



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

"EFECTO DE LA INHALACION DEL  
PENTOXIDO DE VANADIO ( $V_2O_5$ ) EN LA  
MORFOFISIOLOGIA DE LAS CELULAS  
DENDRITICAS (CD) DEL TIMO DE  
RATON"

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. MARTHA LUZ USTARROZ CANO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER  
GOES

COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
DRA. MARIA ISABEL GARCIA PELAEZ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **USTARROZ CANO MARTHA LUZ** con número de cuenta **76840665** con la tesis titulada: **"EFECTO DE LA INHALACIÓN DEL PENTÓXIDO DE VANADIO (V2O5) EN LA MORFOFISIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD) DEL TIMO DE RATÓN"**. realizada bajo la dirección de la : **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**

**PRESIDENTE:** DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
**VOCAL:** DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
**SECRETARIO:** DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
**SUPLENTE:** DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
**SUPLENTE:** DRA. MARÍA ISABEL GARCÍA PELÁEZ

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cd. Universitaria, D.F., a 17 de septiembre de 2012

*M. del Coro Arizmendi*

**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo otorgado por el Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Agradezco a mi comité tutorial, a la Dra. Fortoul por haberme apoyado en todo momento.

A la Dra. Soldevila por todas sus aportaciones a este trabajo.

A la Dra. García Peláez por todos sus consejos durante la realización de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS TECNICOS**

A la Bióloga Diana Millán Aldaco, por la realización de los cortes histológicos por congelación, ¡impecables!

Agradezco a la Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata por la realización de los cortes histológicos de parafina, ¡invaluables!

Al Biólogo Francisco Pasos Nájera, por las fotomicrografías, ¡excelentes!

A los miembros del jurado, Dra. Ingeborg Becker, Dr. Luis Felipe Jiménez y Dr. Andrés Castell.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Tere por toda la ayuda dada y el empuje que me dio para estudiar el doctorado, en verdad, te lo agradezco.

A Isabel por su amistad incondicional, fuiste un excelente apoyo.

A todos los miembros de este grupo de trabajo, a Adrianita, Lauris, Paty, Carlitos Hoomsoftler, Nelly, Marce, Rubén, Vianey y Gumaro, una muestra de lo que es el trabajo en equipo.

A Paco y Armando por su sincera amistad que ha crecido mucho.

A Gaby, Miguel y Andrés por tantos momentos de risas y desvaríos, ¡jjajaja!.

ORGULLOSAMENTE UNAM!!!!, mi segunda casa.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi mamá por ser lo que soy ahora, gracias mamá y perdón por las cosas que te he hecho sufrir, ¡te quiero mucho!

Papá donde quiera que estés, espero estés orgulloso de mi, te recuerdo con mucho cariño.

A mis hermanos y mi sobrina por estar allí cuando los he necesitado, gracias.

A Charlie y Pablo por creer en mi, ¡me caen muy bien!

Y a todas las personas que directa o indirectamente han tenido que ver con el desarrollo de este trabajo, una vez más, ¡gracias!

# I. INDICE

I. INDICE	7
II. RESUMEN	8
III. ABSTRACT	10
IV. INTRODUCCION	12
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
VI. HIPOTESIS	33
VII. OBJETIVOS	34
VIII. METODO	35
IX. RESULTADOS	40
X. DISCUSION	48
XI. CONCLUSIONES	55
XII. BIBLIOGRAFIA	56

## II. RESUMEN

El Vanadio (V) es un metal que se adosa a las partículas suspendidas totales menores de  $2.5\mu$  ( $PST_{2.5}$ ), es un contaminante atmosférico cuya concentración se ha incrementado en las últimas décadas en la atmósfera de la ciudad de México. El V es liberado a la atmósfera por las actividades de la industria metalúrgica y por la quema de combustibles fósiles y sus derivados ya que este metal se encuentra en altas concentraciones (>50%) en muchos tipos de petróleos incluyendo el mexicano. El V proveniente de estas fuentes se libera en forma de óxidos, principalmente pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) y es así como la población general se encuentra expuesta de forma importante a este metal mediante la vía inhalada, la cual constituye la principal ruta de absorción.

Las células dendríticas (CD) son una población heterogénea originaria de médula ósea que difieren en marcadores de superficie, producción de citocinas, localización y pueden ser de origen mieloide y linfoide, las CD del timo están encargadas de la selección negativa de linfocitos T para evitar la salida a la circulación de clonas autorreactivas.

Los reportes previos de nuestro grupo muestran que la inhalación de V provoca cambios en la morfología del bazo y disminuye la respuesta inmune humoral en ratones, estos cambios sugieren un efecto en el sistema inmunológico, también se reportó en el grupo que la inhalación del V induce cambios morfológicos en el timo del ratón, cambios en la relación de la corteza-médula, estos hechos nos sugieren que las CD pueden estar alteradas debido a la inhalación del V; por lo que

decidimos identificar los cambios en el número y función de las CD en el timo de ratón expuesto a la inhalación de  $V_2O_5$ .

Para esto utilizamos ratones machos de la cepa CD1, a los que se puso inhalar  $V_2O_5$  0.02M durante una hora, dos veces por semana, durante 4 semanas. Al final de cada semana se sacrificaron ratones control y ratones expuestos, se les extrajo el timo y éste se procesó para realizar inmunohistoquímica para DEC-205, CD11c (marcadores de CD), citoqueratina 8 (marcador de células epiteliales). Posteriormente otro lote de ratones fueron sometidos al mismo protocolo de inhalación, se sacrificaron y se les extrajo el timo y se realizó un protocolo de separación de CD utilizando el MACS, las células aisladas se utilizaron para realizar citometría de flujo para CD11c y MHCII (marcador de células presentadoras de antígenos).

Los resultados que obtuvimos por inmunohistoquímica mostraron que en el timo de los ratones expuestos había menor cantidad de células CD11c+, resultados que corroboramos mediante la citometría de flujo, es decir, que la expresión de CD11c y MHCII disminuyó en el timo de los ratones expuestos, así como el porcentaje de células CD11c+ y MHCII+.

Por lo anterior concluimos que la inhalación de V disminuyó la expresión del CD11c y del MHCII en el timo de ratones expuestos. Debido a esto y a los antecedentes del grupo respecto a las alteraciones en el sistema inmunológico, suponemos que la selección negativa de linfocitos T puede estar alterada y que esto pudiera ocasionar la salida de clonas autorreactivas a la circulación.

### III. ABSTRACT

Vanadium is a transition metal found in  $2.5\mu$  (PST<sub>2.5</sub>) atmospheric suspended particles, and its concentration has increased in Mexico City. This element is released into the atmosphere as a consequence of industrial activities and by the combustion of fossil fuels in which this element is in high concentrations, such as Mexican oil. Vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ) is the main form liberated into the atmosphere, and by inhalation is how population is exposed.

Dendritic Cells (CD) are a heterogeneous cell population whose origin are the bone marrow owning different surface biomarkers, cytokine production, and location. By its origin CDs could be myeloid or lymphoid. Thymic CD's function is negative lymphocytes T selection for preventing autoreactive clones to reach systemic circulation.

Our previous reports have shown that V inhalation induced spleen histological changes associated with a decrease in humoral immune response. Also we reported thymic morphological changes reflected in the loss of medulla/cortex relationship; former findings suggested that CD might be involved because of vanadium inhalation, and for this reason we evaluated the quantity and functional changes in mice thymic CD cells after  $V_2O_5$  inhalation. With this purpose CD-1 male mice inhaled 1h twice a week,  $V_2O_5$  [0.02M] for 4-week period. At the end of the exposure controls and exposed mice were sacrificed, thymuses were removed and processed for immunohistochemistry for DEC-205, CD11c (CD biomarkers), and cytokeratin 8 for epithelial cells. Later on another mice batch was exposed to

the same experimental protocol, thymuses was removed, CD cells were collected by MACS, and marked for cytometry analysis with CD11c and MHCII (antigen presenting cells).

Our results indicated a reduced CD11c+ immunostained exposed mice, results supported by our cytometric findings in which CD11c and MHCII percentage decreased in exposed mice.

Because of our results we concluded that inhaled V decreased CD11c and MHCII thymic expression, which might lead to an inefficient T-cell negative clone selection and the presence of autoreactive clones in systemic circulation

## **IV. INTRODUCCION**

### **Contaminación Atmosférica**

Desde los inicios de la civilización el hombre ha ocasionado la contaminación atmosférica. A medida que la población ha ido en aumento, la contaminación se ha hecho crítica llegando a niveles que pueden alterar la salud y a los propios ecosistemas. Aunque existe la conciencia del peligro que representa una atmósfera contaminada, la llegada de la era industrial hace que el problema de ésta adquiriera su justa dimensión, llegando en nuestros días a constituir un motivo de inquietud creciente en las zonas urbanas e industriales. La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afectar estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Vallejo et al., 2003).

Las fuentes de contaminantes ambientales son naturales y antropogénicas, y éstas últimas son las que han cobrado gran importancia debido a su incremento. Dentro de las naturales se encuentran los incendios forestales y las erupciones volcánicas. Las actividades del hombre que producen contaminantes atmosféricos son el uso de fogatas, la combustión de madera hasta la industrialización y urbanización de las grandes ciudades. (Vallejo et al., 2003).

La exposición a la contaminación atmosférica es todavía la principal fuente de riesgo en la salud de todo el mundo pero, más aún, en países en desarrollo debido a la falta de un monitoreo detallado. Sin embargo, en los últimos años se han

hecho varios intentos para medir la carga global ocasionada por la contaminación atmosférica (Briggs, 2003).

El aire limpio es uno de los requerimientos básicos para la salud y el bienestar, sin embargo, durante el proceso de desarrollo económico, la contaminación atmosférica ha sido y es un gran peligro para la salud. Además del desarrollo económico, existen otros fenómenos que producen un incremento en la contaminación atmosférica, como lo son la urbanización, el consumo de energía, el transporte, la motorización, así como el incremento en la población urbana. Los efectos de esta exposición pueden ser observados aún cuando los niveles de contaminación estén por debajo de los niveles indicados para la calidad del aire. Los individuos difieren ampliamente en la predisposición genética y en la respuesta fisiológica a los contaminantes, los más susceptibles son los niños y las personas mayores con predisposición a enfermedades cardiovasculares y pulmonares, los trabajadores de ciertas industrias también pueden aumentar el riesgo de exposición a contaminantes (Bingheng y Haidong, 2008).

Los peores escenarios de la contaminación atmosférica se localizan en los países en desarrollo, como son Latinoamérica, Asia y África.

### **Zona Metropolitana de la Ciudad de México**

La ciudad de México tiene 20 millones de habitantes, por lo que es considerada una megaciudad, que se definen como las ciudades con más de 10 millones (Molina y Molina, 2004), la zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM) es una cuenca situada a 2240 m sobre el nivel del mar, tiene un parque vehicular de

cerca de 4 millones de automóviles que quema aproximadamente de 40 millones de litros de combustible al día, tiene 35 000 industrias y se encuentra rodeada de montañas de hasta un km de alto, lo que hace prácticamente imposible, que si hubiera grandes corrientes de aire se dispersaran los contaminantes; con este panorama es claro que las condiciones climáticas, geográficas y sociales de la ZMCM han hecho que la contaminación atmosférica sea un problema muy grave de salud en ella (Vallejo et al., 2003; Molina et al., 2004) (Figura 1).



Figura 1. Imágenes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

En las megaciudades se han identificado una gran cantidad de contaminantes, hay algunos para los que se han establecido normas de

concentraciones permisibles en la atmósfera, como lo son el ozono ( $O_3$ ), el monóxido de carbono (CO), el bióxido de azufre ( $SO_2$ ), el bióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), el plomo (Pb), el Cadmio (Cd), las partículas suspendidas totales (PST), siendo éstas últimas unas de los más importantes contaminantes en la ZMCM (Vallejo et al., 2003) (Figura 2).

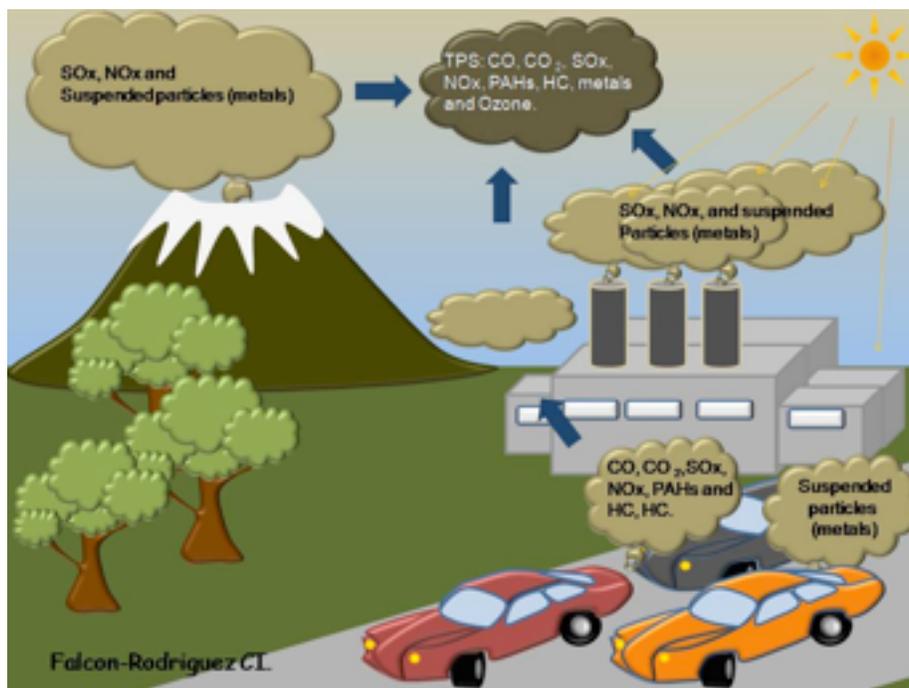


Figura 2. Contaminantes atmosféricos. Tomado de Fortoul et al., 2009.

