



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

ALTERACIONES DE LAS POBLACIONES
CELULARES DEL TIMO DE RATONES EXPUESTOS
A PENTÓXIDO DE VANADIO INHALADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIOL. GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE

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

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 200



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.

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

- Al apoyo recibido por:
 - CONACYT (No de Becario 203411)
 - PAPIIT-DGAPA 2006-06

- A los miembros del Comité Tutorial:
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes
 - Dra. Gloria Soldevila Melgarejo
 - Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
 - Dra. Patricia Ostrosky Shejet
 - Dr. Enrique Ortega Soto

AGRADECIMIENTOS

- Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.
 - Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

- Al Laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.
 - Dra. Gloria Soldevila Melgarejo.

- Al Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular:
 - Téc. Acad. Verónica Rodríguez Mata
 - Téc. Acad. Judith Reyes Ruiz

- A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina:
 - M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada, Jefe de la Unidad
 - M.V.Z. Ismael Torres Saldaña
 - M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro

- A la Unidad de Microscopía Electrónica del Departamento de Biología Celular y Tisular:
 - Biol. Armando Zepeda Rodríguez
 - M.en C. Patricia Bizarro Nevares
 - Tec. Acad. Francisco Pasos Nájera

- A Nancy Carolina Piñón Zárate por su apoyo en el proceso de traducción.

DEDICATORIAS

A mi familia, especialmente a Bebito (BB), mi MONOWO, Pucho y Bicho Raro, ¡ustedes son lo más importante en mi vida! Es para ustedes esta tesis.

A mis hermanitas Mars, Michelita y Gabita, ¡por siempre estar conmigo cuando las necesité! chicas las quiero mucho.

A Tere por brindarme siempre todo tu apoyo y comprensión, mil gracias!!!

A Lau, Patito y Armando por brindarme toda la vida su apoyo y una sonrisa!

A Adrianita!! Te dedico esta tesis con todo mi cariño.

A Daniel y Cels, por todos esos divertidos momentos que pasamos juntos!

A la Dra. Soldevila, porque usted me enseñó muchísimas cosas! Mil gracias

A Padre (Miguel) y al Dr. Abad por todo su apoyo!! Muchas gracias

También dedico este trabajo a todos los chicos que están trabajando en el laboratorio: Sofía (Sofio), Nayeli, Estefania, Paola, Rubén, Carlos, Nelly, Jesús, Gumaro y Paulina.

ALTERACIONES EN LAS POBLACIONES CELULARES DEL TIMO DE RATONES EXPUESTOS
A PENTÓXIDO DE VANADIO INHALADO

INDICE

	Página
1. Resumen.....	7
1. Abstract.....	9
2. Introducción	
2.1. Contaminación atmosférica.....	11
2.2. Contaminación atmosférica y efectos en la salud.....	12
2.3. Efectos de los metales en el sistema inmune.....	14
2.3.1. Oro.....	14
2.3.2. Plomo.....	15
2.3.3. Arsénico.....	15
2.3.4. Zinc.....	16
2.3.5. Cromo.....	16
2.3.6. Berilio.....	17
2.4. Vanadio.....	18
2.4.1. Características Generales.....	18
2.4.2. Usos.....	19
2.4.3. Fuentes.....	19
2.4.4. Niveles de vanadio en la Ciudad de México.....	20
2.4.5. Vías de exposición.....	20
2.4.6. Toxicocinética.....	21
2.4.7. Efectos en la salud.....	22
2.4.8. Mecanismos de acción.....	23
2.4.9. Vanadio y sistema inmune.....	24
3. Timo	25
4. Antecedentes directos	28
5. Justificación	28
6. Hipótesis	28
7. Objetivos	
7.1. Objetivo general.....	29
7.2. Objetivos particulares.....	29
8. Método	29

	Página
9. Resultados	
9.1. Células positivas a CD4.....	31
9.2. Células positivas a CD8.....	31
9.3. Poblaciones DN, DP y SP.....	33
9.4. Células Doble Negativas.....	35
9.5. Selección Positiva.....	36
9.6. Células SP positivas a marcadores de activación (CD25, CD44).....	37
9.10. Tamaño y Granularidad (Forward/Scatter).....	38
9.11. Células Totales y Muerte por Apoptosis (TUNEL).....	40
9.12. Células positivas a CD19.....	41
9.12. Células positivas a MHCII.....	44
10. Discusión	
10.1. Distribución de timocitos y células MHCII+.....	45
10.2. Poblaciones tímicas.....	48
10.2.1. Células DN.....	48
10.2.2. Células DP.....	50
10.2.3. Células SP.....	56
11. Conclusiones.....	59
12. Referencias.....	60

RESUMEN

El pentóxido de vanadio es un contaminante atmosférico que se forma después de la combustión de gasolinas y aceites. De forma indirecta se ha observado que la concentración de vanadio en los habitantes de la Ciudad de México ha aumentado cuando se compararon los niveles de este metal en personas que vivieron en esta ciudad en los años 60's. Asimismo los niveles de vanadio en la atmósfera de la Ciudad de México han aumentado. En modelos con *in vitro*, se ha observado que diversas en múltiples sistemas, en especial en el sistema inmune, en el cual la exposición a vanadio induce muerte por apoptosis, necrosis, proliferación y activación de linfocitos, no obstante no se había observado el efecto de la inhalación del pentóxido de vanadio en el desarrollo de los linfocitos, por lo tanto decidimos estudiar el efecto del vanadio en las diversas poblaciones que conforman al timo. El timo es un órgano linfoide primario que se caracteriza por la presencia de una corteza y una médula. En la corteza del timo podemos encontrar a las células menos diferenciadas las denominadas células doble negativas (DN) (CD4⁻ CD8⁻). Las células DN luego migran hacia la región córtico-medular y maduran a células doble positivas (DP); en este estadio las células retículo epiteliales presentan antígeno a las células DP, si estas células reconocen con baja afinidad al TCR, las células DP sufren selección positiva y maduran a células SP, posteriormente migran a la médula del timo. Mientras que si las células DP reconocen con alta afinidad al TCR de las células epiteliales, morirán por apoptosis.

En este trabajo se utilizaron 84 ratones macho CD1 de 35 g de peso. Se formaron dos grupos, en uno de ellos, 24 ratones fueron expuestos a agua desionizada y se les consideró el grupo control, mientras que el otro grupo estuvo compuesto por 60 ratones que fueron expuestos a una concentración 0.02 M de V₂O₅ por vía inhalada en una caja de acrílico 2 veces por semana durante 1 mes. Primero se realizaron sacrificios de 5 ratones expuestos y 2 controles cada semana hasta completar un grupo de 28 ratones. Se tomó el timo y se congeló con medio tissue teck para la posterior realización de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de células positivas a CD4, CD8, CD19 y MHCII. Posteriormente se sacrificó otro grupo de 28 ratones (8 controles y 20 expuestos), se realizó tinción superficial con anti-CD4 APC, anti-CD8 Cy5, anti CD19Pe, anti-CD25 Fitc, anti-CD69 y anti- CD44Pe y se cuantificaron las diversas poblaciones con ayuda de

un citómetro FACSCalibur y del programa Cell Quest. Finalmente al timo del último grupo de 28 ratones se les realizó la técnica histológica convencional y TUNEL.

Por medio de la inmunohistoquímica para células MHCII⁺ se observó aumento en el tamaño de la médula, tal vez por proliferación de células epiteliales tímicas medulares, macrófagos o células dendríticas, no obstante es necesario conocer específicamente cual de estas células son las que proliferan más. También se observó que las células CD4⁺ y CD8⁺ se localizaban en la médula del timo, mientras que en la corteza sólo podían observarse células B (CD19⁺). Lo anterior puede deberse a que el vanadio induzca la liberación de quimiocinas implicadas con la formación de zonas B dependientes (CXCL13) en la corteza del timo, mientras que en la médula puede ser que se localicen las quimiocinas implicadas que normalmente se encuentran en el timo como CCL19, CCL21 y CCL12. Por otro lado mediante citometría de flujo se observó un aumento en el número de células DN, específicamente en la población DN4 lo cual puede deberse por la liberación de factores de sobrevivencia o señales de sobrevivencia derivadas del pre-TCR.; en el caso de las células DP, se observó una franca disminución, por lo que es posible que el vanadio haya inducido selección negativa en estas células, dado que se ha observado que este metal induce inhibición de proteínas fosfatasas, las cuales son de vital importancia en las vía de activación de linfocitos T. También se observó una disminución en el número de células DP y SP CD69⁺, lo cual indica una disminución en la selección positiva. Finalmente se encontró aumento en el número de células SP, así como aumento en los niveles de fluorescencia en los marcadores de activación CD25 y CD44; el vanadio es conocido por activar linfocitos de sangre periférica, por lo tanto es posible que el pentóxido de vanadio haya utilizado la misma vía de señalización para activar a estas células.

ABSTRACT

The vanadium compounds have been demonstrated to be important atmospheric pollutants, specially the Vanadium Pentoxide which is commonly found on Ambient Particulate Matter (PM) generated by combustion of coals and oils. Vanadium Pentoxide has been associated with elevated levels of cytokines, such as IL-8, IL-6 and $TNF\alpha$ *in vitro*. *In vivo*, we demonstrate that the inhalation of V_2O_5 induced loss of thymic cortex and medulla, as well as presence of B lymphocytes, both in thymus of mice. However, it is not known if vanadium effects the thymic cell populations. The thymus is a central lymphoid organ where the majority of T lymphocytes are generated from lymphoid progenitors. We can find different cell populations in thymus: the Double Negative cells (DN), also known as lymphoid progenitors; the Double Positive cells (DP), which express not only CD4 but also CD8 coreceptors, are the first cells to express a mature $TCR\alpha\beta$ and undergo positive and negative selection; finally, the Single Positive thymocytes (SP) ($CD4^+$ or $CD8^+$) -promoted by Positive selection done in DP thymocytes- that leave the thymus in a few days to circulate as mature cells.

In order to know the effect vanadium inhalation in thymus, two groups of mice were first selected. One of them (60 mice) was exposed to Vanadium Pentoxide inhalation twice a week for a month; the other one was the control group (24 mice). Next, Immunohistochemistry was performed to identify the localization of positive cells to CD4, CD8 or MHCII. After that, the percentages of DN thymocytes (from DN1 up to DN4), DP, SP, SP ($CD69^+$) (positive selection), and SP ($CD44^+$ or $CD25^+$) (activation markers) were quantified by flow cytometry. Finally, the localization of apoptotic cells was observed by TUNEL.

Data demonstrates that inhalation of V_2O_5 induces the deregulation of thymic architecture due to the localization of CD8 and CD4 positive cells *just* in the medulla *not* in cortex. On the other hand, $CD19^+$ cells (B lymphocytes) were found in the cortex. Chemokines guide the traffic of thymocytes; as a result, we consider Vanadium alters the production of chemokines in thymus, specially CCL19, CCL21 and CXCL12 which maintain the thymic architecture. The data also proves that Vanadium induces not only increasing percentages of DN4, SP and SP ($CD44^+$ or $CD25^+$) but also, decreasing percentages of DN3 and DP populations due to the vanadium properties; as it can inhibit

protein phosphatases, which are critical modulators in positive and negative selection and cell activation. Furthermore, Vanadium Pentoxide inhalation inhibited positive selection, as decreasing levels of SP and DP (CD69⁺) were quantified. As a result we believe vanadium induces negative selection in thymus.

INTRODUCCION

Contaminación atmosférica

Se denomina contaminación atmosférica a la presencia de elementos en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afectar estructuras y materiales, y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Vallejo et al. 2002). La contaminación atmosférica puede ser de dos tipos, la natural y la antropogénica. La contaminación por fuentes naturales es la ocasionada por erupciones volcánicas, por la erosión (Newman y McIntosh. 1991), desechos liberados por minas, etc (Freeman. 1998); mientras que la contaminación antropogénica ha acompañado al hombre desde hace aproximadamente 500 años, cuando se inició el desarrollo industrial (Briggs. 2003); no obstante en el siglo XX se presentaron los niveles más altos de contaminantes ambientales, principalmente en ciudades como México, Río de Janeiro, Ankara, Melbourne, Buffalo, Tokio y Moscú por nombrar algunas (Rosales- Castillo et al. 2001). Algunas de las causas en el aumento de los niveles de contaminantes atmosféricos en el siglo XX son las actividades domésticas, la agricultura (plaguicidas), transporte (aéreo y terrestre) (Briggs. 2003), sin embargo, las dos causas más comunes del incremento en la contaminación ambiental son el crecimiento industrial y el aumento en el número de vehículos automotrices en las megaciudades (Newman y McIntosh. 1991; Molina y Molina. 2004).

Los contaminantes que se liberan a la atmósfera pueden clasificarse en dos tipos, primarios o secundarios. Los primeros se refieren a las emisiones que están formadas por compuestos que están en la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o actividades humanas, por ejemplo el monóxido de carbono (CO) y el dióxido de azufre (SO₂); por otro lado, los contaminantes secundarios son aquellos que forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen contaminantes primarios, por ejemplo el ozono (O₃) y los sulfatos (Bravo y Sosa. 1997; Onursal y Gautam 1999). Los sulfatos fueron los primeros compuestos estudiados, dado que los niveles de éstos eran muy elevados en los años 60; hoy en día los contaminantes más estudiados son el ozono, las partículas suspendidas totales (PST) (Molina y Molina. 2004), benceno, solventes, compuestos orgánicos y otros (Briggs. 2003).

En la Ciudad de México, el mayor problema lo constituyen las PST (Molina y Molina. 2004) dado que los niveles permitidos son de $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ y se ha monitoreado niveles de hasta $260\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Mugica *et al.* 2001)), en las cuales se incluyen sustancias que se desprenden del ambiente como el polvo de los suelos erosionados o caminos sin asfaltar o que se forman en la atmósfera por reacciones químicas (contaminantes secundarios). Se clasifican de acuerdo a su tamaño, i.e, PM10 o con un tamaño menor o igual a $10\mu\text{m}$, las PM2.5 μm y las partículas ultrafinas con un diámetro dinámico menor a $1\mu\text{m}$; por su origen antropogénico o geológico; por la fuente, productos de la combustión o desechos de automóviles; o por sus propiedades fisicoquímicas como la solubilidad (Englert. 2004). Las partículas PM10 están compuestas principalmente de sílice, titanio, aluminio, hierro y cloruros, mientras que las PM2.5 están formadas de productos derivados de la combustión de gasolinas y aceites e incluyen carbono, plomo, dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y vanadio. Las partículas ultrafinas son las que se forman por la quema de productos agrícolas y forestales y por la combustión de gasolina y diesel (INE. 1996; Vallejo *et al.* 2004).

Contaminación atmosférica y efectos en la salud

Existe una íntima relación entre los contaminantes ambientales y la salud, no obstante para que los contaminantes tengan un determinado efecto en la salud de los organismos, éstos deben estar expuestos a una determinada dosis durante un cierto tiempo, y para que lo anterior suceda los contaminantes deben dispersarse en el ambiente (en el agua, suelo y aire) para que los organismos estén en contacto con ellos, de manera que existe una cadena de causa y efecto (Briggs. 2003) (Fig. 1). Las megaciudades son un claro ejemplo del fenómeno causa y efecto, puesto que los habitantes de las grandes urbes respiran diariamente diversas dosis de emisiones contaminantes (principalmente metales) durante el tiempo en el que se encuentren en esos lugares, que en muchos casos es toda la vida (Molina y Molina. 2004). Un claro ejemplo es la Ciudad de México, en donde se realizó un estudio en niños que sólo habían vivido en esta ciudad. Se observó que las personas que estaban expuestas a concentraciones muy altas de partículas contaminantes (0.48ppm) presentaban epistaxis, nariz seca, tos, insuficiencia respiratoria y dolor de pecho, mientras que los niños que habitaban una zona con bajos índices de contaminación (0.08ppm) no presentaron lo anterior (Calderón *et al.* 2000).

De todos los contaminantes que existen, los metales son a los que están expuestos la mayor parte de la población, además que cada vez son mayores las concentraciones de los metales en el ambiente (Järup. 2003). El cadmio, el plomo y el arsénico han sido hasta ahora los metales más estudiados, dado que, junto con el vanadio, son los metales más abundantes en el ambiente (Järup. 2003). Estudios epidemiológicos han indicado que el cadmio puede provocar disfunción tubular en los riñones, lo cual induce la aparición de proteínas en la orina; osteoporosis y cáncer. Mientras que el arsénico induce hepatomegalia, hemólisis y cáncer de pulmón, riñón y vejiga (Järup. 2003; Nadal, *et al.* 2004) y el plomo, uno de los contaminantes con gran impacto en la Ciudad de México en los 90's, puede producir dolor de cabeza, irritabilidad, dolor de estómago, dificultad en la concentración en niños, psicosis, confusión, pérdida de la conciencia y anemia microcítica (Vallejo, *et al.* 2002; Järup. 2003).

Los mecanismos de acción de los metales son muy variados, pero en general están relacionados con el daño en los sistemas enzimáticos, que ocurre cuando los iones metálicos inducen cambios en la configuración tridimensional de las proteínas, lo cual provoca un cambio o pérdida de sus funciones catalíticas. Otros efectos son la activación o inhibición de factores de transcripción por estrés oxidante (Ghio y Samet, 1999), peroxidación de lípidos (Ohba *et al.* 1994; Acevedo Nava. 2005), apoptosis y necrosis (Thomson y McNeill. 1998)

Por otro lado, también existe la exposición crónica a varios contaminantes, como es el caso de la exposición a las Partículas Suspendidas Totales (PST) (Briggs. 2003), las cuales inducen en niños y pacientes con enfermedades cardiorrespiratorias y asma aumento de la morbilidad por enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía (Bumett *et al.* 1999; Peters *et al.* 2001) y mortalidad por cardiopatía isquémica (Utell y Samet. 1993). También se ha observado que las partículas suspendidas inducen la generación de radicales libres, daño en el ADN, liberación de citocinas inflamatorias (Fernández, *et al.* 2003) y enfermedades respiratorias crónicas, cardíacas e inclusive cáncer (Rosales-Castillo *et al.* 2001; Englert. 2004).

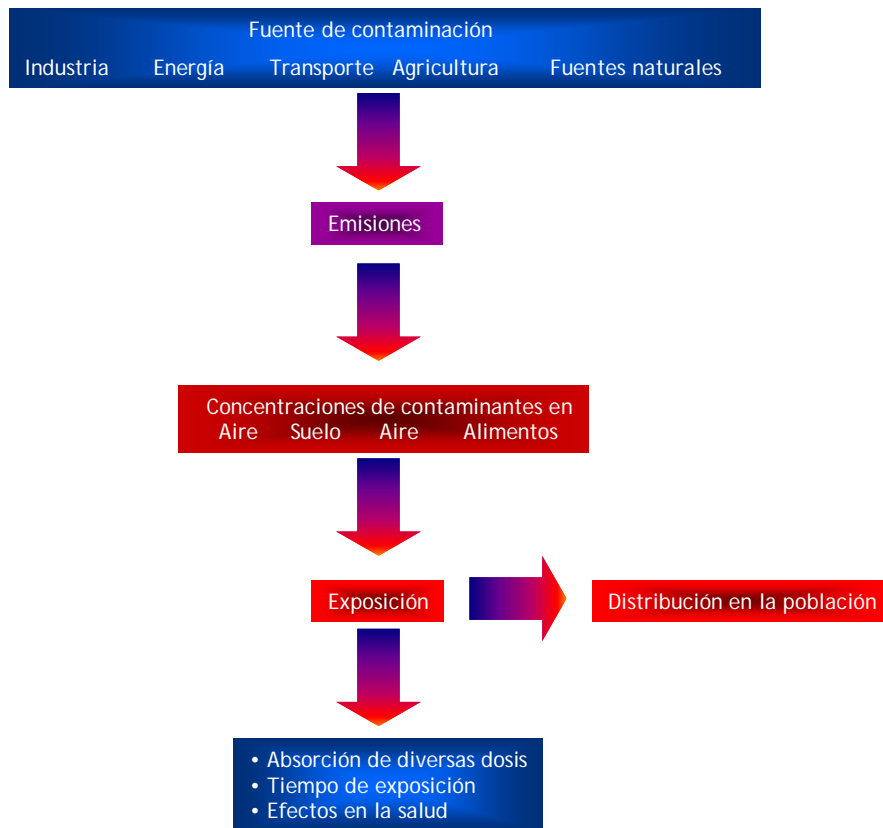


Fig. 1. Esquema que ejemplifica la manera en que los contaminantes ambientales se forman, se dispersan, y posteriormente la población es expuesta a los contaminantes, para finalmente inducir un efecto en la salud de los individuos.

Efecto de los metales en el sistema inmune

- Oro

Se ha observado que compuestos derivados del oro como Auranofila y el tiomalato de sodio- oro inhiben a la proteína cinasa C (Parente et al. 1989; Wong et al. 1990; Balasubramanyam et al. 1995), la proliferación de linfocitos T CD4+, la producción de IL-2 e IL-2R y aumentan la expresión de CD3, aunque tiomalato inhibe la fosforilación de la cadena CD3 γ (Hashimoto et al. 1992; Hashimoto et al. 1994). Otros compuestos como la cloroquina de oro inhiben la liberación de IL-6 y TNF α por linfocitos T (Navarro et al. 2006), mientras que los compuestos de oro con valencia +3, inducen la activación de NF- κ B en los linfocitos CD4+ (Lewis et al. 2005; Piñón Zárata et al. 2007).

- **Plomo**

Al plomo se le considera un potente inhibidor de la proteína cinasa C *in vivo* (Rajanna *et al.*, 1995; Reinholz *et al.*, 1999; Tonner and Heiman, 1997), no obstante se ha observado que el plomo provoca activación de PKC en cultivos celulares (Jadhav *et al.*, 2000; Schanne *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1999). Asimismo, el plomo provoca la activación del factor NF- κ B en linfocitos CD4⁺ (Pyatt *et al.*, 1996),

Los trabajadores ocupacionalmente expuestos a plomo tuvieron un decremento los niveles de linfocitos NK CD16+, CD4+CD45RA+ (linfocitos T naive) y CD3+CD45RO+ (Células T de memoria) (Boscolo *et al.* 1997; Sata *et al.* 1997; Tanigawa *et al.* 2004). La liberación de citocinas inflamatorias también es alterada después de la exposición a plomo; en un estudio con trabajadores expuestos a este metal, se observaron niveles altos de IFN γ en sangre periférica (Mishra *et al.* 2003); no obstante Kimber *et al.*, indicaron que el efecto del plomo en las ratas es muy distinto al encontrado en humanos, puesto que ratas que fueron expuestas a 100 o 1000ppm de plomo no mostraron ningún cambio en el nivel de IFN γ ni en los niveles de linfocitos (Kimber *et al.* 1986).

Por otro lado, se ha revelado que diversos metales afectan la integridad de la membrana celular en especial de los linfocitos T, B y monocitos; puesto que el plomo provoca la liberación de radicales libres y acumulación de partículas en su superficie celular, aunque en el caso de los monocitos también se encontraron partículas en su interior, lo cual posiblemente se debió a la fagocitosis de partículas con plomo (Steffensen *et al.* 1994).

