADN, detener el ciclo celular en la fase S mediante la activación de p21, el cual es un co-activador de p53 y este último es un importante regulador

del ciclo celular, el cual, cuando se sobre expresa, produce la interrupción del ciclo celular ya sea en las fases G0, G1 o S (Zhang Z, et al. 2002).

Las alteraciones en el citoesqueleto también pueden producir cambios en la progresión del ciclo celular. En diferentes estudios se ha mostrado que el vanadio puede interactuar con las proteínas del citoesqueleto, principalmente con las tubulinas; se observó una reducción de γ -tubulina en células de testículo de ratón, causada por la inhalación de V_2O_5 . Sin embargo el efecto depende del órgano y del tejido celular (Mussali GP et al. 2005).

Los cambios en el ciclo celular inducen la activación de la muerte por apoptosis, el vanadio ocasiona directamente este evento (Pei-Shan Chien, Oi-Tong Mak, Hao-Jen Huang. 2006). En este sentido se ha reportado un aumento en el índice de apoptosis en las células germinales del testículo, en particular, en las fases I, III y XII de la espermatogénesis a concentraciones de 9.4 Y 18.8 mg/kg de V_2O_4 (Aragón M.A. et al. 2005).

Por otro lado algunos modelos señalan que el vanadio puede desencadenar la proliferación celular, como en el caso de las condrocitos del pez, las cuales proliferan en presencia de vanadato por las vías de MAPK y PI-3K/Ras/Erk (Tiago D.M, et al 2008).

Todos estos daños a nivel celular pueden tener como consecuencia el desarrollo de cáncer, por lo que también se ha estudiado ampliamente la relación de este con el vanadio.

En el estudio realizado por Ress y cols, (2003) se demostró la presencia y aumento de neoplasias alveolares y bronquiolares en ratas F344/N y ratones B6C3F₁. Estos expuestos durante dos años a V_2O_5 inhalado a concentraciones de 0.5 a 2 mg/m³. Entre otros efectos también se observó inflamación crónica, fibrosis intersticial, metaplasia (transformación de células o tejidos en otros distintos) e hiperplasia (incremento en la proliferación celular que tiene como

consecuencia el aumento de tamaño de un órgano o tejido) de alvéolos y bronquiolos. Con este estudio, la IARC clasificó al vanadio como parte del grupo 2B (posible carcinogénico para humanos) (NTP 2002).

Otros estudios sin embargo argumentan que el vanadio funciona como un antineoplásico, debido a que ciertos efectos del vanadio alteran el ciclo celular y promueven la apoptosis. Algunos ejemplos de estos estudios son:

En cultivos de la línea celular MCF7 de cáncer de mama, la exposición a vanadio (NH_4VO_3) indujo apoptosis de una forma dosis dependiente, medida por espectrofotometría. El porcentaje máximo de apoptosis fue de 42.5% a la más alta dosis no tóxica ($250\mu\text{M}$) (Sankar R.R. et al 2006).

En otro estudio, administrando 0.5 ppm de monovanadato de amonio, vía oral a ratas con hepatocarcinomas, observaron la disminución en el daño al ADN evaluado por la prueba del cometa, así como una disminución en el peso del hígado. Estos efectos se atribuyen a la apoptosis aparentemente inducida por el vanadio suministrado (Chakraborty T. et al. 2006). En este mismo modelo se observó una disminución significativa en la expresión de Ki-67, lo que indica la disminución del índice mitótico; además aumentó la expresión de p53. También se observó la reducción de peso del hígado en comparación con el carcinógeno control (Chakraborty T, et al. 2005).

Igualmente Thompson y Cols. (1984) proponen que el vanadio vía oral, reduce la incidencia de cáncer en ratas hembras tratadas con el carcinógeno 1-metil-1-nitrosourea.

El compuesto bis (4,7-dimetil-1,10-fenantrolina) sulfatoxovanadio (IV) (METVAN [$\text{VO}(\text{SO}_4)(\text{me}_2\text{-Phen})_2$]) es un potente citotóxico para células cancerosas en concentraciones micromolares. Se asoció con una pérdida casi completa de las células migratorias (Narla R.K, et al. 2001).

Como consecuencia de los efectos a nivel celular también se pueden encontrar otros efectos a nivel sistémico.

2.2.6.2 EFECTO TÓXICO A NIVEL SISTÉMICO

La exposición a vanadio produce diversas alteraciones en los humanos, por ejemplo en personas ocupacionalmente expuestas a la inhalación de V_2O_5 (Barceloux DG 1999) se observó hiperreactividad bronquial y asma (Irsigler G.B, et al. 1999) También produce neumonía y bronquitis, así como rinitis, conjuntivitis, faringitis, traqueobronquitis, hemorragias nasales, tos, irritación de garganta y dolor torácico. (Barceloux DG 1999; Irsigler G.B, et al. 1999).

Debido a los efectos tóxicos del V_2O_5 , la OSHA ha establecido un límite de exposición el cual es de 0.5 mg/m^3 en el caso del polvo; y en el caso de humo, es de 0.1 mg/m^3 . La ACGIH y la NIOSH recomiendan un límite permisible diferente (0.05 mg/m^3) y la NIOSH agrega que esta medida debe ser utilizada para cualquier compuesto de vanadio excepto el vanadio como metal puro y el carburo de vanadio. Sin embargo altos niveles de vanadio resultan de las operaciones de limpieza de calderas por la alta concentración de óxidos de vanadio en el polvo. En estas operaciones las concentraciones son de 50 a 100 mg/m^3 y puede subir hasta 500 mg/m^3 (Barceloux DG 1999).

Por otro lado, en modelos in vivo se ha visto que el vanadio puede ser hepatotóxico, cardiotóxico, nefrotóxico, neurotóxico, carcinogénico, reprotóxico y teratogénico (García G.B. 2006).

En otros estudios se observó que las ratas expuestas a aerosol de V_2O_5 ($27 \mu\text{g/m}^3$) durante 70 días, desarrollaron diferentes efectos respiratorios, como congestión pulmonar, hemorragias focales en el pulmón y bronquitis extensiva (WHO. 2000).

Asimismo, el V_2O_5 tiene un efecto inmunotóxico importante (Cohen et al, 1986; Mravcová et al. 1993; Qureshi M.A, Hill C.H., Heggen C.L. 1999; Kyenogeun L, Shen X, König R. 2001). Por ejemplo, se ha reportado que diversos compuestos de vanadio como el V_2O_5 causan genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica que tiene como consecuencia el aumento del índice de replicación y la frecuencia de aberraciones cromosómicas (Paton y Allison A.C. 1972; Sun P. 1987; Roldán y Altamirano 1990; Ramirez et al. 1997; Kleinasser et al 2003; Rodríguez-MJJ, Roldán-R, Altamirano-LM. 2003; Rodriguez MJ, Altamirano MA. 2006).

Otro efecto nocivo del vanadio en el sistema inmunológico en ratones, es la disminución de la capacidad fagocítica de los macrófagos (Cohen et al, 1986, WHO. 2000).

Además produce esplenomegalia, la cual es debida principalmente al incremento en el número de linfocitos en su mayoría $CD4^+$ en el bazo (Qureshi M.A, et al. 1999), También se ha visto la elevación en el número de leucocitos en sangre periférica y activación de células B y T en exposición crónica a vanadio (Mravcová et al. 1993). En un estudio realizado en aves se reportó un aumento en la expresión de la IL-6 y en la actividad fagocítica (Qureshi M.A, et al. 1999).

Por otro lado, se ha reportado que el V_2O_5 administrado por vía inhalada a una concentración de 0.02M, en nuestro modelo murino, produce los siguientes efectos en el sistema inmunológico (Tabla 3):

En el timo, por un lado, se ha observado la pérdida en la relación entre la corteza y la médula después de una exposición a V_2O_5 en ratones machos de la cepa CD-1 (González-Villalva. 2004).

En este mismo modelo se observa el aumento en el número de algunas estirpes celulares como los megacariocitos, tanto en el bazo como en la médula

ósea, así como modificaciones en el núcleo y citoplasma de los mismos (Fortoul TI, et al. 2008). En sangre periférica se observó un aumento en neutrófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas (González-Villalva. 2004).

Además se observó que los centros germinales del bazo de ratones CD-1 mostraron un aumento en el tamaño así como una delimitación poco clara de dichos centros. Morfológicamente se observa un cambio en la distribución de la pulpa blanca por el aumento de linfocitos principalmente CD19. En la sangre también se ha observado linfocitosis (Piñon-Zarate G et al. 2008). También se observó una disminución en la expresión de la caspasa 3 y por lo tanto en la apoptosis en las células del bazo.

Este aumento en el número de linfocitos y la disminución en la apoptosis de los mismos se traduce en esplenomegalia, además estas células presentan alteraciones nucleares debidas a cambios en el nucleoesqueleto, lo cual podría causar alteraciones en la expresión génica que conllevan al desarrollo de diferentes patologías, entre ellas las relacionadas con desórdenes linfoproliferativos (Rodriguez-Lara V. 2008).

En este mismo grupo se ha observado también que los linfocitos en el bazo no solo aumentan en número sino que se encuentran activados, esto se midió por la inmunolocalización de la proteína actina, la cual aumenta su presencia en los linfocitos de bazo de ratones expuestos a V_2O_5 .

| Antecedente | Autor |
|---|-------------------------------|
| Perdida en la relación corteza-médula del timo | González V.A, 2004 |
| Aumento en el número de neutrófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas en sangre periférica | González V.A, 2004 |
| Linfocitos atípicos en sangre periférica | González V.A, 2004 |
| Genotoxicidad en sangre y médula ósea | Rojas-Lemus y Perez de Gante. |
| Megacariocitosis en bazo y médula ósea | Piñon Z.G. 2008 |
| Aumento en el número de CD19+ en bazo causando esplenomegalia | Piñon Z.G. 2008 |
| Disminución en la apoptosis en linfocitos de bazo | |
| Alteraciones nucleares debidas a cambios en el nucleoesqueleto de los linfocitos del bazo | Rodriguez L.V. 2008 |

Tabla 3: Antecedentes de los efectos del V₂O₅ en el sistema inmunológico con el modelo propuesto por Fortoul y cols. (1999).

Debido a las alteraciones que produce el vanadio en el bazo, el presente trabajo se enfoca al estudio de este órgano.

2.3. BAZO

Es un órgano linfoide secundario de gran importancia debido a que su función principal es la de ser el filtro donde se da primordialmente la presentación antigénica de la sangre. (Abbas A.K. y Lichtman A.H. 2004). Particularmente se encarga de la producción de anticuerpos, como IgM, la fagocitosis de las células muertas y anormales de la circulación y juega un papel importante en la hematopoyesis extramedular (Schepper A.M.A. de y Vanhoenacker. 2000).