### Partículas suspendidas totales

Dentro de las PST se incluyen sustancias que provienen de suelos erosionados o que se forman en la atmósfera por la combustión. Consisten en núcleos de carbón y en ellos se adosan otros tipos de partículas, tales como hidrocarburos aromáticos, gases, polvos, iones, material biológico como lipopolisacáridos y

metales de transición (Fortoul et al., 2009). Las PST son causantes de efectos adversos para la salud humana, y se clasifican en:

-Partículas burdas de menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro aerodinámico ( $\text{PM}_{10}$ ) por sus siglas en inglés, *particulate matter*, y más de 2.5  $\mu\text{m}$ , compuestas principalmente de sodio, cloruros, hierro, aluminio.

-Partículas finas con un diámetro aerodinámico igual o menor de 2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ), compuestas por productos derivados de la combustión particularmente del diesel e incluyen carbono, plomo, vanadio.

-Partículas ultrafinas con un diámetro aerodinámico menor de 1  $\mu\text{m}$  derivadas de la quema de combustibles fósiles. Tienden a unirse con partículas más gruesas, por lo tanto, se encuentran aisladas en la atmósfera por periodos cortos (Vallejo et al., 2003).

Además de su composición, el tamaño de las partículas juega un papel importante en su comportamiento en la atmósfera, las  $\text{PM}_{10}$ , tendrán una vida de horas suspendidas en la atmósfera, mientras que las partículas ultrafinas, es decir, las de diámetro menor de 1  $\mu\text{m}$ , tendrán una vida media de días a semanas (Mussali-Galante y Fortoul, 2008). Por otro lado, entre más grande es la partícula, menor será la posibilidad de que ingrese a la circulación sanguínea y al organismo en general. Las partículas más pequeñas penetran hasta el espacio alveolar, estas partículas se encuentran asociadas con un incremento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Dockery and Pope, 1994).

## **Metales**

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Muchos son micronutrientes y constituyen parte esencial en los sistemas biológicos.

Las partículas suspendidas pueden contener metales que constituyen un problema grave en el aire de la ZMCM (Fortoul et al., 1996). El vanadio (V) es uno de estos metales, el cual una vez que es inhalado llega a la circulación general y así puede ejercer un efecto tóxico en otros órganos y tejidos.

### **El Vanadio como contaminante atmosférico**

El V es un elemento que se encuentra adosado a las  $PM_{2.5}$ , es considerado un contaminante atmosférico, y se desconocen muchos de sus efectos tóxicos. La concentración de este metal se ha incrementado en las últimas décadas en la atmósfera de la ciudad de México (Fortoul et al., 2002), sin embargo, no es monitoreado en el aire de manera regular.

El V es el elemento químico de número atómico 23 situado en el grupo 5 de la tabla periódica. El V es liberado a la atmósfera por las actividades de la industria metalúrgica y por la quema de combustibles fósiles y sus derivados (Hope, 1994). Este metal se encuentra en altas concentraciones (>50%) en muchos tipos de petróleos incluyendo el mexicano (IPCS, 2000; Fortoul et al., 2002; Rodríguez-Mercado, et al. 2006). El V proveniente de estas fuentes se libera en forma de óxidos, principalmente pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ), el cual es considerado el compuesto más tóxico del vanadio en la atmósfera (WHO, 1998). Es así como la población general se encuentra expuesta de forma importante a este metal

mediante la vía inhalada, la cual constituye la principal ruta de absorción (Pope et al., 1999; Laden et al., 2000; Cohen, 2004).

### **Características del Vanadio**

El V es un metal de transición que debe su nombre a Vanadis la diosa escandinava del amor y la fertilidad; este nombre se debió a la amplia gama de colores que se encuentran en los compuestos de V. Fue descubierto por Andrés Manuel del Río, mineralogista mexicano en 1801, pero no fue sino hasta 1831 que el químico sueco Nils Gabriel Sefström le dio el nombre de Vanadium.

El V ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes en la corteza terrestre, con una presencia de 0.01 a 0.02%. Participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente para varias especies marinas y terrestres. El requerimiento para los humanos no ha sido confirmado. En la última década, distintos complejos orgánicos y compuestos inorgánicos de vanadio han adquirido importancia especial en farmacología, se han empleado en la terapia contra la diabetes y la obesidad. En atletas se ha utilizado en el mejoramiento del rendimiento físico y en biología de la reproducción como anticonceptivo vaginal (Rodríguez-Mercado et al., 2003). Por sus propiedades moduladoras de la expresión de diversos genes, diferentes tipos de compuestos de V se han usado como agentes anti-neoplásicos (Mukherjee et al., 2004).

En los mamíferos el V puede entrar a la circulación vía tracto respiratorio, vía gastrointestinal o por la piel, el V es absorbido de un 25 a un 90%, los compuestos del V son transportados principalmente por la transferrina, también por la

albúmina, o por componentes del plasma de bajo peso molecular, tales como los citratos y en menor proporción lactatos o fosfatos (Kiss et al., 2000). En la circulación se distribuye a todos los órganos y tejidos aproximadamente en media a una hora, el V se acumula después en riñones, bazo, huesos, hígado y pulmón e incluso es capaz de cruzar la barrera hemato-placentaria (Mukherjee et al., 2004). Se excreta por heces (incluyendo la parte que no se absorbió y la parte eliminada por el hígado a través de la bilis) y principalmente por la orina, ya que en el riñón se elimina de una forma bifásica, la primera fase rápida en las primeras 10 a 20 horas y otra fase lenta entre los 40 y 50 días. Aproximadamente, un 40 a 60% del V absorbido es excretado por riñón en los primeros 3 días (Barceloux, 1999).

### **Propiedades químicas del Vanadio**

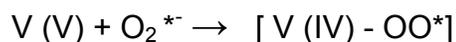
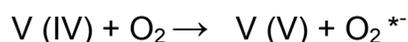
El V es un metal de color grisáceo con densidad de  $6.11 \text{ g/cm}^3$ . Como ya se mencionó, en la tabla periódica se ubica como el primer elemento de transición del grupo VB, tiene número atómico 23, peso atómico 50.95, punto de fusión  $1950^\circ\text{C}$  y punto de ebullición  $3600^\circ\text{C}$ . Sus estados de oxidación son: -1, 0, +2, +3, +4, y +5. La mayoría de sus compuestos tienen valencias +3, +4 (tetavalente) y +5 (pentavalente). El compuesto más abundante es el  $\text{V}_2\text{O}_5$ . Su toxicidad aumenta conforme aumenta la valencia, por lo tanto, los compuestos pentavalentes son los más tóxicos (Barceloux, 1999).

Entre los compuestos más tóxicos, encontramos el  $\text{V}_2\text{O}_5$  que es el de mayor uso comercial, es una sal de color amarillo-rojizo, con punto de fusión de  $1750^\circ\text{C}$  y punto de ebullición de  $690^\circ\text{C}$ , es un agente químico peligroso, su límite de exposición ocupacional a polvos y humos es de  $0.05 \text{ mg/m}^3$  (ACGIH, 2009). Otros

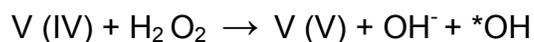
compuestos de interés toxicológico son: el metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ), el metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ), el ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), el sulfato de vanadilo ( $\text{VOSO}_4$ ), oxidicloruro de vanadio ( $\text{VOCl}_2$ ) y tricloruro de vanadio ( $\text{VCl}_3$ ) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

El V puede actuar como anión o catión en los procesos biológicos; en condiciones fisiológicas, el vanadio pentavalente se encuentra en forma de anión vanadato ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) y el vanadio tetravalente, en forma de catión vanadilo ( $\text{VO}^{2+}$ ). En condiciones ácidas, el ión vanadilo es muy estable, pero en condiciones básicas, es más estable el ión ortovanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ), que es muy similar al ión fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

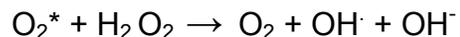
El  $\text{V}^{+5}$  o V(V) en el plasma se reduce rápidamente a  $\text{V}^{+4}$  por la NADPH y el ácido ascórbico, posteriormente los compuestos del vanadio generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como resultado de la reacción de Fenton o de la reacción del oxígeno atmosférico:



Reacción de Fenton:



Reacción de Haber-Weiss:



## **Toxicidad del Vanadio**

Existen personas ocupacionalmente expuestas a concentraciones ambientales de V que van de 0.2-0.5 mg/m<sup>3</sup>, concentraciones reportadas por la IARC (2006), otras se encuentran expuestas a concentraciones que van de 0.01-60 mg/m<sup>3</sup>, concentraciones reportadas por la WHO (2000). Se han reportado concentraciones elevadas de V (mayores de 600 mg/kg) en suelos de las cercanías de plantas petroquímicas en la ZMCM como consecuencia de la quema de combustibles fósiles, (Hernández y Rodríguez, 2011).

La exposición a estas concentraciones de V es importante pues el V puede ser altamente tóxico debido a que como es un análogo de fosfatos puede inhibir proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) aumentando la fosforilación celular, puede inhibir o activar diferentes enzimas, puede provocar genotoxicidad, alteraciones en el citoesqueleto y provocar estrés oxidante (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

En modelos animales se han reportado efectos tóxicos en diversos órganos y sistemas. En nuestro grupo, utilizando V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inhalado (0.02M) en un modelo murino, se han encontrado alteraciones en sistema nervioso (neurotoxicidad) (Ávila-Costa et al., 2004; Colín Barenque et al., 2008).

También en el grupo se han reportado alteraciones en vías respiratorias similares a los cambios encontrados en asma, con aumento en citocinas inflamatorias (IL-6, TNF $\alpha$ ) y disminución de la luz de los bronquiolos (Fortoul et al, 2011; Falcón-Rodríguez, 2007).

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

Relacionado con el sistema inmunológico hemos reportado que el V induce un incremento en el número y tamaño de plaquetas (González-Villalva et al., 2006), hiperplasia de los centros germinales del bazo y supresión de la respuesta inmune humoral (Piñón-Zárate et al., 2008), así como cambios en la relación corteza-médula del timo (Fortoul et al., 2011).

### **Células Dendríticas del Timo**

La maduración de los timocitos hasta linfocitos T inmunocompetentes depende de los microambientes cortical y medular del timo creados por las células epiteliales (CE) distribuidas en la zona cortical y medular y por las células dendríticas (CD) distribuidas en la zona medular y cortico-medular. Las CE corticales participan en la selección positiva de timocitos mientras que las CE medulares y las CD en la selección negativa (Takahama et al., 2008). Ambos procesos son altamente ordenados y dependen de la expresión secuencial y cuantitativa de marcadores como son los CD4, CD8, receptores de células T (TCR1, TCR2) y de cambios en los patrones de glucosilación de proteínas de membrana de los timocitos en maduración (Álvarez et. al, 1999).

Las CD son una población heterogénea derivada de médula ósea, comparten una habilidad de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T “vírgenes” iniciando una respuesta inmunológica, poseen un linaje hematopoyético heterogéneo y por

esta razón muestran diferente morfología, función y fenotipo, se han reconocido las CD de origen mieloide y las CD de origen linfoide (Wu y Liu, 2007), las CD expresan moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (CPHI, CPHII), se encuentran en la circulación como precursores inmaduros (no han presentado antígenos), para posteriormente migrar a los tejidos periféricos, en donde se diferencian y se activan al captar y procesar antígenos, experimentando ya una maduración (aumentan la expresión de moléculas necesarias para la presentación de antígenos), después migran a los órganos linfoides secundarios donde presentan a los antígenos a los linfocitos T induciendo una respuesta inmunológica (Romani, 2003).

Las CD se encuentran ampliamente distribuidas en muchos tejidos, pueden estar como células maduras: CD de ganglios linfáticos, CD esplénicas, CD intersticiales, CD tímicas; como células inmaduras: células de Langerhans de piel y mucosas.