- **Arsénico**

El arsénico es conocido por inducir la formación de especies reactivas de oxígeno y por ser inmunotóxico (Wang *et al.* 1996). El arsénico interfiere con la presentación de antígenos en el bazo, la proliferación de linfocitos (Sikorski *et al.* 1991; Savabieasfahani *et al.* 1998), además estudios *in vitro* e *in vivo* han dado a conocer que el arsénico (1-0 μ M) es pro-apoptótico en linfocitos T (De la Fuente *et al.* 2002; Wang *et al.* 1996;

Sarukai. 2003). El arsénico induce la liberación de IL-8, IL-1 α , TNF α , TGF α , factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), así como la activación de NF-k β y AP-1 (Akagawa, 2002; Fassbender *et al.* 2004; Vega *et al.* 2001). Por otro lado también se ha demostrado que el arsénico induce la muerte de células DP y DN en el timo (Nohara *et al.* 2008)

- **Zinc**

Se ha observado que el zinc induce un aumento en la expresión de moléculas que indican señalización en linfocitos, como CD69 y CD23, no obstante se observó que inhibía la expresión de CD3 en linfocitos T (Petanova *et al.* 2006). Otros estudios también indicaron que el zinc induce la expresión de CD98 in vitro (Petanova *et al.* 2002) y la liberación de IL-4 (Petanova *et al.* 2000), IFN γ (Boscolo *et al.* 2005) e IL-8 (Samet *et al.* 1998).

Asimismo se han realizado estudios del efecto del zinc en el timo, se ha visto que este elemento a muy bajas concentraciones inhibe la apoptosis en este órgano (Chukhlovi *et al.* 2001), mientras que la deficiencia de zinc aumenta el número de células apoptóticas en el timo, especialmente las células doble positivas en animales jóvenes (Fraker *et al.* 1977; Chrest *et al.* 1995; Provinciali *et al.* 1998).

- **Cromo**

El efecto del cromo en el sistema inmune ha sido estudiado en personas que han estado expuestas a cromato de plomo; se observó que estas personas mostraban una reducción del 30 al 50% en los niveles de linfocitos T CD4+CD45RO (linfocitos naive) y CD5 CD19 B y natural killer (Boscolo *et al.* 1997; Tanigawa *et al.* 2004). Asimismo, estudios en niños y trabajadores expuestos a cromo hexavalente mostraban una disminución en los niveles de linfocitos CD3+ y CD4+ en sangre periférica (Cirla *et al.* 1993; Chuchlovi *et al.* 2001; Tanigawa *et al.* 2004). Por otro lado, estudios comparativos en personas con y sin implantes con altas concentraciones de cromo, indicaron que el cromo induce un aumento en la concentración de citocinas en suero como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y prostaglandinas compa (Kim *et al.* 1994; Goodman *et al.* 1998; Masui *et al.* 2005).

Finalmente el cromo puede tener efectos antiapoptóticos en el timo (Chuklovi *et al.* 2001)

- **Berilio**

El berilio es conocido por causar una enfermedad crónica denominada beriliosis, la cual se caracteriza por aparecer 10 años después de la exposición al berilio (Kreiss *et al.* 1993; Kreiss *et al.* 1996; Henneberger *et al.* 2001). La beriliosis se caracteriza por la presencia de alveolitis y granulomatosis, dada la acumulación de linfocitos T CD4+ y la secreción de citocinas Th1 (Tinkle *et al.* 2006; Fontenot *et al.* 2002; Pott *et al.* 2005), la presencia de quimiocinas como IP-10 (Agostini *et al.* 1998), la proliferación de linfocitos CD4+ CD45RO+ (células de memoria), la expresión de moléculas coestimuladoras características de estadios tardíos de activación como CD80 y CD86 y la liberación de IFN γ (Chou *et al.* 2005).

También se ha estudiado el efecto del berilio en personas que no desarrollaron beriliosis después de la exposición a berilio; se ha observado que la exposición a berilio reduce la liberación de IL-6 y aumenta la de IL-10, puesto que este metal está relacionado con la activación de p45 y p38, las cuales están íntimamente involucradas en la producción de las citocinas antes mencionadas (Chaudhary *et al.* 2004),

Después de la pequeña reseña de los efectos de los metales en el sistema inmune, podemos observar que sólo se ha estudiado el efecto del cromo y el zinc en el desarrollo de los linfocitos T, no obstante sólo el cromo es conocido por ser un contaminante ambiental.

Podemos encontrar otros metales cuyos niveles han aumentado en el aire, como es el caso del vanadio (Fortoul *et al.* 1996; Fortoul *et al.* 2002), el cual es el principal contaminante que es liberado después de la combustión de gasolinas, en especial de la mexicana. Asimismo, sólo se conoce algunos efectos del vanadio en el timo (González Villalva. 2005), aunque no se conocen los efectos del vanadio en las principales poblaciones celulares del timo, por lo tanto es importante conocer un poco acerca del vanadio y del timo, los cuales son los principales objetivos de este trabajo.

Vanadio

- Características generales

En 1801 Andrés Manuel del Río descubrió al vanadio en México y lo llamó pancronium (García- Guevara, 1996). Mas adelante, inspirados por la variedad de colores generados por este metaloide en solución, Sefstrôm y Berzelius llamaron a este nuevo elemento vanadio, en honor a la diosa Vanadis en 1830 (Morinville *et al.* 1998).

El vanadio es el producto principal de la combustión de gasolina y petróleo, dado que es uno de los elemento más abundantes en el petróleo (WHO. 2000; Mugica *et al.* 2002). Por lo tanto se encuentra en altas concentraciones en las TSP (se liberan a la atmósfera 64000 ton de vanado al año) (WHO. 2000) y se le ha relacionado con varios trastornos en la salud (Chen *et al.* 2001).

Es un metal grisáceo y por sus características químicas, se identifica por ser el primer elemento del quinto grupo de la tabla periódica de los elementos. Presenta diferentes estados de oxidación que van desde el -1 a +5, pero se encuentran con mayor frecuencia +3, +4 (vanadil) y +5 (vanadato) (Byczkowski y Kulkarni. 1998; Thomson y McNeill. 1998; WHO, 2000; Ivancsits *et al.* 2002,). El compuesto de vanadio más abundante, más utilizado (por ejemplo, en la formación de aleaciones) (WHO, 2000) y más tóxico es el pentóxido de vanadio (Morinville *et al.* 1998), también conocido como anhídrido vanádico ó pentóxido de divanadio y existe en un estado pentavalente como cristales amarillos, rojos e inclusive verdes (WHO. 2000)

Debajo de un pH de 3.5, el vanadio existe como vanadil (VO^{2+}), mientras que en soluciones alcalinas el orto- vanadato es la forma prominente. En soluciones neutras, el vanadio se comporta de forma pentavalente ($H_2VO_4^-$) (García- Guevara. 1996), el cual es el compuesto más tóxico, ya que puede entrar con facilidad a la célula donde es reducido a vanadil. Posteriormente el vanadil interactúa con las moléculas celulares, para más tarde involucrarse en la generación de radicales libres (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits *et al.* 2002). La conversión de vanadato a vanadil in vivo no es instantánea, el proceso puede tomar de 15 a 30 minutos después de la exposición (Thomson y McNeill. 1998).

- Usos

Son muy variados los usos que tiene el vanadio, uno de ellos son los fines terapéuticos, ya que los compuestos de vanadio (por ejemplo, el metavanadato de sodio) han sido administrados como tratamiento contra la anemia, tuberculosis, diabetes, sífilis (Morinville *et al.* 1998; Thomson y McNeill. 1998; Ivancsits *et al.* 2002), así como para la disminución de los niveles de colesterol (Fortoul *et al.* 2002) y triglicéridos en sangre (Morinville *et al.* 1998; Thomson y McNeill. 1998; Mukherjee *et al.* 2004), no obstante el uso de los distintos compuestos de vanadio ya no son utilizados, dado su alto grado de toxicidad.

Por otro lado, se utiliza para fabricar herramientas e implantes ortopédicos, como revelador de fotos, semiconductor, pigmento en cerámicas, producción de ácido sulfúrico o como filtro contra los rayos UV en algunos anteojos (WHO. 2000; Ivancsits *et al.* 2002).

- Fuentes

Una de las fuentes de vanadio es el petróleo, siendo el venezolano (80% de especies de vanadio) y el mexicano los que contienen las más altas concentraciones (Byczkowki y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits *et al.* 2002). Por lo general, el petróleo crudo contiene impurezas metálicas y es en ellas en donde podemos encontrar al vanadio en forma de un complejo organo-metal (US. EPA, 1991a,b). Igualmente, durante la combustión de aceites, carbón y gasolinas (los cuales pueden contener 0.3 a 1180 ppm de vanadio) (Ress *et al.* 2003); en calderas, calentadores de agua y hornos (Byczkowski y Kulkarni. 1998; Ivancsits *et al.* 2002), el vanadio se desprende en forma de pentóxido de vanadio sobre los residuos sólidos (hollín y ceniza), los cuales pueden contener de 1 al 60% de pentóxido de vanadio (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000). Asimismo, el vanadio se libera durante las erupciones volcánicas, la erosión eólica y en los aerosoles marinos (Fortoul *et al.* 2002; WHO 2000; Mugica *et al.* 2001; Baran. 2003).

Es importante señalar que las fuentes antropogénicas son las principales generadoras de vanadio (García Guevara. 1996; WHO. 2000), por lo tanto es el personal ocupacionalmente expuesto el que está en contacto con las concentraciones más altas

de este metal (Al-Bayati *et al.* 1992; Byczkowki y Kalkarni. 1998; WHO, 2000; Ivancsits *et al.* 2002). Dado lo anterior, el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) recomendó que el límite de exposición a vapores y polvos de V₂O₅ sea 0.05mg/m³ por un tiempo de 15 minutos (U.S. EPA. 1991b), no obstante, la World Health Organization dio a conocer que existen personas ocupacionalmente expuestas a concentraciones que van desde 0.05 a 60mg/m³ (WHO. 2000).

Otra fuente importante de vanadio son los alimentos, especialmente los mariscos, la pimienta y los hongos; y diariamente consumimos una dosis aproximada de 10µg por día en los alimentos y una dosis de 100µg/ litro en el agua (U.S.EPA, 1991b; WHO, 2000; Ivancsits *et al.* 2002).

- **Niveles de vanadio en la Ciudad de México**

En el caso de México, solamente se han hecho estudios en el D.F. Mugica, *et al.*, reportaron que la concentración de vanadio ha aumentado con el paso del tiempo, además señalan que las concentraciones de vanadio en las diferentes zonas del Distrito Federal van de 0.13µg/m³ a 0.24µg/m³ (Riveros- Rosas, *et al.* 1997).

De la misma forma se conoce de forma indirecta, que la concentración de vanadio en la Ciudad de México aumentó de forma significativa a través de un estudio realizado por Fortoul y cols., en el 2002.

- **Vías de exposición**

La vía de absorción más importante es la inhalada, dado que se puede absorber hasta el 35% de la dosis inhalada de pentóxido de vanadio (U.S. EPA. 1987), lo cual es muy importante puesto que el vanadio se ha convertido en uno de los principales contaminantes del aire en las grandes urbes (Al-Bayati *et al.* 1992; Byczowski y Kulkarni. 1998). Mientras que la vía de exposición más importante es la enteral, sin embargo, la absorción del vanadio en el tracto intestinal es muy escasa (solo se absorbe del 0.5 al 2% de la cantidad ingerida) (WHO, 2000), además, no hay que olvidar que la absorción del vanadio en el tracto digestivo, también depende de la dieta (ingestión de carbohidratos, fibras, proteínas, elementos traza, agentes quelantes y electrolitos) (Thomson *et al.*

1998). Además, el vanadio también es absorbido por la piel cuando se encuentra en forma de sales en solución acuosa, no obstante, la absorción es muy pobre (U.S. EPA. 1987).

- **Toxicocinética**

Los efectos tóxicos del vanadio dependen del compuesto, la dosis y la ruta de administración (Evangelou. 2002). Los óxidos de vanadio pueden ser absorbidos con facilidad en los pulmones y con mayor dificultad en los intestinos (Thomson y Kulkarni. 1998; Byczkowski y McNeill. 1998; WHO, 2000). Su distribución en la circulación es rápida (1- 11/2) (WHO. 2000) y puede experimentar autooxidación en presencia de oxígeno (Baran. 2003), provocando un aumento en los niveles de vanadato en el plasma (García-Guevara. 1996; Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000), aunque también se puede encontrar vanadil en concentraciones menores (Baran. 2003). El vanadio en el plasma se puede unir a albúmina, transferrina y hemoglobina (Thomson y McNeill. 1998), las cuales lo transportarán a todo el organismo; sin embargo, existen órganos en los que se acumulan altas cantidades de este metal como son los huesos (Baran. 2003), riñones, hígado, pulmones (Thomson y McNeill. 1998) y bazo (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO. 2000; Mukherjee. *et al.* 2004) .

Cuando el vanadio ya se encuentra en los órganos, generalmente se introduce en la célula gracias al mecanismo de transporte de fosfatos (Baran. 2003), posteriormente es reducido por glutatión, ascorbato y cisteína, lo que provoca un alto nivel de vanadilo en los órganos (García- Guevara, 1996; Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000) y que éste se una a catecolaminas u otros péptidos (Thomson y McNeill. 1998; Mukherjee. *et al.* 2004) (Fig. 2).

El vanadio que no es absorbido se elimina principalmente en la orina y en menor grado en heces, con una cinética de eliminación bifásica compuesta de una fase rápida (15 a 40 horas) y una fase lenta terminal (40 a 50 días), que generalmente se utiliza como monitor biológico en los trabajadores que están expuestos a vanadio (Byczkowski y Kulkarni. 1998; WHO, 2000; Mukherjee, *et al.* 2004) (Fig. 2).

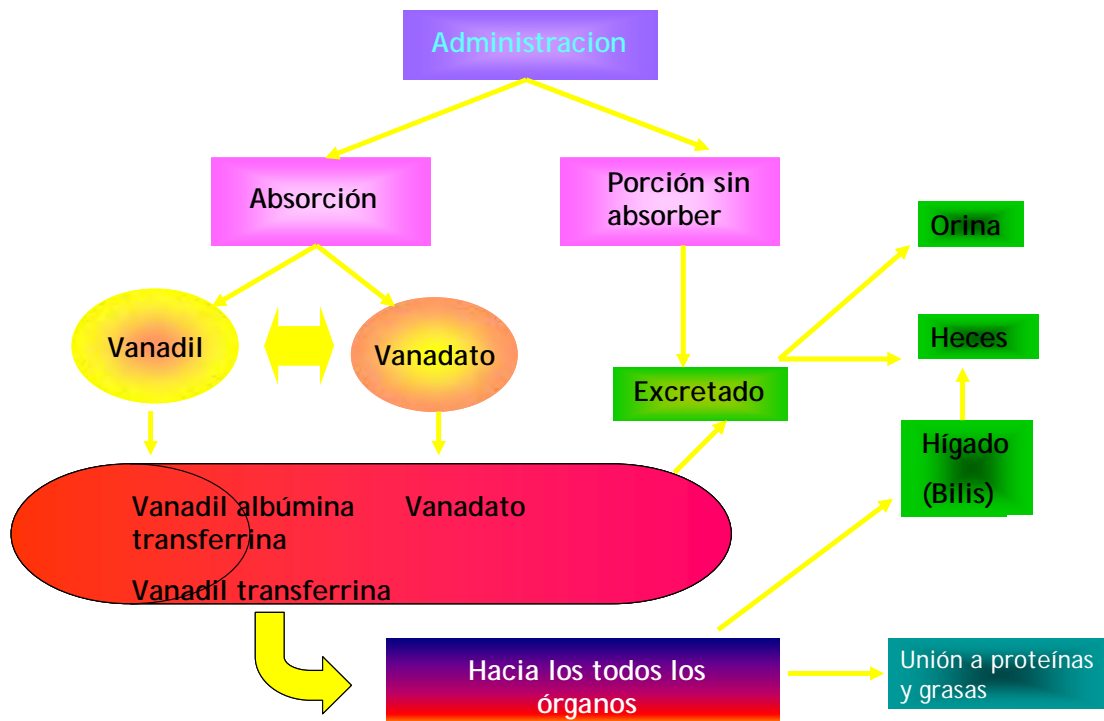


Fig.2. Toxicocinética del vanadio

- Efectos en la salud

La inhalación aguda de polvo con altas concentraciones de vanadio puede causar en los humanos daños en el tracto respiratorio, irritación de pulmones, congestión, estornudos, dolor de pecho y garganta (Byczkowski y Kulkarni. 1998); así como un aumento en la incidencia de cáncer en residentes de ciertas áreas metropolitanas (Ramírez, *et al.* 1997)

También se han llevado a cabo estudios en personas ocupacionalmente expuestas a pentóxido de vanadio, en donde se reportan alteraciones como: necrosis en hígado, lengua verde, pérdida de peso (Al Bayati *et al.* 1992), irritación de la piel, del tracto respiratorio, cambios en el número de células inflamatorias (Carter *et al.* 1997; Woodin *et al.* 1998; Ivancsits *et al.* 2002) e irritación de los ojos (Chen *et al.* 2001), aunque no se mostraron cambios en el conteo hemático (Ivancsits *et al.* 2002).

Además de los estudios realizados en las personas ocupacionalmente expuestas, se han realizado estudios en voluntarios, quienes fueron expuestos a 0.1g de vanadio durante 8 horas. Se observó exceso en la producción de moco y tos (WHO. 2000)

- **Mecanismos de acción**

El vanadio puede causar efectos genotóxicos puesto que se han observado células con micronúcleos en médula ósea, linfocitos (Leonard y Gerber. 1998) y fibroblastos (Ivancsits et al. 2002), además de aberraciones cromosómicas y un aumento en la frecuencia de células poliploides y binucleadas en linfocitos humanos tratados con V_2O_5 (Roldan y Altamirano. 1990; Ramírez et al. 1997; Rodríguez Mercado. et al. 2003), metavanadato de sodio y metavanadato de amonio (WHO. 2000). Estos efectos pudieran ser resultado de la interacción del vanadio con la polimerización de tubulinas, lo que resultaría en alteraciones en la formación y función del huso mitótico (Ramírez. *et al.*, 1997; Ivancsits. *et al.* 2002) y la acumulación de células en fase G2 lo que impide que se lleve a cabo la mitosis (Morinville. *et al.* 1998; Zhang. et al. 2001)

En lo que se refiere a las transformaciones neoplásicas se demostró que éstas aparecen después de una larga exposición a vanadio, como lo demostraron estudios en los que se expusieron ratones machos y hembras a pentóxido de vanadio (2 y 4mg/m³) durante 1 y 2 años. Como resultado se mostraron adenomas, papilomas (WHO. 2000; Chen. *et al.* 2001) y carcinomas (Ress. *et al.* 2003). De la misma forma, el vanadio puede provocar fibrosis, proliferación celular (Morinville. *et al.* 1998; Ress. *et al.* 2003) y efectos antiapoptóticos (Chen. *et al.* 2001). Sin embargo, se ha observado que este elemento también puede inducir apoptosis y necrosis (Thomson y McNeill. 1998; Ye *et al.* 1999; D´Cruz y Uckun. 2000; Chen *et al.* 2001; D´Cruz y Uckun. 2002; Huang *et al.* 2003; Aragón *et al.* 2005), las cuales pueden ser desencadenadas por la liberación de radicales libres y peroxidación lipídica; o por las propiedades miméticas con el grupo fosfato que tiene este metal (Morinville *et al.* 1998).

En el aspecto bioquímico, se ha estudiado que el vanadato se acumula en el espacio intermembranal de las mitocondrias y bloquea la transmisión de electrones a través de la cadena respiratoria, lo que causa la inhibición de la primera unión de NADH y sus sustratos (Byczkowski y Kulkarni. 1998), también provoca cambios en la actividad de

Na⁺-, K⁺-ATPasa, Ca-ATPasa, adenilato cinasa, ribonucleasas, fosfofructocinasas y Glucosa-6-fosfato; y la reducción en los niveles de coenzima A en el hígado y de coenzima Q en la mitocondria (WHO, 2000).

- **Vanadio y el Sistema Inmune**

Estudios *in vitro* han dado a conocer que algunas especies de vanadio (p.e. pervanadato y pentóxido de vanadio), inducen la activación de linfocitos (Shen *et al.* 2001), dado que se ha demostrado que este metal inactiva fosfatasa y activa cinasas (Evangelou. 2002; Mukherjee *et al.* 2004), tal es el caso de las proteínas MAP cinasas (Samet *et al.* 1998; Wang y Bonner. 2000), las cuales están implicadas con la activación de diversos factores de transcripción como NF-kb, c-Jun, ATF-2 y AP-1 (Byczkowski y Kukulni. 1998; Huang *et al.* 2000; Wang y Bonner. 2000; Jaspers *et al.* 2000). El vanadio también induce la activación de otras proteínas como PLC γ y otros factores de transcripción como N-FAT, así como liberación de calcio (Huang *et al.* 2000), los cuales son característicos en la activación de linfocitos (Abbas y Lichtman. 2004)

Estudios realizados en personas ocupacionalmente expuestas a sales de vanadio y TSP (Carter *et al.* 1997; Samet *et al.* 1998; Byczkowski y Kulkarni. 1998; Woodin *et al.* 1998; Huang *et al.* 2000; Vandenplas *et al.* 2002), así como estudios *in vitro* (Shen *et al.* 2001; Lee *et al.* 2001), dieron a conocer que éstos provocan la liberación de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8) y factores de crecimiento (TNF- α ; IFN- γ) así como elevados niveles de leucocitos. La acción inmunomoduladora del vanadio además se hizo presente cuando se observó que podía provocar la activación y proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, células B y macrófagos en aves (Quereshi *et al.* 1999) y en estudios realizados *in vitro* (Krejsa *et al.* 1997; Shen *et al.* 2001). Por otro lado, por medio de estudios realizados en ratones, Cohen en 1986, observó que el metavanadato de amonio vía intraperitoneal provocaba un decremento en la activación de macrófagos, mientras que Al-Bayati en 1992 observó necrosis en bazo, timo y ganglios linfáticos en ratones después de la exposición a metavanadato de amonio vía intraperitoneal.

A pesar de todos los estudios llevados a cabo en linfocitos expuestos a vanadio, no se ha descrito como se comportan las diversas poblaciones que conforman al timo por lo tanto se decidió estudiar el efecto de la inhalación de este metal en el timo.

Timo

El timo es el lugar donde maduran los linfocitos T. Es un órgano bilobulado que se localiza en el mediastino superior. Los dos lóbulos están rodeados por una delgada cápsula de tejido conectivo que emite numerosos tabiques que se extienden desde la cápsula hacia el interior del órgano y dividen a cada uno de los dos lóbulos en numerosos lobulillos. Cada lobulillo se divide en una zona periférica más oscura y rica en células que se denomina corteza, y otra más clara con un menor número de células denominada médula (Fig. 3). En la corteza del timo encontramos a las células menos diferenciadas, las denominadas células Dobles Negativas ($CD4^- CD8^-$), que son aproximadamente el 5% de las células en el timo, y a las células Dobles Positivas ($CD4^+ CD8^+$) (aproximadamente el 5% de las células en el timo), mientras que en la médula se localizan las células Simple Positivas ($CD8^+$ o $CD4^+$) las cuales son células T maduras y se caracterizan por ser el 15% de la población celular total (Savino et al. 2004).