Está rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo denso desde la cual parten trabéculas hacia el parénquima del órgano; este tejido contiene

miofibroblastos que son células contráctiles que contribuyen en mamíferos a la liberación de eritrocitos almacenados hacia la circulación sistemática (Michael H.R., *et al.* 2005).

El hilio en la superficie medial del bazo es el sitio por donde pasan la arteria y la vena esplénicas, los nervios y los vasos linfáticos (Michael H.R., *et al.* 2005). Tiene conductos vasculares especializados, una malla de células reticulares y fibras reticulares y una rica provisión de macrófagos (Michael H.R., *et al.* 2005).

Las principales células que lo conforman son los linfocitos B y T (Michael H.R., *et al.* 2005). Los linfocitos T permanecen en el bazo durante 4-6 horas, mientras que los B permanecen hasta 16 horas (Schepper A.M.A. de y Vanhoenacker. 2000).

La pulpa esplénica se divide en dos: la roja y la blanca. La pulpa blanca se observa como regiones circulares o alargadas de color grisáceo rodeadas por la pulpa roja (Michael H.R., *et al.* 2005). Está compuesta por tejido linfoide; las ramas de la arteria esplénica atraviesan la cápsula y las trabéculas y luego se introducen en la pulpa blanca, los linfocitos que se aglomeran alrededor de esta arteria forman la vaina linfática periarterial (Michael H.R., *et al.* 2005).

Los nódulos son el territorio de los linfocitos B, los que rodean los nódulos son linfocitos T; los nódulos suelen contener centros germinales que se desarrollan conforme a los linfocitos B proliferan después de su activación (Michael H.R., *et al.* 2005).

En el parénquima esplénico la arteria central emite ramas para la propia pulpa blanca y sinusoides de su periferia llamados sinusoides marginales. Las ramificaciones hacia la pulpa roja se llaman arteriolas peniciladas que se convierten en capilares arteriales o envainados (rodeados de macrófagos); La sangre se filtra a través de los cordones quedando expuesta a los macrófagos (Michael H.R., *et al.* 2005).

En cuanto a la pulpa roja, tiene gran cantidad de eritrocitos, a lo que debe su nombre. Contiene sinusoides a partir de los cuales llegan antígenos de la sangre que son reconocidos por macrófagos. Estos últimos degradan los eritrocitos dañados y el hierro de la hemoglobina es reutilizado para la formación de nuevos eritrocitos (Michael H.R., *et al.* 2005).

Existen diversas alteraciones que se pueden presentar en el bazo debido a diferentes patologías que lo afecten. Una de estas es el aumento de tamaño del bazo, es decir, la esplenomegalia, la cual es un fenómeno común en este órgano y tiene diversas causas (Tabla 4) como son:

| | |
|---------------------------------|---|
| Causas infecciosas | |
| Bacterias | Por ejemplo: Tifoidea y tuberculosis |
| Virus | Mononucleosis infecciosa |
| Protozoos | Paludismo, tripanosomiasis, toxoplasmosis |
| Causas vasculares | |
| Hipertensión portal | La principal causa es la cirrosis |
| Causas neoplásicas | |
| Linfomas | Enfermedad de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos |
| Leucemias | Especialmente crónicas |
| Hematopoyesis extramedular | Enfermedades mieloproliferativas y en la ocupación difusa de médula ósea por tumor |
| Metástasis | Las metástasis esplénicas de tumores sólidos son raras |
| Causas hematológicas | |
| Anemias hemolíticas | Esterocitosis hereditaria, β -talasemina, hemólisis autoinmunitaria |
| Trombocitopenia autoinmunitaria | La destrucción esplénica de plaquetas produce una acumulación de histiocitos espumosos en los senos |

| | |
|-----------------------------|---|
| Causas inmunológicas | |
| Síndrome de Felty | Hiperplasia folicular esplénica asociada a hiperesplenismo con enfermedad reumatoide |
| Sarcoidosis | Bazo infiltrado por granulomas |
| Amiloidosis | Bazo infiltrado por amiloide |
| Causas metabólicas | |
| Enfermedades de depósito | Debidas a deficiencias enzimáticas hereditarias, por ejemplo, enfermedad de Gaucher y de Niemann-Pick que producen depósitos de material en los macrófagos esplénicos |

Tabla 4: Causas principales de la esplenomegalia. (Modificado de Stevens A. Lowe J. 2001.)

La esplenomegalia además puede tener consecuencias como el hiperesplenismo, el cual se asocia a la disminución de cifras de glóbulos rojos, blancos y plaquetas en sangre por secuestro de dichas células en el órgano, y esto a su vez causa hiperplasia de médula ósea (Halpert R.D. Feczko P.J. 2000).

Como se ve en la tabla 4, la acumulación de productos celulares o de células de un tipo en particular, como los linfocitos, producen esplenomegalia. Una de las causas de dicha acumulación es la proliferación.

Las causas de proliferación de linfocitos son principalmente infecciones virales y bacterianas, formación de células neoplásicas (Behrman RE, *et al.* 2004); y exposición a algún tóxico como el plomo (Teijón C *et al.* 2004).

En el caso de la formación de células neoplásicas, en la leucemia por ejemplo, la esplenomegalia constituye un dato inicial y su presencia plantea la posibilidad de una complicación a leucemia crónica. Uno de los tipos de leucemia en donde se presenta mayor esplenomegalia es en la mieloide (Halpert R.D. Feczko P.J. 2000).

Otro de estos eventos es el linfoma no Hodgkin. En esta patología el bazo puede presentar un agrandamiento difuso sin lesiones focales, como una masa tumoral redondeada o como múltiples nódulos pequeños (Halpert R.D. Feczko P.J. 2000).

En un evento de proliferación celular, como los vistos anteriormente, hay proteínas que se expresan y que por lo tanto sirven como marcadores de dicho evento; una de estas proteínas es conocida como Ki-67.

2.4. KI-67

La proteína Ki-67 fue encontrada por Gerdes y cols. (1983) en células de mieloma de ratón. La inmunolocalización de Ki-67 fue por primera vez descrita en timocitos corticales, mucosa gastrointestinal, espermatogonias, entre otras líneas celulares. La proteína no se encontró en células que no estaban proliferando: linfocitos, monocitos, hepatocitos, entre otros. Sin embargo se pudo inducir la expresión de Ki-67 en linfocitos a través de la estimulación con fitohemaglutinina, ya que esta es un mitógeno que actúa sobre células del sistema inmunológico causando que proliferen. Con ello se descubrió que la expresión de Ki-67 está estrictamente relacionada con la proliferación celular (Gerdes J. et al. 1983; Kubbutat MHG et al. 1994).

En la interfase se encuentra en el núcleo, pero en mitosis, la proteína está localizada en la superficie de los cromosomas (Scholzen T., Gerdes J. 2000). Está relacionada al ADN más que a las histonas o a la matriz nuclear (Sasaki K, et al. 1990). Esta proteína está ausente solo durante la fase G0, por lo que es un excelente marcador para el crecimiento de una población celular dada. El Ki-67 se utiliza como un marcador de proliferación celular en animales de laboratorio y en la clínica para detectar algunos tumores, particularmente de próstata y de mama.

La expresión de la proteína es absolutamente requerida para la progresión de la división celular (Scholzen T., Gerdes J. 2000).

La estructura primaria revela un sitio de fosforilación potencial para la unión de cinasas, secuencias PEST (ricas en prolina, glutamato/aspartato, serina y treonina) que son sitios de degradación presentes también en las ciclinas reguladoras del ciclo celular; y un dominio en forma de tenedor que funge como sitio de fosforilación; estas son características presentes en una variedad de proteínas reguladoras del ciclo celular (Endl E y Gerdes J. 2000).

El gen que codifica para esta proteína está compuesto por 30,000 pares de bases y 15 exones que permiten variaciones en su estructura proteica. La estructura primaria está caracterizada por 10 secuencias de unión a estructuras nucleares, 143 sitios potenciales de fosforilación para la proteína cinasa II, 2 sitios de tirosina cinasa y 8 sitios consenso para la cinasa cdc2. La fosforilación y desfosforilación de la proteína coincide con el paso de las células por mitosis y está controlada por el complejo ciclina B/cdc2 (Endl E y Gerdes J. 2000). Todo esto sugiere que Ki-67 puede tener una función reguladora del ciclo celular.

Se ha demostrado que Ki-67 tiene una vida media muy corta, de 20 minutos, ocurriendo un gran catabolismo al final de la mitosis (Ross W. P.A. Hall. 1995). Esta molécula se expresa en un sitio específico del núcleo, dependiendo de la fase en que esté. Así tenemos que en la interfase, la expresión se encuentra principalmente en el nucleolo; en la profase se concentra alrededor de los cromosomas; en la metafase la marca se vuelve granular y se hace más notoria alrededor de cada cromosoma; en anafase la densidad de la marca es más grande y más granular; y en telofase se dispersa por todo el nucleoplasma (Ross W. P.A. Hall. 1995).

Ki-67 solo se presenta en células que estrictamente están proliferando y no células que ya están en estado terminal diferenciado. Resalta de otros marcadores de proliferación porque este se encuentra en todas las fases del ciclo

celular y es un marcador que ha sido probado en linfocitos. Además el patrón de expresión de Ki-67 no se ve afectado por daño al ADN (Ross W. P.A. Hall. 1995).

3 JUSTIFICACIÓN

El vanadio es un contaminante atmosférico de gran importancia, particularmente en la ciudad de México, debido a la alta concentración del metal en el petróleo mexicano y su liberación al aire mediante la quema del mismo; poco se ha estudiado su efecto sobre el sistema inmunológico y debido a las importantes alteraciones previamente observadas como la esplenomegalia, la modificación en la distribución de las pulpas esplénicas y los cambios en la morfología de los linfocitos mostrando un parecido a células neoplásicas, es importante identificar la presencia de un evento linfoproliferativo.

4 OBJETIVOS

4.1 GENERAL

Evaluar la proliferación celular como un mecanismo por el cual el V_2O_5 produce esplenomegalia y aumento en el tamaño de la pulpa blanca en un modelo murino de exposición por inhalación.

4.2 PARTICULAR

Identificar los cambios en la proliferación de los linfocitos de la pulpa blanca del bazo de ratones CD-1, posteriormente a la inhalación de V_2O_5 (0.02M) mediante la inmunolocalización de Ki-67.

5 HIPÓTESIS

La esplenomegalia y el aumento de la pulpa blanca del bazo de los ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 se deben principalmente a la proliferación de los linfocitos.