Las células de Langerhans fueron descritas en 1868 por Paul Langerhans (Langerhans, 1868), pero no fue hasta cien años después que se les reconoció como células pertenecientes al sistema inmunológico. Steinman identificó un tipo celular con características de macrófagos y morfología dendrítica en los ganglios linfáticos del ratón que posteriormente fueron reconocidas como CD (Steinman y Cohn, 1973).

### **Origen y Diferenciación de CD**

Las CD no solamente se derivan de progenitores mieloide sino también de linfoides (Shortman, 2002). Los subtipos de CD en estado “estable” estudiados en

el humano y en el ratón son las CD plasmacitoides (CDp), productoras de interferón  $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) y las CD convencionales CDc, ambas pueden ser de origen mieloide o linfoide. Una característica en común, es que ambos progenitores hematopoyéticos expresan el receptor de superficie tirosina cinasa parecido a Fms (FIT3) y su ligando (FIT3L) (Wu y Liu, 2007).

### **Origen Mieloide**

Uno de los primeros estudios de los progenitores de las CD hechos en ratón demostraron que precursores mieloides de médula ósea, en presencia del factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF), tenían la capacidad de diferenciarse hacia macrófagos, granulocitos y CD (Inaba, et. al., 1993); resultados parecidos fueron los encontrados en el humano, en donde células hematopoyéticas derivadas de médula ósea (HSC) CD34+ se podían diferenciar a monocitos CD1a bajo, a una población precursora de granulocitos; a una población precursora y bipotencial para originar CD maduras en presencia de GM-CSF y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ); o a macrófagos en presencia del factor estimulante de monocitos (M-CSF) (Caux et al. 1996).

Otros experimentos demostraron evidencias de un origen mieloide de las CD por el hecho de que los monocitos en presencia de GM-CSF e interleucina 4 (IL-4) se diferenciaban a CD (Sallusto y Lanzavecchia, 1994). Cuando se hizo el trasplante de progenitores mieloides comunes (CMP) de médula ósea a ratones irradiados, se observó que se originaban CDc y CDp en el bazo y en el timo (Wu et al., 2001), reforzando la teoría del origen mieloide de las CD.

Una de las características de la población de origen mieloide es la expresión de CD11b+ y la no secreción de IL-12 (Vandenabeele et al., 2001). El progenitor clonogénico Cx<sub>3</sub>CR1+CD117+ desarrolla macrófagos y CDc pero no CDp, este progenitor pudiera ser el progenitor común para macrófagos y CDc que provinieran de un CMP y tal vez aquí estaría el punto de divergencia hacia las CDp (Fogg et al., 2006).

### **Origen Linfoide**

Se ha demostrado que las CDc expresan marcadores relacionados con células linfoides como: CD8 $\alpha$ , CD4, CD2, BP1, CD25 (Vremec et al., 1992), este hecho sugería que las CD podrían tener un origen linfoide. Al trasplantar progenitores linfoides a ratones irradiados se producían linfocitos T y CDc, evidencia de un origen linfoide (Wu et al., 1995).

Otra prueba del origen linfoide es que el TLR9 se expresa altamente en progenitores linfoides, además se demostró que los progenitores linfoides comunes de ratones infectados por HSV-1 se diferenciaban a CD, fenómeno altamente dependiente de TLR-9 (Weineer et al., 2008).

### **Células Dendríticas Plasmacitoides**

En un principio se pensaba que las CDp eran sólo de origen linfoide por expresar marcadores linfoides incluyendo a los receptores pre-T, sin embargo, células que pueden provenir de los CMP o de los CLP se pueden diferenciar a CDc o CDp *in vivo* (D'Amico y Wu, 2003).

La principal característica de las CDp es la producción de grandes cantidades de INF- $\alpha$  y polarizar la respuesta de las células T, aunque se encuentra bien establecido que son CD123+, Ly-6+, RAG+, algunos autores difieren en sí son o no CD11c+, para Li J sí (Li et al., 2009), pero otros autores afirman que son CD11c- (Colonna et al., 2004). En el bazo son CD11c+ (Pelayo et al., 2005).

La divergencia en algunas características ha resultado en la propuesta de diferentes hipótesis acerca de su origen y diferenciación: una primera hipótesis sugiere un precursor de CD en sangre que puede dar lugar a todos los subtipos de CD, la segunda sugiere que las CDp provienen de un precursor linfoide, por último, la tercera, propone a las CDp como una población de células linfoides que pueden convertirse en mieloides (Colonna et al., 2004).

### **Factores de Transcripción**

Debido a que tanto los CMP como los CLP tienen la capacidad de dar todos los subtipos de CD, no queda claro cómo se determina el destino de las CD durante su desarrollo.

Uno de los factores de transcripción estudiados en la hematopoyesis es el Ikaros que es esencial para la formación de todos los linfocitos y es crítico en el estado de CLP para originar CD de origen linfoide, el factor Rel-B se expresa en altas cantidades en las DC de origen mieloides y no se necesita para la diferenciación de las CD de origen linfoide, el factor PU-1 es esencial para la formación de linfocitos B, monocitos y macrófagos y también se requiere para la formación de las CD de origen mieloides (Wu y Galy, 2001).

## **Poblaciones de CD Residentes del Timo**

Las CD son células profesionales presentadoras de antígenos, pero en el timo tienen un papel diferente que consiste en presentar antígenos propios induciendo una selección negativa en las clonas potencialmente autorreactivas de los linfocitos T.

En el timo humano se identificaron dos diferentes tipos de CD maduras (participan en la selección negativa), la principal población es CD11b<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>. CD45RO bajo, no expresa los marcadores mieloides, muestra la típica forma dendrítica, expresa altos niveles de marcadores de superficie HL-DR, es CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, no expresa la proteína inflamatoria de macrófagos 1- $\alpha$  (MIP 1- $\alpha$ ) y secreta IL-12, la otra población se encuentra en menor cantidad y es CD11b<sup>+</sup>, CD11c alto, VD45RO alto, comprende la población madura CD83<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> y la inmadura (involucrada en la tolerancia inmunológica) CD83<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>, expresa MIP 1- $\alpha$  en altas concentraciones y casi no produce IL-12 (Vandenabeele et al., 2001).

Recientemente se han identificado tres subtipos de CD en el timo humano y en el murino, uno que no expresa la proteína señal reguladora  $\alpha$ - (Sirp $\alpha$ -), CD11b<sup>-</sup>, CD8 $\alpha$  alto, con un origen de progenitores intratímicos linfoides, son las CDc que participan en la selección negativa de timocitos, la segunda población es CD11c<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, con morfología plasmacitoide, son las CDp de origen extratímico, por último, la tercera población expresa Sirp $\alpha$ <sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> de origen mieloides y extratímico, estas dos últimas poblaciones de CD de origen extratímico pueden ser las que inducen la formación de linfocitos T reg

CD4+CD25+Foxp3+ en el timo (Li et al., 2009).

Se ha propuesto que algunos linfocitos T residentes en la médula tímica son “educados” por la linfopoyetina estromal (TSLP) producida por las CE de los corpúsculos de Hassall, para escapar de la selección negativa que realizan las CD para continuar su diferenciación hacia T reg CD4+CD25+Foxp3+ en el timo (Liu, 2007).

Tamahisa en 2009 reconoce también tres poblaciones de CD en el timo humano y murino: 1 la B220+, CD11c+, CDp; 2 la B220-, CD11c+, Sirpa-, CDc y 3 la B220-, CD11c+, Sirpa+, CDc; teniendo como marcador común el CD11c.

### **Selección Positiva y Selección Negativa**

La maduración de timocitos es un proceso dinámico que consiste en el reclutamiento de progenitores tempranos de timocitos del torrente sanguíneo y que culmina en el regreso de linfocitos T maduros a la circulación. Todo esto involucra varios procesos controlados por los diferentes microambientes existentes en el timo. Estos procesos incluyen primero, la entrada de las células progenitoras al timo, segundo, la generación de los llamados timocitos dobles positivos (DP) CD4+CD8+ en la corteza externa del timo a partir de los dobles negativos (DN) CD4-CD8-, tercero, la selección positiva en la corteza de los timocitos DP hasta llegar a los sencillos positivos (SP) CD4+ o CD8+, cuarto, la interacción de los timocitos seleccionados positivamente con las CD de la médula (selección negativa) para completar el desarrollo y así asegurar la tolerancia central, y por último la salida de los linfocitos T maduros del timo (Figura 3).

Las interacciones de las CE y de las CD con los timocitos son muy importantes para la maduración y salida de los linfocitos T; sin embargo, solo un pequeño porcentaje del 1 al 3% lo logra (Takahama, 2006).

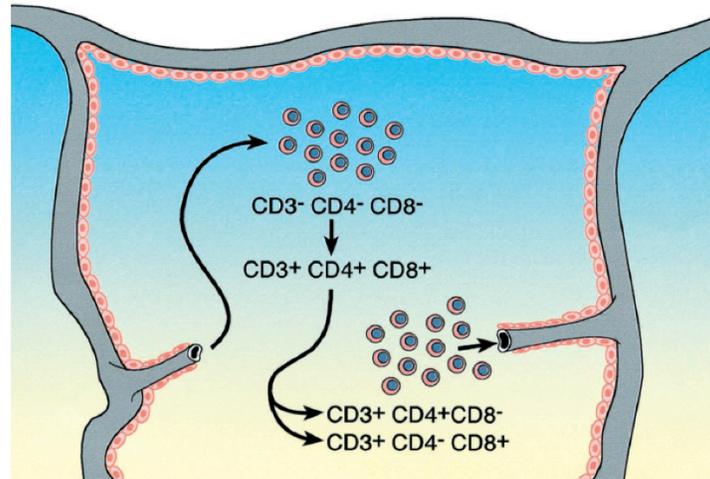


Figura 3. Modificada de Savino y Dardenne, 2000.

### Entrada de los progenitores

Los precursores de timocitos entran al timo a través de las venas poscapilares de la unión corticomedular. Las células endoteliales de estos vasos secretan P-selectina, una proteína unida a un carbohidrato a la que los progenitores de timocitos se unen a través del ligando de la P-selectina ((PSGL), entrando por estas “puertas”, y así empiezan “la siembra” del timo; esta “siembra” está reportada como un proceso intermitente más que continuo.

En la llegada a casa “homing” de los progenitores de timocitos se encuentran involucrados los ligandos de las quimiocinas CC 21 y 25: CCL21 y CCL25, expresadas por el primordio tímico, con sus respectivos receptores CC 7 y 9, CCR7 y CCR9 de los progenitores de timocitos, esto ha sido demostrado en el

“homing” de timos fetales, aunque no en él de los adultos (Takahama, 2006).

Algunos autores consideran también involucrados en el “homing”, al ligando de la quimiocina CXC12, CXCL12, con su receptor CXC4, CXCR4 (Ladi, 2006), sin embargo, otros no (Takahama, 2006).

### **Tráfico en la Corteza**

En el timo existen diferentes microambientes anatómicos conocidos como la región capsular, subcapsular, cortical, corticomedular y medular, los timocitos más inmaduros son los DN que se han dividido en 4 subpoblaciones con base en la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD25, en la entrada del timo, es decir, en la unión corticomedular encontramos a los menos maduros DN1 (CD44+CD25-), a través de toda la corteza encontramos a los DN2 (CD44+CD25+), a los DN3 (CD44-CD25+) en la región subcapsular, finalmente a los DN4 (CD44-CD25-) en la región cortical.

La migración de la región capsular está regulada por el receptor de quimiocina-CXC4, CXCR4 y por el receptor de quimiocina-CC, CCR7, la migración hacia la zona subcapsular está regulada por el receptor de quimiocina-CC9, CCR9 (Takahama, 2006).

Existe el llamado primer punto de control que es DN3 en donde los timocitos expresan un receptor de células T inmaduro (pre-TCR), los DN que logren un rearreglo adecuado del gen que codifica para la cadena  $\beta$  del TCR puede pasar hasta esta etapa, esto es conocido como la selección  $\beta$  (Aifantis, 2006). Después

sigue el rearrreglo de la cadena  $\alpha$ , y él de  $\gamma$  y  $\delta$  (Starr, 2003).

La activina-A e inhibina-A regulan positivamente el paso de DN3 a DN4 *in vitro*. De DN4 a DP puede existir un paso intermedio donde sólo se expresa CD8+, es la etapa del intermedio sencillo positivo (ISP), antes de llegar a DP. También se ha propuesto que la inhibina-A promueve el paso a DP. La activina-A induce la acumulación de timocitos en la etapa ISP y ambas la inhibina-A y la activina-A parecen promover la diferenciación al SP, CD8+ (Licona, 2009).

### **Selección Positiva y Negativa en Corteza y Médula**

Los timocitos DP generados en la corteza serán sometidos a la selección positiva y negativa mediante la interacción de sus TCR con el MHC expresado por las CE y por las CD, si los DP muestran baja avidéz por MHC son seleccionados positivamente en la corteza y serán CD4+CD8- o CD8+CD4-; sí muestran una alta afinidad por el MHC son seleccionados negativamente en la médula y mueren por apoptosis, esto contribuye a la delección de clonas autorreactivas evitando la autoinmunidad, ésta llamada la tolerancia central es regulada, en parte, por el factor regulador autoinmune (AIRE) expresado por las CE de la médula.