Tanto la corteza como la médula tienen un estroma compuesto por células tímicas epiteliales que presentan niveles elevados de MHC I y II, no obstante en la médula podemos encontrar células con altos niveles de MHC II. Otras células que podemos encontrar son las células dendríticas interdigitantes y los macrófagos, los cuales también presentan niveles elevados de moléculas MHC I y MHC II. Todas las células anteriormente mencionadas están involucradas en la formación de un microambiente para la maduración y selección de linfocitos T (Geneser. 2005; Takahama. 2006)

El desarrollo de los timocitos recae en una serie de eventos intracelulares que regulan la diferenciación celular, proliferación y sobrevivencia. Este proceso puede ser estudiado por la presencia o ausencia de marcadores extracelulares como CD4, CD8, CD25 y CD44 (Shortman y Wu. 1996; Germain. 2002; Zúñiga. 2004) Los progenitores tempranos tímicos no expresan las moléculas CD4 y CD8, se les denomina dobles negativos (DN) y se encuentran en la corteza del timo. El estadio DN se subdivide en cuatro categorías: DN1, DN2, DN3 y DN4. El estadio DN1 se caracteriza por la expresión de CD44 (son $CD44^+ CD25^-$). La maduración de este grupo de células da origen al estadio DN2 ($CD44^+ CD25^+$), luego a DN3 ($CD44^- CD25^+$) y finalmente al estadio DN4 ($CD44^- CD25^-$). El primer punto de verificación en el desarrollo de los timocitos, denominado selección β , ocurre en el estadio DN3 y está relacionado con el rearreglo y expresión del gen

TCR β , el cual permite la formación del complejo pre-TCR (Dudley *et al.* 1994; Borowski *et al.* 2002). Aquellos timocitos que no sufrieron de un rearreglo correcto mueren por apoptosis durante el estadio DN3 (Falk *et al.* 2001; Michie *et al.* 2002). Señales subsecuentes, provenientes de pre-TCR y el microambiente local, inducen la proliferación y diferenciación de los timocitos DN a estadio doble positivo (CD4⁺ CD8⁺ DP), las cuales luego migran hacia la región córtico-medular (Takahama. 2006). Sólo un pequeño porcentaje de las células DP tendrán un complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 funcional que podrá interactuar con moléculas MHC, que presentan péptidos propios, y que son expresadas por células epiteliales tímicas y células presentadoras de antígeno. Si la interacción entre TCR y MHC es de muy alta afinidad, los timocitos sufren de selección negativa, dado que se postula que una señal muy alta dada por TCR en los timocitos DP puede significar que el TCR puede ser autorreactivo (Palacios y Weiss. 2004). Pero si la interacción entre TCR-MHC-péptido es de baja afinidad, las células sufren de selección positiva y maduran a células simple positivas (CD4 o CD8) CD69⁺ y migran hacia la médula del timo. Por otro lado, si las células DP no tienen una interacción TCR-MHC-péptido mueren por negligencia (Palacios y Weiss. 2004).

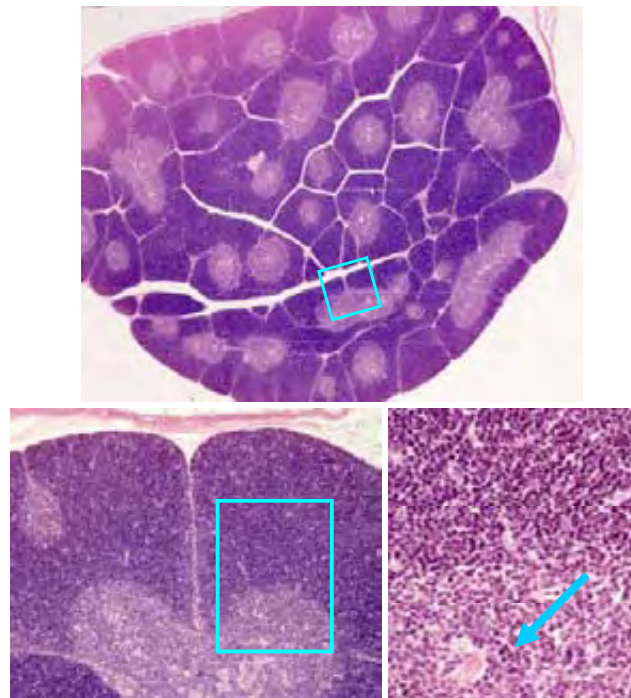


Fig. 3. Fotomicrografías de un timo de ratón. A) se muestran diversos lobulillos con corteza y médula. B) Se observa claramente la corteza y la médula. C) Zona cortico-medular y un corpúsculo de Hassal (flecha).

Existe otro punto de control, en el que las células dendríticas o las células epiteliales medulares presentan antígenos a los timocitos SP; sólo aquellos timocitos que reconocen con baja afinidad al complejo MHC- péptido serán los más aptos para madurar y migrar hacia los tejidos linfoides periféricos, mientras que aquellos timocitos que reconocieron al complejo péptido-MHC con alta afinidad morirán por apoptosis (Starr. 2003; Takahama. 2006) (Fig. 4)

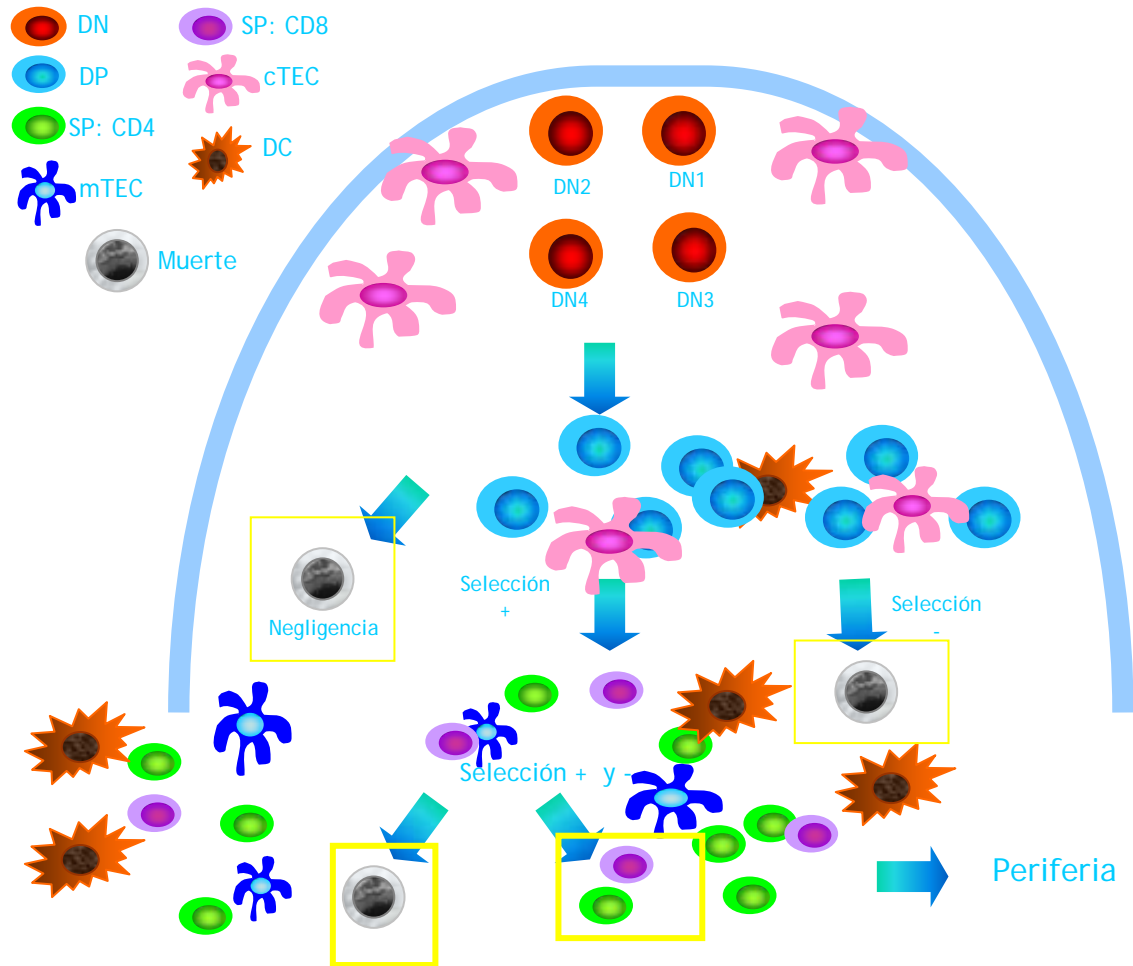


Fig. 4. Poblaciones de linfocitos en el timo y selección positiva y negativa.

Antecedentes directos

En nuestro grupo de trabajo se ha observado que la inhalación de pentóxido de vanadio induce diversas alteraciones en órganos linfoides de ratones. En el bazo induce proliferación difusa y nodular de linfocitos, mientras que en el timo se reportó pérdida en la relación corteza y médula, además de presencia de folículos linfoides primarios y secundarios (González Villalva. 2004; Piñón Zárata. 2008).

Justificación

El vanadio es un metal que tiene cada vez más importancia como contaminante atmosférico en la Ciudad de México, puesto que los niveles de este elemento han aumentado en distintas zonas de la ciudad (Mugica, *et al.* 2002). Asimismo, se demostró que la concentración de vanadio en personas que habitaron el valle de México en los 90´s fue mayor a las que residían en la zona en los años 60 (Fortoul, *et al.* 2002).

A pesar de los estudios morfológicos que se han llevado a cabo en timo de animales expuestos a este metal (Al-Bayati *et al.* 1992; González Villava. 2005) no se ha estudiado cómo se comportan las diversas poblaciones que conforman al timo, y dado que numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el vanadio induce activación de linfocitos (Marini. 1987, Krejsa, *et al.* 1997 ; Samet, *et al.* 1998; Ouellet, *et al.* 1999; Huang, *et al.* 2000 ; Lee, *et al.* 2001; Barat y Tremblay, 2003) es posible que en nuestro modelo de exposición a vanadio se hallen células activadas y alteraciones en las poblaciones tímicas. Debido a lo anterior, es importante la caracterización de las subpoblaciones de linfocitos en el timo de animales expuestos a pentóxido de vanadio.

Hipótesis

Dado que el vanadio provoca alteraciones morfológicas en timo (pérdida de la relación entre la corteza y la médula, así como la presencia de folículos linfoides) y activación de linfocitos T *in vitro*; se encontrarán alteraciones en la organización y en el porcentaje de las subpoblaciones tímicas, así como células T activadas en el timo de ratones expuestos a inhalación de pentóxido de vanadio 0.02M.

Objetivos

General

- Identificar por citometría de flujo e inmunohistoquímica, los cambios cuantitativos y la distribución de los timocitos de ratones expuestos durante cuatro semanas a la inhalación de pentóxido de vanadio (0.02M).

Particulares

- Identificar por inmunohistoquímica, en el timo, la localización de las células CD4+, CD8+, CD19+ y MHCII+
- Cuantificar por citometría de flujo las variaciones en las poblaciones DN (CD4-CD8-), DP (CD4+CD8+), SP (CD4+ o CD8+) y CD19+
- Cuantificar por citometría de flujo las células SP que presenten los siguientes marcadores de activación: CD44, CD25.
- Cuantificar por citometría de flujo las células SP y DP CD69+ (Selección positiva).
- Cuantificar las células apoptóticas mediante TUNEL

Metodología

Para un mes de exposición a vanadio, se utilizaron 84 ratones macho CD1 de 35 g de peso. Se formaron dos grupos, en uno de ellos, 24 ratones fueron expuestos a agua desionizada y se les consideró el grupo control, mientras que el otro grupo estuvo compuesto por 60 ratones que fueron expuestos a una concentración 0.02 M de V₂O₅ por vía inhalada en una caja de acrílico 2 veces por semana durante 1 mes. Primero se realizaron sacrificios de 5 ratones expuestos y 2 controles cada semana hasta completar un grupo de 28 ratones. Se tomó el timo y se congeló con medio tissue teck para la posterior realización de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de células positivas a CD4, CD8, CD19 y MHCII. Posteriormente se sacrificó otro grupo de 28 ratones (8 controles y 20 expuestos), se realizó tinción superficial con anti-CD4 APC, anti-CD8 Cy5, anti CD19PE, anti-CD25 Fitc, anti-CD69 y anti- CD44PE y se cuantificaron las diversas poblaciones con ayuda de un citómetro FACSCalibur y del programa Cell Quest. Finalmente al timo del último grupo de 28 ratones se les realizó la técnica histológica convencional y TUNEL (Fig. 5).

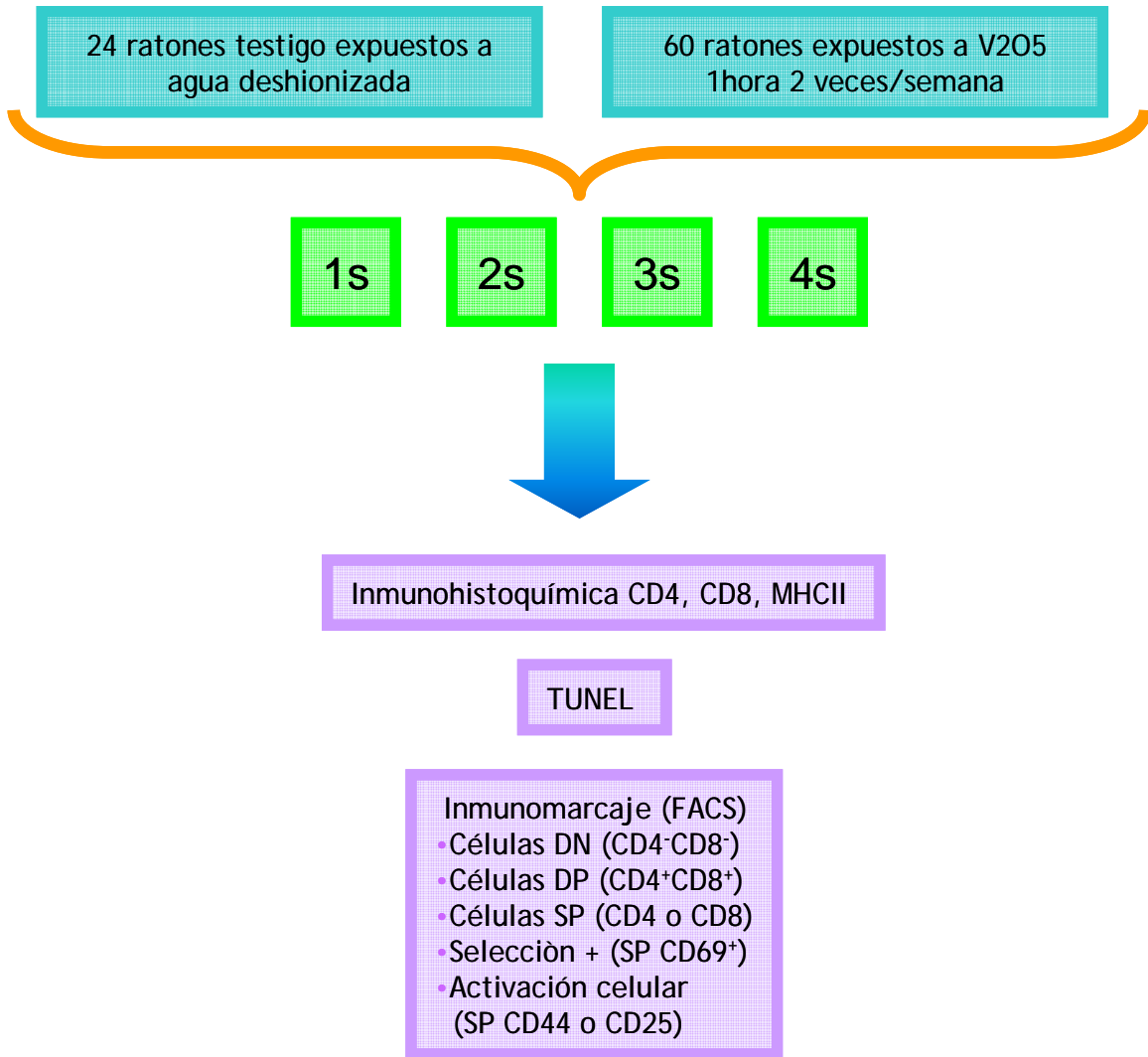


Fig. 5. Método

RESULTADOS

Células positivas a CD4

La inmunohistoquímica para células inmunopositivas a CD4, demostró en los animales control una distribución normal de estas células, es decir, se observó que en la región córtico medular todas las células fueron positivas a CD4, estas células son timocitos Doble positivos (CD4+ CD8+), mientras que en la corteza sólo algunas células fueron positivas para CD4, por lo tanto, dado su localización se trataban de las células CD4 simple positivas (Fig. 6a). En los timos de los ratones expuestos a vanadio, se observó que las células positivas para CD4 se localizaban en la región central de los lobulillos tímicos, región que normalmente recibe el nombre de médula, y en la región que comúnmente se conoce como corteza se observaban muy pocas células positivas a CD4 (Fig. 6b). Dada la localización de los células positivas a CD4 en los timos de los animales expuestos a vanadio, no se conoce si éstas células se trataban de timocitos CD4 simple positivos o células dobles negativas, asimismo se desconoce si la inhalación de vanadio indujo la pérdida de la corteza y la médula.

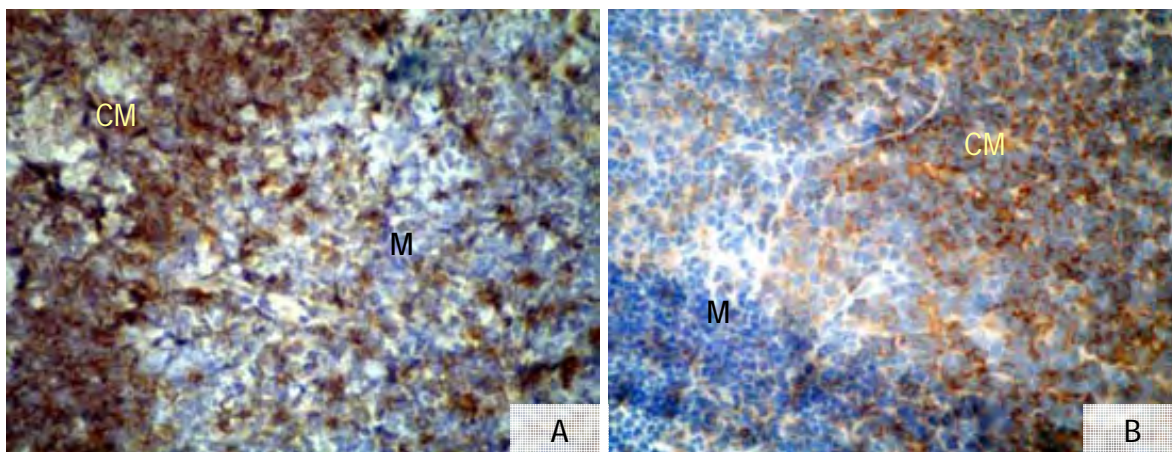


Fig. 6. Distribución de las células CD4+ en el timo de animales expuestos a pentóxido de vanadio. A) Control 400x. B) 4 Semanas 400x. M: Médula. CM: Región córtico- medular. Se puede observar que en el timo de los animales expuestos a V_2O_5 los linfocitos CD4+ se encuentran principalmente en la médula.

Células positivas a CD8

Por otro lado, también se efectuó inmunohistoquímica para identificar células CD8+. Las imágenes fueron similares a las inmunohistoquímicas realizadas para

identificar a las células inmunoreactivas a CD8, de manera que en los timos de los animales controles fue evidente que todas las células que conforman la región córtico-medular eran positivas a CD8, por lo tanto se trataba de las células DP (Fig. 7a); por otro lado, en la médula del timo se observaron algunas células positivas a CD8, por lo que podemos considerar que se trataban de las células CD8 simple positivas (Fig. 7a). En el timo de los ratones expuestos a vanadio las células positivas a CD8 se localizaban principalmente en el centro de los lobulillos tímicos, mientras que en la región periférica la mayoría de las células fueron negativas a CD8 (Fig. 7b).

También se pudo observar que los timos de los ratones expuestos a vanadio tenían una menor cantidad de células que los animales control en la región que comúnmente se le identifica como corteza (Fig. 7), la cual se caracteriza por ser la región en donde existe una mayor cantidad de células en el timo.

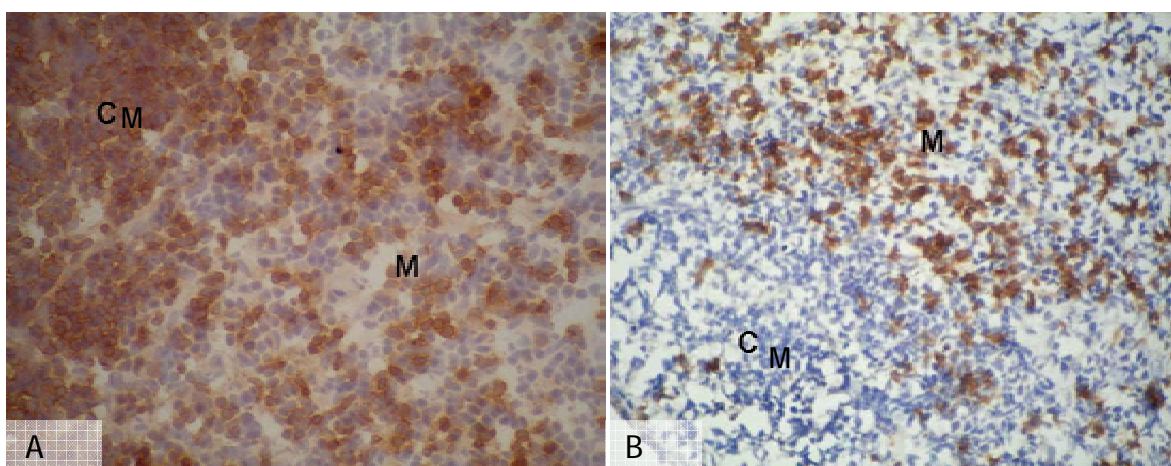


Fig. 7. Inmunohistoquímica para linfocitos CD8+ en timo de ratones CD1 expuestos a inhalación de pentóxido de vanadio. A). Animal control 400x, B) 2 semanas de exposición 400x. Se observa distribución normal de células CD8+. En los timos animales expuestos a vanadio, la distribución de los linfocitos T positivos a CD8+ es principalmente en la médula. M: médula. CM: Región córtico medular

Después que se observó la distribución de las células positivas a CD4+ y CD8+ en el timo por inmunohistoquímica, se cuantificaron las poblaciones simples positivas (CD4+ o CD8+) (SP), las dobles positivas (CD4+CD8+)(DP) y las dobles negativas (CD4⁻CD8⁻) por citometría de flujo dado existía una alta probabilidad de que se existieran cambios cuantitativos en las poblaciones tímicas

Poblaciones SP, DN, DP.