6 METODOLOGÍA

6.1 Modelo de exposición por inhalación a V_2O_5

Se utilizaron 72 ratones machos de la cepa CD1 de 1 mes de edad y de 35 gramos de peso. Se establecieron dos grupos: 1) 36 ratones expuestos a la inhalación de solución salina 2) 36 ratones expuestos a la inhalación de V_2O_5 a una concentración de 0.02M. Se controlaron las variables de alimentación (*ad libitum*) y de ciclos de luz/oscuridad (12:12). Cada grupo fue expuesto durante 12 semanas, una hora dos veces por semana. Esto se realizó colocando a los ratones en una caja de acrílico sellada y conectada a un ultranebulizador (UltraNeb99Devilbiss) Este modelo se basó en las condiciones propuestas por Fortoul y cols. (1999).

6.2 Obtención del bazo

Se sacrificaron 3 ratones expuestos y 3 ratones controles al final de cada semana de exposición.

Los ratones se perfundieron vía intracardiaca con solución salina y posteriormente con fijador de paraformaldehído al 2% en buffer de cacodilatos a un pH de 7.4. A continuación se tomó el bazo y se incluyó en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor con un microtomo (Reichert-jung) para posteriormente inmunolocalizar a la proteína Ki 67 en los tejidos de individuos controles y tratados.

6.3 Inmunohistoquímica para Ki-67

Para observar los efectos de una exposición aguda, subaguda, subcrónica y crónica, se eligieron los tejidos de los ratones tratados 1, 4, 8 y 12 semanas para realizar la inmunohistoquímica para Ki-67.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó como reporta Mussali GP y cols (2005) utilizando PBS tritón al 10% para permeabilizar las membranas nucleares de las células. El procedimiento se menciona a continuación (Figura 3):

- Se desparafinaron los tejidos con un tren de deshidratación de xiloles y alcoholes (2 cambios de xilol, 2 de alcohol absoluto y 2 de alcohol al 96%) y se lavaron con agua corriente y agua destilada.

- La exposición del epítpe se llevó a cabo mediante calor y presión. Para ello los cortes se sumergieron en Declere (Cell Marque, AR) al 10%. Se dejaron enfriar y se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con el buffer de fosfatos PBS tritón al 10% en una cámara húmeda
- Posteriormente se inhibió la peroxidasa endógena con un bloqueador de peroxidasa (ImmunoCruz Staining System, Santa Cruz Biotechnology) durante 30 minutos y se repitieron los tres lavados de PBS tritón de 5 minutos más uno de PBS albúmina tritón (10%) de 10 minutos.
- Se Incubaron los tejidos a 37°C durante una hora con el anticuerpo primario para Ki-67 (abcam) a una concentración de 1:200. Se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos de PBS tritón y un cuarto lavado con PBS albúmina tritón de 10 minutos.
- Se procedió a incubar los tejidos con el anticuerpo secundario anti-conejo (Santa Cruz Biotechnology, CA), a una concentración de 1:400 a 37°C durante 30 minutos. Se realizaron tres lavados de PBS tritón de 5 minutos.
- Se incubaron los tejidos durante 30 minutos a 37°C con el complejo HRP-estreptavidina (Dako). Se realizaron 3 lavados más con PBS tritón de 5 minutos cada uno.
- Se revelaron con 3.3- Diaminobenzidina (DAB) y Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (Santa Cruz Biotechnology, CA), la cual causa la reacción que produce la marca que indica la presencia de la proteína Ki-67 sobre las células del bazo.
- Se colocaron 50 µl de esta solución a cada tejido y se observó la reacción en el microscopio hasta que la marca se hizo evidente, entonces se inhibió la reacción con PBS.

- Los tejidos se contratiñeron con Hematoxilina y Eosina, se deshidrataron con alcohol y xilol de concentración creciente y se montaron en resina sintética.

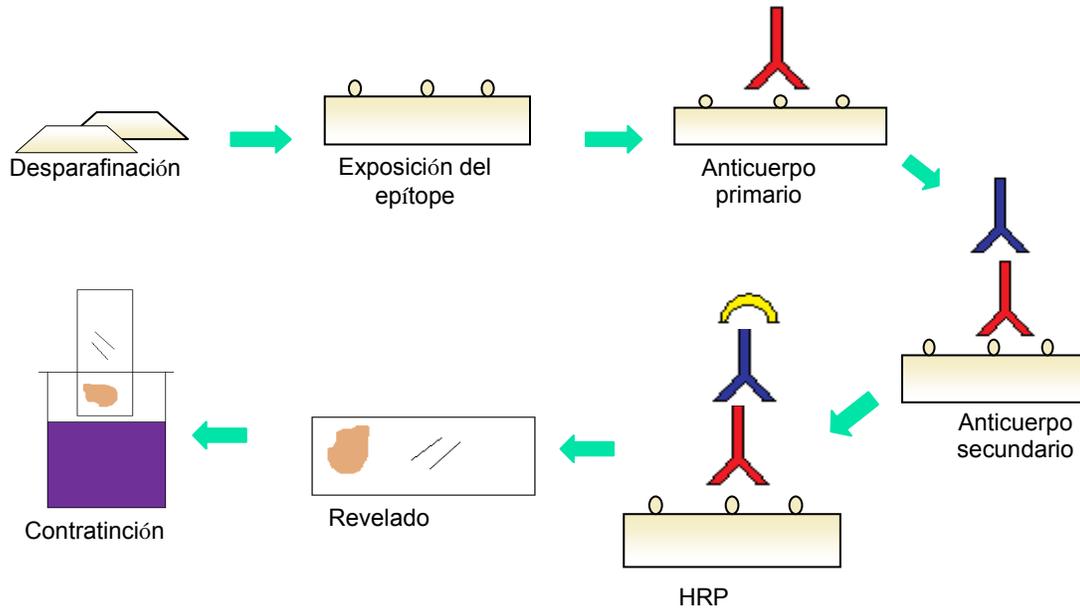


Figura 3: Inmunohistoquímica para Ki-67

6.4 Análisis y estadística

Posteriormente a la inmunohistoquímica para Ki-67, se observaron las muestras al microscopio fotónico y se tomaron fotografías de los tejidos controles y tratados. Se tomaron 5 campos al azar a un aumento de 1000x de cada bazo de ratón (3 bazos por cada condición: control, 1, 4, 8 y 12 semanas de exposición a V_2O_5), teniendo una N de 7133 células por condición. Los campos fueron escogidos como zonas exclusivamente de pulpa blanca y por lo tanto de linfocitos (Figura 4).

Se realizó un conteo celular para cada campo, se obtuvo el porcentaje de linfocitos inmunopositivos a Ki-67. Dicho conteo se realizó con el programa Image J.

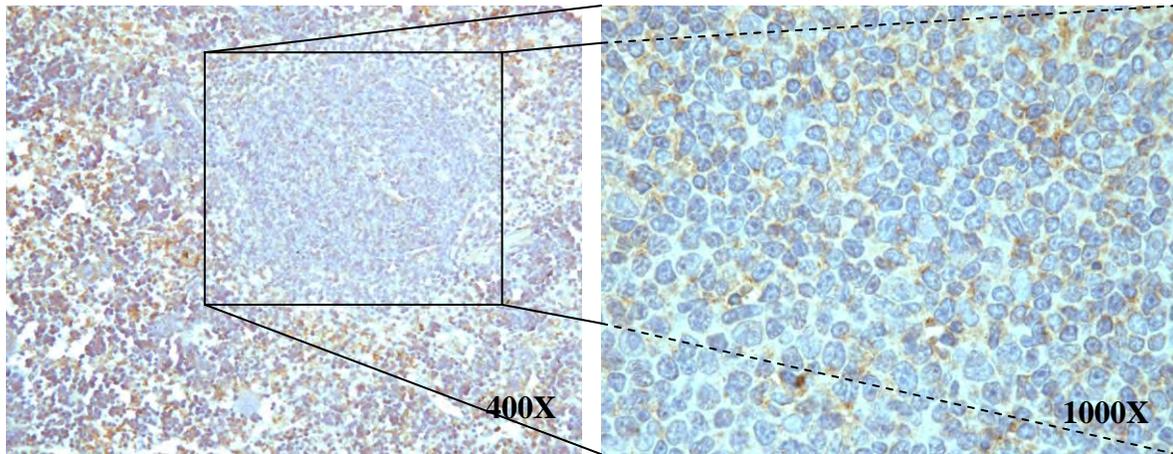


Figura 4: Proyección de la pulpa blanca de 400X a 1000X. Los campos tomados fueron de zonas exclusivas de la pulpa blanca del bazo.

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comprobar si había diferencia significativa entre las medias de cada grupo; asimismo se realizó una prueba post-ANOVA: Tukey, para comparar los resultados entre cada uno de los grupos de bazos de ratones expuestos a V_2O_5 con respecto a los bazos de ratones control.

Finalmente se realizó una regresión lineal para observar si el patrón de proliferación se aproxima a ser directamente proporcional al tiempo de exposición y en que porcentaje se relacionan los resultados con el efecto que causa el V_2O_5 .

7. RESULTADOS

7.1 Cambios en el porcentaje de linfocitos inmunopositivos a Ki-67

En cada campo observado se realizó el conteo de linfocitos totales y posteriormente el conteo de linfocitos marcados por la presencia de la proteína Ki-67 tanto en el núcleo como en el citoplasma. Con estos datos se obtuvo el porcentaje de linfocitos inmunopositivos a la proteína y por lo tanto el porcentaje de proliferación de los linfocitos de la pulpa blanca de los bazo de los ratones tratados.

En todos los grupos se observó la presencia de la marca de la proteína Ki-67 tanto en el núcleo como en el citoplasma de los linfocitos (Figura 5). En el grupo control, el porcentaje de marca a Ki-67 fue de 23.051% (Figura 6).

En contraste, en los grupos tratados se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos inmunopositivos a Ki-67 de una manera dependiente al tiempo de exposición (Figura 5).

El aumento en la proliferación de linfocitos del bazo de ratones fue evidente desde la primera semana de exposición, ya que hay una diferencia significativa entre el porcentaje en todos los grupos tratados con respecto al grupo control (Figura 6).

El grupo tratado durante 1 semana, presentó un porcentaje de linfoproliferación de 28.23%. El siguiente grupo, tratado durante 4 semanas, presentó un porcentaje de 38.77%. A las 8 semanas de exposición, el porcentaje incrementó a 41.13%, y a las 12 semanas a 42.31% (Figura 6).

En la regresión lineal se obtuvo una R de de 0.94878. En la gráfica (Figura 7) observamos un patrón de proliferación directamente relacionado con el efecto del V_2O_5 . También se observa que la relación de dependencia entre la proliferación y el tiempo de exposición es positiva y alta.