Resulta interesante que la mayoría de los DP no interactúan con las CE ni con las CD y mueren por apoptosis denominada muerte por negligencia (Ladi, 2006) (Figura 4).

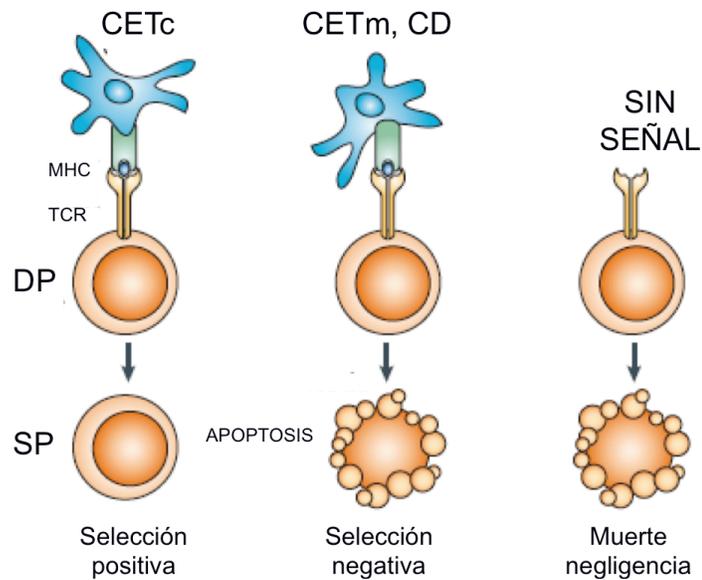


Figura 4. Modificada de Takahama, 2006.

### Salida del Timo

Las señales que regulan el movimiento de los linfocitos maduros de regreso a la circulación son la proteína G acoplada al receptor SIP1 (receptor tipo 1 esfingosina 1-fosfato): La SIP1 es expresada por los linfocitos T maduros, además de esto deben expresar el ligando CD62L en altos niveles y el CD69 en bajos, para salir (Ladi, 2006).

Como se ha descrito, la función de las CD tímicas es muy importante para evitar la salida a la circulación de clonas autorreactivas, si llegara a existir algún factor que afecte a las CD; la selección negativa se puede alterar.

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El V es un contaminante atmosférico producto de la actividad industrial y de la quema de combustibles fósiles, su concentración ha aumentado en los últimos años en la atmósfera de la ZMCM, los reportes previos de nuestro grupo muestran que la inhalación de V provoca cambios en la morfología del bazo y disminuye la respuesta inmune humoral en ratones. Además, también se reportó en el grupo que la inhalación del V induce cambios morfológicos en el timo del ratón, cambios en la relación de la corteza-médula, con base en esto nos preguntamos si las CD tímicas también pudieran estar alteradas.

## **VI. HIPOTESIS**

Si la inhalación de  $V_2O_5$  ocasiona pérdida de la relación corteza-médula del timo, entonces observaremos cambios en el número y fenotipo de las CD del timo, en ratones expuestos al  $V_2O_5$ .

## **VII. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- . Identificar los cambios en el número y fenotipo de las CD en el timo de ratón expuesto por inhalación al  $V_2O_5$

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Corroborar la pérdida de la relación corteza-médula en el timo mediante inmunohistoquímica utilizando el DEC-205, marcador de CD y la citoqueratina 8, marcador de CE.
- Estudiar los cambios numéricos de las CD mediante inmunohistoquímica para CD11c.
- Estudiar los cambios en la expresión del CD11c y del MHCII mediante citometría de flujo.

## **VIII. METODO**

### **Modelo biológico**

Se utilizaron 134 ratones macho de la cepa CD1, de aproximadamente 8 semanas de edad y de 33 ( $\pm$ 2) g de peso, con agua y comida *ad libitum* y en condiciones de luz-oscuridad (12:12h ).

Los ratones se separaron en 3 tipos:

1. 40 ratones, 20 controles y 20 expuestos, para el análisis de inmunohistoquímica en cortes por parafina.
2. 40 ratones, 20 controles y 20 expuestos, para el análisis de inmunohistoquímica en cortes por congelación.
3. 54 ratones, 27 controles y 27 expuestos, para el análisis de citometría de flujo.

### **Protocolo de Inhalación**

Los ratones se expusieron al pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ) 0.02M por vía inhalada, 1 h, 2 veces por semana, durante 4 semanas; en una caja de acrílico transparente de 45x21x35 cm, con una capacidad de 3.3 L, conectada a un nebulizador Ultraneb 99 DeVilbiss, con un flujo de 10 L/min. Los controles inhalaron solo el vehículo, solución salina al 0.9%. Al final de cada semana se sacrificaron cinco ratones control y cinco ratones expuestos (Figura 5).

### **Inmunohistoquímica para DEC-205 y Citoqueratina 8**

Se utilizaron 40 ratones, 20 controles y 20 experimentales y se siguió el protocolo de exposición. Se anestesiaron con una inyección de pentobarbital sódico intraperitoneal y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con solución

salina seguida de paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los timos y fueron procesados para su inclusión en parafina. Se hicieron cortes de 8  $\mu\text{m}$  de grosor, para realizar una inmunohistoquímica convencional, los cortes se desparafinaron e hidrataron, se bloqueó la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% por 10 min, se incubó en cámara húmeda con el anticuerpo primario, DEC-205 (1:100) o Citoqueratina 8 (1:50) durante toda la noche, posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado, después se incubó con el complejo estreptavidina peroxidasa y finalmente se hizo el revelado con diaminobencidina (DAB) y se contratiñó con hematoxilina. Entre cada paso se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4, finalmente los cortes se deshidrataron y se montaron con resina para poder ser observados al microscopio.

### **Inmunohistoquímica para CD11c**

Se utilizaron 40 ratones, 20 controles y 20 experimentales y se siguió el protocolo de exposición. Al final de este periodo los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les extrajo el timo y se colocó en una solución de paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, por 24 h a 4°C, posteriormente los timos se sometieron a un gradiente de sacarosa del 10%, 20% y 30% a 4°C, con cambios cada 24 h, después se hicieron cortes en el criostato de 8  $\mu\text{m}$  de grosor, para realizar una inmunohistoquímica convencional, para analizar la expresión del CD11c. Se bloqueó la peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% por 10 min, se hicieron 3 lavados con PBS, los cortes se incubaron en cámara húmeda con un anticuerpo anti-CD11c biotinilado (1:50) toda la noche. Se hicieron 3 lavados con PBS y los cortes se incubaron posteriormente con estreptavidina peroxidasa, se hicieron 3 lavados con PBS y finalmente se realizó el

revelado con DAB por 3 min y se hizo una contratinción con hematoxilina. Los cortes se montaron con cubreobjetos del número 1 y se observaron con un microscopio Olympus CX 31.

### **Análisis estadístico**

De los resultados obtenidos para la inmunohistoquímica para CD11c se tomaron fotomicrografías y con el programa Images Pro Plus Versión 6, se realizó densitometría de la marca positiva (se analizaron 5 campos/animal, controles y expuestos), se hizo un análisis de varianza, ANOVA (Tukey) y se determinaron las diferencias significativas entre grupos. Se consideró la significancia cuando  $p < 0.05$ .

### **Separación de CD tímicas y citometría de flujo**

Para estudiar la expresión del CD11c y del MHCII en las CD tímicas se hizo un análisis por citometría de flujo. Se utilizaron 54 ratones, 27 controles y 27 expuestos, los ratones se sometieron al protocolo de exposición, al final de la tercera semana los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se escogió esta semana basados en los resultados obtenidos por inmunohistoquímica, (figura 6). Se extrajeron los timos y se colocaron en PBS a 4°C. Se utilizaron 54 ratones pues se necesitaba un número suficiente de CD para el estudio, por lo que se hicieron pools de 3 timos cada uno para cada grupo, es decir, 27 controles y 27 expuestos (n=9). Los timos se cortaron con bisturís en pequeños fragmentos de 3 mm<sup>3</sup> aproximadamente y se sometieron a una digestión enzimática con colagenasa tipo IV, 0.6 mg/ml, DNasa 25 Kuntiz/ml, en medio RPMI 1640 (Baba, 2009), a 37°C por 60 min. Posteriormente con el émbolo de una jeringa de insulina

se presionaron los fragmentos para obtener un homogenado que fue lavado dos veces con PBS a 4°C y se realizó un conteo celular con una cámara de Neubauer obteniéndose un total  $350 \times 10^6$  células, el homogenizado se incubó con un anti-MHCII acoplado a perlas magnéticas 1:9, por 15 min. a 4°C. Se hicieron dos lavados con PBS y para la separación de las células se utilizó un Magnetic cell sorting (MACS) de Miltenyi Biotec. El homogenizado se pasó por una columna grande, obteniéndose una fracción negativa y una fracción positiva que contenía las células MHCII+ del timo. De esta fracción se hizo un conteo y se estandarizó para tener  $7 \times 10^6$  células.

Las células obtenidas por medio del MACS, tanto las de los controles, como las de los expuestos, se tiñeron con un anti-CD11c marcado con APC 1:200, con un anti-MHCII (IA, IE) biotinilado 1:300 que posteriormente se incubó con estreptoavidina marcada con PE-Cy5 1:300 y también se realizó una doble tinción. Se analizaron los siguientes tubos tanto de los 9 pools de ratones control como de los 9 pools de expuestos en un citómetro de flujo FACSCalibur de BD.

- 1.-Células sin teñir
- 2.-CD11c APC
- 3.-MHCII Cy5
- 4.-CD11c APC, MHCII Cy5

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa FlowJo 8.7.



## PROTOCOLO DE INHALACION

Caja de acrílico transparente de 45 cm x 21 cm x 35 cm, con una capacidad de 3.3 L, conectada a un nebulizador Ultraneb 99 DeVilbis.

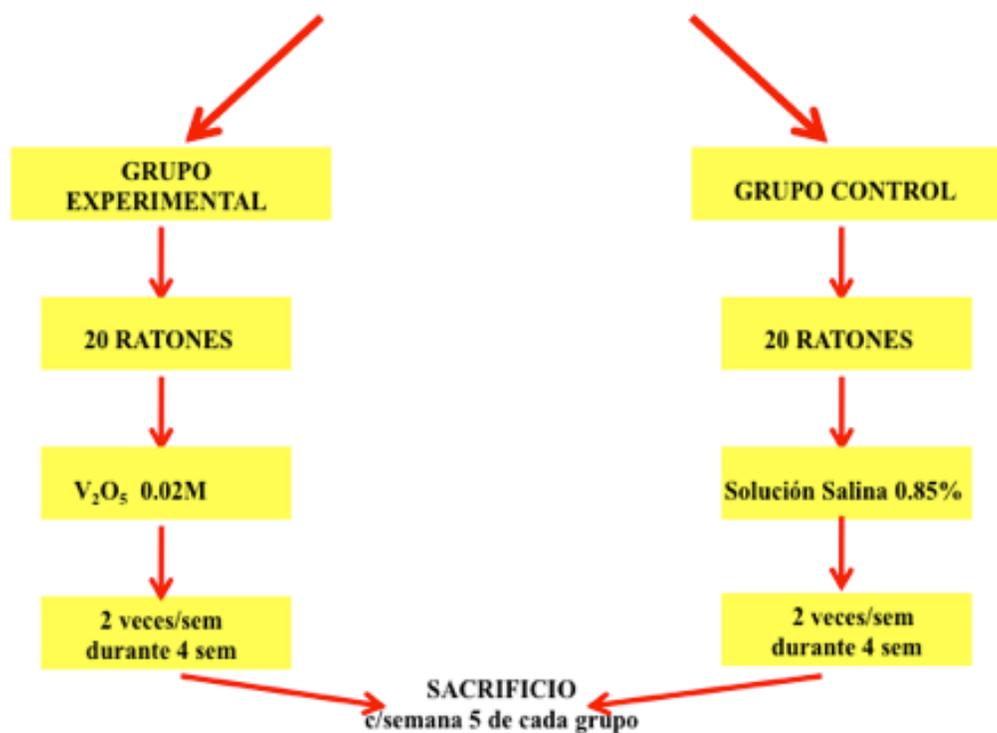


Figura 5. Se muestra la caja de acrílico transparente y el esquema del protocolo de inhalación.

## IX. RESULTADOS

### Efecto del Vanadio en la expresión del DEC 205

Decidimos utilizar el DEC 205 marcador de diferentes poblaciones de CD (Kraal et al,1986), suponíamos que habría un cambio, mayor o menor número de CD marcadas. La inmunohistoquímica para este marcador mostró mayor número de células DEC 205 positivas (color ocre) en los timos de ratones expuestos a V (Figura 6). Lo que aparentemente nos indicaría que las células DEC 205+ aumentan en número después de la inhalación de V, como teníamos el antecedente que la inhalación de V aumenta el número de linfocitos B en el bazo de ratones, y que en timos de ratones expuestos a V se pueden encontrar linfocitos B (González-Villalva et al., 2006) y además el marcador DEC 205 puede resultar positivo para estas células (McKay et al., 1998), al realizar una inmunohistoquímica para CD19, ésta fue positiva para algunas de estas células, por lo que el DEC-205 no era un marcador seguro de CD en estas condiciones, así que decidimos utilizar el CD11c.