El análisis por medio de citometría de flujo mostró un aumento en el número y porcentaje de células CD4 y CD8 SP, así como en las células dobles negativas; no obstante el porcentaje de células DP disminuyó desde la primera semana de tratamiento (Fig. 8, 9 y 10; Tabla 1)

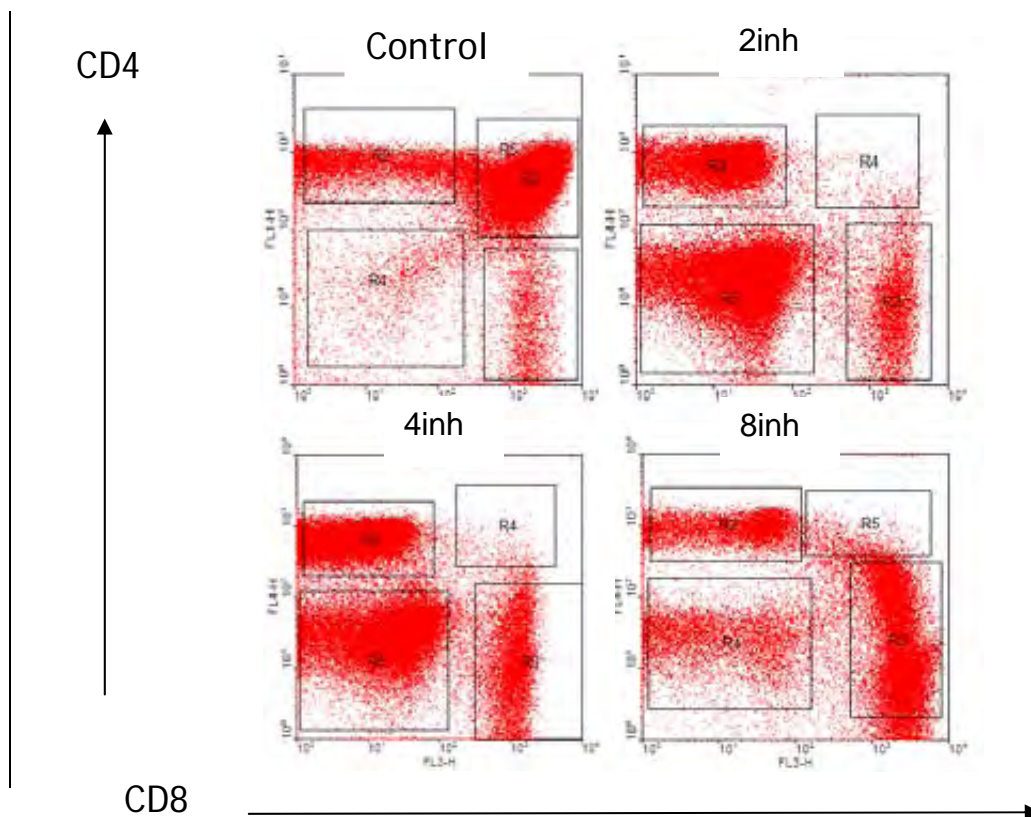


Fig. 8. Dot blots representivos de las poblaciones DN, DP y SP de timos de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. 1, 2 y 4 semanas de exposición.

	Control	1 semana	2 semanas	4 semanas
DN	5.465	14.253	28.587	19.818
DP	45.624	19.312	21.703	22.135
SP CD4+	7.185	10.004	16.792	13.505
SP CD8+	4.302	13.075	8.404	37.682

Tabla. 1. Medias del porcentaje de células DN, DP y SP antes y después del tratamiento con pentóxido de vanadio.

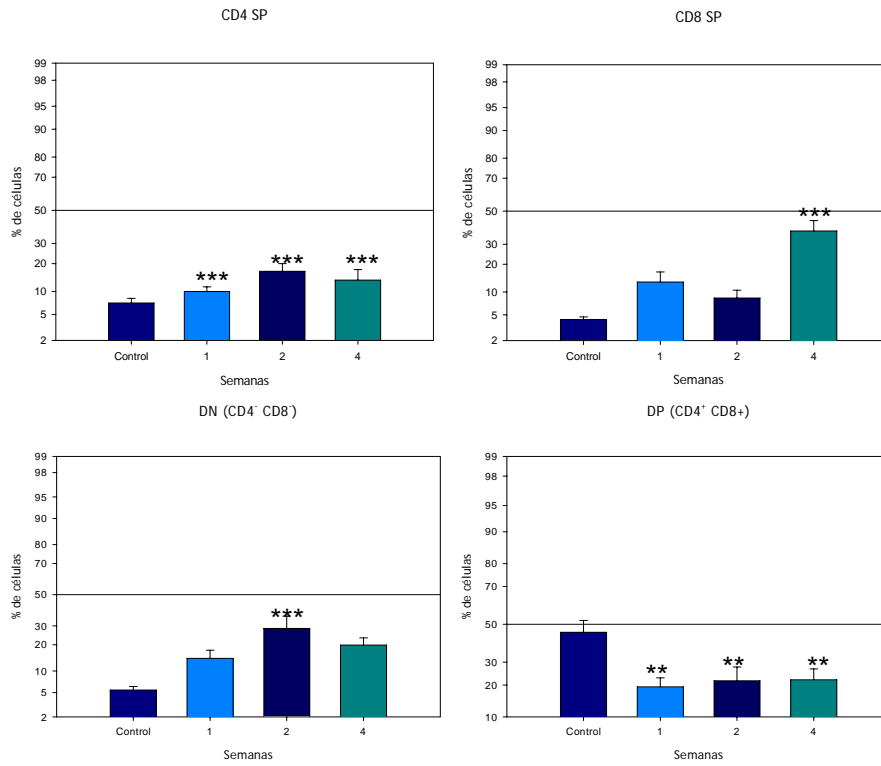


Fig 9. Porcentaje de células DP, DN y SP de timo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. ***=P<0.001 ANOVA (CD4+SP, CD8+SP y DP); **= P< 0.011 ANOVA (DP)

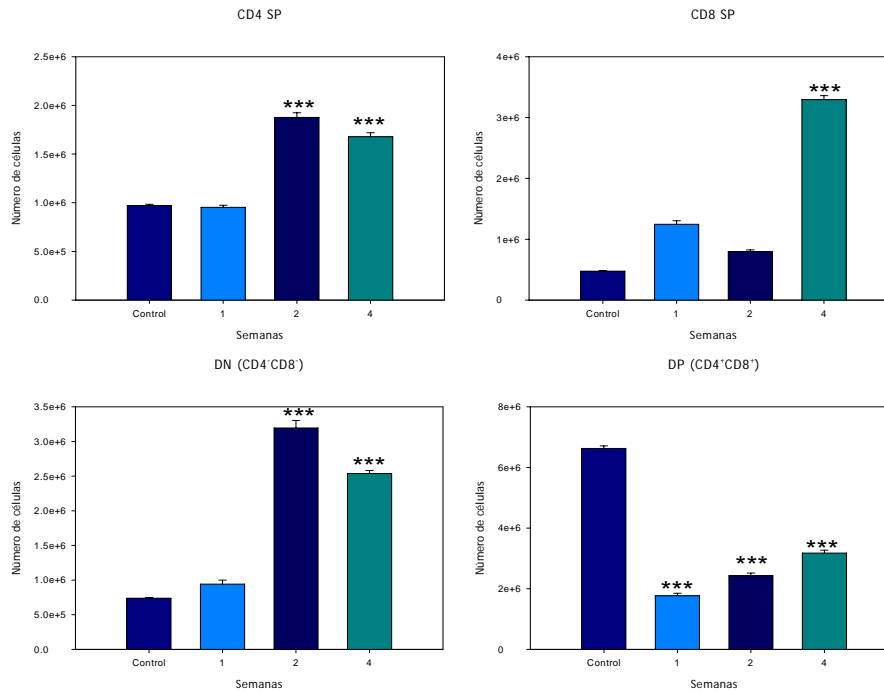


Fig 10. Número de células DP, DN y SP de timo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. *** = P< 0.005. ANOVA

Células Doble Negativas (DN)

Después de haber observado que el porcentaje de células DN fue elevado en los timos de los animales expuestos, se midió el porcentaje de cada una de las poblaciones que conforman a los timocitos DN: DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻). Los resultados demostraron una disminución en el porcentaje de células DN1 en la semana 2 y 4 de tratamiento, mientras que las células DN4 mostraron un aumento significativo en la cuarta semana de exposición. Tanto la población DN1 como DN3 no tuvieron cambios significativos después de la exposición a vanadio, no obstante en ambas poblaciones se observa un mayor porcentaje en la última semana de exposición (Fig. 11).

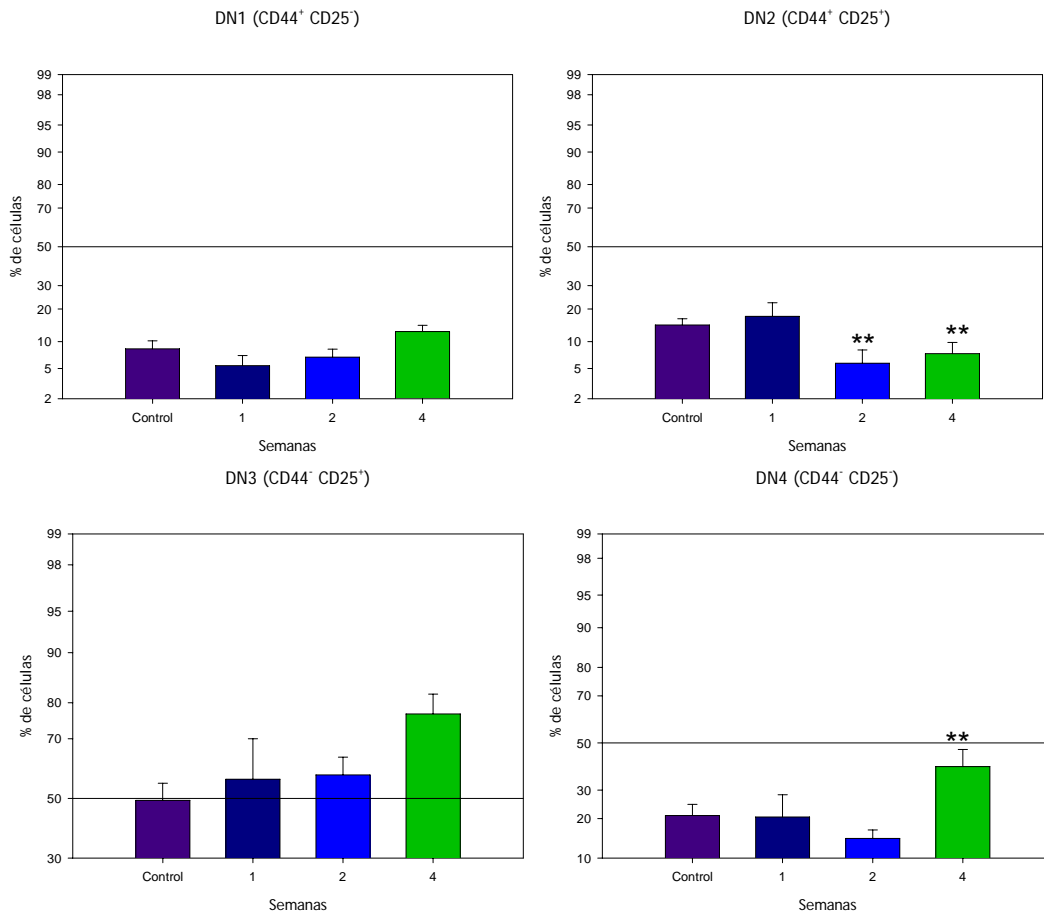


Fig. 11. Número de células DN1, 2,3 y 4 de timo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. ** = P < 0.05 ANOVA

Selección Positiva

Cuando las células inician la selección positiva expresan el marcador CD69 desde que son DP, posteriormente la expresión de este marcador continua durante el estadio SP, por lo tanto se considera a CD69 como un marcador de selección positiva. Se cuantificó el porcentaje de las células DP y SP (CD4 y CD8) CD69+, así como la media de fluorescencia de CD69 en estas células en los timocitos de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. Los resultados mostraron lo siguiente:

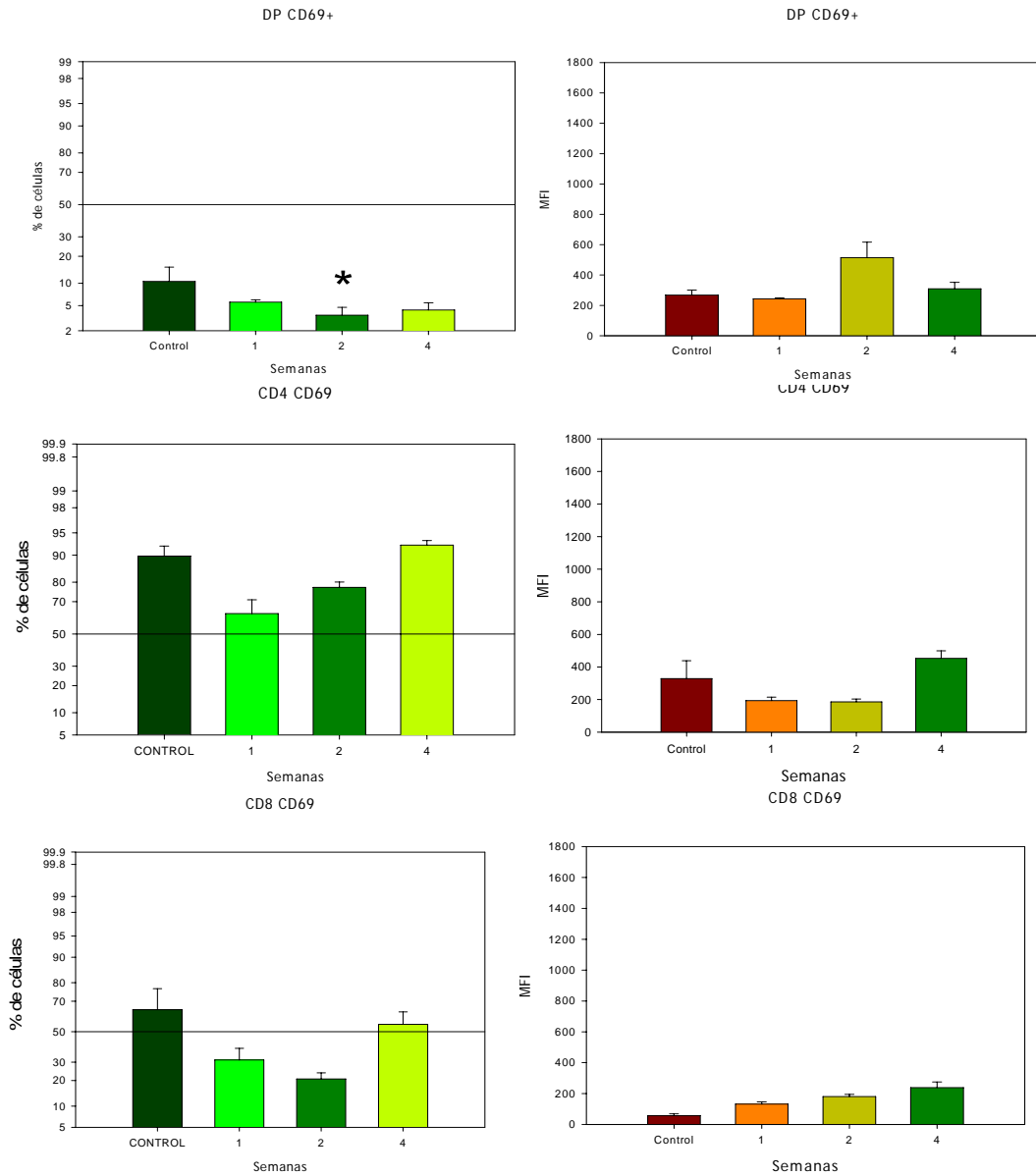


Fig. 12. Porcentaje y medias de fluorescencia de células Doble positivas (CD4+CD8+) y Simple Positivas (CD4 o CD8) CD69+. * = P<0.05 ANOVA

En las células dobles positivas se observó una disminución en el porcentaje de células CD69+ dependiente al tiempo de exposición, mientras que la media de fluorescencia de CD69 aumentó en la segunda semana, por lo tanto se obtuvieron menos células CD69+ pero con altos niveles de fluorescencia (Fig.12).

Por otro lado, en las células Simple Positivas no mostraron cambios significativos en el porcentaje de células y medias de fluorescencia, aunque si se encontró que el porcentaje de células positivas a CD69 disminuyó conforme al tratamiento (Fig. 12)

Células SP positivas a marcadores de activación (CD25, CD44)

Por otro lado, también se estudió el comportamiento de las células simples positivas después de la exposición a vanadio, al medir el porcentaje de células positivas a marcadores de activación como CD44 y CD25. En primer lugar se realizó un dot blot para obtener las células SP CD4 y CD8, posteriormente por medio de histogramas se midió la media de fluorescencia y el porcentaje de las células SP positivas para CD44 y CD25. Los resultados se muestran a continuación (Fig. 13).

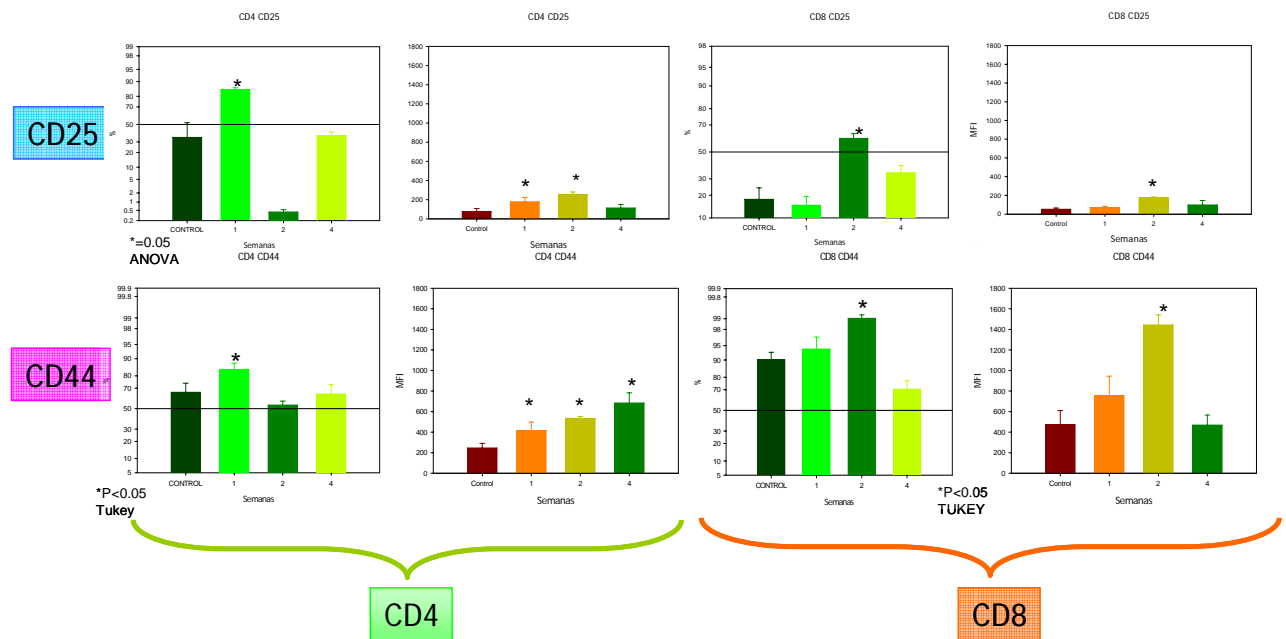


Fig. 13. En tonos verdes se muestran los porcentajes de células SP CD8 ó CD4 positivas a diferentes marcadores de activación. Las gráficas en tonos naranjas y verdes muestran el porcentaje de medias de fluorescencia para cada marcador. Las barras muestran la media de una n= 10

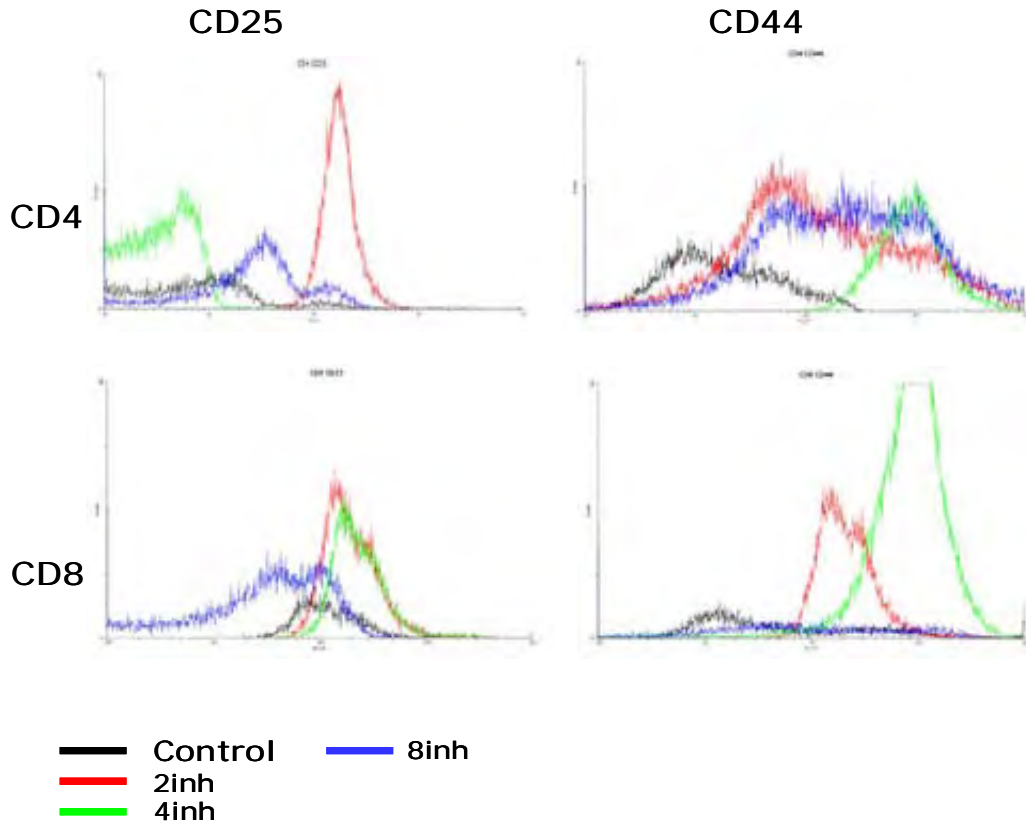


Fig. 14. Histogramas representativos (n=10) de las medias de fluorescencia para cada marcador de activación (CD44 y CD25) en las células Simple Positivas en cada una de las exposiciones a vanadio.

