



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EFFECTO DE LA INHALACIÓN DE VANADIO EN
CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO
(CPA) CD11c+ EN PULMÓN DE UN MODELO
MURINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

SONIA ANDREA RIVERA PINEDA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA LUZ USTARROZ CANO



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2017



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.

Dedicatoria

El presente trabajo está dedicado a las personas más importantes para mí por todo el amor, esfuerzo y paciencia que me han brindado no sólo durante esta etapa, sino cada día de mi vida.

A mis papás, Sonia Pineda Aguirre y Ernesto Rivera López, quienes han estado a mi lado apoyándome incondicionalmente. A mis hermanos, Jorge y José, por hacerme repasar todo lo aprendido y porque sin ellos la vida no sería divertida. Y a Eduardo Martínez por todo lo compartido.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, la Doctora Martha Ustarroz, por haberme aceptado como su alumna en el laboratorio y haberme apoyado en el desarrollo del presente proyecto. Por haberme enseñado muchas cosas útiles para mi formación tanto en el ámbito académico como personal.

A la Doctora Nelly López por los conocimientos compartidos sobre el vanadio y el sistema respiratorio, así como el apoyo y enseñanza tanto en el manejo, el sacrificio y disección de los ratones, como por las aportaciones al presente trabajo y la resolución de las dudas que tenía.

A la Doctora Teresa Fortoul por haberme acogido como miembro de su laboratorio y por el apoyo brindado en la parte estadística, así como por sus consejos para darle un mejor enfoque al proyecto.

A la Doctora Laura Colín Barenque por cuidarnos en los congresos y ser siempre amable y accesible; por los aportes en la corrección de la Tesis y el apoyo brindado para terminar este proyecto.

A todos los miembros del grupo de investigación de la Doctora Fortoul, tanto doctores como alumnos, por las observaciones y aportes al proyecto, por el conocimiento y los alimentos -incluso las ensaladas- compartidos durante los seminarios.

A la Doctora Diana Millán Aldaco de la unidad de Fisiología Celular por su apoyo al realizar los cortes por congelación de los pulmones con tanto cuidado.

A Araceli Martínez por toda la ayuda y desveladas que hicieron posible esta tesis.

A mis sinodales, la Doctora Leticia Moreno, la Doctora Verónica Anaya y el Doctor Maximiliano Fierro, quienes han contribuido en el desarrollo del presente proyecto desde el LICyT y lo han enriquecido con sus valiosas observaciones.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	5
Índice de cuadros.....	6
Índice de gráficas.....	6
Glosario de abreviaturas.....	7
Resumen.....	9
Introducción.....	10
Zona Metropolitana del Valle de México.....	10
Contaminación.....	13
Partículas suspendidas (PM).....	14
Vanadio.....	18
Vanadio y el Sistema Respiratorio.....	23
Sistema Respiratorio y sus Mecanismos de Defensa.....	24
Cavidades Nasales.....	25
Faringe.....	26
Laringe.....	26
Tráquea.....	26
Bronquios.....	26
Bronquiolos.....	27
Bronquiolos respiratorios.....	27
Alveolos.....	28
Macrófagos.....	32
Células Dendríticas.....	35
Células de Langerhans.....	36