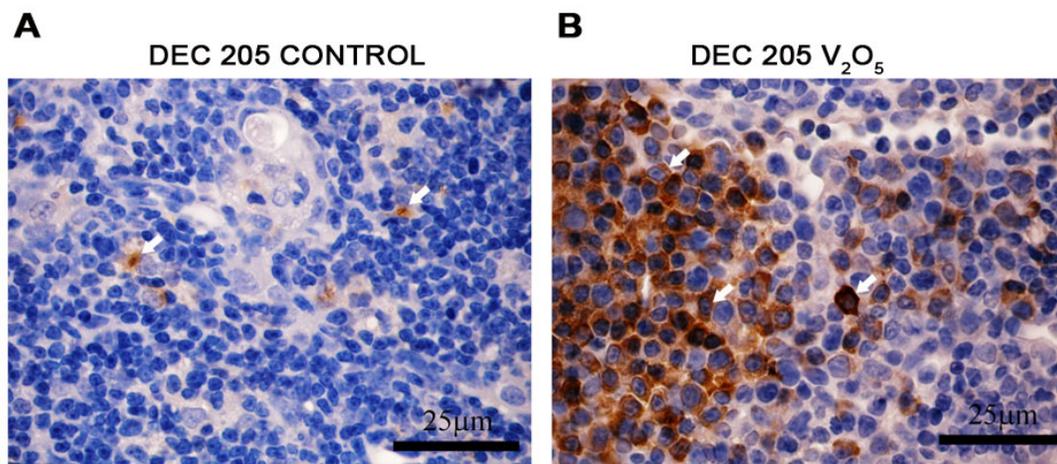


Figura 6. Inmunohistoquímica para DEC 205 en timos de ratones control y expuestos. Se observan las células DEC 205+ (color ocre). Fotomicrografías representativas de un control de la semana 3 (A) y un expuesto de la semana 3 (B). Se observa mayor cantidad de células positivas en B.

## Efecto del Vanadio en la expresión de la Citoqueratina 8

En el timo existen además de las CD, las células epiteliales, hay diferentes tipos de éstas células, pero existen dos grandes grupos, las que se encuentran en la corteza, las células epiteliales corticales (CEc), positivas a la citoqueratina 8, aunque dependiendo de la edad del ratón también pueden ser positivas en las células epiteliales medulares (CEm) (Osada et. al., 2006), el otro gran grupo. Las células positivas para la citoqueratina 8 se encontraron principalmente en la médula tímica, la densidad fue tal, tanto en controles como en expuestos, que fue imposible realizar densitometría, pero las microfotografías muestran la desorganización de la corteza y de la médula en ratones expuestos a la inhalación del vanadio (Figura 7).

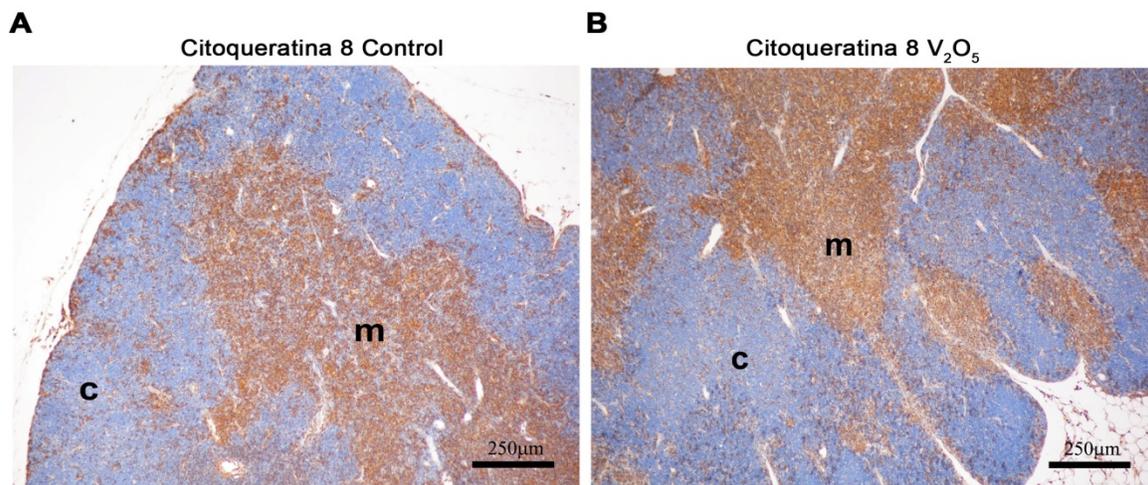


Figura 7. Inmunohistoquímica para Citoqueratina 8 en timos de ratones control y expuestos. Se observan las células Citoqueratina 8+ (color ocre) distribuidas principalmente en la médula tímica (m), se observan algunas positivas en la corteza (c). Fotomicrografía representativas de un control de la semana 3 (A) y un expuesto de la semana 3 (B). Se puede observar la desorganización de la corteza-médula en B.

## Efecto del Vanadio en la expresión de CD11c. Inmunohistoquímica

Las células positivas para el CD11c se observaron tanto en controles como en expuestos. La principal localización de estas células fue en la médula tímica. En los ratones expuestos se observó menor cantidad de células CD11c+ (Figura 8).

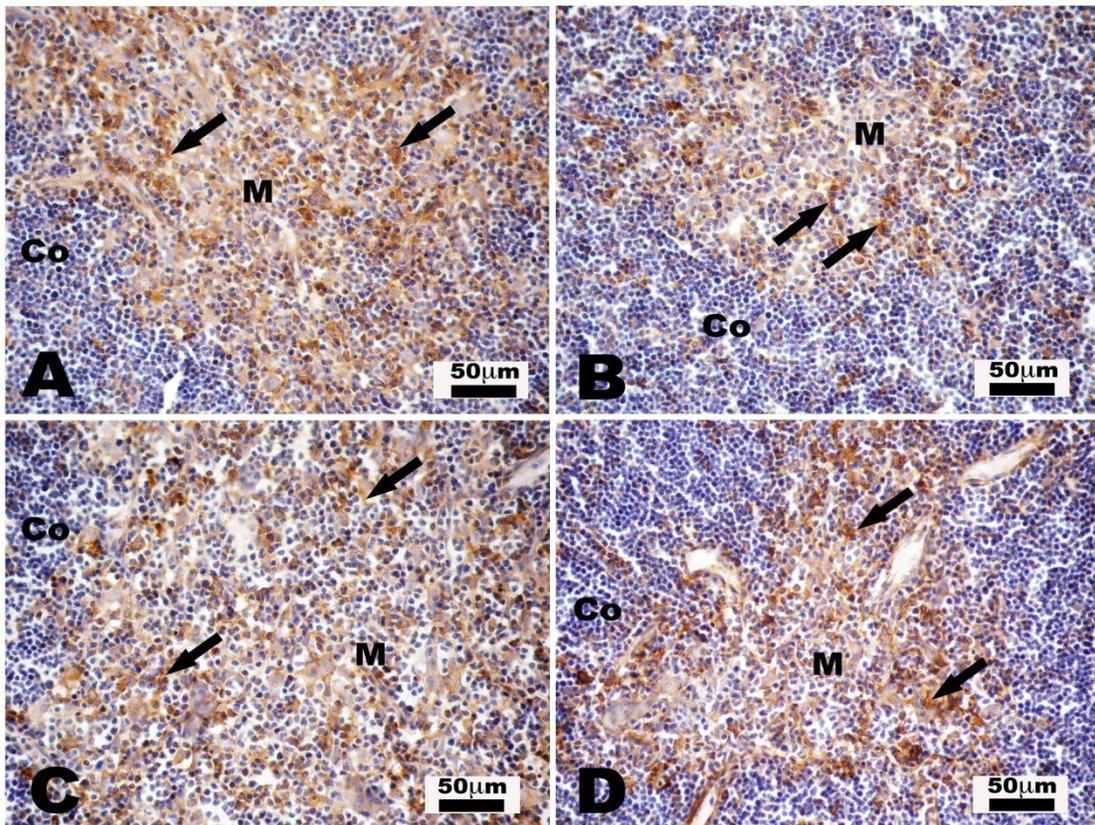


Figura 8. Inmunohistoquímica para CD11c en timos de ratones control y expuestos. Se observan las células CD11c+ (flechas) principalmente en la médula tímica (M), se observan muy pocas de éstas células en la corteza (Co). Fotomicrografías representativas de un control de la semana 3 (A), expuesto de la semana 3 (B), control de la semana 4 (C) y expuesto de la semana 4 (D). En A y C se observan mayor cantidad de células CD11c+ que en B y D.

Comparando los resultados de los controles contra los expuestos, la densitometría corroboró los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica, es decir, que la expresión de CD11c disminuyó en los ratones expuestos, este resultado fue estadísticamente significativo desde la segunda semana de exposición. El decremento continuó hasta el final del tiempo de exposición (Figura 9).

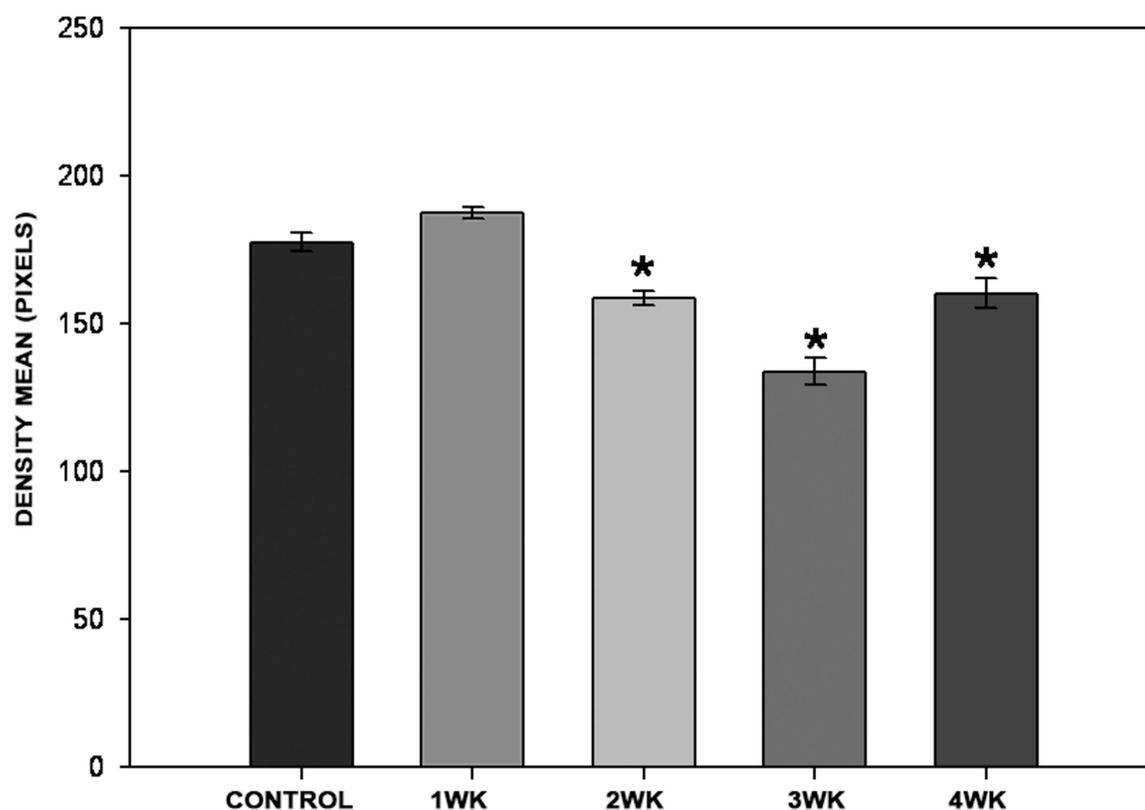


Figura 9. Densitometría de la marca positiva de la inmunohistoquímica para CD11c de los ratones expuestos contra los ratones control. La media de densidad en pixeles disminuyó conforme se avanzó en las semanas de inhalación. Las diferencias entre controles y expuestos son estadísticamente significativas. ANOVA (Tukey's),  $p < 0.05$ . Modificado de Ustarroz-Cano et. al., 2012.

### **Efecto del Vanadio en la expresión de CD11c. Citometría de flujo**

La citometría de flujo demostró que la expresión de CD11c y MHCII disminuyó significativamente en los timos de ratones expuestos comparados con los de los controles. La disminución fue tanto en la intensidad media de fluorescencia (IMF) como en el porcentaje de células dobles positivas, CD11c+, MHCII+,  $p < 0.05$  (Figura 10).