Se observó que el vanadio induce un aumento en las medias de fluorescencia y en el porcentaje de células SP CD8 y CD4 positivas a CD25 y CD44 en la primera y segunda semana no obstante en la cuarta semana de exposición el porcentaje de células positivas a estos marcadores disminuyó considerablemente. (Figs. 13 y 14)

Tamaño y Granularidad (Forward/Scatter)

Por medio del citómetro de flujo se analizó el forward/scatter de los timocitos expuestos a vanadio, dado que las células activadas se caracterizan por ser más grandes que las células quiescentes, además también se puede distinguir la presencia de células muertas dado que estas son muy pequeñas. El citómetro de flujo mostró lo siguiente (Fig. 15):

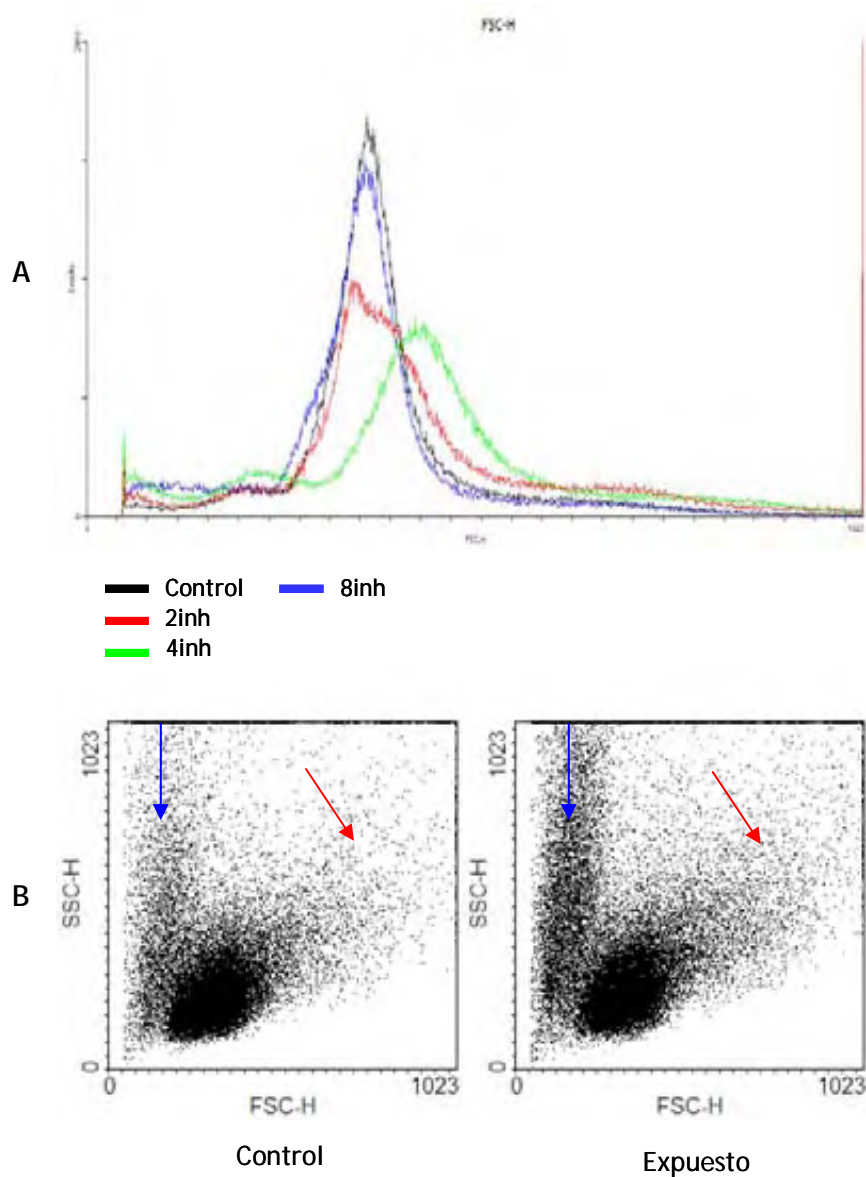
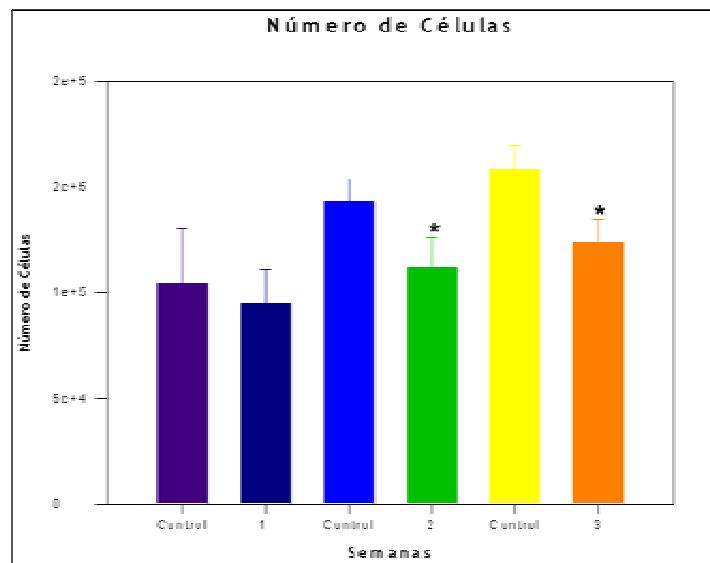


Fig. 15. A) Histograma representativo (n=10) del tamaño de los timocitos expuestos a V_2O_5 . B) Dot Blots ssc/fsc representativos (n=10) de un testigo y un ratón expuesto a pentóxido de vanadio. Flecha azul: Células muertas. Flecha roja: células grandes. Se puede ver una mayor cantidad de células muertas en el timo de un ratón expuesto a vanadio, asimismo existe un mayor número de células grandes

Como puede observarse en la primera y segunda semana de exposición se observa un aumento en el tamaño de los linfocitos en el timo, lo cual confirma la presencia de células activadas en los timos de los animales que inhalan vanadio. Además también se encuentra un mayor número de células muertas en los animales tratados (Fig. 15).

Células Totales y Muerte por apoptosis (TUNEL)

Dado que se observó que pentóxido de vanadio inducía una disminución de células DP y además que los Dot Blots ssc/fsc dieron a conocer la presencia de células muertas después de la exposición a vanadio, se cuantificó el número de células totales en el timo. Se comprobó que el vanadio provoca la disminución de células en el timo desde la primera semana de exposición (Fig. 16)



*P<0.01 T student

Fig. 16. Número de células totales en el timo de animales expuesto a pentóxido de vanadio.

Posteriormente se realizó la técnica de TUNEL para observar si la disminución de células en el timo se debía a muerte por apoptosis. En un organismo control es normal observar células apoptóticas en la corteza del timo (Fig. 17a), no obstante es importante recordar que los animales que inhalan vanadio perdieron la relación corteza médula, por lo tanto no podemos conocer con exactitud que tipo de células son las que murieron por apoptosis, aunque sabemos que el vanadio indujo una dramática disminución de las células DP, por lo tanto es posible que las células muertas observadas a través del TUNEL sean las DP. Asimismo en la figura 17b se observa una mayor cantidad de células muertas en la sección que se consideraría la corteza del timo, que es la zona donde se localizan a los timocitos DP. En la última semana de exposición no sólo se encontraban abundantes

células apoptóticas en la periferia de los lobulillos tímicos, sino también en la región central, lo cual no podría indicar la muerte de células SP (Fig. 17c).

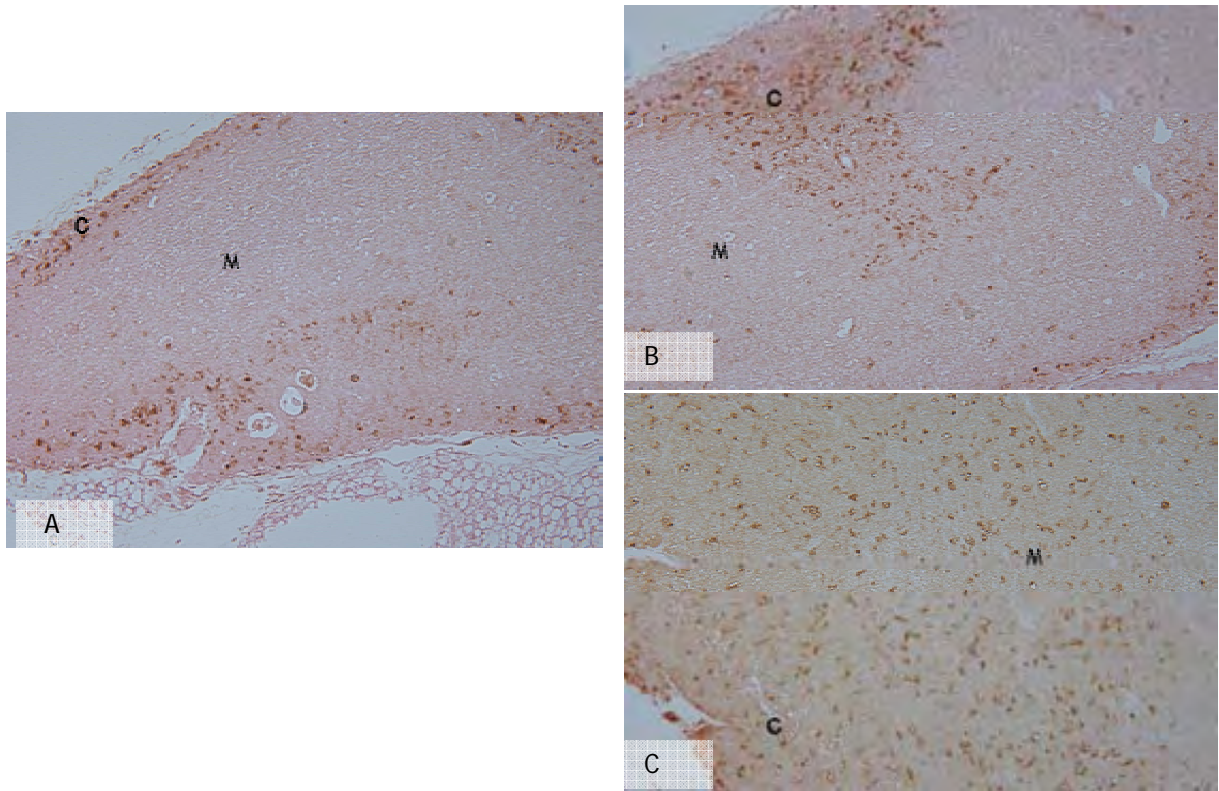


Fig. 17. A) Timo testigo, se observan células apoptóticas en la región de la corteza. B) 2 semanas de exposición, hay aumento en el número de células apoptóticas en la corteza del timo. C) 4 semanas, aumento en el número de células apoptóticas en la corteza y médula del timo

Células positivas a CD19

Dado que los timos de los ratones expuestos a vanadio poseían características morfológicas propias de los nódulos linfoides (González Villalva. 2005), se realizaron estudios de inmunohistoquímica para comprobar la existencia de linfocitos B. Los timos de los ratones control contenían una proporción muy pequeña de linfocitos CD19+ (Fig. 18), sin embargo, el número de linfocitos CD19+ aumentó proporcionalmente al tiempo de exposición, y además las células B se encontraban principalmente en la corteza del timo (Fig. 18).

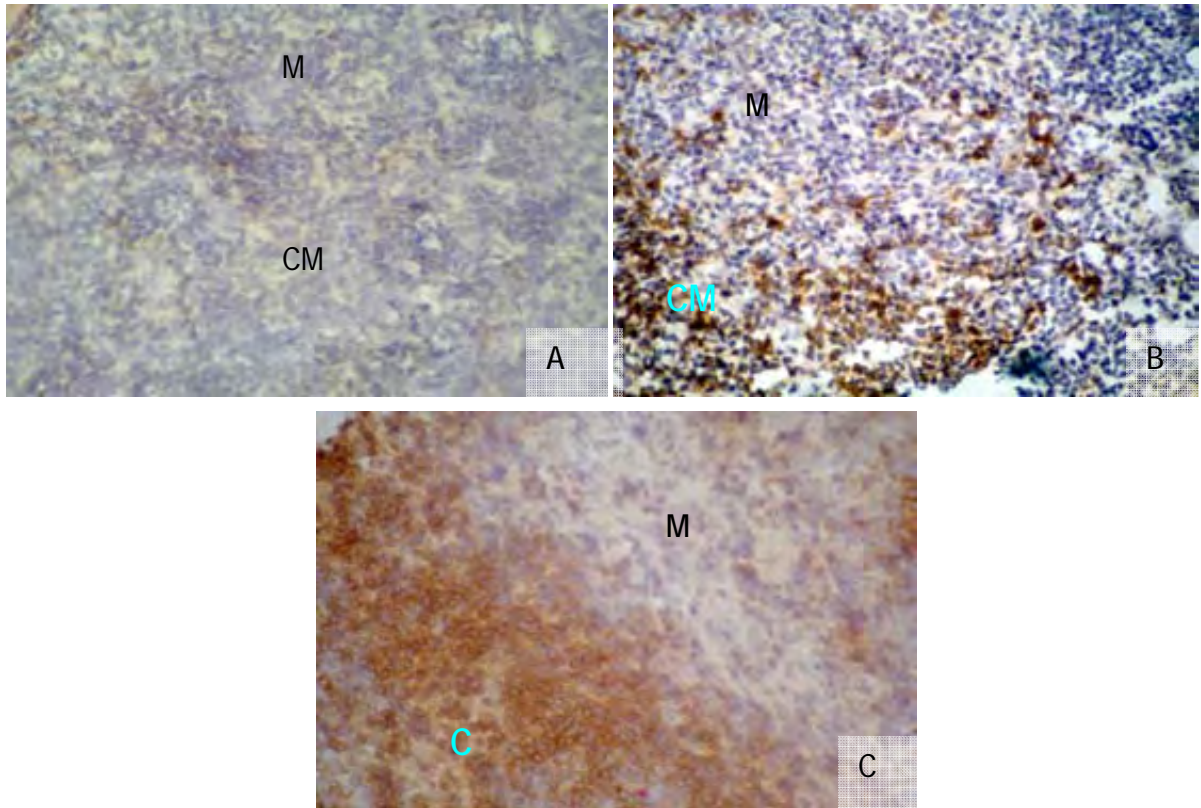


Fig. 18. Inmunohistoquímica para células CD19+ de timos de ratones expuestos a V_2O_5 . A). Control 400x. B) 4inh (2 semanas de exposición) C) 8inh (4 semanas de exposición). M: médula CM: región córtico-medular. En los animales control no se observan células CD19+, no obstante en los animales expuestos a pentóxido de vanadio se observan células CD19+ sobre todo en la corteza del timo.

Posteriormente se cuantificaron las células CD19+ por citometría de flujo y se demostró que existía un aumento en el número y porcentaje de esta población (Fig. 19 y 20).

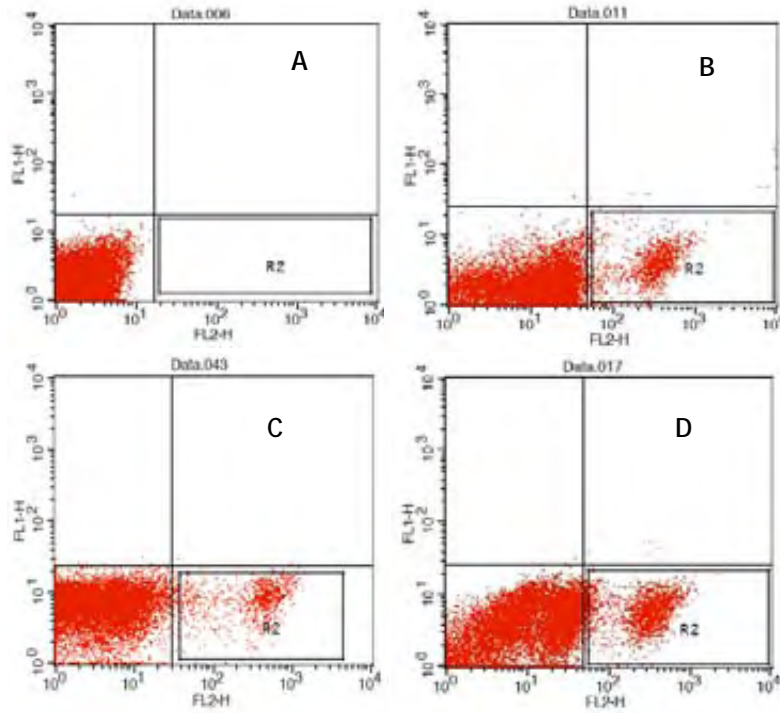


Fig. 19. Dot blots representativos de las células CD19+. A)Control, B)2inh, C)4inh, D)8inh.

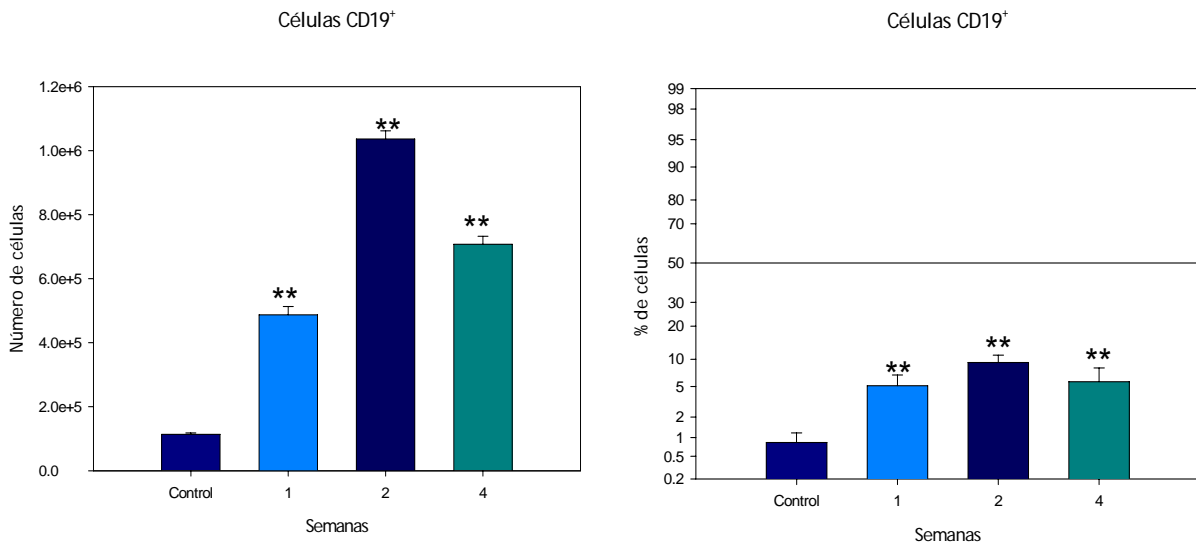


Fig. 20. Número y porcentaje de células CD19+ en el timo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio medidos por citometría de flujo. **= 0.08. ANOVA

Células positivas a MHC II

Las células MHC II+ se encuentran tanto en la médula como en la corteza del timo (Takahama. 2006), como fue que se observó tanto en los ratones control como en los expuestos a vanadio. Sin embargo, estas células incrementaron en la medula del timo de los animales expuestos a este metal (Fig. 21 y 22)

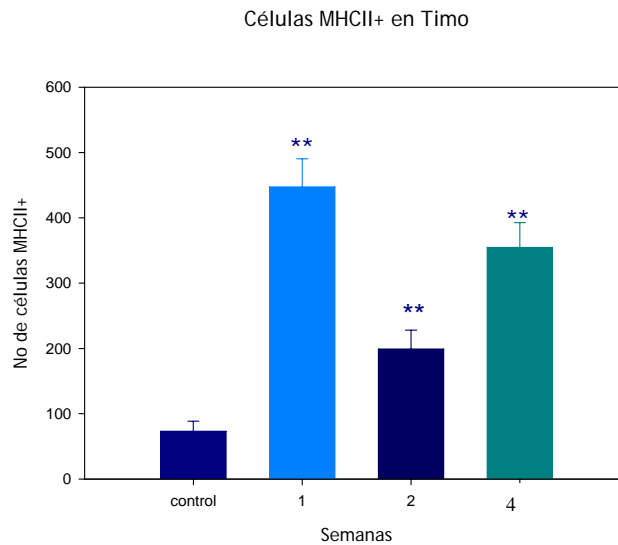


Fig. 21. Número de células MHCII+ en el timo de ratones expuestos a pentóxido de vanadio. **= $P < 0.05$. ANOVA

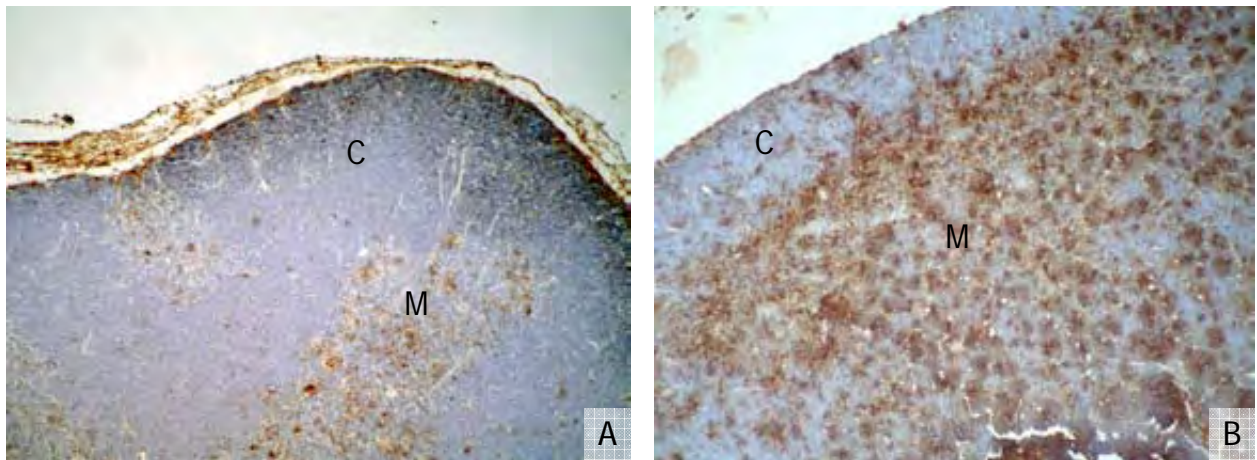


Fig. 22. Estudio inmunohistoquímico para identificar células MHCII+ en el timo de ratones expuestos a vanadio. A. Ratones control 100x. B. Timos de ratones con 4 semanas de exposición 100x. C: corteza y M: médula.

DISCUSIÓN

Distribución de timocitos y células MHCII+

Estudios realizados en cortes histológicos de ratones expuestos a la inhalación de pentóxido de vanadio, dieron a conocer que este metal inducía la desorganización de la corteza y la médula del timo (González Villalva.2005), por lo que se realizó una tinción inmunohistoquímica para conocer cuál era la localización de las células positivas a CD4+, CD8+ y MHCII en este órgano. La inmunohistoquímica tanto para células positivas a CD4 y CD8 dan a conocer 2 zonas, la corteza y médula. En la corteza casi todas las células son positivas tanto para CD4 como para CD8, sobre todo la región córtico-medular, dado que en esta sección del timo podemos encontrar a las células DP; mientras que en la médula sólo algunas células son positivas para CD8 y otras lo son para CD4, y son las denominadas Simple Positivas (Takahama. 2006). Por lo tanto, en una inmunohistoquímica en la que se utiliza uno de los dos anticuerpos (anti CD4 o anti CD8), la corteza tendrá todas las células positivas y la médula poseerá células positivas y negativas (Fig.6a y 7a). En los timos de los animales expuestos a pentóxido de vanadio, la inmunohistoquímica demostró que en la región central de los lobulillos tímicos se localizaban las células positivas a CD4 o CD8, mientras que en la periferia, región que comúnmente se denomina corteza, existían muy pocas células positivas para CD4 o CD8, es decir, la mayoría de las células que se encontraban en esta zona eran negativas para CD4 y CD8 (Fig. 6b y 7b). Asimismo, reportes anteriores indicaron que la inhalación de pentóxido de vanadio inducía la aparición de nódulos linfoides en el timo, por lo que por medio de inmunohistoquímica y citometría de flujo se comprobó que en los timos de ratones expuestos a vanadio existen células B CD19+ (Figs. 18, 19 y 20). Además la tinción mostró que los linfocitos B se localizaron principalmente en la periferia de los lobulillos tímicos, región conocida como corteza, no obstante dado la alteración estructural que muestran los timos después de la exposición a vanadio, no podemos saber con certeza si todavía existe una corteza y una médula en los timos de los animales que inhalaron este metal. Debido a lo anterior, se realizó inmunohistoquímica para MHCII, que es una técnica que se utiliza para conocer la distribución de la corteza y la médula (Murphy *et al.* 1989), dado que las células de la médula que son MHCII+ (p.e. células dendríticas) expresan una mayor cantidad de moléculas MHCII que las células que se encuentran en la corteza (Fig. 22a). En los animales expuestos a vanadio, se observó

que la región central de un lobulillo tímico (la médula) aumentaba en tamaño, asimismo la región conocida como la corteza disminuyó dramáticamente de tamaño (Fig. 22b). Por lo tanto el vanadio induce en el timo disminución en el tamaño de la corteza, aumento en el tamaño de la médula, aparición de linfocitos B en la zona conocida como corteza y acumulación de las células T sólo en la médula (Fig. 23).