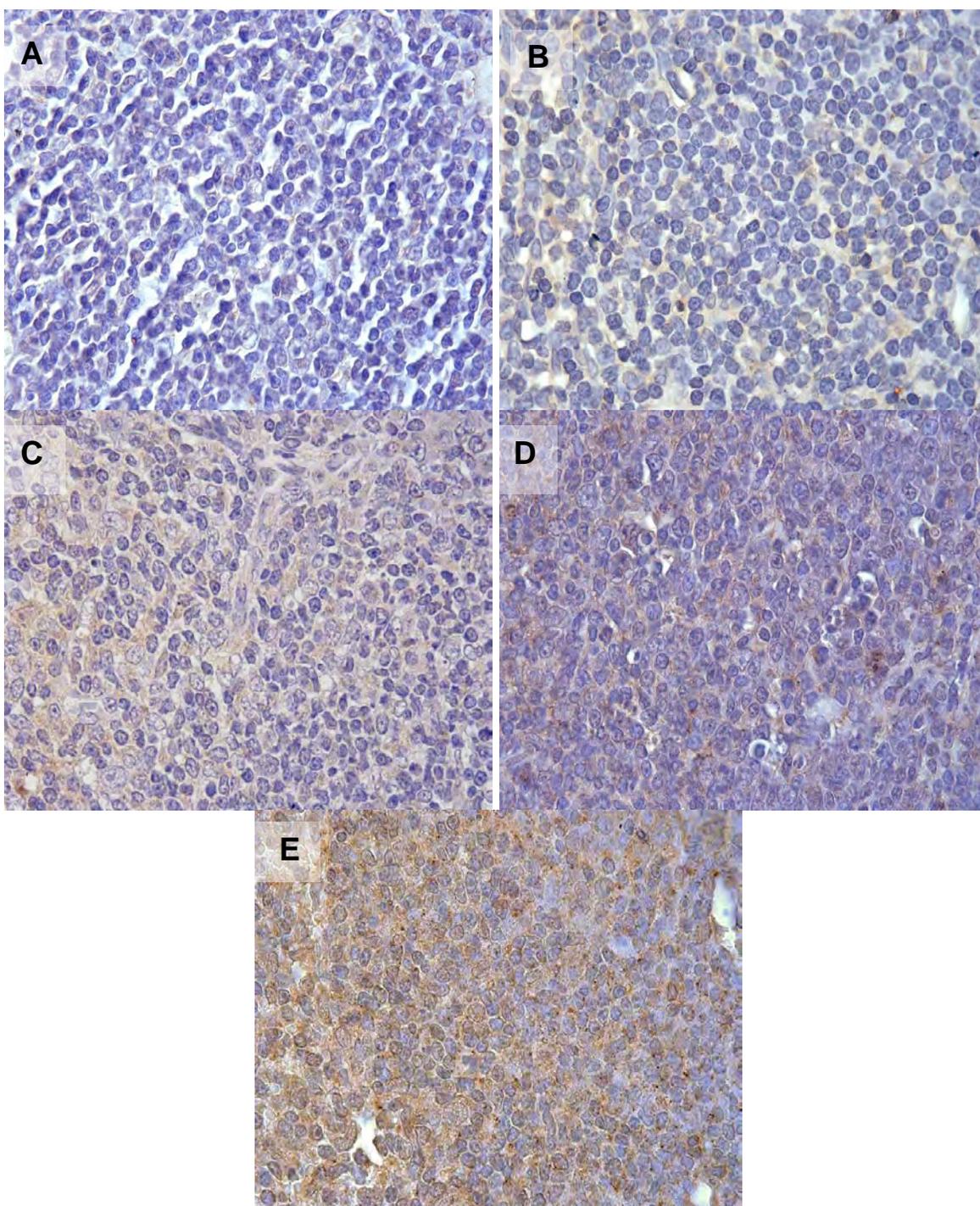
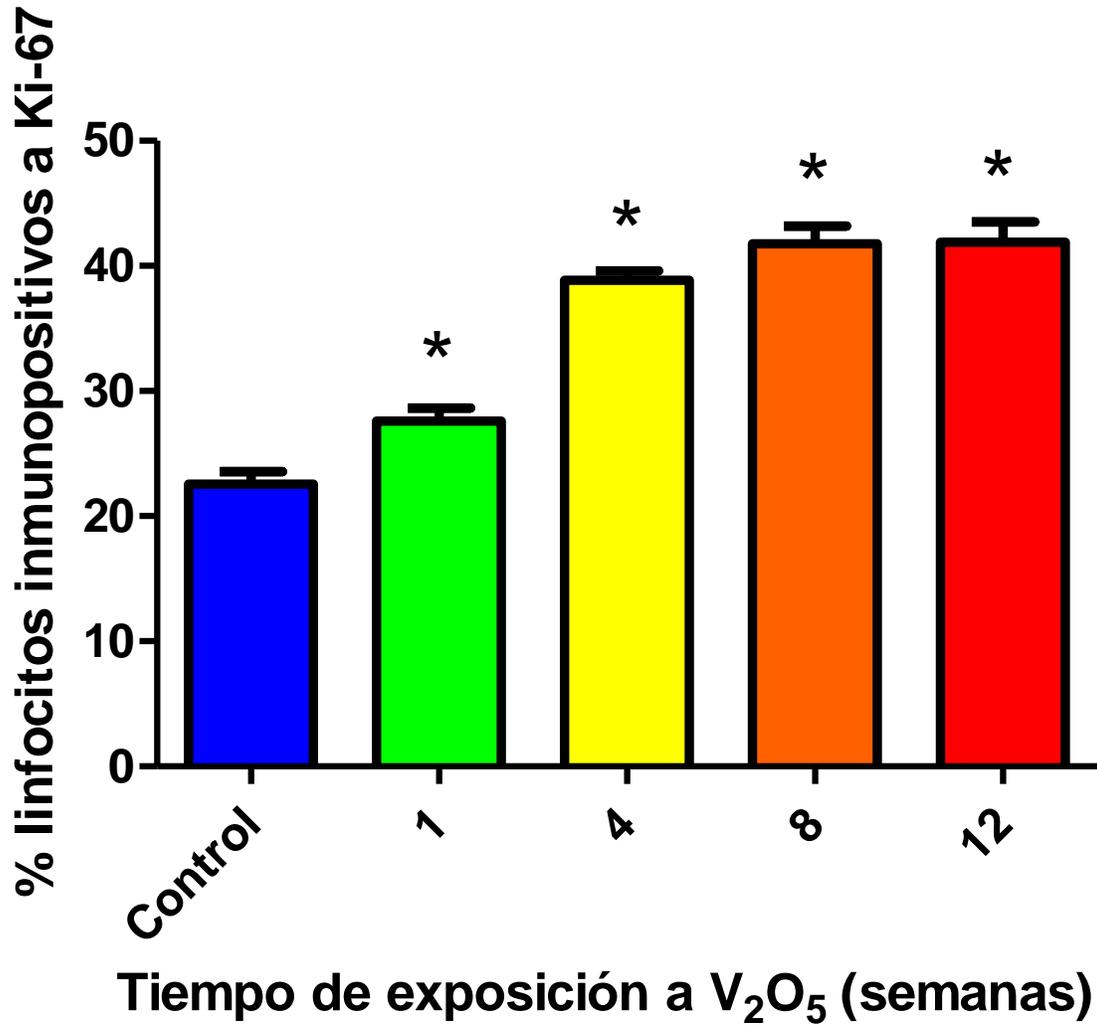


Figura 5: Efecto proliferativo del V_2O_5 en los linfocitos de bazo. A. Control (1000X). Se observan pocos linfocitos inmunopositivos a Ki-67. Se aprecia que el efecto proliferativo del V_2O_5 es mayor a partir de la primera semana de exposición, ya que incrementa la proporción de linfocitos en proliferación a las 2 (B) (1000X), 4 (C) (1000X), 8 (D) (1000X) y 12 semanas (E) (1000X).



P=0.0001

Figura 6: Efecto Proliferativo del V₂O₅ sobre los linfocitos de bazo. Se observa el incremento significativo en la proliferación de los linfocitos a partir de la primera semana de exposición. *= P< 0.0001 ANOVA (Tukey)

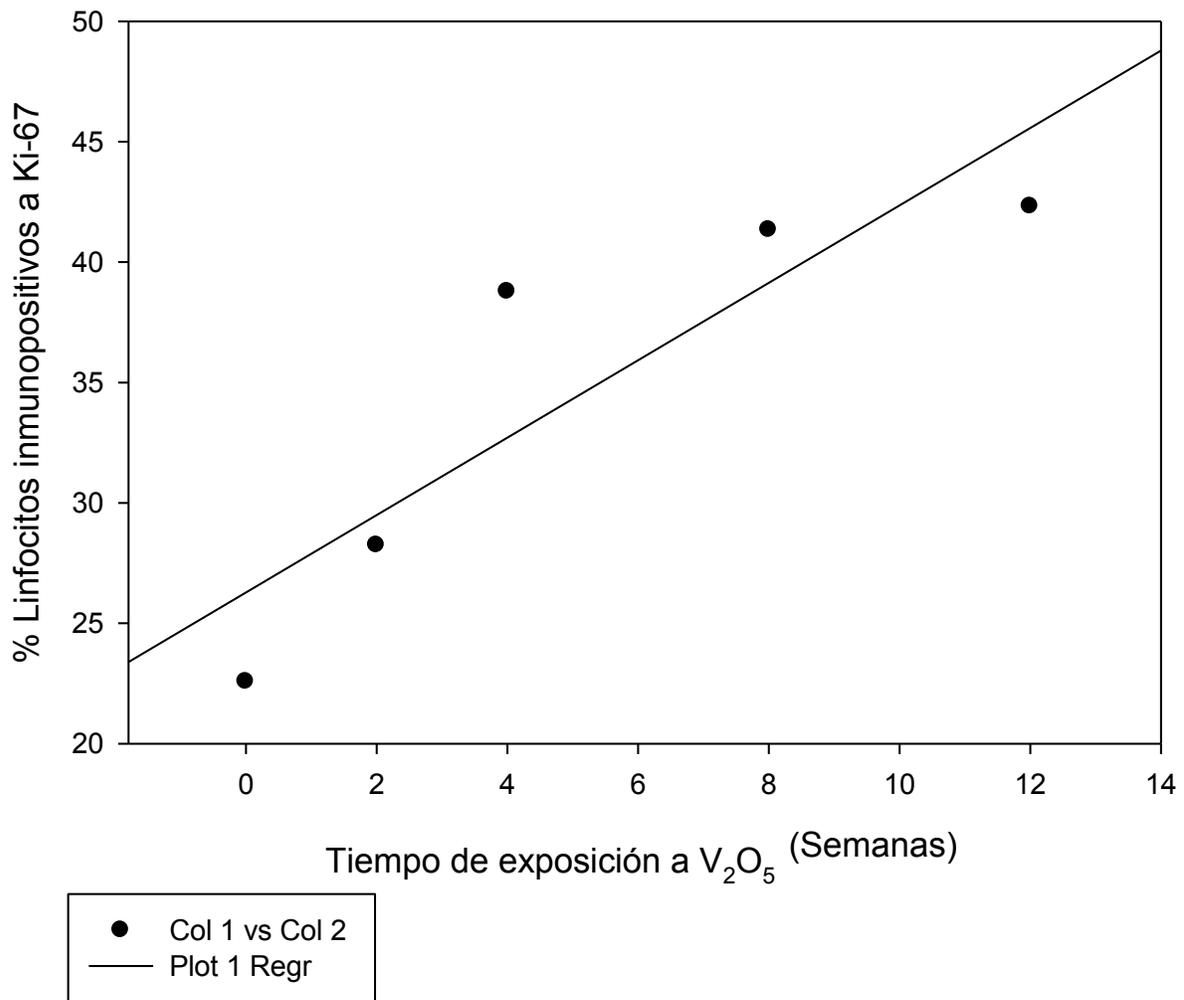


Figura 7: Regresión lineal. El valor resultante de la regresión lineal fue de 0.948, lo que indica que el 94.8% de los datos se deben a la exposición de V₂O₅. Los resultados están directamente relacionados con el tiempo de exposición.