Los dot-plots mostraron un porcentaje de células dobles positivas CD11c+ y MHCII+ mayor en los controles comparados con el de los expuestos. El histograma de la IMF de CD11c mostró un corrimiento a la izquierda de la curva correspondiente al ratón expuesto comparado con el ratón no expuesto (control) (Figura 11 y 12, panel izquierdo). El mismo efecto se observó al analizar la IMF para el marcador MHCII (Figura 11 y 12, panel derecho). Esto demuestra que no solo existe un menor número de CDs en el timo de ratones tratados sino que su fenotipo se encuentra alterado, mostrando niveles más bajos de CD11c y MHCII. La diferencia con las figuras 11 y 12 es el número de eventos adquiridos menor en la 11 que la 12.

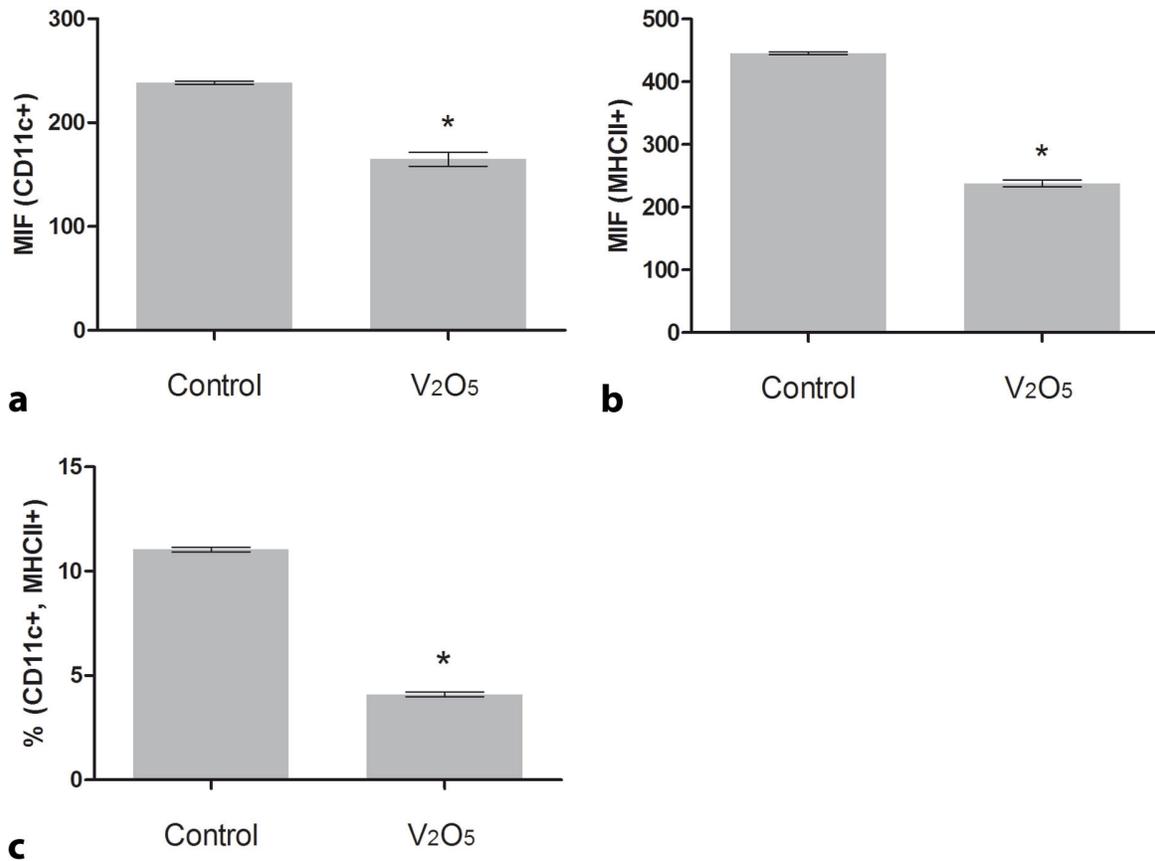


Figura 10. Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de CD11c y de MHCII, y porcentaje de células dobles positivas CD11c y MHCII en ratones control y expuestos. (a) La IMF de CD11c de ratones expuestos fue menor comparada con la de los controles. Las diferencias fueron estadísticamente significativas. ANOVA,  $p < 0.05$ . (b) La IMF de MHCII de ratones expuestos disminuyó comparada con la de los controles. Las diferencias fueron estadísticamente significativas. ANOVA,  $p < 0.05$ . (c) El porcentaje de células dobles positivas CD11c+ y MHCII+, mostró un decremento significativo en los ratones expuestos. ANOVA,  $p < 0.05$ .

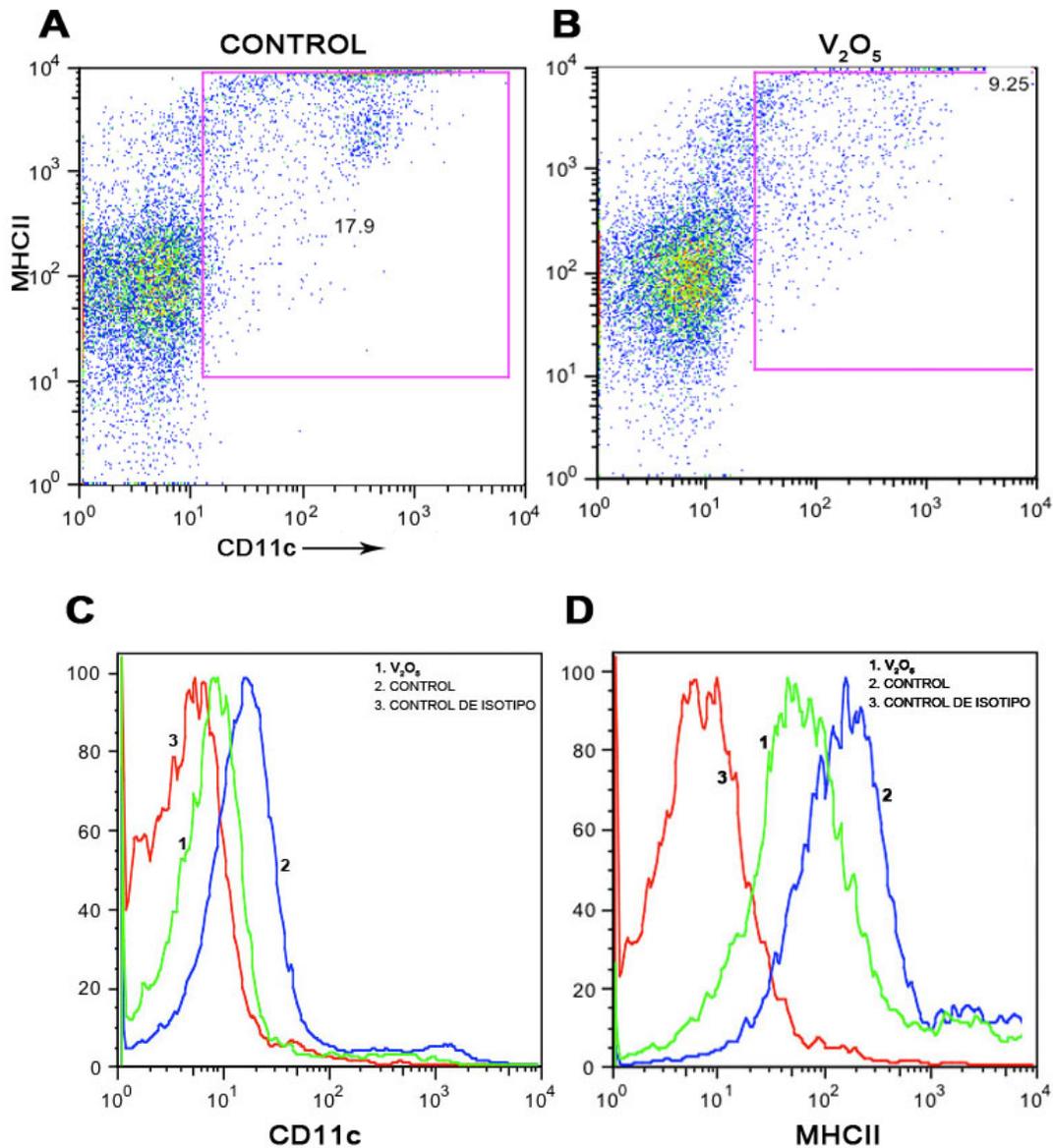


Figura 11. Dot-plots e Histogramas de CD11c y MHCII de células obtenidas del timo de ratones control y expuestos. (A). Control. La región indica el porcentaje de células dobles positivas CD11c<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>, a partir de 10 000 eventos adquiridos. (B). Expuesto. Porcentaje de células dobles positivas CD11c<sup>+</sup> y MHCII<sup>+</sup>, a partir de 10 000 eventos adquiridos. Los valores de B son menores comparados a los de A. (C). Histograma representativo que indica la IMF de CD11c. (1) Expuesto, (2) Curva control y (3) Control de isotipo. Se observa mayor expresión en el control (2) comparada con el tratado con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1), este corrimiento indica que la expresión de CD11c en controles es mayor comparada con la de los expuestos. (D). Histograma representativo que indica la IMF de MHCII. (1) Expuesto, (2) Curva control y (3) Control de isotipo. Al igual que para CD11c, se observa una mayor expresión de MHCII en el control (2) comparada con el tratado con V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1).

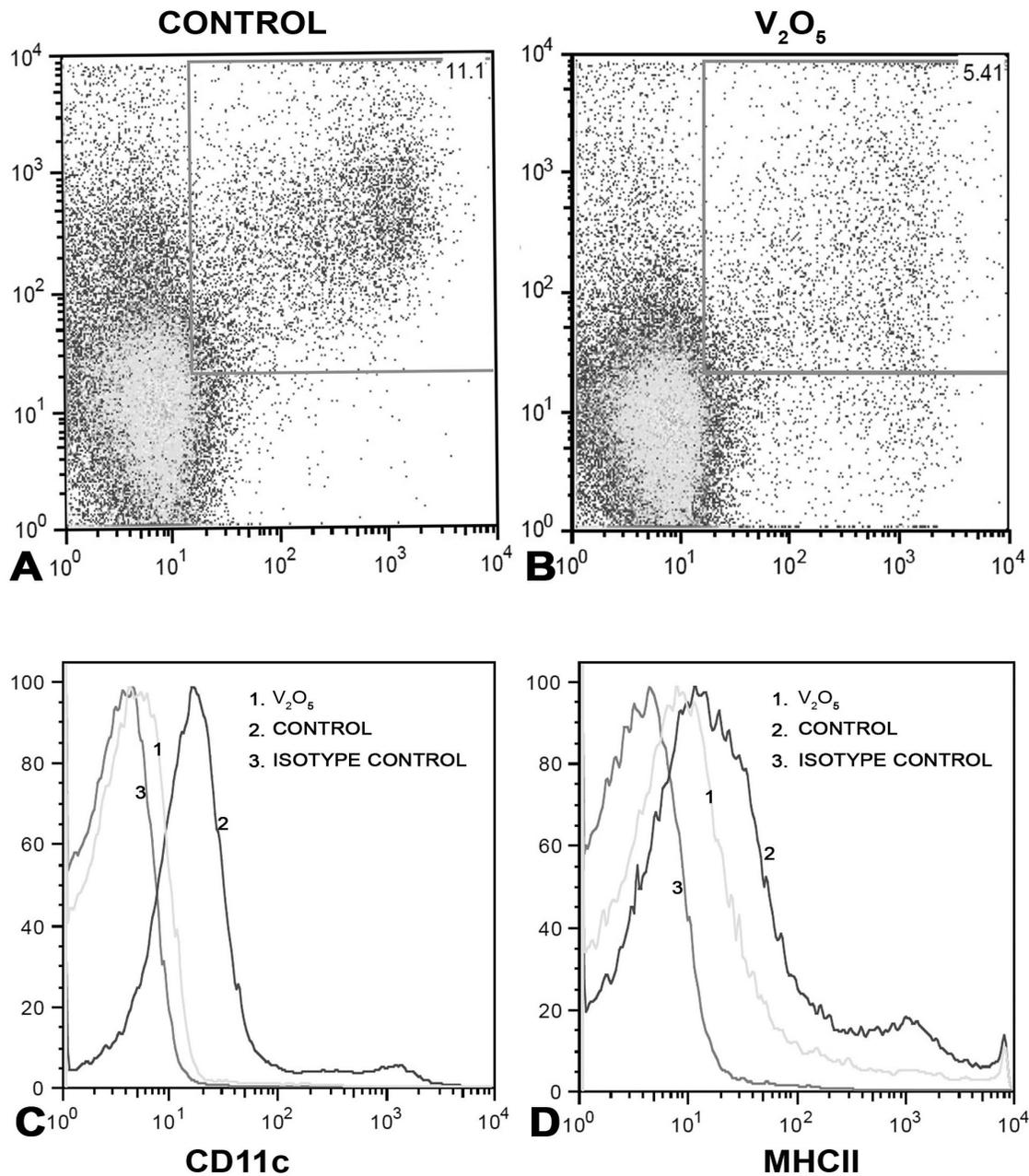


Figura 12. Expresión de CD11c y MHCII de células obtenidas del timo de ratones control y expuestos. (A y B). Dot Plot representando el porcentaje de células dobles positivas CD11c+ y MHCII+ a partir de 50 000 eventos adquiridos de CDs aisladas de ratones control (A) o expuestos a V (B). Porcentaje de células dobles positivas CD11c+ y MHCII+ de 50 000 eventos adquiridos. Los valores de B son menores comparados a los de A. (C). Histograma representativo de la expresión de CD11c. (1) Expuesto, (2) Control no expuesto y (3) Control de isotipo. Se observa un corrimiento a la derecha de (2) comparada con (1), este corrimiento indica que la expresión de CD11c en controles es mayor comparada con la de los expuestos. (D). Histograma de la IMF de MHCII. (1) Expuesto, (2) Curva control y (3) Control de isotipo. Se observa un corrimiento a la derecha de (2) comparado con (1). Este corrimiento indica que la expresión de MHCII en los controles es mayor comparada con la de los expuestos. Modificado de Ustarroz-Cano et. al, 2012

## **X. DISCUSION**

Se han documentado ampliamente los efectos de los contaminantes inhalados en el sistema respiratorio, siendo éste la principal vía por la cual las  $PST_{2.5}$  llegan directamente a la circulación (Nenmar et al., 2004). Cuando el V entra al organismo, por vía inhalada, puede causar daños en diferentes órganos tales como el pulmón, el cerebro, el hígado y el bazo (Bonner et al., 2000).