Algunas de las moléculas implicadas con la distribución de los timocitos son las quimiocinas y sus receptores, los cuales se encargan de la formación de una corteza y una médula en el timo (Takahama. 2006; Petrie. 2003). Se ha estudiado que diversos receptores de quimiocinas como: CXCR4, CCR7 y CCR9 están implicados en el movimiento de timocitos inmaduros en la corteza (Plotkin *et al.* 2003; Misslitz *et al.* 2004; Benz *et al.* 2004); se ha observado que timocitos deficientes en CCR7 se localizan principalmente en la región córtico-medular (Misslitz *et al.* 2004); por otro lado, los timocitos deficientes de CXCR4 no migran a través de la región córtico-medular (Ara *et al.* 2003); mientras que en los ratones deficientes en CCR9 se distribuyen normalmente en la corteza, no obstante las células no migran hacia la zona subcapsular (Benz *et al.* 2004). Por lo tanto, las quimiocinas CCL19, CCL21 (ligandos de CCR7), CXCL12 (ligando de CXCR4) y CCL25 (ligando de CCR9) están relacionadas con la formación de la corteza en el timo. Mientras que en la formación de la médula es esencial la presencia de CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21 (Takahama. 2006). Es posible que el pentóxido de vanadio induzca en el timo la liberación de quimiocinas implicadas en la formación de la corteza en la médula, y que en la médula del timo de los animales expuestos a pentóxido de vanadio se encuentren las quimiocinas CCL19, CCL21, CXCL12 o CCL25, las cuales también están implicadas en la formación de la médula del timo (Kim y Broxmeyer 1999). Por otro lado, dado que se observaron células B en la corteza de los timos tratados es posible que se encuentren en ese sitio gracias a la liberación de quimiocinas implicadas en la formación de las zonas B dependientes, como es el caso de CXCL13 (Kim y Broxmeyer. 1999) (Fig. 23).

Por otro lado, existen reportes de desarrollo aberrante de timocitos en ratones Knock out para laminina 2, la cual está involucrada tanto en el desarrollo de la arquitectura de la corteza y médula en el timo, como en la señalización relacionada con la sobrevivencia y desarrollo de los timocitos de la corteza (Magner *et al.* 2000), dado que se observaron cambios drásticos en las arquitectura del timo consideramos que el

vanadio podría haber inducido cambios en esta molécula y que sea esta una de las causas de las alteraciones en la distribución de los timocitos (Fig. 23).

Otro cambio que ocasionó el vanadio en la estructura del timo, fue el aumento en el tamaño de la médula del timo, la cual se observó mediante la tinción de células MHCII. Es entonces posible que el desarreglo de la corteza y la médula observada en cortes histológicos de timos de ratones expuestos a pentóxido de vanadio (González Villalva. 2005), sea causado por el aumento en el número de células MHCII+. En este sentido, es probable que el vanadio haya provocado la migración de células presentadoras de antígeno al timo (p.e. macrófagos, células dendríticas, etc) no obstante es necesario realizar diversos marcajes (p.e. MAC-1+ MCSFR+, CD11C- para macrófagos y CD11c+, MAC-1+ para células dendríticas) (Donskoy y Goldschneider. 2003)

Por todo lo anterior, es alta la probabilidad de que las poblaciones tímicas sufrieran cambios, debido a que en cada zona del timo se llevan a cabo fenómenos relacionados con la maduración de los linfocitos T (Anderson *et al.* 2007). Así, en la zona subcapsular podemos encontrar un ambiente que favorece la maduración de las células DN y la selección beta; en la región córtico-medular se lleva a cabo la selección negativa de los DP mientras que en la médula se encuentran los SP que finalmente saldrán a la periferia (Anderson *et al.* 2007). Por esto, se estudió a las poblaciones DN, DP y SP del timo de los ratones expuestos a vanadio para conocer más acerca del efecto de este metal en este órgano.

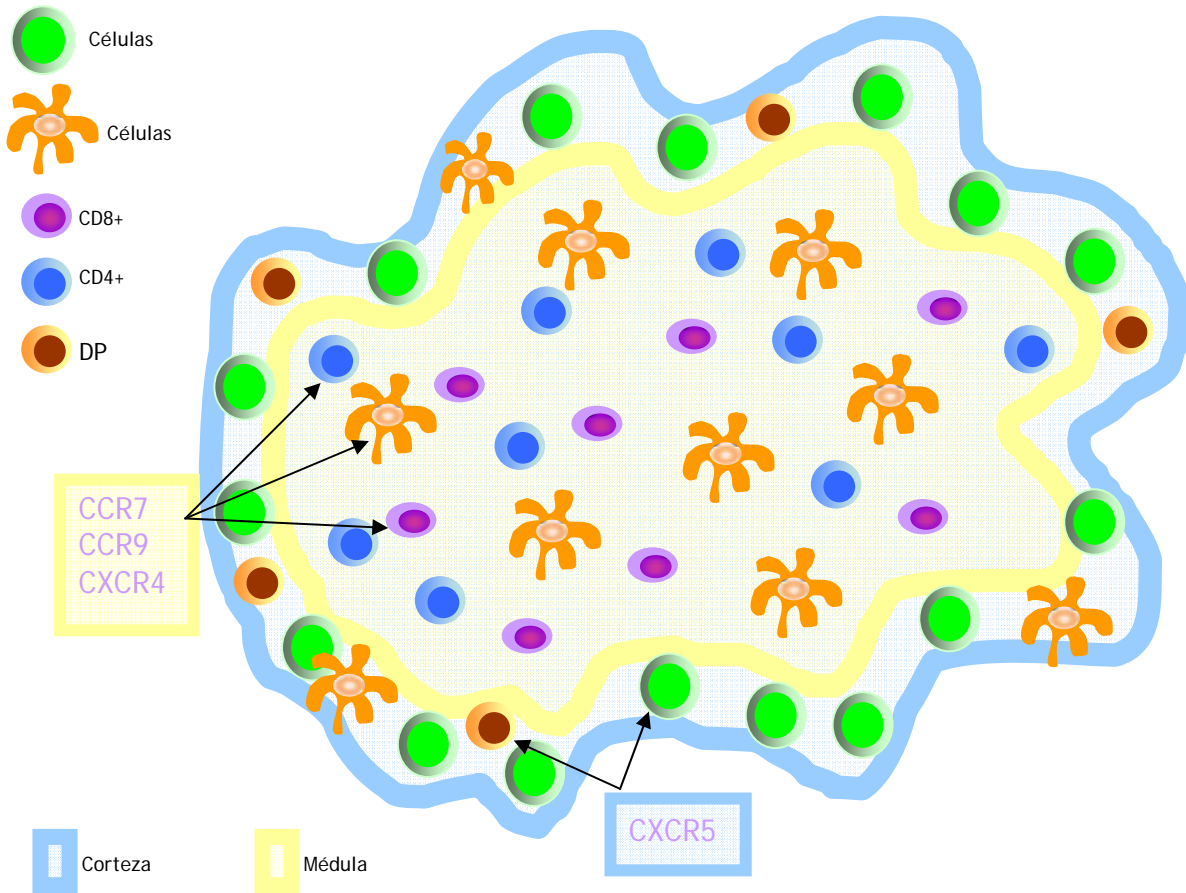


Fig. 23. Distribución de las diversas poblaciones del timo de ratones expuestos a vanadio. El cuadro azul y amarillo indica la zona cortical del timo y medular respectivamente y los posibles receptores de quimiocinas involucrados en la estructuración del timo después de la inhalación de vanadio.

POBLACIONES TÍMICAS

Células DN

Por medio de citometría de flujo, se cuantificaron las poblaciones tímicas DN, DP y SP de los animales expuestos a vanadio (Fig.8). Desde la primera semana de exposición se observó un aumento en el porcentaje de células DN y SP y una disminución en el porcentaje de células DP. Esto aumenta la posibilidad de que el vanadio provoque cambios en moléculas que están involucradas en el desarrollo de los timocitos. El desarrollo y proliferación de estas células está relacionada con moléculas de

sobrevivencia (p.e. IL-7 y c-kit en las células DN), señales vía pre-TCR y TCR, así como con varios puntos de control, los cuales son de vital importancia en la selección positiva y negativa de los DP y SP (Juntilla *et al.* 2007).

En este estudio, se comprobó que el pentóxido de vanadio induce aumento en la proporción de células DN (Fig. 9 y 10), específicamente en las poblaciones DN3 y DN4, mientras que en la población DN2 se mostró un menor porcentaje que los animales testigo (Fig. 11). En el caso de las células DN (DN1-DN2), la proliferación y supervivencia de las células DN está relacionado con diferentes proteínas como c-kit, IL-7 y Notch1 (Wu y Strasser. 2001; Juntilla *et al.* 2007), no obstante la supervivencia de las células DN3 y DN4 está involucradas con señales vía pre-TCR, las cuales están implicadas con la activación de diversas vías de señalización como es el caso de las MAPK (Juntilla *et al.* 2007) y otras proteínas como Fyn, Zap-70, Syk y LAT (Crompton *et al.* 1999). El vanadio es capaz de activar la vía de MAPKs y moléculas como ZAP-70, Syk, LAT *in vitro* (Samet *et al.* 1998; Barat *et al.* 2003), por lo tanto es posible que este metal haya iniciado la activación de estas vías de señalización en los timocitos DN (posiblemente de DN3 a DN4), y con ello la supervivencia de las células DN (Juntilla *et al.* 2007)

Otra de las moléculas involucradas en la supervivencia de los linfocitos DN es la vía PI3/Akt. En ratones Knock out se ha observado que la inhibición de proteínas Akt1 y 3 intervienen en la diferenciación de DN3 y la acumulación de DP, mientras que la inhibición de Akt 1 y 2 induce muerte de DP, por lo tanto Akt1 y 2 inducen señales de supervivencia vía pre-TCR en timocitos que se encuentran en los estadios de maduración DN3- DP (Juntilla *et al.* 2007; Mao *et al.* 2007). En el caso del vanadio, se ha observado que el vanadato induce la activación de la vía PI3k/Akt (Li *et al.* 2004; Li *et al.* 2005), por lo tanto podría inducir la supervivencia de las células DN por medio de esta vía, no obstante sería conveniente estudiar la activación de esta vía de señalización en los timocitos DN3, DN4 y DP de los animales expuestos a este metal.

Diversos estudios también han reportado los efectos de los contaminantes ambientales en las poblaciones DN del timo (Oyama 1999; Oyama 2007; Nohara *et al.* 2008). Se ha demostrado que contaminantes, como el arsenito, inducen la muerte de las poblaciones DN2, DN3, DN4 y DP, aunque no se ha identificado la vía de señalización responsable del fenómeno en las células DN, aunque si se observó un decremento en los

niveles Bcl-xl en los DP (Nohara *et al.* 2008). Por otro lado, estudios con cloruro de cadmio, indicaron que este compuesto induce la muerte de los timocitos, pero no aclaran cuál es la población celular tímica más afectada (Oyama *et al.* 2007). El pentóxido de vanadio también es considerado un contaminante ambiental y al contrario de los dos compuestos antes mencionados, en este estudio se comprobó un aumento en la proporción de timocitos DN, por lo que es posible que este compuesto esté relacionado con la activación o inhibición de vías de señalización diferentes a las que activan el arsenito o el cadmio.

El aumento en el número de células DN también puede estar involucrado con la presencia de células B en el timo de los ratones expuestos a vanadio, dado que las células B carecen de los marcadores CD4 y CD8, es entonces que serían parte de la población DN cuando se realiza el estudio de las células tímicas por medio de citometría de flujo.

Por todo lo anterior se propone que la inhalación de vanadio aparentemente induce un aumento en el porcentaje de timocitos DN, aunque es importante añadir que este aumento en el porcentaje puede ser causado por un aumento en el número de células CD19 en el timo (Fig.20). No obstante también se conoce que el vanadio provoca la activación de proteínas tales como Fyn, ZAP-70, SyK, LAT, vía de las MAPks y la vía PI3K/Akt, las cuales están implicadas en la sobrevivencia de células DN.

Células DP

Los timocitos DP son las células más abundantes en el timo pues son aproximadamente el 80% de la población total en este órgano linfoide primario. En los timos de los ratones expuestos a pentóxido de vanadio, se observó ausencia de timocitos DP (Fig. 8), mientras que en otros animales el porcentaje de células DP se trataba del 19% de las células totales (Fig. 9). De igual forma por medio de la técnica de TUNEL, se observó un aumento en el número de células apoptóticas encontradas en la corteza, que es la zona en donde se localizan las células DP (Takahama. 2006), además de que el número de timocitos totales fue menor en los animales expuestos a V₂O₅ que en los animales testigo (Fig. 16). Lo anterior también se ha demostrado en otros modelos de exposición a contaminantes, por ejemplo el cadmio y el zinc inducen atrofia del timo

(Provinciali *et al.* 2001; Oyama *et al.* 2007), mientras que un trabajo en el que se exponía a los timocitos a diversas concentraciones de arsenito, se hallaron bajos niveles de Bcl-xl en las células dobles positivas (Nohara *et al.* 2008) la cual es una molécula indispensable para la sobrevivencia de DP (Starr *et al.* 2003). En muchas ocasiones, los contaminantes ambientales comparten mecanismos de acción, es entonces posible que el vanadio actúe por medio de una vía de señalización parecida a los otros metales para la inducción de muerte en los timocitos DP.

Los linfocitos DP se caracterizan por ser CD4⁺ y CD8⁺, y porque presentan un TCR totalmente formado (Takahama. 2006), además que en este estadio se lleva a cabo un fenómeno de suma importancia conocido como selección positiva o negativa (Legname *et al.* 2000). Durante la maduración de los timocitos DP a SP, las células DP reconocerán al MHC de las células reticulares epiteliales, si la interacción entre TCR y MHC es alta, es decir, si se reconoce con una alta avidéz al TCR, las células sufrirán de selección negativa (McNeil *et al.* 2005), de manera que por medio de este fenómeno pueden morir por apoptosis el 5% de los timocitos DP (Xing *et al.* 2008). Por otro lado, si los timocitos DP tienen una interacción de mediana intensidad con las células epiteliales reticulares, entonces se llevará a cabo la selección positiva y la posterior maduración a células SP CD4⁺ o CD8⁺ (Mariathasan *et al.* 2000)

El reconocimiento de TCR por las células epiteliales corticales del timo (Legname *et al.* 2000; Nakayama *et al.* 2002), induce la estimulación de las células DP a través de las cinasas Src (Lck y Zap-70) (Ashe *et al.* 1999); la proteína Lck fosforila a los ITAMs de las cadenas ζ del complejo TCR y a los ITAMs de las cadenas γ , δ y ϵ de CD3 (Ashe *et al.* 1999). Asimismo, fosforila a Zap70 y ésta a su vez a LAT (aunque esta molécula sólo sufre de una fosforilación parcial) (Starr *et al.* 2003), lo cual induce la activación de otras moléculas como PKC, PI3K, PLC γ 1 y Gags, también se produce movilización de calcio y se induce la activación de las MAPKs (Ashe *et al.* 1999; Starr. 2003; Palacios y Weiss. 2004) (Fig. 24). La vía anteriormente mencionada, es la que utilizan los timocitos DP para su posterior diferenciación a SP, aunque se ha demostrado que dependiendo del grado de activación de las moléculas es que se llevará a cabo la selección positiva o negativa, es decir, dependiendo del grado de avidéz y afinidad del TCR, es el grado de activación de la vía de señalización, de manera que si existe una alta avidéz de TCR por su ligando se llevará a cabo la selección negativa, mientras que si la afinidad es baja

entonces se llevará a cabo la selección positiva (Bommhardt *et al.* 2000) (Fig. 24). En los timos de los ratones expuestos a pentóxido de vanadio, se observó una disminución en el porcentaje de células DP, por lo tanto, es posible que este metal induzca selección negativa por inducir un alto grado de activación de las vías anteriormente mencionadas (Samet *et al.* 1997; Krejsa, *et al.* 1999; Baran *et al.* 2003)

Una de las primeras moléculas en activarse después de la interacción TCR- MHC es Lck (Palacios y Weiss. 2004) (Fig. 24); se ha estudiado que Lck está involucrada principalmente en la diferenciación de las células SP CD4, mientras que la ligera activación de Lck induce la diferenciación de células SP CD8+ (Legname *et al.* 2000). En relación con la selección negativa, se ha observado que la activación continua de Lck induce la selección negativa de DP (Bommhardt *et al.* 2000). En estudios *in vitro*, se constató que el vanadato induce la activación continua de Lck (Barat *et al.* 2003), entonces el pentóxido de vanadio, al tener un estado de oxidación pentavalente como el vanadato, es posible que sea capaz de inducir la fosforilación continua de Lck y con ello provocar la selección negativa en las células DP.

Como ya se señaló, aparte de Lck, también están involucradas otras proteínas en la vía de señalización mediada por TCR (Groves *et al.* 1999), tal es el caso de Zap 70 (Negishi *et al.* 1995), SLP76 (Yablonski *et al.* 1998), LAT (Zhang *et al.* 1998), Itk (Schaeffer *et al.* 1999)(Fig. 20) y Csk (Schmedt *et al.* 1998), así como las proteínas, Vav, Fosfolipasa C γ (PLC γ) y calcineurina (Bommhardt *et al.* 2000). El vanadato es conocido por ser un potente inhibidor de fosfatasas, en la Figura 24, se puede observar que la molécula LAT está completamente fosforilada cuando se lleva a cabo la selección negativa (Starr. 2003)(Fig. 24). Se ha comprobado que el vanadio induce la activación continua de LAT, Zap 70, SLP 76, PLC γ y calcineurina (Enring *et al.* 2000; Barat *et al.* 2003), por lo tanto debido a que el vanadio también induce la fosforilación continua de Lck, se puede deducir que este metal posiblemente puede inducir la selección negativa de DP en nuestro modelo.

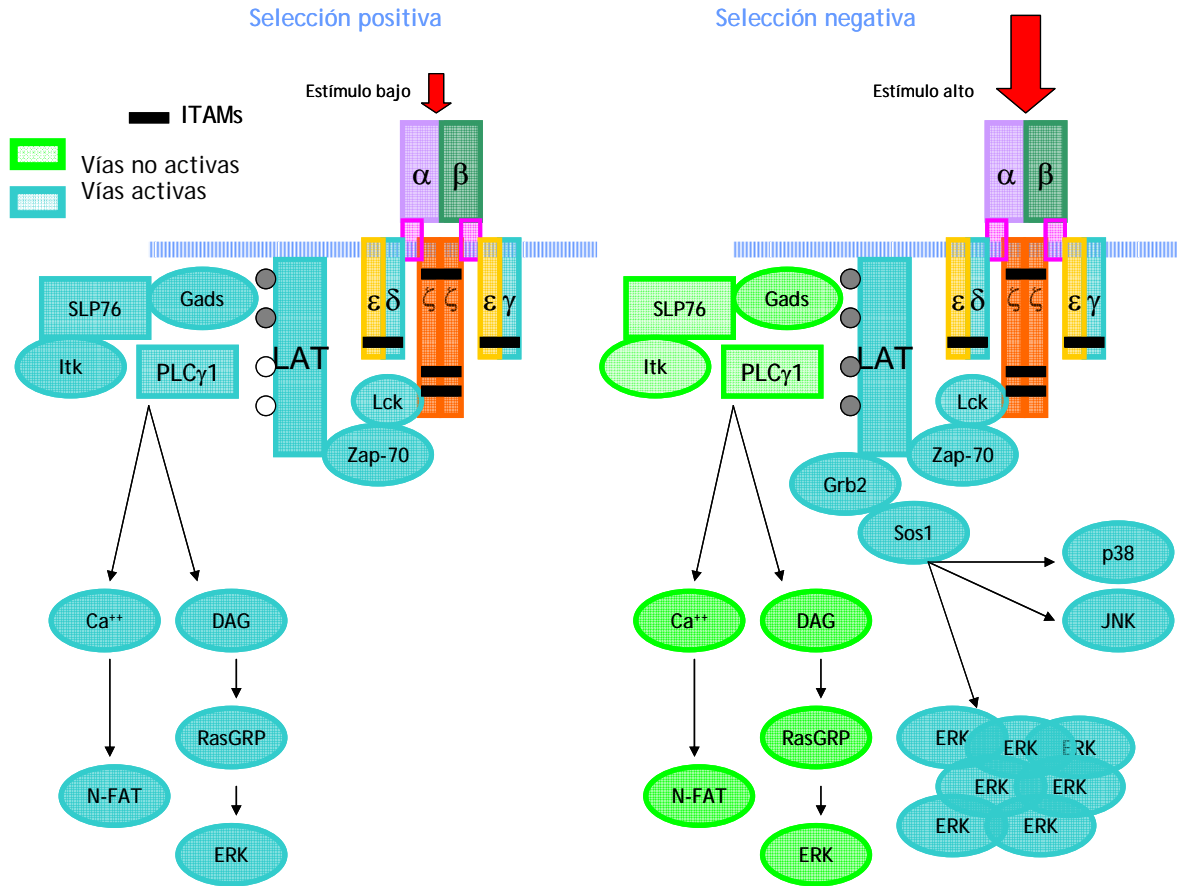


Fig. 24. Modelo de selección negativa y positiva en los timocitos. Durante la selección positiva un ligando de baja afinidad estimula a TCR, que a su vez transmite una señal vía TCR α , el ITAM de CD3 γ y CD3 δ , lo cual induce una fosforilación parcial de LAT que induce el agrupamiento de moléculas como Gads, PLC γ , DAG y calcio. Posteriormente éstas pueden inducir que la vía de señalización ERK tenga bajos niveles de activación. La selección negativa se lleva a cabo cuando un ligando de alta afinidad estimula a TCR y a moléculas coestimuladoras, lo cual induce una fosforilación completa de LAT, el agrupamiento de Grb2/Sos1, activación de p38, JNK y un alto nivel de activación de ERK (Adaptación de Starr. 2003).

Después de la activación de proteínas como Lck, Zap 70, SLP 76 y LAT, se activa la vía de las MAPKs, especialmente la vía ras-Raf-MEK-ERK (Hakem *et al.* 1999; Bommhardt *et al.* 2000) (Fig. 24), la cual está relacionada con crecimiento, apoptosis y diferenciación de las células T (Sugawara *et al.* 1998; Xing *et al.* 2008). Además experimentos en los que se utilizaron animales knock out o animales transgénicos en alguna de las MAPKs, demostraron que la vía Ras/ERK está implicada en la selección

positiva y negativa (Delgado *et al.* 2000; Xing *et al.* 2008) (Fig. 24). Asimismo, se ha demostrado que la activación continua o constitutiva de la vía MEK/ERK contribuye a la selección negativa, mientras que la activación intermedia de MEK/ERK induce la selección positiva de CD4, aunque cuando ocurre una baja activación de la misma vía induce la selección positiva de CD8 (Bommhardt *et al.* 2000; Mariathasan *et al.* 2000). En el caso del vanadio, existen estudios que indican que el vanadio induce la activación de la vía Ras-Raf-MEK-ERK diez veces más que los niveles basales (Krejsa *et al.* 1997; Samet *et al.* 1998), por lo que ésta vía podría ser parcialmente responsable de la disminución de DP en el timo de animales que inhalan vanadio.