8. DISCUSIÓN

El V_2O_5 es un contaminante atmosférico cuya fuente principal es la quema de combustibles fósiles derivada de la actividad industrial y del tráfico vehicular (Barceloux 1999; Rodriguez et al. 2003). Este compuesto produce diversas alteraciones en el sistema inmunológico.

En nuestro modelo, se ha observado que la exposición vía inhalada a V_2O_5 (0.02M) produce esplenomegalia, provocada por el aumento en el tamaño de la pulpa blanca, la cual crece como resultado del incremento en el tamaño de los nódulos linfoides y por lo tanto del número de linfocitos, principalmente CD19+ (Piñon-Zarate G et al. 2008).

En otros estudios también se ha observado que el vanadio produce un incremento en las células del bazo, por ejemplo Qureshi et al, 1999, reportó en aves un aumento de linfocitos CD4+ en el bazo ocasionado por la exposición vía oral a metavanadato de amonio (10, 25 y 50 mg/kg). También se ha observado hipertrofia e hiperplasia en la pulpa blanca del bazo de ratones expuestos a este mismo compuesto (WHO 2001).

Además de encontrar incremento en la proporción de células en el bazo, en sangre periférica se ha observado un incremento en el número de células como: neutrófilos, monocitos, plaquetas y linfocitos en nuestro modelo (González VA, 2004). Estas observaciones han sido corroboradas en otros trabajos. (Zaporowska H y Wasilewski W. 1992; Mravcová y cols. 1993)

El incremento en la proporción de linfocitos en el bazo observado en este y otros modelos podría ser resultado de diferentes procesos como: a) la proliferación *in situ* de las células del bazo, b) migración de linfocitos de sangre periférica o de otros órganos linfoides a este órgano. El proceso principal mediante el cual se estimula tanto la migración como la proliferación de linfocitos en el bazo y otros órganos linfáticos, es el reconocimiento de un antígeno y la

respuesta ante una infección. Otro de los factores que podría promover estos procesos es el daño tisular. (Abbas A.K. y Lichtman A.H. 2004)

Debido a lo anterior, evaluamos la presencia de proliferación en los linfocitos de la pulpa blanca del bazo. Nuestros resultados mostraron que los bazos de los ratones expuestos a V_2O_5 vía inhalada a una concentración de 0.02M, presentaron un incremento en el porcentaje de linfocitos en proliferación con respecto a los bazos de individuos controles; este efecto fue dependiente del tiempo de exposición. Estos resultados explicarían en parte la esplenomegalia observada por la exposición a V_2O_5 y el incremento en la proporción de la pulpa blanca.

Se conocen algunos compuestos de vanadio que estimulan la proliferación de líneas celulares, por ejemplo: el ortovanadato de sodio causa un aumento de la proliferación y diferenciación de progenitores eritropoyéticos mediante la previa disminución de la eritropoyesis en una exposición aguda. (Aguirre M.V. et al. 2004). Este mismo compuesto causa la proliferación de linfocitos en modelos *in vivo*, (Marini M, Zunica G, Bagnara GB, Franceschi C 1987) y estimula la proliferación y modificación morfológica de células embrionarias BALB/3T3 de ratón (Shew C.W, Rodriguez I, Lee J.K. 1992).

Para que el vanadio cause sus efectos tóxicos en la célula, entra a ella por canales iónicos inespecíficos como vanadato (V), donde se reduce a vanadil (IV) (Nechay BR et al 1986). Una vez dentro, funciona como catalizador de reacciones intracelulares que producen radicales libres como el OH^- ; los cuales causan estrés oxidante en la célula. Esto puede llevar a una desregulación del crecimiento celular debido a cambios en la expresión genética, como en el caso de la estimulación de la producción de factores de crecimiento como NfκB, o de la inactivación de mecanismos de control de crecimiento celular como p53 (Huang C et al. 2000; Beyersmann D, Hirtwig A, 2008).

Así mismo, en nuestro modelo se han observado alteraciones morfológicas en el núcleo de linfocitos de bazo debidas a cambios en el nucleoesqueleto. Estos cambios se pueden traducir en modificaciones en la expresión génica y relacionarse con desórdenes linfoproliferativos (Rodriguez-Lara V. 2008).

El vanadio está relacionado con la regulación positiva de algunos genes, moléculas y vías de señalización que se encuentran ligados a eventos de proliferación celular e inflamación por ejemplo: IL1, MIP-2, TNF- α , IL-8, IL-6, IL-2, AP-1, Ras, C-Raf-1, MAPK, p53 y Nf κ β (Mukherjee B. et al. 2004; Zhuowei L, et al. 2005).

El TNF- α , la IL-8 y la IL-6, son citocinas proinflamatorias cuyo aumento se ha observado en presencia de vanadio en células como las del epitelio bronquiolar (Carter J.D et al. 1997). También se observó el incremento de la producción de IL-1 β en macrófagos peritoneales, en presencia de vanadil-sulfato. (Johnson D.R et al. 2005). En linfocitos T hay un aumento en la producción de IL-2, el cual es un factor de crecimiento para estas células; esto se observó en aves expuestas a metavanadato de amonio vía oral (5ppm) (Cui W. et al. 2010).

Es importante resaltar la producción de estas citocinas debido a que: el TNF- α se encarga de reclutar células inflamatorias induciendo la activación y por lo tanto la proliferación de linfocitos; la IL-6 es producida por leucocitos y favorece la producción de anticuerpos por los linfocitos B; la IL-8 es un quimioatrayente de neutrófilos (Roitt I. et al. 1998). Y la IL-1- β es parte de la familia de IL-1 y es el miembro que se encuentra en mayor porcentaje en la circulación. Tiene una función mediadora de la respuesta inflamatoria en la inmunidad innata, promueve la producción de IL-2 en linfocitos T, la cual es un factor de crecimiento para los linfocitos T estimulados por antígenos, y es responsable de la expansión clonal de los mismos. (Abbas A.K. y Lichtman A.H 2004).

La producción de TNF- α en la célula, se estimula por la presencia de vanadato, esta activación se asocia al incremento de la actividad del factor de

transcripción $Nfk\beta$, el cual se une al ADN, y es un factor de crecimiento necesario para la proliferación y diferenciación de diferentes células como los linfocitos (Ye J. et al. 1999). Este factor también va acompañado del aumento en la expresión de MIP-2 (proteína inflamatoria de macrófago-2) la cual es una molécula proinflamatoria cuya expresión se observó en macrófagos en el tejido pulmonar (Mukherjee B. et al. 2004); Es un posible factor de migración de células al bazo puesto que se encarga de reclutar células NKT en la zona marginal del mismo (Faunce D.E et al. 2001) Así mismo se observó el aumento en la producción del factor de transcripción AP-1, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno en células epidermales. Este factor estimula eventos de diferenciación y proliferación (Ding M. et al. 1999), en células B del bazo, la sobre expresión de c-Fos/AP-1, aumenta la proliferación de las mismas, debido a que estimula la expresión de los genes para las ciclinas D1 y E (Phuchareon J y Tokuhisa T. 1995).

Debido a la similitud química del vanadio con los fosfatos (Nechay BR et al 1986), el vanadio puede estimular vías involucradas con la activación del ciclo celular por ejemplo las tirosina fosfatasas como la cdc25 fosfatasa, importante para la activación del factor promotor de maduración en la meiosis y el paso de la célula a la mitosis; y cinasas como Erk1 y 2 y la ciclina B, y la activación indirecta de la fosfolipasa C, las cuales tienen diversas funciones celulares como el control del ciclo celular (Lopez V, Stevens T y Lindquist RN, 1976; Tsiani E y Fantus I.G. 1997; Wang YZ. Bonner J.C. 2000; Mailhes JB. et al. 2003; Mehdi M, Srivastava A. 2005).

Algunas cinasas, como las dependientes de ciclinas, se encargan de regular la formación del huso mitótico y del paso a través de la mitosis regulado por puntos de control, esto lo hace mediante una cadena de fosforilaciones y desfosforilaciones que permiten la activación e inactivación de las enzimas que conlleva a que la célula pase por el proceso de mitosis (Jimenez GLF y Merchant LH. 2003).

En este sentido, diversos compuestos de vanadio modulan la duración de la fosforilación de moléculas como la cinasa ERK, PI3-K y JNK, cinasas involucradas en vías de señalización que llevan a la célula a procesos de apoptosis, diferenciación y proliferación (Figura 8) (Morinvile A, et al. 1998).

El V_2O_5 en miofibroblastos pulmonares activa las proteínas cinasas ERK 1 y ERK 2. Esta activación fue resultado de la fosforilación del receptor EGF-R. (Wang YZ. Bonner J.C. 2000). El vanadato actúa sinérgicamente con mitógenos, particularmente con el factor de crecimiento epidérmico (EGF), para promover la síntesis de ADN en fibroblastos humanos (Swarup G, et al. 1982). Otra de las vías por las cuales el vanadio podía estimular la fosforilación de ERK-1 y ERK-2, es a través de PI3-K, debido a que esta molécula activa la vía de ras-MAPK, c-raf estimulando la proliferación celular. (Figura 8) (Tsiani E y Fantus I.G. 1997; Pandey S.K. 1999). Esto es importante debido a que también se ha visto que ERK promueve la proliferación de diversas células como los linfocitos; pues el ERK activo es dirigido al núcleo donde fosforila varios sustratos incluyendo los factores de transcripción que participan en la activación de células T (Miyaji M. et al. 2009).