Debido a que la concentración del V se ha incrementado en las últimas décadas en la atmósfera de la Ciudad de México, resulta de interés el estudio de sus efectos en diferentes órganos y sistemas. Nuestro grupo ha reportado alteraciones en el sistema inmunológico debido a la exposición de V en un modelo murino; en estos trabajos se observaron cambios morfológicos y funcionales en el bazo de ratones expuestos a la inhalación de V (Fortoul et al., 2002; González-Villalva et al., 2006); ya que el bazo es un órgano inmunológico y tiene una participación importante en la respuesta inmunológica, nos preguntamos si estos efectos se presentarían también en otros órganos inmunológicos, particularmente en el timo.

El timo es un órgano linfoide primario al que llegan, desde la médula ósea, los progenitores linfoides para madurar y diferenciarse en linfocitos T. El desarrollo de linfocitos T requiere de una interacción estrecha de los timocitos inmaduros con las CD y las CET. Es en este órgano donde se lleva a cabo la selección negativa de linfocitos T, lo que asegura la adquisición de un repertorio de linfocitos T funcional, y al mismo tiempo evita la salida de clonas autorreactivas a la

circulación. En específico las CD del timo tienen un papel crucial en este proceso de tolerancia central (Krueger, 2011).

En este trabajo demostramos los efectos que el V inhalado produce en las CD del timo del ratón *in vivo*. Los resultados obtenidos fueron, una disminución en la expresión del CD11c y del MHCII de las CD, así como una disminución en el porcentaje de éstas.

Para este trabajo se utilizó el anticuerpo anti CD11c, tanto para la técnica de inmunohistoquímica y como para la citometría de flujo, porque es el marcador común de las tres poblaciones de CD tímicas que se han reportado: las CD plasmacitoides (pCD) y las dos poblaciones de CD convencionales (cCD), una de origen linfóide y otra de origen mielóide (Li et al., 2009).

Los resultados de inmunohistoquímica mostraron que en los timos de los ratones expuestos se observaba la médula un poco más pequeña que en los controles, por lo que supusimos que el número de las CD era menor, ya que éstas se encuentran en las zonas corticomedular y medular tímicas (Steinman et al., 1996); es por esto que se realizó una densitometría de la marca positiva, y los resultados indicaron que la presencia del CD11c disminuyó conforme se avanzó en las semanas de inhalación. Estos resultados se podrían interpretar como, que el número de CD disminuyó o que la expresión del CD11c fue menor, por lo que era importante corroborarlo cuantitativamente y con este fin utilizamos la citometría de flujo.

Para la citometría de flujo se necesitó de un método de separación de CD tímicas. Nos basamos en el método de Baba (2009), el cual modificamos, para obtener suficiente número de CD para utilizar el MACS. El uso del MACS fue importante pues en otros métodos de separación de CD tímicas utilizan una pequeña coladera; esto es eficaz para la separación de linfocitos tímicos pero no para las CD, ya que éstas se quedan atrapadas en la malla (Baba, 2009). Otra ventaja de este método de separación es que utilizamos únicamente dos anticuerpos, un anti-MHCII y un anti CD11c a diferencia de otros métodos en los que utilizan varios anticuerpos para aislar, además de las CD, a todas las demás poblaciones del timo (Varas, 2008).

La citometría de flujo demostró que no sólo disminuyó la expresión del CD11c, sino el porcentaje de células dobles positivas, CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>, fenotipo de las CD, es decir, disminuyó la expresión del marcador CD11c y el número de CD, corroborando nuestros resultados obtenidos cuando utilizamos a la inmunohistoquímica para identificar las CD.

Nuestros resultados fueron diferentes a los obtenidos por Chan y Filgueira (2011), ya que ellos reportan en su estudio que el V ejerció un débil efecto sobre la maduración y función de las CD, y no reportan cambios en la expresión del CD11c. Esto se puede deber a que nuestro trabajo fue realizado en ratón e *in vivo* mientras que ellos hicieron el estudio *in vitro* en células obtenidas de médula ósea (monocitos) de humanos promoviendo su diferenciación a CD, para posteriormente cultivarlas y exponerlas a diferentes compuestos de V en diferentes concentraciones y tiempos. Nosotros utilizamos CD aisladas

directamente del timo del ratón, a una concentración de 0.02M, durante 4 semanas, es decir, la obtención de CD, la forma de administración, el tiempo de exposición y la concentración utilizada, fueron diferentes.

Se han reportado cambios por la inhalación de V, en otro órgano linfoide como es el bazo (Fortoul et al., 2002; González-Villalva, 2006). Se observó un aumento en la cantidad de megacariocitos e hiperplasia de los centros germinales; los autores señalan que estas lesiones esplénicas pueden derivar en lesiones histológicas y alteraciones funcionales de este órgano linfoide. Esto va de acuerdo con nuestros resultados, en los que sugerimos que los cambios que observamos en las células dendríticas, pueden provocar alteraciones funcionales en el timo.

La disminución de la expresión del CD11c y en el número de CD que observamos, que sugieren alteraciones en la respuesta inmunológica, están de acuerdo con lo reportado por Piñón-Zarate (2008), los autores observaron una disminución de la respuesta inmune humoral por la inhalación de V utilizando el mismo modelo, otra vez hiperplasia de centros germinales en el bazo y además disminución del número de células CD19+, es decir, linfocitos B. En este trabajo también inmunizaron a ratones con el antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) y después midieron por ELISA la cantidad de anticuerpo formada (HBsAb) la cual resultó menor en los ratones que inhalaron V, y concluyeron que la respuesta inmunológica humoral se encuentra disminuida por efecto de la inhalación de V.

Las CD son muy importantes en la respuesta inmunológica de los linfocitos B, ya que activan la proliferación de linfocitos CD40 y la de los linfocitos B de memoria,

así como la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas, productoras de inmunoglobulinas (Caux et al., 1995).

Pensamos que la presencia del CD11c está disminuida porque el V tiene un gran potencial para inducir estrés oxidante, esto ya lo reportamos, lo que concuerda con los resultados de otros autores (Gusik et al., 2003; Cano-Gutiérrez et al., 2011). El estrés oxidante libera especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies de nitrógeno (NOS), y se ha demostrado que estas especies pueden tener como consecuencia la modificación de la actividad de factores de transcripción en la respuesta inflamatoria.

El CD11c es una subunidad que forma parte de una integrina denominada también como: Axb2, CR4 ó antígeno leucocitario de superficie p150, 95, (Pribila, 2004). Esta integrina es un heterodímero, en el que el CD11c forma la cadena alfa X (ITGAX) que se combina con la cadena beta 2 (ITGB2), formando una integrina específica de leucocitos (Steinman et al., 1996), que interactúa con elementos de la matriz celular (D'Amico et al., 1998), por esto pensamos que la disminución en el CD11c podría traer como consecuencia una alteración en el tráfico de las CD, esto a su vez podría repercutir, una vez más, en alteraciones funcionales del timo.

Otra posible consecuencia de la disminución en la expresión sería la alteración de la interacción con los linfocitos T, ya que la presencia de CD11c se encuentra asociada con la presencia del CD40 (Pribila et al., 1994) y del MHCII (Mausberg et al., 2009). Esto último concuerda con nuestros resultados ya que en el estudio también se observó la disminución de la expresión y el número de células MHCII+.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran alteraciones en el timo como resultado de la inhalación del V, en particular del  $V_2O_5$ ; estos resultados son importantes ya que la disminución de la presencia y la expresión del CD11c son indicadores de que la función de las CD tímicas pudiera estar alterada, lo que implicaría efectos en la selección negativa de los linfocitos T y esto a su vez puede implicar cambios en la respuesta inmunológica, ya que los linfocitos CD4 interactúan con el MHCII de las CD, por lo que podríamos sugerir un cambio en la respuesta de los linfocitos cooperadores, basándonos en resultados previos del grupo en los que la inhalación de V provocó disminución en el número de los linfocitos dobles positivos en el timo de ratones tratados (Piñón, 2005), suponemos que también habrá un cambio en la selección no sólo de los linfocitos CD4 sino también en la de los CD8. Dichos cambios podrían favorecer el desarrollo de respuestas autoinmunes como lo sugiere Chang (2010) e indirectamente Zouali (2011), quien propone un efecto epigenético debido a la contaminación atmosférica, que daría como resultado fenotipos alterados de las células inmunológicas y así favorecer el desarrollo de autoinmunidad.

Como se observa en la Figura 13, los resultados presentados aquí favorecen nuestra hipótesis de que los contaminantes atmosféricos, especialmente las  $PST_{125}$ , son capaces de inducir cambios en la respuesta inmunológica sistémica, hecho que podría explicar el incremento de una variedad de enfermedades autoinmunes, tales como, el lupus, la artritis reumatoide, por mencionar algunas, que no han sido claramente asociadas con factores ambientales (Fortoul et al., 2002; Fortoul y Rojas-Lemus, 2007).

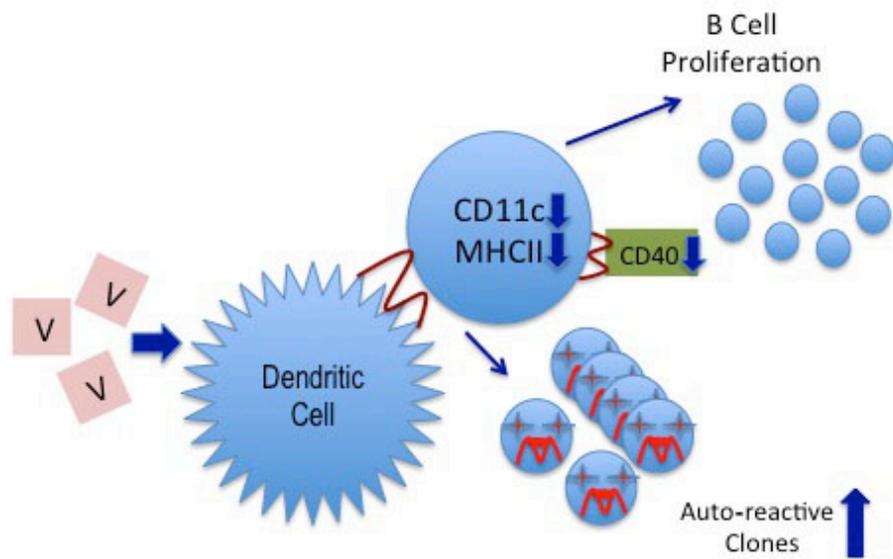


Figura 13. Descripción esquematizada del efecto propuesto del V sobre las CD. La disminución en la expresión del CD11c y del MHCII, tendrían como consecuencias un decremento de las células CD40 y una proliferación de linfocitos B (Caux et al., 1995), así como un incremento en los niveles de clones autorreactivos (Chang, 2010). Modificado de Ustarroz-Cano et al., 2012.

En resumen, estamos conscientes de la necesidad de continuar el estudio de los efectos del vanadio para explorar este fenómeno, empezando por utilizar marcadores de maduración, moléculas coestimuladoras (CD80; CD86) y coinhibidoras (B7-H1, B7-DC) de las CD, y por supuesto la evaluación de la función de las CD *in vitro* e *in vivo*.