Por otro lado, se ha estudiado la selección negativa de DP por medio de la administración de anticuerpos anti-CD3, los cuales inducen la activación de TCR y deleción clonal de timocitos DP (Groves *et al.* 1997; Bommhardt *et al.* 2000). Por medio de lo anterior se observó que la mayoría de las células que sufrían selección negativa contenían altos niveles de JNK y p38, por lo tanto se involucró de forma directa a estas proteínas con la selección negativa (Sagawara *et al.* 1998; Xing *et al.* 2008) (Fig. 24). Se ha observado que diversas especies de vanadio como el metavanadato de amonio induce la activación *in vitro* de JNK y p38 (Samet *et al.* 1998), por lo que ésta es otra posible vía por la cual el vanadio podría inducir la selección negativa en estas células.

Los timocitos DP pueden morir, no sólo después de la estimulación vía TCR, sino también mediante la participación de moléculas co-reguladoras como CD28, CD2, CD5, CD24, CD49d, CD81 (Delado *et al.* 2000; Graham *et al.* 2006). Se ha demostrado que cuando se añaden anticuerpos anti-CD28, se induce muerte por apoptosis de DP, por lo tanto las moléculas que están implicadas en la activación de las células T maduras también están implicadas en la selección negativa de DP (Graham *et al.* 2006). CD28 incrementa la señal del TCR, a través de PI3K, aumentando la avidéz de la interacción TCR-MHC, por lo tanto induce muerte de las células DP (McKean *et al.* 2001). El pentóxido de vanadio provoca la activación de PI3K *in vitro*, de manera que es probable que esta sea otra vía importante en la disminución del número de células DP (Fig. 10)

Otra posible causa de la disminución en el número de células DP es la liberación de citocinas por las células SP en el timo, dado que se encontró que el vanadio induce la activación de células T en este órgano, es posible que las citocinas liberadas por éstas

células provocaran la muerte de los DP (Zhan *et al.* 2002; Boyer *et al.* 2002). Asimismo, se considera que la activación periférica de linfocitos puede producir la producción de citocinas, las cuales a su vez pueden provocar la muerte de timocitos (Zhan *et al.* 2002). En nuestro modelo, se ha observado que el vanadio induce proliferación de linfocitos en bazo (Piñón Zárate, *et al.* 2008) y órganos periféricos (Acevedo Nava. 2005; Rodríguez Falcón. 2006), y es posible que este metal haya producido la activación de linfocitos en la periferia. Los efectos anteriormente mencionados ya habían sido observados en modelos *in vitro* y con animales de corral; el metavanadato de amonio y peroxovanadio inducen la activación de linfocitos CD4 y CD8 (Marini, *et al.* 1987; Ouellet, *et al.* 2003; Dyakonova, *et al.* 2004), así como liberación de IL-6 (Quereshi *et al.* 1999), IL 1, IL-2, IL-3, IL-5 e IL-8 (Krejsa, *et al.* 1997; Lee, *et al.* 2001).

Por otro lado, se conoce que las partículas contaminantes y los metales, entre ellos el vanadio, pueden provocar la formación de radicales libres (Wang, *et al.* 2003; Yaglom, *et al.* 2003; Li, *et al.* 2004; Horbinski, *et al.* 2005), mediante reacciones de tipo Fenton ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} y OH) (Zhang, *et al.* 2001; Rodríguez- Mercado, *et al.* 2003; Mukherjee, *et al.* 2004). Una de las especies de oxígeno más reactivas es el peróxido de hidrógeno, la cual también puede inducir la producción de radicales libres, dado que es esencial para las reacciones de tipo Fenton (Zhang *et al.* 2001). Un estudio *in vitro* dio a conocer que el peróxido de hidrógeno trae como consecuencia altos niveles de timocitos apoptóticos, aunque no estudiaron cuales de las poblaciones celulares residentes del timo contenía un mayor número de células apoptóticas (Oyama *et al.* 1999), por lo tanto es también posible que el pentóxido de vanadio induzca muerte de DP por medio de la formación de especies reactivas de oxígeno.

En resumen podemos concluir que el V_2O_5 induce la selección negativa de los timocitos DP a través de la activación de PI3K, ERK, JNK y p38, las cuales están directamente relacionadas con la selección negativa. Además, otras posibles causas de la muerte de las células DP son: liberación de citocinas pro-inflamatorias por las células SP en el timo, la formación de radicales libres y/o el cambio en algunas moléculas de la matriz extracelular, todas ellas involucradas en la estructura tímica (Fig. 24).

Células SP

El último estadio de maduración de los timocitos es el de Simple Positivo, que es consecuencia de la selección positiva, la cual comienza en el estadio DP y las células SP más inmaduras son aquellas que apenas sufrieron selección positiva y se caracterizan por ser CD4+ o CD8+ y positivas a CD69+ (Hare *et al.* 1999). Estas son células semi-maduras y son susceptibles a apoptosis, mientras que los linfocitos SP CD69^{low} son timocitos maduros totalmente funcionales, se encuentran en la médula y pueden ser seleccionadas negativamente si reconocen con alta avidéz a un auto-antígeno presentado por una células reticulares medular; por otro lado, si las células SP reconocieron al autoantígeno con abaja afinidad entonces serán seleccionadas positivamente y pueden salir a la periferia (Nakayama *et al.* 2002; Starr. 2003; Takahama. 2006) En los ratones que fueron expuestos a pentóxido de vanadio, se observó que tanto los niveles de fluorescencia como el número de células SP positivas a CD69 no cambiaron después de la exposición a vanadio, no obstante mostraron una tendencia negativa en su porcentaje (Fig. 12). Mientras que las células DP CD69+ si mostraron una disminución significativa en el porcentaje después de la exposición a vanadio (Fig. 12). Lo anterior puede indicarnos que el vanadio induce una disminución en el número de células seleccionadas positivamente (Hare *et al.* 1999; Nakayama *et al.* 2002). Por otro lado, dado que en el timo de los animales que fueron expuestos a pentóxido de vanadio se encontraron células activadas, y CD69 es un marcador de activación temprano, es posible que la expresión de éste haya disminuido por ser medido un día después de la inhalación a vanadio, por lo tanto sería conveniente realizar experimentos horas después de la administración de vanadio.

Igualmente se observó que el porcentaje de células SP CD4 o CD8 fue mayor en los animales expuestos a vanadio (Fig. 8 y 9), por lo tanto, la mayoría de las células SP que se encontraban en el timo no son células que hayan madurado recientemente, sino que es probable que hayan migrado desde la periferia, por lo que sería conveniente realizar experimentos para conocer si las células SP migraron hacia el timo. Asimismo, dadas las alteraciones que se encontraron en el timo de los animales expuestos a vanadio, además de diversos antecedentes que indican que el vanadio induce la activación de linfocitos T (Ouellet *et al.* 1999; Lambert *et al.* 1999, Barat *et al.* 2003), se decidió medir la

presencia de marcadores de activación (CD25 y CD44) en los timocitos SP y medir el tamaño y granularidad de los timocitos por citometría de flujo.

Se constató que el pentóxido de vanadio si inducía la aparición de células activadas. En primer lugar se constató mediante Dot Blots ssc/fsc, que el tamaño de las células después de la exposición a vanadio era mayor a las células de los animales testigo (Fig. 15). Además, se observaron altos niveles de fluorescencia de los marcadores de activación CD44 y CD25 tanto en los SP CD8 como CD4 (Fig. 14). En cuanto al porcentaje de células SP CD44+ o CD25+, éste también aumentó desde la primera semana de exposición (Fig.13).

Como ya se mencionó anteriormente, durante la interacción TCR/ligando-MHC, pueden activarse diversas moléculas como PI3K, N-FAT, NF- κ B, Lck, ZAP-70, etc (Palacios y Weiss. 2004), además de vías de señalización como MAPKs (Ogasawa *et al.* 2002; Palacios y Weiss. 2004) y la vía Akt/PKB, además de la liberación de calcio (Ogasawa *et al.* 2002). Todas las moléculas y vías anteriormente mencionadas, son activadas por alguna de las especies de vanadio, cuando este metal inhibe a las proteínas tirosina fosfatasa, por lo tanto es posible que en el timo de los ratones expuestos a vanadio se observe la activación de células SP sin que éstas hayan tenido interacción con una célula presentadora de antígeno (Krejsa *et al.* 1997; Ouellet *et al.* 1999; Barat *et al.* 2003). Asimismo, se ha observado que el bisperoxovanadio induce la activación de factores de transcripción relacionados con la activación de linfocitos T como N-FAT, NF. κ B y AP-1 (Baeuerle *et al.* 1996; Jaspers *et al.* 1999; Krejsa *et al.* 1999; Ehring *et al.* 2000; Barat *et al.* 2003).

En las últimas semanas de exposición se observó una disminución en los niveles de fluorescencia de CD44 y CD25, así como el porcentaje de células activadas (Fig. 14). Walters y colaboradores (2002) reportaron que, cuando las células mueren por activación se observa una disminución en la expresión de CD44 y CD25 en las células apoptóticas (Waters *et al.* 2002). Además por medio de la técnica de TUNEL se observó que el número de células apoptóticas en la médula era mayor en los animales expuestos en la cuarta semana de exposición (Fig. 17) además mediante Dot Blot ssc/fsc se demostró un mayor número de células muertas en los timos de animales expuestos a vanadio (Fig. 15), por lo que es posible que este metal haya ocasionado la activación y

luego la muerte de las células SP. Por otro lado, la estimulación de CD44 regula la expresión de Fas, y otros estudios muestran que ratones que no expresan CD44 son más resistentes a apoptosis inducida por activación, es por eso que CD44 podría estar involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la muerte en células activadas (Waters *et al.* 2002).

Por otro lado, las células CD44+ son consideradas células de memoria, pero también podemos encontrar un grupo de células T de memoria efectoras (Curtsinger *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1999; Masopust *et al.* 2001; Berard *et al.* 2003; Khanolkar *et al.* 2004. No obstante, no hay estudios que indiquen el efecto del vanadio en estas poblaciones de linfocitos.

Finalmente en esta sección se concluye que el pentóxido de vanadio induce la activación y aumento en el número y porcentaje de células SP en el timo; así como la disminución en el número de células seleccionadas positivamente (Fig. 25).

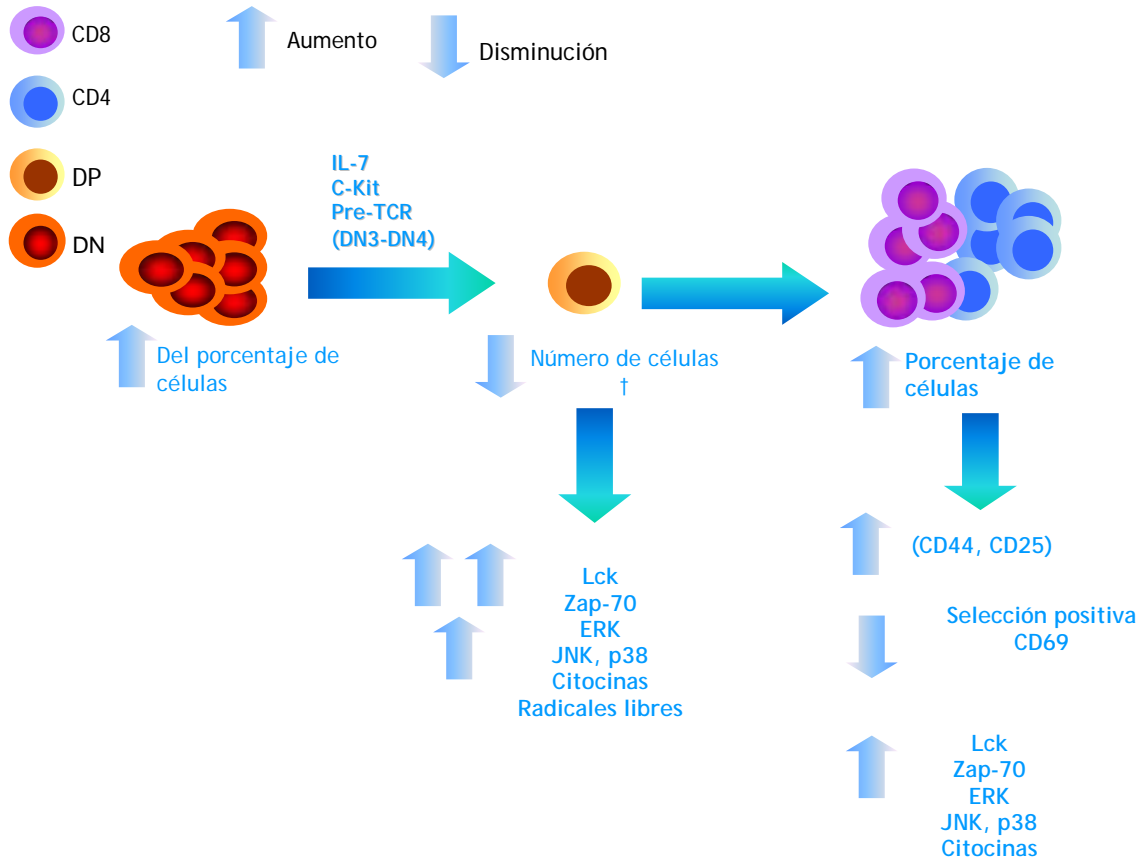


Fig. 25. Efecto de la inhalación del pentóxido de vanadio en los timocitos de ratón.

CONCLUSIONES

Con los resultados anteriormente descritos podemos concluir que la inhalación de pentóxido de vanadio induce en el timo:

- Localización de timocitos positivos a CD4 y CD8 predominantemente en la médula del timo.
- Aumento en el número y porcentaje de células CD4 y CD8 SP.
- Aumento en el porcentaje y número de células DN.
- Disminución en el porcentaje y número de células DP.
- Disminución en el número de células totales en el timo.

- Aumento en el número de células apoptóticas, primero en la corteza y luego en la médula.
- Aumento en las primeras semanas de exposición en la proporción de células SP positivas a CD25 y CD44 (marcadores de activación)
- Aumento de tamaño de la médula (se observó por medio de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de MHCII)
- Aparición de células CD19+ en la corteza del timo.

Un estudio más profundo sobre la acción que el vanadio induce en el desarrollo del timo, permitiría conocer si en realidad el vanadio induce la activación de vías de señalización (p.e. MAPK), migración celular y liberación de quimiocinas que pensamos son las implicadas en el fenotipo que muestran los timos de los animales expuestos a pentóxido de vanadio.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Litchman AH. Inmunología Celular y Molecular. Quinta Edición. ELSEVIER. Madrid. 563 pp.
- Acevedo Nava S. La participación de la peroxidación lipídica en el daño hepático por la inhalación de vanadio. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 2005.
- Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* 2002; 76: 27- 34.
- Al-Bayati M, Mohammad A, Culbertson R, Scheider JP, Rosenblatt LS, Raabe OG. The Lymphotoxic Action of Vanadate. *Journal of Enviromental Pathology, Toxicology and Oncology.* 1992; 2: 19-27
- Anderson G, Lane PTL y Jenkinson EJ. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nature Reviews.* 2007;7; 954-963.

- Ara, T. *et al.* A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development *in vivo*. *Journal of Immunology*. 2003; 170: 4649-4655.
- Aragón MA, Ayala Me, Fortoul TI, Bizarro P, Altamirano- Lozano M. Vanadium induced ultra structural changes and apoptosis in males germ cells. *Reproductive Toxicology*. 2005; 20: 127-134
- Ashe JM, Wiest DL, Abe R y Singer A. Zap 70 protein promotes tyrosine phosphorylation of T Cell Receptor signaling motives (ITAMs) in immatures CD4+ 8+ thymocytes with limiting p56lck. *The Journal of Experimental Medicine*. 1999; 189; 1163-1167.
- Baeuerle PA y Baltimore D. NF-kb: ten years. *Cell*. 1996; 87: 13.
- Baran EJ. Model studies related to vanadium biochemistry: Recent advances and perspectives. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. 2003; 14: 878-888
- Barat C y Tremblay MJ. Treatment of Human T Cells with Bisperoxovanadium Phosphotyrosyl Phosphatase Inhibitors Leads to Activation of Cyclooxygenase-2 Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 6992-7000.
- Benz, C., Heinzl, K. & Bleul, C. C. Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development. *European Journal of Immunology*. 2004; 34: 3652-3663
- Berard M, Brandt K, Bulfone Paus S y Tough DF. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 5018- 5026.
- Bommhardt V, Basson AM, Krummrei U y Zamoyska R. Activation of the extracellular signal- related kinase/mitogen activated protein kinase pathways discriminates CD4 versus CD8 lineage commitment in the thymus. *The Journal of Immunology*. 1999; 163: 715-722.
- Borowski C, Martin C, Gounari F. On the brink of becoming a T cell. *Current Opinion in Immunology*. 2002; 14: 200-206.
- Boscolo P, Di Giampaolo L, Qiao N, Reale M, Castellani ML, Lucci I, Travaglini P, Kouri M, Verna N, Volpe AR, Carmignani M, Paganelli R, Di Gioacchino M. Inhibitory effects of cadmium on peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine release are reversed by zinc and selenium salts. *Ann Clin Lab Sci*. 2005; 35:115-20.

- Boscolo P, Di Gioacchino M, Bavazzano P, White M, Enrico Sabbioni E. Effects of chromium on lymphocyte subsets and immunoglobulins. From normal population and exposed workers. *Life Scimca*. 1997; 60: 1319-1325.
- Boscolo P, Di Gioacchino M, Bavazzano P, White M, Enrico Sabbioni E. Effects of chromium on lymphocyte subsets and immunoglobulins. From normal population and exposed workers. *Life Scimca*. 1997; 60: 1319-1325
- Boyer O, Marodon G, Cohen JL, Lejeune L, Irinopoulou T, Liblau R, Bruneval P y Klatzmann. Human CD4 expression at the late single-positive stage of thymic development supports T cell maturation and peripheral export in CD4-Deficient mice. *The Journal of Immunology*. 2002; 169: 4347-4353.
- Bravo AH, Sosa ER. Características de los contaminantes atmosféricos. En: Contaminación del aire. Riesgos para la salud. Eds. Gutierrez JH, Romieu I, Fortoul T. México DF. *El Manual Moderno*. 1997. 1-4.
- Briggs D. Environmental pollution and the global burden of disease *British Medical Bulletin*. 2003; 68:1-24.
- Bumett RT, Smith- Doiron M, Stieb D, Cakmak S, Brook J. Effects of particulate matter and gaseous pollution on cardiorespiratory hospitalizations. *Archives of Enviromental Health*. 1999; 54: 130-139.
- Byczkowski J, Kulkarni AP. 1998. Oxidative Stress and pro-oxidant Biological Effects of Vanadium. Vanadium in the Enviroment Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver, 397 pp.
- Calderon-Garciduenas L, Mora-Tiscareno A, Chung CJ, Valencia G, Fordham LA, Garcia R, Osnaya N, Romero L, Acuna H, Villarreal-Calderon A, Devlin RB, Koren HS. Exposure to air pollution is associated with lung hyperinflation in healthy children and adolescents in Southwest Mexico City: a pilot study. *Inhal Toxicol*. 2000; 12: 537-561.
- Carter JD, Ghio AJ, Samet JM y Devlin RV. Cytokine Production by Human Airway Epithelial Cells after Exposure to an Air Pollution Particle Is Metal-Dependent. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 146: 180-188.
- Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2001; 222: 183-188.
- Chrest FJ, Buchholz MA, Ho Kim Y, Kwon T, Nordin AA. Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry*. 1995; 20:33-42.

- Chaudhary A, Saber NN, Gupta G. Beryllium-specific immune response in primary cells from healthy individuals. *Toxicology*. 2004; 201: 9-19.
- Chukhlovi AB, Tokalov SV, Yagunov AS, Westendorf J, Reincke H, Karbe L. In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. *Sci Total Environ*. 2001; 281:153-63.
- Cirila AM, Lava R, Bolsón G, Romanini GL y Bodini U. 56' Congr. Naz. Sot. It. Med. Lav. Ig. Ind. Venezia, October 1993, 424-435, SGE, Padova (1993).
- Crompton T, Gilmour KC y Owen MJ. The MAP kinase pathway controls differentiation from double- negative to double- positive thymocytes. *Cell*. 1996; 86: 243-251
- Curtsinger JM, Lins DC y Mescher MF. CD8+ memory T cells (CD44^{high}, Ly6C⁺) are more sensitive than naïve cells (CD44^{low}, Ly-6C⁻) to TCR/CD8 signaling in response to antigen. *The Journal of Immunology*. 1998; 160: 3236- 3243.
- D´ Cruz O y Uckun F. Vanadocene- Mediated in vivo male germ cell apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000; 166: 186-195
- De la Fuente H, Portales-Pérez D, Baranda L, Díaz Barriga F, Saavedra- Alanis V, Layseca E, Gonzalez-Amaro R. Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2002; 129:69-77.
- Delgado P, Fernández E, Dave V, Kapees D y Alarcón B. CD3 δ couples T cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature*. 2000; 406: 426-430.
- Donskoy E y Goldschneider. Two developmentally distinct populations of Dendritic Cells inhabit the adult thymus mouse; Demonstration by differential importation of hematogenous precursors under steady state conditions. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 3514-3521.
- Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity*. 1994; 1:83-93.
- Ehring GR, Kerschbaum HH, Fanger CM, Eder C, Rauer H y Cahalan MD. Vanadate Induces Calcium Signaling, Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channel Activation, and Gene Expression in T Lymphocytes and RBL-2H3 Mast Cells Via Thiol Oxidation. *The Journal of Immunology*, 2000; 164: 679-687.

- Englert N. Fine particles and human health—a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149: 235-242.
- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002; 42: 249-265.
- Falcón-Rodríguez CI, Librado-Ordoñez JL, Piñón-Zarate G, Rodríguez-Mata V, Reyes-Ruiz J, Fortoul TI. Cambios Bronquiolares como consecuencia de la inhalación de vanadio. Modelo en rata. VI Congreso Nacional de Toxicología. Celebrado en la Facultad de Química del 2 al 7 de Julio del 2006
- Falk I, Nerz G, Haidl I, Krotkova A, Eichmann K. Immature thymocytes that fail to express TCRbeta and/or TCRgamma delta proteins die by apoptotic cell death in the CD44(-)CD25(-) (DN4) subset. *European Journal of Immunology*. 2001; 31: 3308-3317.
- Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2004; 18: 203- 205.
- Fernandez A, Wents JO, Wolski N, Hein KRG, Wang S, Witten ML. Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel. *Chemosphere* 51(2003)1129-1139
- Fortoul TI, Quan-Torres A, Sánchez I, López IE, Bizarro P, Mendoza ML, Saldivar Osorio L, Espejel Maya G, Ávila Casado MC, Ávila Costa MR, Colín Barenque L, Navarro Villanueva D, Olaiz Fernández G. Vanadium in Ambient Air: Concentrations in Lung Tissue from Autopsies of Mexico City Residents in 1960s and 1990s. *Archives of Environmental Health* 2002; 57: 446-449
- Fortoul TI, Saldivar OL, Tovar TA. Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents: comparison of cases from the 1950s and the 1980s. *Environ Health Perspect*. 1996; 104: 630-632.
- Fraker PJ, Haas SM, Luecke RW. Effect of zinc deficiency on the immune response of the young adult A/J mouse. *J Nutr*. 1977; 107:1889-1895.
- Freeman B. Environmental Ecology. The Ecological Effects of pollution, Disturbance and other Stresses. Academic Press. 1998. New York. 606 pp
- García- Guevara JA. Una semblanza de la química del vanadio. *Profesores al día*. 1996; 185- 189.