Células Dendríticas Convencionales.....	37
CDc1.....	37
CDc2.....	37
Células Dendríticas Plasmacitoides.....	38
Células Dendríticas Derivadas de Monocitos.....	38
Células Presentadoras de Antígeno.....	39
CD11c.....	42
Justificación.....	43
Hipótesis.....	43
Objetivo General.....	43
Objetivos Particulares.....	43
Materiales y Métodos.....	44
Modelo Biológico.....	44
Protocolo de Inhalación.....	44
Sacrificio y Disección Pulmonar.....	45
Inmunohistoquímica.....	47
Análisis.....	49
Resultados.....	51
Conteo Celular.....	51
Densitometría.....	52
Discusión.....	59
Conclusiones.....	65
Referencias.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona Metropolitana del Valle de México.....	11
Figura 2. Contaminantes primarios y secundarios.....	14
Figura 3. Diámetro de las partículas suspendidas y su deposición en las vías aéreas.....	16
Figura 4. Grupos sensibles a la contaminación.....	17
Figura 5. Principales fuentes de vanadio en la atmósfera.....	20
Figura 6. Efectos de la exposición a vanadio en las vías respiratorias.....	23
Figura 7. El sistema respiratorio.....	25
Figura 8. Células Presentadoras de Antígeno alveolares.....	31
Figura 9. Macrófagos residentes de tejidos.....	32
Figura 10. Desarrollo de las Células Presentadoras de Antígenos.....	40
Figura 11. Cámara de acrílico y nebulizador para las exposiciones.....	45
Figura 12. Fijación por perfusión.....	46
Figura 13. Diagrama del método de inmunohistoquímica.....	48
Figura 14. Uso de ImageJ.....	49
Figura 15. Resumen del método.....	50
Figura 16. Fotomicrografías representativas de la inmunohistoquímica, control, semana 2, 3 y 4.....	52
Figura 17. Procesamiento de imágenes en Photoshop.....	53
Fotomicrografías representativas de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón:	
Figura 18. Organismo control.....	54
Figura 19. Organismo expuesto a V ₂ O ₅ por una semana.....	55
Figura 20. Organismo expuesto a V ₂ O ₅ por dos semanas.....	56
Figura 21. Organismo expuesto a V ₂ O ₅ por tres semanas.....	57

Figura 22. Organismo expuesto a V_2O_5 por cuatro semanas.....	58
Figura 23. Organismo expuesto a V_2O_5 por cuatro semanas, células binucleadas.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la exposición a V_2O_5 en un modelo murino.....	22
--	----

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto de la exposición a V_2O_5 sobre el número de células CD11c+ de pulmón.....	51
Gráfica 2. Efecto de la exposición a V_2O_5 sobre la densidad media de la marca CD11c expresada en las CPAs de pulmón.....	53

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Al	Aluminio
C	Carbón
CD	Células dendríticas
CD11c	<i>Cluster of differentiation 11c</i>
CDc	Células dendríticas convencionales
CDmo	Células dendríticas derivadas de monocitos
CDp	Células dendríticas plasmacitoides
CL	Células de Langerhans
CO	Monóxido de carbono
CPAs	Células presentadoras de antígenos
CSF-1	Factor estimulante de colonias
dsRNA	RNA de doble cadena
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fe	Hierro
IFNγ	Interferon gamma
IL	Interleucina
IRF4	Factor 4 regulador del interferon
M1	Macrófagos activados por la vía clásica
M2	Macrófagos activados por la vía alternativa
MAT	Macrófagos asociados a tumores
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
Na	Sodio
NO₂	Dioxido de nitrógeno
NOx	Oxidos de nitrógeno
O₂	Oxígeno
O₃	Ozono
Pb	Plomo
PM	Particulate Matter (Material Particulado)
PM₁	Material Particulado <1 μ m
PM₁₀	Material Particulado <10 μ m
PM_{2.5}	Material Particulado <2.5 μ m
PS	Proteína surfactante
PST	Partículas suspendidas totales
SO₂	Dioxido de azufre
SOx	Óxidos de azufre
TGFβ	Factor de crecimiento tumoral beta
Ti	Titanio
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa

V	Vanadio
V₂O₅	Pentóxido de vanadio
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
ZMVM	Zona Metropolitana del Valle de México

EFFECTO DE LA INHALACIÓN DE VANADIO EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (CPA) CD11c+ EN PULMÓN DE UN MODELO MURINO