## **XI. CONCLUSIONES**

- 1.- Existe una disminución significativa en el porcentaje de células dendríticas (CD11c+MHCII+) en el timo de ratones tratados.
- 2.- El efecto de la inhalación de V afecta tanto el porcentaje, como la intensidad de la expresión de los marcadores CD11c y MHCII de las células dendríticas tímicas.

## XII. BIBLIOGRAFIA

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

Aifantis, I., Mandal, M., Sawai, K., Ferrando, A., and Vilimas, T. 2006. Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor. *Immunol. Rev.* 209:159-169.

Alvarez, G., Lascurain, R., Perez, A., Degand, P., Montaña, L.F., Martinez-Cairo, S., and Zenteno, E. 1999. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol. Inves.* 28:9-18.

Avila-Costa, M. R., Montiel-Flores, E., Colin-Barenque, L., Ordonez, J.L., Gutierrez, A.L., Nino-Cabrera, H. G., Mussali-Galante, P., and Fortoul, T. I. 2004. Nigrostriatal modifications after vanadium inhalation: An immunocytochemical and cytological approach. *Neurochem. Res.* 29:1365–1369.

Baba, T., Nakamoto, Y., and Mukaida, N. 2009. Crucial contribution of thymic sirp $\alpha$ + conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR-dependent manner. *J. Immunol.* 183:3053–3063.

Barceloux, D.G. 1999. Vanadium. *Clin. Toxicol.* 37:265-278.

Bingheng, Ch. and Haidong, K. 2008. Air pollution and population health: a global Challenger. *Environ. Health Prev. Med.* 13:94–101.

Bonner, J. C., Rice, A. B., Moomaw, C. R., and Morgan, D. L. 2000. Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am. J. Physiol.* 278:L209–L216.

Briggs, D. 2003. Environmental pollution and the global burden of disease *Br. Med. Bull.* 68:1-24.

Cano-Gutierrez, G., Acevedo-Nava, S., Santamaria, A., Altamirano-Lozano, M., Cano-Rodriguez, M. C., and Fortoul, T. I. 2011. Hepatic megalocytosis due to vanadium inhalation: Participation of oxidative stress. *Toxicol. Ind. Health* (doi 10.1177/0748233711412424).

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. 1995. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263–1272.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D., and Banchereau, J. 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184:695-706.

Chan, E., and Filgueira, L. 2011. Effect of vanadium on human dendritic cells. *Toxicol. Environ. Chem.* 92:355–371.

Chang, C. 2010. The immune effects of naturally occurring and synthetic nanoparticles. *J. Autoimmun.* 34:J234–J246.

Cohen, M. D. 2004. Pulmonary immunotoxicology of select metals: Aluminum, arsenic, cadmium, chromium, copper, manganese, nickel, vanadium, and zinc. *J. Immunotoxicol.* 1:39–70.

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

Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5:1219-1226.

D'Amico, G., Bianchi, G., Bernasconi, S., Bersani, L., Piemonti, L., Sozzani, S., Mantovani, A., and Allavena, P. 1998. Adhesion, trans-endothelial migration, and reverse transmigration of *in vitro* cultured dendritic cells. *Blood* 92:207–214.

D'Amico, A., and Wu, L. 2003. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells are within the bone marrow hemopoietic expressing Flt3. *J. Exp. Med.* 198:293-303.

Dockery, D. W., and Pope, C. A., 3rd. 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Publ. Health.* 15:107–132.

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

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. 2006. Aclonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311:83-87.

Fortoul, T. I., and Rojas-Lemus, M. 2007. *Vanadium as an air pollutant. In: Vanadium: its impact on health* (Fortoul, T. I., and Avila Costa, M. R., Eds.). New York: Nova Science Publishers, pp. 1–6.

Fortoul, T.I., Rodriguez-Lara, V., Falcon-Rodriguez Cl., Lopez-Valdez N., Ustarroz-Cano M., Montañó LF. 2009. *Traffic related air pollution. In: Traffic related air pollution and internal combustion engines.* (Demidov, S., and Bonnet, J., Eds.). New York: Nova Science Publishers, pp. 1-28.

Fortoul Tl., Saldivar L., Tovar TA., Salazar D., Castilla ME and Olaiz- Fernandez G. 1996. Metal and lung tissue from autopsy cases in Mexico City residents. Comparison between cases from the 1950s and 1980s. *Environ. health perspect.* 104:630-636.

Fortoul, T. I., QuanTorres, A., Sanchez, I., Lopez, I. E., Bizarro, P., Mendoza, M. L., Osorio, L. S., Espejel-Maya, G., Avila-Casado, M. del C., Avila-Costa, M. R., Colin-Barenque, L., Villanueva, D. N., and Olaiz-Fernandez, G. 2002. Vanadium in ambient air: Concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health.* 57:446–449.

Fortoul, T. I., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colin-Barenque, L., Montano, L. F., Garcia Pelaez, I., Bizarro-Neves, P., Lopez-Valdez, N., Falcon-Rodriguez, C. I., Jimenez-Martinez, R. S., Ruiz Guerrero, M. L., Lopez-Zepeda, L. S., Morales-Rivero, A., and Muniz-Rivera-Cambas, A. 2011. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:951043.

Gonzalez Villalva, A., Fortoul, T. I., Avila-Acosta, M. R., Pinon-Zarate, G., Rodriguez-Lara, V., Martinez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Bizarro-Neves, P., Diaz-Bech, P., Mussali-Galante, P., and Colin Barenque, L. 2006. Thrombocytosis induced in mice after subacute and sub-chronic V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> inhalation. *Toxicol. Ind. Health.* 22:113–116.

Gonzalez-Villalva, A., Pinon-Zarate, G., De la Pena-Diaz, A., Flores-Garcia, M., Bizarro-Neves, P., Rendon-Huerta, E., Colin-Barenque, L., and Fortoul, T. I. 2011. The effect of vanadium on platelet function. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32: 447–456.

Gusik, T. J., Korbut, R., and Adame-Gusik, T. 2003. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 54:469–487.

Hernandez, H., and Rodriguez, R. 2011. Geochemical evidence for the origin of vanadium in an urban environment. *Environ. Monit. Assess.* doi: 10.1007/s10661-011-2343-9.

Hope, B. K. 1994. A global biogeochemical budget for vanadium. *Sci. Total Environ.* 141:1–10.

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

Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3038-3042.

IPCS, International Programme on Chemical Safety. 2000. *Concise international chemical assessment: document. vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds*. Geneva: World Health Organization (WHO).

Kiss, T., Kiss, E., Garribba, E., and Sakurai, H. 2000. Speciation of insulina-mimetic VO<sub>4</sub> (IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.* 80:65-73.

Kraal, G., Breel, M., Janse, M., and Bruin, G. 1986. Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163:981-987.

Krueger, A. 2011. A missing link in thymic dendritic cell development. *Eur. J. Immunol.* 41:2141-2147.

Laden, F., Neas, L. M., Dockery, D. W., and Schwartz, J. 2000. Association of fine particulate matter from different source with daily mortality in six U.S. cities. *Environ. Health Perspect.* 108:941-947.

Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., and Robey, E.A. 2006. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat. Immunol.* 7:338-343.

Li, C., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. 2009. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 206:607-622.

Licona-Limon, P., Aleman-Muench, G., Chimal-Monroy, J., Macias-Silva, M., Garcia-Zepeda, E. A., Matzuk, M.M., Fortoul, T.I., and Soldevila, G. 2009. Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381:229-235.

Liu, Y.J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.H., Malefyt, Rde W., Omori, M., Zhou, B., and Ziegler, S.F. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.* 25:193-219.

McKay, P.F., Imami, N., Johns, M., Taylor-Fishwick, D.A., Sedibane, L.M., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Palmer, D.B., George, A.J., Foxwell, B.M. and Ritter M.A. 1998. The gp200-MR6 molecule which is functionally associated with the IL-4 receptor modulates B cell phenotype and is a novel member of the human macrophage mannose receptor family. *Eur. J. Immunol.* 28: 4071-4083.

Marr, L.C., Grogan, L.A., Wohrnschimmel, H., Molina, L.T., and Molina, M.J. 2004. Vehicle traffic as a source of particulate polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the Mexico City Metropolitan Area. *Environ. Sci. Technol.* 38: 2584-2592.

Mausberg, A. K., Jander, S., and Reichmann, G. 2009. Intra-cerebral granulocyte-macrophage-colony stimulating factor induces functionally competent dendritic cells in the mouse brain. *Glia* 57:1341-1350.

Molina, M.J., and Molina, L.T. 2004. Megacities and atmospheric pollution. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 54:644-680.

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

Mussali-Galante, P., and Fortoul, T.I. 2008. *Atmospheric Pollution. In: Enviromental research progress.* (Florian P. Maes. Eds.). New York: Nova Science Publishers, pp,147-160.

Nemmar, A., Hoylaerts, M. F., Hoet, P. H., and Nemery, B. 2004. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: Systemic translocation and pro-thrombotic effects. *Toxicol. Lett.* 149:243–253.

Osada, M., Ito, E., Fermin, H.A., Vazquez-Cintron, E., Venkatesh, T., Friedel, R.H., and Pezzano, M. 2006. The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin. Dev. Immunol.* 13:299-319.

Pelayo, R., Hirose, J., Huang, J., Garrett, K.P., Delogu, A., Busslinger, M., and Kincade, P.W. 2005. P: Derivation of 2 categories of plasmacytoid dendritic cells in murine bone marrow. *Blood* 105:4407-4415.

Piñón-Zárate G. 2005. Alteraciones en las poblaciones celulares de timo después de la inhalación de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Modelo en ratón. Tesis para obtener el grado de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. 80 pp.

Pinon-Zarate, G., Rodriguez-Lara, V., Rojas-Lemus, M., Martinez-Pedraza, M., Gonzalez Villalva, A., Mussali-Galante, P., and Fortoul, T. 2008. Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses. *J. Immunotoxicol.* 5:115–122.

Pope, M., Ashley, M. J., and Ferrence, R. 1999. The carcinogenic and toxic effects of tobacco smoke: Are women particularly susceptible? *J. Gend. Specif. Med.* 2:45–51.

Pribila, J., Itano, A., Mueller, K., and Shimizu, Y. 2004. The  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 1\beta 1$  integrins define a subset of dendritic cells in peripheral lymph nodes with unique adhesive and antigen uptake properties. *J. Immunol.* 172:282–291.

Rodriguez-Mercado, J. J., and Altamirano-Lozano, M. A. 2006. Vanadium: Contamination, metabolism, and genotoxicity. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173–189.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, CH., Koch, F., and Stoitzner, P. 2003. Langerhans cells-dendritic cells of the epidermis. *APMIS.* 111:725-740.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179:1109-1118.

Savino, W., and Dardenne, M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* 21:412-443.

Shortman, K., and Liu, Y.J. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:139-176.

Steinman, R.M. and Cohn, Z. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.

Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K. 1996. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156:25–37.

Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6:127-135.

Takahama, Y., Tanaka, K., and Murata, S. 2008. Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire. *Trends Immunol.* 29:251-255.

Ustarroz-Cano, M., Garcia-Pelaez, I., Piñon-Zarate, G., Herrera-Enriquez, M., Soldevila, G., and Fortoul, T.I. 2012. CD11c decrease in mouse thymic dendritic cells after vanadium inhalation. *J. Immunotoxicol.* [Epub ahead of print].

Vallejo, M., Jáuregui-Renaud, K., Hermosillo, A.G., Márquez, M.F., y Cárdenas, M. 2003. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Médica de México.* 139: 57-63.

Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K., and Shortman, K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97:1733-1741.

Varas, A., Hernandez-Lopez, C., Valencia, J., Mattavelli, S., Martinez, V. G., Hidalgo, L., Gutierrez-Frias, C., Zapata, A.G., Sacedon, R., and Vicente, A. 2009. Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling. *J. Leukocyte Biol.* 83:1476–1483.

Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176:47-58.

Welner, R.S., Pelayo, R., Nagai, Y., Garrett, K.P., Wuest, T.R., Carr, D.J., Borghesi, L.A., Farrar, M.A., and Kincade, P.W. 2008. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. *Blood* 112:3753-3761.

World Health Organization (WHO). 1998. Vanadium. In: Environmental Health Criteria 81. Geneva: WHO.

World Health Organization (WHO). *Regional Office for Europe*. 2000. *Vanadium*. In: WHO Regional Publications, European series No. 91. Copenhagen: WHO.

Wu, L., and Galy, A. 2001. *The development of dendritic cells from hematopoietic precursors*. In: *Dendritic cells* (Lotze, M., and Thomson, A., Elsevier Academic Press). Great Britain, pp. 780-794.

Wu, L., Vremec, D., Ardavin, C., Winkel, K., Süß, G., Georgiou, H., Maraskovsky, E., Cook, W., and Shortman, K. 1995. Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. 1995. *Eur. J. Immunol.* 25:418-425.

Wu, L., and Liu, Y. J. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26:741–750.

Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98:3376-3382.

Zouali, M. 2011. Epigenetics in lupus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217:154–165.