- Geneser F. *Histología*. Editorial Médica Panamericana. 2004. Madrid. 813pp
- Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2: 309-322.
- Ghio AJ, Samet JM. *Air Pollutions and Health*. Academic Press. 1999. New York. 648 pp.
- González Villalva A. Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda y crónica de vanadio en médula osea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 2005.
- Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, Sibley R. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces: study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Jt Surg*. 1998; 80-B: 5319.
- Graham DB, Bell MP, Huntoon CJ, Griffin MD, Tai X, Singer A y Mckean DJ. CD28 ligation coestimulates cell death but not maturation of Double-Positive Thymocytes due to Defective ERK MAPK signaling. *The Journal of Immunology*. 2006; 177: 6098-6107
- Groves T, Parsons M, Miyamoto NG, Guidos CJ. TCR engagement of CD4+ CD8+ thymocytes in vitro induces early aspects of positive selection, but not apoptosis. *The Journal of Immunology*. 1997; 158: 65-75.
- Haken A, Sasaki T, Kozieradzki I y Penninger JM. The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocytes apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1999; 189: 957.
- Hare KJ, Jenkinson EJ y Anderson G. CD69 expression discriminates MHC-Dependent and independent stages of Thymocyte Positive selection. *The Journal of Immunology*. 1999; 162: 3978- 3983.
- Hashimoto K, Whitehurst CE, Lipsky PE. Synergistic inhibition of T cell proliferation by gold sodium thiomalate and auranofin. *J Rheumatol*. 1994; 21:1020-6.
- Hogquist KA. Central Tolerance: learning self- control in the thymus. *Nat. Rev Immunol*. 2005; 21: 772-785.
- Horbinski C, Chu CT. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 38: 2-11.
- Huang C, Dinos M, Li J, Leonard S, Rojanasakul Y, Casatranova V, Vallyanthan V, Ju Gong J, Shi X. Vanadium induced nuclear factor of activated T cells

activation through Hydrogen Peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; 276: 22397-22403.

- Huang YC, Soukup J, Harder S, Becker S. Mitochondrial oxidant production by a pollutant dust and NO₂- mediated apoptosis in human alveolar macrophage. *Am J. Physiol Cell Physiol*. 2003; 284: c 24- c 32.
- Instituto Nacional de Ecología. Primer coloquio binacional México- Japón sobre gestión ambiental: contaminación atmosférica. 1996. 1-173.
- Ivancsits S, Pilger A, Diem E, Schaffer A, Rüdiger WH. Vanadate induces DNA strand break in culture human fibroblasts at doses relevant occupational exposure. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2002; 519:25-35
- Jadhav AL, Ramesh GT, Gunasekar PG. Contribution of protein kinase C and glutamate in Pb(2+)-induced cytotoxicity. *Toxicology Letters*. 2000; 115: 89-98.
- Järup L. Hazards of heavy metals contamination. *British Medical Bulletin*. 2003; 68:167-182.
- Jaspers I, Samet JM, Erzurum S, Reed W. Vanadium-Induced kB-Dependent Transcription Depends upon Peroxide-Induced Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2000; 23: 95-102.
- Juntilla M, Wofford J, Birnbaum M, Rathmell J y Koretzky GA. Akt1 y Akt2 are required for thymocyte survival and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. Immunology*. 2007; 104: 12105- 12110
- Khanolkar A, Fuller MF y Zajac AJ. CD4 T cell dependent CD8 T Cell maturation. *The Journal of Immunology*. 2004; 172: 2834- 2844.
- Kim CH y Broxmeyer HE. Chemokines: signal for trafficking of T and B cells for development ad effector function. *Journal of Leukocyte Biology*. 1999; 65; 6-15.
- Kim KJ, Chiba J, Rubash HE. In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. *J Bone Jt Surg*. 1994; 76-A:172-80.
- Kimber I, Jackson JA, Stonard MD. Failure of inorganic exposure to impar natura killer (NK) and T lymphocyte function in rats. *Toxicology Letters*. 1986; 31:211-8.
- Krejsa C, Nadler SG, Esselstn M, Kavanagh T, Ledbetter JA, Schievens GL. Role of Oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *JBC*. 1997; 272: 11549- 11549.
- Lambert ML, Dong W, Winsett DW, Selgrade MJK y Gilmour MI. Residual Oil Fly Ash Exposure Enhances Allergic Sensitization to House Dust Mite. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1999; 158: 269-277.

- Lee K, Shen X, König R. Effects of Cadmium and vanadium ions on antigen-induced signaling in CD4⁺ T cells. *Toxicology*. 2001; 169: 53-65.
- Legname G, Seddon B, Lovatt M, Tomlinson P, Samer N, Tolaini M, Williams K; Norton T, Kioussis D y Zamoyska R. Inducible expression of p56^{lck} transgene reveals a central role for Lck in the differentiation of CD4⁺ SP Thymocytes. *Immunity*. 2000; 12: 537-546.
- Leonard A, Gerber GB. Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of vanadium. Vanadium in the environment. Segunda Parte.1998. *Health Effects. Wiley and Sons*
- Lewis JB, Wataha JC, McCloud V, Lockwood PE, Messer RL, Tseng WY. Au(III), Pd(II), Ni(II), and Hg(II) alter NF kappa B signaling in THP1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res A*. 1995; 74:474-81.
- Li J, Dokka S, Wang L, Shi X, Castranova V, Yan Y, Casta M y Huang C. Activation of aPKC is required for vanadate-induced phosphorylation of protein kinase B (Akt) but not p70^{S6k} in mouse epidermal JBG cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004; 255: 217-225.
- Li Z, Stonehuerner J, Devlin RB y Huang YT. Discrimination of Vanadium from Zinc Using Gene Profiling in Human Bronchial Epithelial Cells. *Environ Health Perspect*. 2005; 113:1747-1754.
- Mao C, Tili EG, Dose M, Haks MC, Bear SE, Maroulakou I, Horie K, Gaitanaris GA, Fidanza V, Ludwig T, Wiest DL, Gounari F and Tsihchlis PN. Unequal contribution of Akt isoforms in the Double- Negative to Double- Positive Thymocyte Transition. *The Journal of Immunology*; 178: 5443-5453
- Mariathasan S, Zakarian A y Ohashi PG. Degree of ERK activation influences both positive and negative selection. *European Journal Immunology*. 2000; 1060-1068.
- Masopust D, Vezyts V, Marzo AL y Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 2001; 291 2413
- Masui T, Sakano S, Hasegawa Y, Warashina H, Ishiguro N. Expression of inflammatory cytokines, RANKL and OPG induced by titanium, cobalt-chromium and polyethylene particles. *Biomaterials*. 2005; 26: 1695-1702.
- McKean DJ, Huntoon CJ, Bell MP, Tai X, Sharrow S, Hedin KE, Conley A y Singer A. Maturation versus death of developing double-positive thymocytes reflects competing effects on Bcl-2 expression and can be regulated by the

- intensity of CD28 coestimulation. *The Journal of Immunology*. 2001; 166: 3468-3475.
- McNeil LK, Starr TK y Hogquist KA. A requirement for sustained ERK signaling during thymocyte positive selection in vivo. *PNAS. The National Academy of the USA*. 2005; 102: 13574-13579.
 - Michie AM, Zuniga-Pflucker JC. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. *Semin Immunol*. 2002; 14:311- 323.
 - Mishra KP, Singh VK, Rani R, Yadav VS, Chandran V, Srivastava SP, Seth PK. Effect of lead exposure on the immune response of some occupationally exposed individuals. *Toxicology*. 2003; 188:251-9.
 - Misslitz, A. *et al*. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J. Exp. Med*. 200, 481-491 (2004).
 - Molina MJ, Molina LT. Megacities and atmospheric pollution. *J Air Waste Manag Assoc*. 2004;54(6):644-80.
 - Morinville A, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signaling. *TIPS*. 1998; 19: 452-460
 - Mugica V, Maubert M, Torres M, Muñoz J, Rico E. temporal and spatial variations of metal content in TSP and PM10 in Mexico city during 1996-1998. *Journal of Aerosol Science*. 2001; 33: 91-102.
 - Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*. 2004;150: 135-143
 - Murphy DB, Lo D, Rath S, Brinster R, Flavell RA, Slanetz A y Janeway CA. A novel MHC Class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex. *Nature*. 1989; 338: 765-768.
 - Mustelin T, Alonso A, Bottini N, Huynh H, Rahmouni S, Nika K, Louis-dit-Sully C, Tautz L, Togo SH, Bruckner S, Mena-Duran AV, al- Khouri AM. Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Molecular Immunology*.2004; 41: 687-700.
 - Nakayama T, Kasprovicz DJ, Yamashita M, Schubert LA, Gillard G, Kimura M, Didierlaurent A, Koseki H y Ziegler SF. The generation of mature single positive in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *The Journal of Immunology*. 2002; 168: 87-94

- Navarro M, Fraile G, Velasquez M, Gonzalez E, Escalona J, Ilanjan R, Abad MJ, Taylor P. Effect of a gold-chloroquine complex and inflammation-related leukocyte functions and cell viability. Comparison with auranofin. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56:826-33.
- Negishi I, Motoyama N, Nakayama K, Senju S, Hatakeyama S, Zhang Q, Chan AC y Loh DY. Essential role for Zap-70 in both positive and negative selection in thymocytes. *Nature*. 1995; 376: 435.
- Newman CM y McIntosh AW. Advances in Trace Substances Research Metal Ecotoxicology. *Concepts and Applications*. Lewis Publishers. 1991. Orlando. 456 pp.
- Nohara K, Ao K, Miyamoto Y, Suzuke T, Maisumi S, Tateishi Y, Amura S, Tohyama C y Kobayshi T. *Toxicological Sciences*. 2008; 2: 226- 238.
- Ogasawara H, Hida S, Weng Y, Saiura A, Sato K, Takayanagi H, Sakaguchi S, Yokochi T, Kodama T, Naitoh M, De Martino JA y Taniguchi T. Requirement of the IFN induced CXCR3 chemokine signalling for CD8+ T cell activation. *Genes to Cells*. 2002; 7: 309-320.
- Ohba S, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori I, Mori A. Metal ions affect neuronal membrane fluidity of rat cerebral cortex. *Neurochemistry Res*. 1994; 19: 237-241.
- Onursal B, Gautam SP. Contaminantes ambientales y sus efectos. En: Contaminación atmosférica por vehículos automotores. Documento técnico del Banco Mundial. Washington. 1997. 15-57.
- Ouellet M, Barbeau B y Tremblay MJ. p56^{lck}, ZAP-70, SLP-76, and Calcium-regulated Effectors Are Involved in NF-κB Activation by Bisperoxovanadium Phosphotyrosyl Phosphatase Inhibitors in Human T Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274: 35029-35036,
- Oyama TM, Oyama TB, Oyama K, Sakanashi Y, Morimoto M, Matsui H y Oyama Y. Clotrimazole an antifungal drug possessing diverse actions, increases membrana permeation of cadmium in rat thymocytes. *Toxicology in vitro*. 2007; 21: 1505-1512.
- Oyama Y, Noguchi S, Nakata M, Okata Y, Yamazaki Y, Funai M, Chikahisa L y Kanemaru K. Exposure of rat thymocytes to H₂O₂ increases annexin V binding to membranas, inhibitory actions of deferoxamine and quercetin. *European Journal of Pharmacology*. 1999; 384: 47-52

- Palacios HE y Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in the T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004; 23: 7990-8000.
- Parente JE, Walsh MP, Girard PR, Kuo JF, Ng DS, Wong K. Effects of gold coordination complexes on neutrophil function are mediated via inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol*. 1989; 35:26-33.
- Petanova J, Fucikova T, Bencko V, Sterzl I. The influence of metals on the expression of surface antigens on human lymphocytes in vitro. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006; 29: 27(Suppl1).
- Petanova J, Fucikova T, Bencko V. Cadmium and zinc sulphates on the function of human T lymphocytes in vitro. *Cent Eur J Public Health*. 2000; 8:137-40.
- Petanova J, Fucikova T, Bencko V. Interference of CD95 expression on human lymphocytes. *Int J Hyg Environ Health*. 2002; 204:381-3.
- Peters A, Dockery WD, Muller JE, Mittleman MA. Increase particulate air pollution and triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001; 103:2810-2815.
- Petrie HT. Cell migrations and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nature Reviews*. 2003; 3: 859-866.
- Piñón Zárata G, Rojas Lemus M, Montaño LF, García Zepeda E. Chapter 5; Metals and Immune System. En *Metals and Toxicological Implications in Health*. Research Signpost. 2007.
- Piñón Zárata G. Alteraciones morfológicas de bazo secundarias a la inhalación aguda, Subaguda y crónica de pentóxido de vanadio. Modelo en ratón. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2005.
- Piñón-Zarate G, Rodríguez-Lara V, Rojas-Lemus M, Martínez-Pedraza M, González-Villalva A, Barquet A, Masso F, Montaño LF, Fortoul TI. Vanadium pentoxide-inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses. 2008. In Press.
- Plotkin J, Prockop SE, Lepique A y Petrie H T. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *The Journal of Immunology*. 2003; 171: 4521-4527
- Provinciali M, Di Stefano G, Stronati S. Flow Cytometric Analysis of CD3/TCR Complex, Zinc, and Glucocorticoid-Mediated Regulation of Apoptosis and Cell Cycle Distribution in Thymocytes From Old Mice. *Cytometry*. 1998; 32:1-8.

- Pyatt DW, Zheng JH, Stillman WS, Irons RD. Inorganic lead activates NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 227: 380-385.
- Qureshi MA, Hill CH, Heggen CL. Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1999; 68: 61-71.
- Rajanna B, Chetty CS, Rajanna S, Hall E, Fail S, Yallapragada PR. Modulation of protein kinase C by heavy metals. *Toxicol. Letters.* 1995; 81: 197-203.
- Ramírez P, Eatmond DA, Laclette JP, Ostrosky- Wegman P. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutation Research.* 1997; 386: 291- 298.
- Reinholz MM, Bertics PJ, Miletic V. Chronic exposure to lead acetate affects the development of protein kinase C activity and the distribution of the PKC gamma isozyme in the rat hippocampus. *Neurotoxicology.* 1999; 20: 609- 617.
- Ress NB, Chon JB, Renne RA, Dill JA ; Miller RA, Roycroft JH, Hailey JR, JK Haseman y Bucher JR. Carcinogenicity of inhaled Vanadium pentoxide in F344/rats and B5C3F Mice. *Toxicological Science.* 2003; 74: 287-296.
- Riveros Rosas H, Pfeifer G, Lynam D, Pedroza JL, Julian Sanchez A, Canales O, Garfias J. Personal exposure to elements in Mexico City air. *The science of total environment .*1997; 79-96.
- Rodriguez- Mercado J, Roldan Reyes E, Altamirano Lozano M. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood. *Toxicology Letters.*2003; 144: 359-369.
- Roldan RE, Altamirano- Lozano M. Chromosomal aberration, sister chromatid exchange, cell cycle kinetics and satellite association in human lymphocytes cultures exposed to vanadium pentoxide. *Mutat Res* 1990; 245: 61-65.
- Rosales-Castillo JA, Torres-Meza VM, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud pública de México.* 2001; 43:544-555
- Sakurai T. Biomethylation of arsenic is essentially detoxicating event. *J. Health Sci.* 2003; 49: 171-178.

- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M y Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999; 401: 708
- Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg P y Reed W. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals *Am. J. Physiol (Lung Cell. Mol. Physiol)*. 1998; 19: L551-L558.
- Sata F, Araki S, Tanigawa T, Morita Y, Sakurai S, Katsuno N. Changes in natural killer cell subpopulation in lead workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1997; 69:306-10.
- Savabieasfahani M, Lochmiller RL, Rafferty DP, Sinclair JA. Sensitivity of wild cotton rats (*Sigmodon hispidus*) to the immunotoxic effects of low-level arsenic exposure. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1998; 34:289-96.
- Savino W, Areas Mendes-da-Cruz D, Smaniotto S, Silva-Monteiro E y Serra Villa-Verde M. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 75: 951-961
- Schaeffer EM, Debnath J, Yap G, McVicar D, Liao XC, Littman DR, Sher A, Varmus HE, Lenardo MJ y Schwartzberg PL. Requirement for Tec kinases Rik and Itk in Tcell receptor signaling and immunity. *Science*. 1999; 284: 638.
- Schanne FA, Long GJ, Rosen JF. Lead induced rise in intracellular free calcium is mediated through activation of protein kinase C in osteoblastic bone cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1997; 1360: 247-254.
- Schmedt C, Saijo K, Niidome T, Kuhn R, Aizawa S y Tarakhovsky A. Csk controls antigen receptor mediated development and selection of T lineage cells. *Nature*. 1998; 394: 901.
- Shen X, Lee K, König R. Effects of heavy metal ions on resting and antigen-activated CD4+ T cells. *Toxicology*. 2001; 169; 67-80.
- Shortman K, Wu L. Early T lymphocyte progenitors. *Annu Rev Immunol*. 1996; 14: 29-47.
- Sikorski EE, Burns LA, McCoy KL, Stern M, Munson AE. Suppression of splenic accessory cell function in mice exposed to gallium arsenide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991; 110:143-56.
- Starr TK. Positive and negative selection of T cell. *Annu. Rev. Immunol*. 2003; 21: 139- 176.

- Steffensen IL, Mesna OJ, Andruchow E, Namork E, Hylland K, Andersen RA. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes in vitro. *Gen Pharmacol*. 1994; 25:1621-33.
- Sugawara T, Moriguchi T, Nishida E y Takahama Y. Differential roles of ERK and p38 MAPkinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity*. 1998; 9: 565.
- Sun X, Tian X, Tomsig JL, Suszkiw JB. Analysis of differential effects of Pb²⁺ on protein kinase C isozymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1999; 156: 40-45.
- Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews*. 2006; 6; 127-135.
- Tanigawa T, Takehashi H, Nakata A. Naive (CD4+CD45RA+) Tcell population is susceptible to varius types of hazardous substances in the workplace. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004; 17(2 Suppl):109-14.
- Tanigawa T, Takehashi H, Nakata A. Naive (CD4+CD45RA+) Tcell population is susceptible to varius types of hazardous substances in the workplace. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 17(2 Suppl). 2004:109-14.
- Thomson KH, McNeill JH. 1998. Toxicology of vanadium in mammals. Vanadium in the Enviroment. Part 2. Health Effects. John Wiley and Sons. Vancouver, 397 pp.
- Tonner LE, Heiman AS. Lead may affect glucocorticoid signal transduction in cultured hepatoma cells through inhibition of protein kinase C. *Toxicology*. 1997; 119: 155-166.
- U.S. EPA. 1987. Health Effects Assessment for Vanadium and Compounds. *Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office*, Cincinnati, OH
- U.S. EPA. 1991a. Health Effects Assessment Summary Tables. Annual FY-91. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, *Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH, for the Office of Emergency and Remedial Response*. Washington, DC.
- U.S. EPA. 1991b. Vanadium Pentoxide. Integrated Risk Information System (IRIS). *Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office*, Cincinnati, OH.
- Utell MJ y Samet JM. Particulate air pollution and health. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1993; 147: 1334-1335.

- Vallejo M, Jáuregui- Renaud K, Hermosillo AG, Marquez MF, Cárdenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. 2003; 139 (1): 57-63.
- Vandenplas O, Binard -van Cangh F, Gregoire J, Brumagne A, Larbanois A. Fever and neutrophilic alveolitis caused by vanadium based catalyst. *Occup Environ med*. 2002; 59: 785-787.
- Vega L, Styblo M, Patterson R, Cullen W, Wang C, Germolec D. Differential Effects of Trivalent and Pentavalent Arsenicals on Cell Proliferation and Cytokine Secretion in Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2001; 172: 225-232.
- Von Boemer H. Positive selection of lymphocytes. *Cell*. 1994; 76: 219- 228.
- Wang TS, Kuo CF, Jan KY, Huang H. Arsenite induces apoptosis in chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol*. 1996; 169:256-68.
- Wang Y Z, Ingram JL, Walters DM, Rice AB, Santos JH, Van Houten B y Bonner JC. Vanadium-induced STAT-1 activation in lung myelofibroblasts requires H₂O₂ and P38 MAP Kinase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 35: 845-855.
- Wang YZ, Bonner JC. 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*. 2000; 22: 590-596.
- Waters WR, Rahner TE, Palmer MV, Cheng D, Nonnecke BJ y Whipple DL. Expression of L-Selectine (CD62L), CD44 and Cd25 on activated Bovine T cells. *Infection and Immunity*. 2003; 317-326
- Wei CI, Cohen MD, Tan H. Effect of Ammonium Metavanadate on the Murine Immune Response. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1986; 19: 279-298.
- Wong K, Parentell J, Prasad K, Ng D. Auranofin Modulated Cytoplasmic Free Calcium in Neutrophils by Mobilizing Intracellular Calcium and Inhibiting Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265: 21454-21461
- Woodin MA, Hauser R, Liu Y, Smith TJ, Siegel PD, Lewis DM, Tollerud DJ, Christiani DC. Molecular Markers of Acute Upper Airway: Inflammation in workers exposed to Fuel-Oil Ash. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 158: 182-187.

- World Health Organization. International Program on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document. Vanadium Pentoxide ad other inorganic vanadium compounds. 2000.
- Wu L y Strasser A. Decisions, decisions... beta-catenina- mediated activation of TCF-1 and Lef-1 influences the fate of developing T cells. *Nature Immunology*. 2001; 9: 823-824.
- Xing Y, Wang X, Igarashi H, Kawamoto H y Sakaguchi N. Protein phosphatase subunit G5PR that regulates the JNK-mediated apoptosis signal is essential for the survival of CD4 and CD8 double-positive thymocytes. *Molecular Immunology*. 2008; 7; 2028- 2037.
- Yablonski D, Kuhne MR, Kadlecsek T y Weiss A. Uncoupling of nonreceptor tyrosine kinases from PLC-g1 in an SLP-76 deficient T cell. *Science*. 1998: 281; 413.
- Yaglom J, Ekhterae D, Gabai V, Sherman MY. Regulation of Necrosis of H9c2 Myogenic Cells upon Transient Energy Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278: 50483-50496
- Ye J, Ding M, Leonard SS, Robinson VA, Millecchia L, Zhang X, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem*. 1999; 20:9-17.
- Zhang W, Sloan Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP y Samelson LE. LAT: the ZAP70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell*. 1998:92; 83
- Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard S, Lanciotti R, Butterworth L y Shi X. Vanadate- induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001; 392: 311-320.
- Zuniga-Pflucker JC. T-cell development made simple. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:67-72.