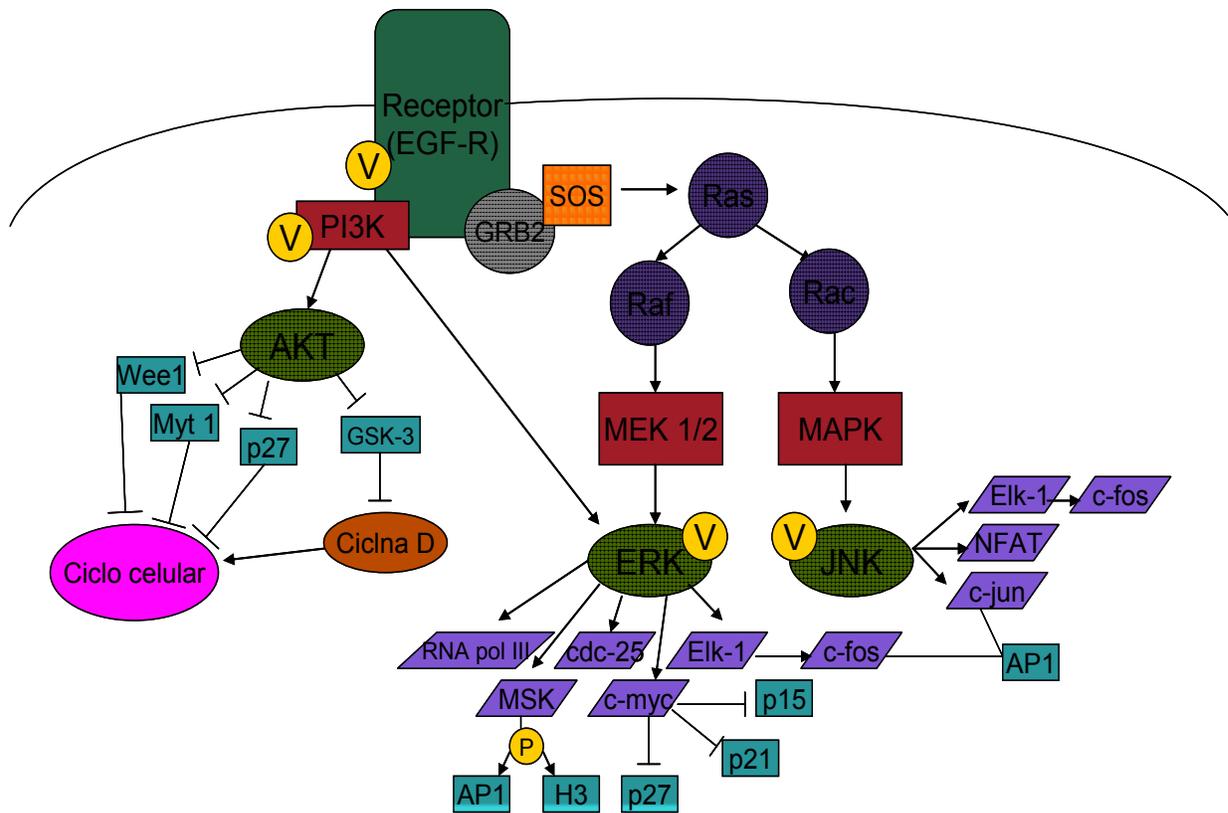


Figura 8: Vías de señalización celular en las que el vanadio actúa para promover la proliferación. El receptor con actividad cinasa intrínseca, la cinasa PI3K, ERK y JNK pueden ser activados porque el vanadio toma el lugar del fosfato, desencadenando la activación de factores de transcripción como AP1, la fosforilación de la histona 3 y el bloqueo de inhibidores del ciclo celular; causando la proliferación de la célula.

Uno de estos factores de transcripción es NFAT, cuya actividad aumenta en presencia de vanadato, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno particularmente de H_2O_2 . (Huang C. et al. 2001) Este factor es necesario para la expresión de IL-2, responsable de la expansión clonal de los linfocitos T (Abbas A.K. y Lichtman A.H 2004).

Particularmente en los linfocitos B, ciertos compuestos de vanadio (oxodiperoxo (1,10-fenantrolina) vanadato (V)) activan la cinasa Syk (Figura 9), una proteína tirosina cinasa que participa en la cascada de señalización de los receptores de los linfocitos B. Se une al receptor de membrana en la activación de dichos linfocitos, finalizando la vía con factores de transcripción como $Nfk\beta$, el cual induce la proliferación y diferenciación de los linfocitos. También se ha

observado el aumento en la cantidad de este factor de transcripción con compuestos como el ortovanadato de sodio y el bis (maltolato)-oxovanadio (IV). Esto se observó en líneas celulares humanas de linfoma de células B y de leucemia de células T (Krejsa C.M et al. 1997).

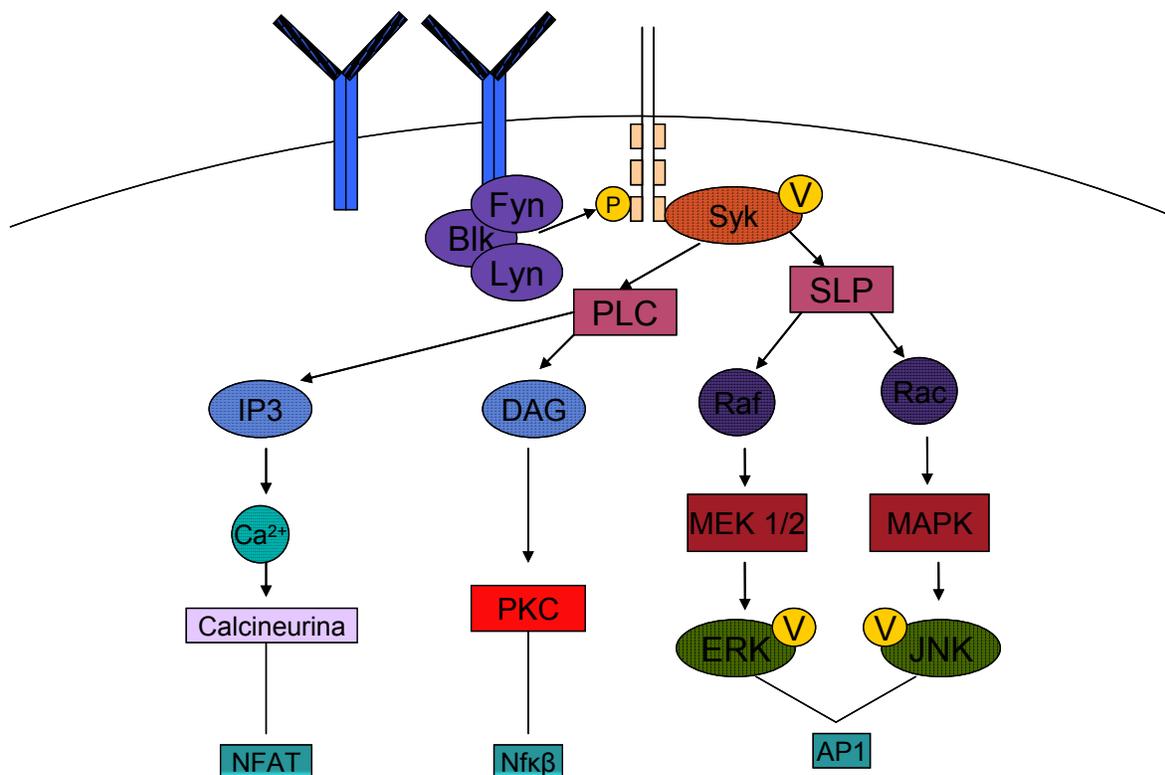


Figura 9: Participación del vanadio en la vía de activación de los linfocitos B. El vanadio activa a Syk, desencadenando la vía de activación de los linfocitos B mediante la producción de factores de transcripción (NFAT, Nfκβ Y AP1) que facilitan la proliferación celular del linfocito.

Otros compuestos de vanadio como el biperioxovanadio son inhibidores de las proteínas tirosina fosfatasa y por lo tanto potentes activadores de linfocitos T; este compuesto activa a la proteína Zap-70 y por esta vía induce la proliferación de los linfocitos T (Figura 10) (Barat C. y Tremblay M.J 2003).

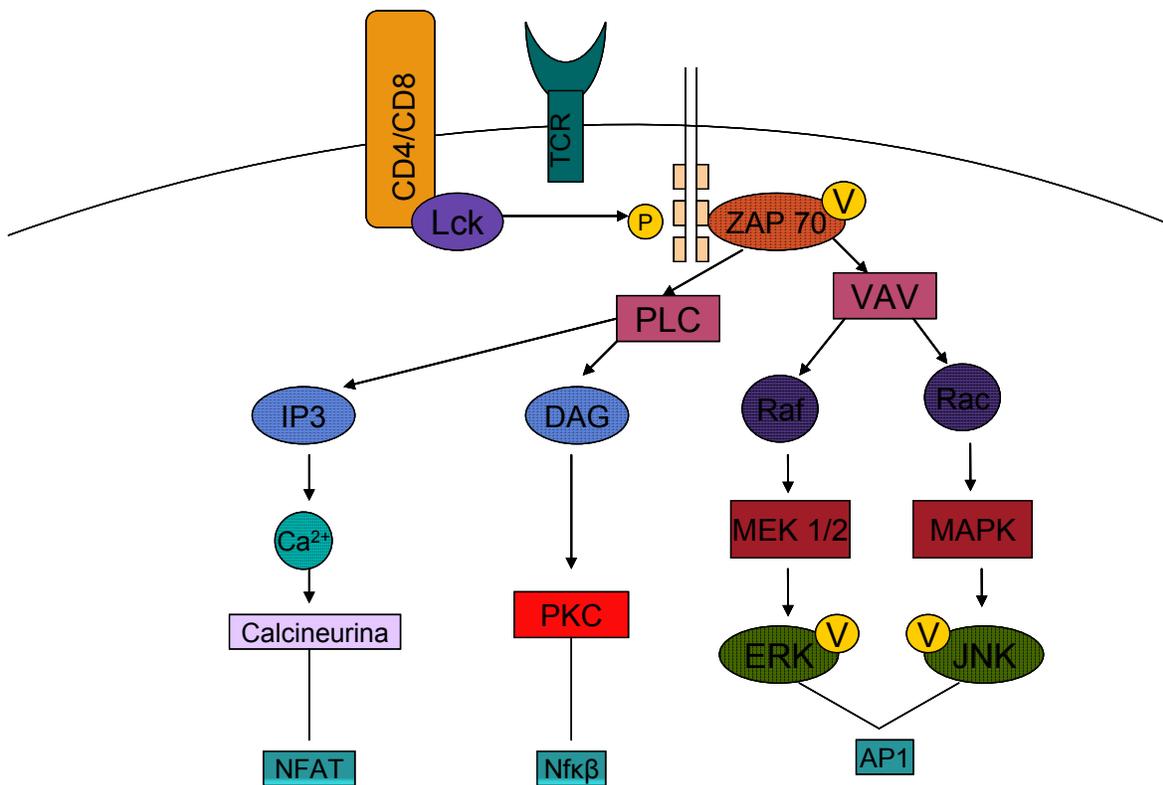


Figura 10: Participación del vanadio en la vía de activación de los linfocitos T. El vanadio puede activar la proteína ZAP-70 desencadenando vías de señalización que causan la producción de factores de transcripción que producen moléculas como la IL-2 induciendo la activación y proliferación del linfocito.

La proliferación excesiva de linfocitos producida por la exposición a V_2O_5 conlleva a la desregulación de la homeostasis del sistema inmunológico; como se mencionó anteriormente en nuestro modelo el vanadio promovió además la disminución en la apoptosis de los mismos aumentando la probabilidad de que exista dicha desregulación, ya que para mantener la homeostasis, debe existir un equilibrio entre estos dos procesos, de lo contrario puede haber un fenómeno de autoinmunidad (Abbas A.K. y Lichtman A.H. 2004). Por ejemplo, se reportó que la proliferación de células T puede expandir la población de células T autorreactivas (Datta S, Sarvetnick N. 2009).

Debido a que los linfocitos no son las únicas células de la sangre y del sistema inmunológico que presentan un aumento en su número, es probable que

el vanadio estimule la proliferación en otras estirpes celulares como las células hematopoyéticas, mediante la activación de la vía de Erk, ciclinas y cinasas que son vías de activación de proliferación en general.

9. CONCLUSIONES

1. El V_2O_5 por vía inhalada produce la proliferación de linfocitos de bazo de manera dependiente al tiempo de exposición.

2. La proliferación de los linfocitos explica el incremento en la proporción de estas células en el bazo y la esplenomegalia observada en este y otros modelos. Sin embargo no descartamos además la migración de linfocitos de sangre y de otros órganos linfoides

3. Debido a que el vanadio estimula la proliferación de linfocitos vía la activación de ERK y de factores de transcripción como $Nf\kappa\beta$ y AP-1, es posible que promueva la división de otras estirpes celulares.

4. El vanadio promueve un estado de inflamación que mantiene la proliferación de estas células.

5. Es importante evaluar el impacto de esta proliferación y pérdida de la homeostasis debido a las alteraciones que presentan los linfocitos.

10. PERSPECTIVAS

1. Medir la proliferación en otras líneas celulares que se encuentren aumentadas en número por la exposición a V_2O_5 .
2. Comprobar la actividad de los linfocitos T y B del bazo de ratones expuestos a V_2O_5 .
3. Identificar las vías por medio de las cuales el V_2O_5 activa la proliferación celular mediante el marcaje de moléculas presentes en las vías propuestas.
4. Determinar el impacto de esta desregulación del sistema inmunológico identificando la presencia de células neoplásicas o autorreactivas.
5. Observar si hay disminución de las alteraciones en el bazo en ratones cuya exposición a V_2O_5 se suspende.
6. Analizar si el efecto linfoproliferativo del vanadio es diferente comparando por género.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A.K. y Lichtman A.H. 2004. Inmunología celular y molecular. 5ª. Editorial El Sevier. Estados Unidos. 534pp.
- Aguirre M.V. ET AL. 2004. Estimulación de la eritropoyesis por efecto del ortovanadato de sodio. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y tecnológicas.
- Altamirano LM, et al. 1988. Genetic toxicology of vanadium compounds. En: Nriagu, J. (ED) Vanadium in the environment, part 2. Health effects, Jhon Wiley and sons, Inc. 159-179pp.
- Aragón M.A, Ayala M.E, Fortoul T.I, Bizarro P, Altamirano-Lozano M. 2005. Vanadium induced ultrastructural changes and apoptosis in male germ cells. Reproductive Toxicology. Vol 20: 127-134pp.
- Aureliano M, Crans D.C. 2008. Decavanadate ($V_{10}O^{6-}_{28}$) and oxovanadates: Oxometalates with many biological activities. Journal of Inorganic Biochemistry. Science Direct.
- Badillo Carrete A. 2004. Hidrotratamiento del petróleo crudo tipo Maya. Tesis de licenciatura. Ingeniería Química con área en Ingeniería de Procesos. Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla. 87pp.
- Barat C y Tremblay MJ. 2003. Treatment of Human T cells with Bisperoxovanadium Phosphotyrosyl Phosphatase Inhibitors leads to activation of cyclooxygenase-2 gene. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Vol 278: 6992-7000 pp.

- Barceloux D.G. 1999. Vanadium. *Clinical Toxicology*. Vol 37:2, 265-278pp.
- Behrman R.E. *et al.* 2004. *Nelson Tratado de Pediatría*. El Sevier. España. 2618pp.
- Borja-Aburto V.H. *et al.* 1996. Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico city. *American Journal of Epidemiology*. Vol 145: 258-268pp.
- Carter J.D. Ghio A.J, Samet J.M. y Devlin R. 1997. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicology and applied pharmacology*. Vol 146. 180-188pp.
- Chakraborty T, *et al.* 2005. Vanadium induces apoptosis and modulates the expressions of metallothionein, Ki-67 nuclear antigen, and p53 during 2-acetilaminofluorene-induced rat liver preneoplasia. *Journal of cellular biochemistry*. Vol 94: 744-762pp.
- Chakraborty T. *et al.* 2006. Vanadium limits the expression of proliferating cell nuclear antigen and inhibits early DNA damage during diethylnitrosamine-induced hepatocellular preneoplasia in rats. *Environmental and molecular mutagenesis*. Vol 47: 603-615 pp.
- Cohen, M.D., Wei, C.I., Tan, H., Kao, K.J., 1986. Effect of ammonium metavanadate on the murine immune response. *J. Toxicol. Environ. Health* Vol 19: 279–298pp.
- Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants. 1974. *Vanadium* Washington, DC, National Academy of Sciences.

- Cui W. et al. 2010. Effect of vanadium on the subset and proliferation of peripheral blood T cells, and serum interleukin-2 content in broilers. *Biological Trace Element Research*. DOI: 10.1007/s12011-010-8737-7
- Datta S, Sarvetnick N. 2009. Lymphocyte proliferation in immune-mediated diseases. *Trends in immunology*. Vol 30: 430-438pp.
- Ding M. et al. 1999. Vanadate-induced activation of activator proteína-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*. Vol 20: 663-668pp.
- Domenech X, Peral J. 2006. *Química ambiental de sistemas terrestres*. Reverté. Barcelona, España. 239pp.
- Dreosti. I.E. 1991. Trace elements, micronutrients, and free radicals. Humana Press. Berlín Alemania. 231pp.
- Dundar MS. 2005. Vanadium concentrations in settled outdoor dust particles. *Environmental Monitoring and Assessment*. DOI: 10.1007/s10661-006-9201-1
- Escobedo F y Chacalo A. 2008. Estimación preliminar de la descontaminación atmosférica por el arbolado urbano de la ciudad de México. *INCI*. Vol 33: 29-32pp.
- Faunce D.E. et al. 2001. MIP-2 recruits NKT cells to the Spleen Turing tolerance induction. *The journal of immunology*. Vol 166: 313-321 pp.
- Fickl et al. 2006. Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. *Free radical Biology & Medicine*. Vol 40: 146-155 pp.

- Fortoul T.I. y Ávila CMR, 2007. Vanadium: its impact on health. Nova Publishers. México. 87pp.
- Fortoul T.I. et al. 2008. Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histol histopathol.* Vol 11: 1321-1326 pp.
- García G.B. 2006. El vanadio, un elemento ambiguo. *Acta Toxicol. Argent.* Vol. 14. No. 2 32-36pp.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H y Stain H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* Vol 31: 1. 13-20pp.
- Gómez T.M. et al. 2003. Formación de sedimentos durante la hidrodesintegración de residuos de petróleo. *Journal of the Mexican Chemical Society.* Vol 47. No. 003. 260-266pp.
- González Villalva Adriana. 2004. Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Goodno CC. y Taylor EW. 1982. Inhibition of actomyosin ATPase by vanadate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol 79. 21-25pp.
- Halpert R.D. Feczko P.J. 2000. *Radiología gastrointestinal.* 2°. Elsevier. España. 334pp.
- Huang C. et al. 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 275: 32516-32522pp.

- IARC. 1989. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. Monogr Eval Carcinog Risks Hum. Vol 46:1-458 pp.
- IDRC. 2003. Contra la contaminación del aire en ciudad de México: La campaña por aire limpio apunta a mejorar la salud y reducir sus gastos. Estudio de Caso: México (Contaminación Ambiental) 8. CASE-ECO-8S. International Development Centre, Canada. 4 pp.
- INE. 1999. Inventario de emisiones de los estados de la frontera norte de México. Instituto Nacional de Ecología. México. 368pp.
- Irsigler G.B, Visser P.J, Spangenberg P.A.L. 1999. Asthma and chemical bronchitis in vanadium plant workers. American Journal of Industrial Medicine. Vol 35: 366-374pp.
- Jiménez B.E. 2001. La contaminación ambiental en México. Limusa. México. 918pp.
- Jimenez GLF y Merchant LH. 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación. México. 853pp.
- Johnson D.R et al. 2005. Inhibition of vagally mediated immune-to-brain signaling by vanadyl sulfate speeds recovery from sickness. PNAS. Vol 102: 15184-15189pp.
- Krejsa CM. et al. 1997. Role of oxidative stress in action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. Journal of Biological Chemistry. Vol: 272.

- Kubbutat MHG, et al. 1994. Epitope analysis of antibodies recognizing the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by antibody Ki-67 (Ki-67 protein). *Journal Clin. Pathology*. Vol 47. 524-528pp.
- Kyenogeun L, Shen X, König R. 2001. Effects of cadmium and vanadium ions on antigen-induced signaling in CD4+ T cells. *Toxicology*. Vol 169: 53-65 pp.
- Lahmann, E. et al. 1986. Heavy metals: identification of air quality and environmental problems in the European Community. Luxembourg, Commission of the European Communities. Vol. 1 & 2.
- Lopez V, Stevens T y Lindquist RN. 1976. Vanadium ion inhibition of alkaline phosphatase-catalyzed phosphate ester hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 175: 31-38pp.
- Mailhes JB. et al. 2003. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in Mouse bone marrow cells. *Mutation research*. Vol 538: 101-107 pp.
- Marini M, Zunica G, Bagnara GB, Franceschi C. 1987. Effect of vanadate on PHA induced proliferation of human lymphocytes from young and old subjects. *Biochemical and biophysical research communications*. Vol 142: 836-842pp.
- Mehdi M, Srivastava A. 2005. Organo-vanadium compounds are potente activators of the proteína kinase B signaling pathway and proteína tyrosine phosphorylation: Mechanism of insulinomimesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 440: 158-164pp.

- Michael H.R., Gordon I.K., y Wojciech P. 2005. Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. 4ª. Editorial Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay. 864pp.
- Miyaji M. et al. 2009. Genetic evidence for the role of Erk activation in a lymphoproliferative disease of mice. PNAS. Vol. 106; 34.
- Mravcová, A., Jirova, D., Janci, H., Lener, J., 1993. Effects of orally administered vanadium on the immune system and bone metabolism in experimental animals. Sci. Total Environ. Suppl. Pt. 1, 663–669pp.
- Morales, R.G.E. 2006. Contaminación atmosférica urbana: Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 328pp.
- Morinvile A, Maysinger D y Shaver A. 1998. From vanadis to atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. Trends in Pharmacological sciences. Vol 19: 452-460pp.
- Mugica V. et al. 2002. Temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico City during 1996-1998. Aerosol Science. Vol. 33. 91-102 pp.
- Mukherjee B. et al. 2004. Vanadium - an element of atypical biological significance. Toxicology letters. Vol 150: 135-143pp.
- Mussali G.P. et al. 2005. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. Toxicology and Industrial Health. Vol 21: 215-222 pp.
- Narla RK, et al. 2001. Bis (4,7 - dimethyl, 10-phenanthroline) sulfatoxovanadium (IV) as a novel myeloleukemic agent with matrix

metalloproteinase inhibitory activity. *Clinical Cancer Research*. Vol 4: 1094-1101 pp.

- Nebel B.J, Wright R.T. 1999. *Ciencias ambientales: ecología y desarrollo sostenible*. 6ª. Prentice Hall. México. 372- 377pp.
- Nechay B.R. et al. 1986. Vanadyl (IV) and Vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and Amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution. *Archives of biochemistry and biophysics*. 251: 128-138pp.
- NIOSH. 1977. Occupational exposure to vanadium. National Institute for Occupational Safety and Health. Document No. 77-222, Washington, DC.
- NTP. 2002. Toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide. Cas No. 1314-62-1. InF344/N rats and B6C3F1 mice. P.O. Box 12233. Research Triangle Park NC 27709. NIH Publication No. 03-4441.
- Ole Raaschou-Nielsen et al. 2001. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *American Journal of Epidemiology*. Vol: 153: 433-443 pp.
- OMS. 2008. Calidad del aire y salud. Nota descriptiva No. 313.
- OSHA. 2007. Occupational safety and health guidelines for vanadium pentoxide dust. Occupational Safety and Health Administration: Washington
- Pandey S.K. 1999. Phosphatidylinositol 3-Kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK/and p70^{S6k} signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. *Biochemistry*. Vol 38: 14667-14675pp.

- Paton G.R. y Allison A.C. 1972. Chromosome damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat. Research*. Vol 16. 332-336 pp.
- Pei-Shan Chien, Oi-Tong Mak, Hao-Jen Huang. 2006. Induction of COX-2 protein expresión by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK- mediated pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol 339. 262-268 pp.
- Phuchareon J y Tokuhisa T. 1995. Dereglates c-Fos/AP-1 modulates expresión of the cyclin and the cdk gene in splenic B cells stimulated with lipopolysaccharide. *Cancer letters*. Vol 92: 203-208 pp.
- Piñon-Zarate G. 2008. Alteraciones en poblaciones celulares del timo en ratones expuestos a V₂O₅ inhalado. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM.
- Piñon-Zarate G., Rodriguez-Lara V., Rojas-Lemus M., Martinez-Pedraza M., González-Villalva A., Mussali-Galante P. y Fortoul T.I. 2008. Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hiperplasia and suppressed humoral immune responses. *Journal of Immunotoxicology*. Vol 5: 115-122 pp.
- Qureshi M.A, Hill C.H., Heggen C.L. 1999. Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Vol. 68: 61-71pp.
- Ragosta M et al. 2002. Source origin and parameters influencing levels of heavy metals in TSP, in an industrial background area of Southern Italy. *Atmospheric Environment*. Vol. 36: 3071-3087 pp.
- Ramírez P. Easstmond D.A. Laclette JP y Ostrosky-Wegman P. 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism

for the induction of aneuploidy cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* Vol. 386. 291-298pp.

- Ress N.B. *et al.* 2003. Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Toxicological Sciences.* Vol 74, 287-296 pp.
- Rico Méndez, Favio Gerardo, Rafael López Castañares y Ezequiel Jaimes Figueroa. 2001. Daños a la salud por contaminación atmosférica. Universidad Autónoma del Estado de México. México. 473pp.
- Riveros-Rosas, et al. 1997. Personal exposure to elements in Mexico City air. *The science of the total environment.* Vol. 198. 79-96 pp.
- Rodríguez –Lara V. 2008 Alteraciones morfológicas del núcleo de linfocitos se ratones expuestos a la inhalación aguda, subaguda y crónica de V₂O₅. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM, México D.F.. 182 pp.
- Rodriguez M.J, Altamirano LM. 2006. Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental.* Vol 22: 173-189 pp.
- Rodríguez-MJJ, Roldán-R, Altamirano-LM. 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. *Toxicology letters.* Vol 144: 359-369 pp.
- Roitt I, Brostoff J., Male D. 1988. *Inmunología.* 4ta. Harcourt Brace. Madrid, España.
- Roldán E. y Altamirano M. 1990. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges, cell-cycle kinetics and satellite association in human

lymphocytes culture exposed to vanadium pentoxide. *Mutat. Res.* Vol. 245. 62-65pp.

- Rosales-CJA et al. 2001. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México.* Vol. 43 No.6. 544-555pp.
- Ross W, Hall P.A. 1995. Ki67: from antibody to molecule to understanding? *Clin Pathol: Mol Pathol.* Vol 48: M113-M117.
- Russanov E. et al. 1994. Lipid peroxidation and antioxidante enzymes in vanadate-treated rats. *Comparative Biochemistry and physiology part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* Vol 107: 415-421 pp.
- Sankar R.R. et al. 2006. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF7 cell line. *Chemico-Biological interactions* Vol 163: 239-247 pp.
- Sasaki K, Matsumura K, Murakami T, Shinozaki F, Takahashi M. 1990. Intranuclear localization of the Ki-67 reactive antigen in HeLa cells. *Flow cytometric analysys.* *Biol Cell.* Vol 68. 129-132pp.
- Shaller K.H y Triebig G. 1994. Bioloical indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals. EUR 11135 EN. Edicions Vicent Llorens. Bruselas Luxemburgo. 49pp.
- Schepper A.M.A. de y Vanhoenacker. 2000. *Medical Imaging if the spleen.* Springer Verlag Berlin. 165pp.
- Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology.* Vol 182: 311-322 pp.

- Seoáñez CM, et al. 2002. Tratado de la contaminación atmosférica. Colección Ingeniería del medio ambiente. Ediciones Mundi. Prensa. 1112 pp.
- Shew C.W, Rodriguez I, Lee J.K. 1992. Proliferation and morphological transformation of BALB/3T3 cells by prolonged treatment with sodium orthovanadate. Food and Chemical Toxicology. Vol: 30: 307-311pp.
- Singh J, Nordile RC, Jorgenson RA, 1981. Vanadate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 678: 477-482pp.
- Stevens A. Lowe J. 2001. Anatomía patológica. 2°. El Sevier. España. 652 pp.
- Sun P. 1987. Toxicity of vanadium and its environmental Elath standard. Changdu West China University of Medical Sciences, China.
- Swarup G, Cohen S y Garbers D. 1982. Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol 197: 1104-1109pp.
- Teijón C, *et al.* Effects of lead administration at low doses by different routes on rat spleens. Study of response of splenic lymphodes and tissue lyzozyme. Toxicology. Vol 191: 245-268pp.
- Télles-Rojo MM., Romieu I., Polo-Peña M., Ruiz Velasco S., Meneses González F., Hernández Ávila M. 1997. Efecto de la contaminación ambiental sobre las consultas por infecciones respiratorias en niños de la ciudad de México. Salud Pública Mex. Vol: 39 No 6.

- Thompson K.H *et al.* Toxicology of Vanadium in mammals. En: Jerome O. Nriagu. 1998. Vanadium in the environment part 2. Health effects. John Wiley & sons inc. 403pp.
- Tiago D.M, *et al.* 2008. Vanadate proliferative and anti-mineralogenic effects are mediated by MAPK and PI-3K/Ras/Erk pathways in a fish chondrocyte cell line. FEBS Letters. Vol 582: 1381-1385 pp.
- Tsiani E y Fantus I.G. 1997. Vanadium compounds. Biological actions and potencial as pharmacological agents. Trends in Endocrinology and Metabolism. Vol 8: 51-58pp.
- Valle-Hernández BL. *Et al.* 2010. Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern Mexico City. Science of the total environment. Vol 408: 5429-5438pp.
- Wang, C., Chang, C. Y., Chin, C. J. and Men, L. C. 1999. Determination of arsenic and vanadium in airborne related reference materials by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 392: 299–306pp.
- Wang YZ y Bonner JC. 2000. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. Am J Respir. Cell Mol. Biol. Vol. 22. 590-596pp.
- Waters, M.D. 1977. Toxicology of vanadium. In: Goyer, R.A. & Mehlman, M.A., ed. Advances in modern toxicology. Vol. 2. Toxicology of trace elements. New York, Wiley, 147-189pp.
- WHO (World Health Organization). 2000. Air Quality Guidelines for Europe, Copenhagen, Denmark. 2° edición. European Series, No 91.

- WHO (World Health Organization). 2001. Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds. UK. 53pp.
- Ye J. et al. 1999. Induction of TNF- α in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF- κ B and free radical reactions. *Molecular and cellular biochemistry*. Vol 198: 193-200pp.
- Zaporowska H y Wasilewski W. 1992. Haematological results of vanadium intoxication in wistar rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. Vol 101: 57-61 pp.
- Zhang Z, et al. 2002. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells
- Zhuowei L, Stonehuerner J, Devlin RB, Huang YCT. 2005. Discrimination of vanadium from zinc using gene profiling in human bronquial epithelial cells. *Environmental Health Perspectives*. Vol 113: 1747-1754pp.