RESUMEN

Los productos derivados de la combustión de petróleo, como la gasolina, son la principal fuente de vanadio (V); las partículas suspendidas (PM) pueden ser vehículo de dicho metal. La inhalación de V es la mayor fuente de absorción ($\pm 25\%$) y ocasiona síntomas como: dificultad respiratoria, inflamación, irritación en mucosas, etc. Entre los mecanismos de defensa del sistema respiratorio están las células presentadoras de antígenos (CPAs), tales como los macrófagos que actúan como mediadores de una respuesta innata, y las células dendríticas (CD), favorecen una respuesta inmune adaptativa, ambas CD11c+. Los cambios en estas poblaciones celulares pueden ocasionar alteraciones en la respuesta inmunológica por lo que se determinó el efecto de la exposición a V_2O_5 en las CPAs del pulmón de ratón caracterizándolas mediante inmunohistoquímica para CD11c, para su cuantificación y análisis. Se utilizaron 20 ratones en el grupo experimental y 20 de control; inhalaron $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de V, 2 veces por semana, durante 4 semanas. Se sacrificaron 5 ratones por grupo cada semana; se extrajeron los pulmones y se realizaron cortes por congelación a los que se les hizo inmunohistoquímica para CD11c. Se cuantificaron las células (ImageJ) CD11c+ y análisis de densitometría de marca positiva (DensiFe, MATLAB central). Los datos se analizaron mediante un ANOVA $p < 0.05$ post Hoc Dunnet. Los resultados muestran que posterior a la exposición a V por 4 semanas hubo un aumento de las CPAs CD11c+, tanto en número de células con marca, como en intensidad del marcador, siendo un cambio significativo con respecto al control. Probablemente este aumento se deba a que el pulmón es el primer órgano al que llega el V. Este resultado es importante pues cualquier cambio en el marcador o en el número de CPAs CD11c+ puede repercutir en la respuesta inmunológica, ocasionando problemas en la salud.

INTRODUCCIÓN

ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO

Al centro de la República Mexicana, en la porción meridional de la altiplanicie mexicana, a una altitud promedio de 2240 metros sobre el nivel del mar, se encuentra la Cuenca del Valle de México y dentro de ésta se localiza la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) (Comisión Ambiental Metropolitana, 2000; SMA-GDF, RAMA, 2005). La ZMVM forma parte de una cuenca endorreica, es decir, se encuentra rodeada por sierras de origen volcánico con cumbres que alcanzan alturas promedio de 3,200 m y superiores a los 5,000 m, por lo que se constituye como una cuenca atmosférica semicerrada (SMA-GDF, 2008); se integra por varias entidades federativas: la mayor parte del Estado de México, la totalidad de la Ciudad de México, el occidente de Tlaxcala, una pequeña porción del oeste de Puebla y el sur del estado de Hidalgo (Figura 1). Aproximadamente el 65.5% de su superficie es de uso urbano y 34.5% es zona rural, incluyendo usos: agrícola, pecuario, forestal y áreas de conservación (Comisión Ambiental Metropolitana, 2000).

Las Zonas Metropolitanas se caracterizan por una tendencia a la concentración de la población, se delimitan a partir de la interacción de municipios completos que, además de la colindancia geográfica, comparten un alto grado de integración socioeconómica rebasando sus límites territoriales e incorporándose en sus áreas de influencia directa y compartiendo procesos de conurbación (SEDESOL, CONAPO, INEGI, 2012).

Debido a su alta densidad poblacional la ZMVM es considerada la tercera metrópoli más poblada del mundo (después de Tokio y la conformada por Nueva York – Filadelfia) y la más grande de América Latina y del país, con poco más de 20 millones de personas, lo que equivale a 17.9% de los habitantes del país o 31.5% de las personas asentadas en alguna de las 59 zonas metropolitanas del país (Comisión Ambiental Metropolitana 2000; INEGI, 2011; SEMARNAT, 2012).

Y también se le considera como una de las zonas urbanas con mayor contaminación atmosférica en el mundo, y aunque este fenómeno se ve favorecido por una serie de características fisiográficas -los distintos tipos de relieve- y climáticas propias de la zona, son las actividades humanas o factores antropológicos y las emisiones contaminantes que generan los que han contribuido considerablemente al deterioro de la calidad del aire que los residentes de la ZMVM han respirado durante las últimas décadas (SMA-GDF, 2008; SMA-GDF, RAMA, 2005; Comisión Ambiental Metropolitana, 2000).

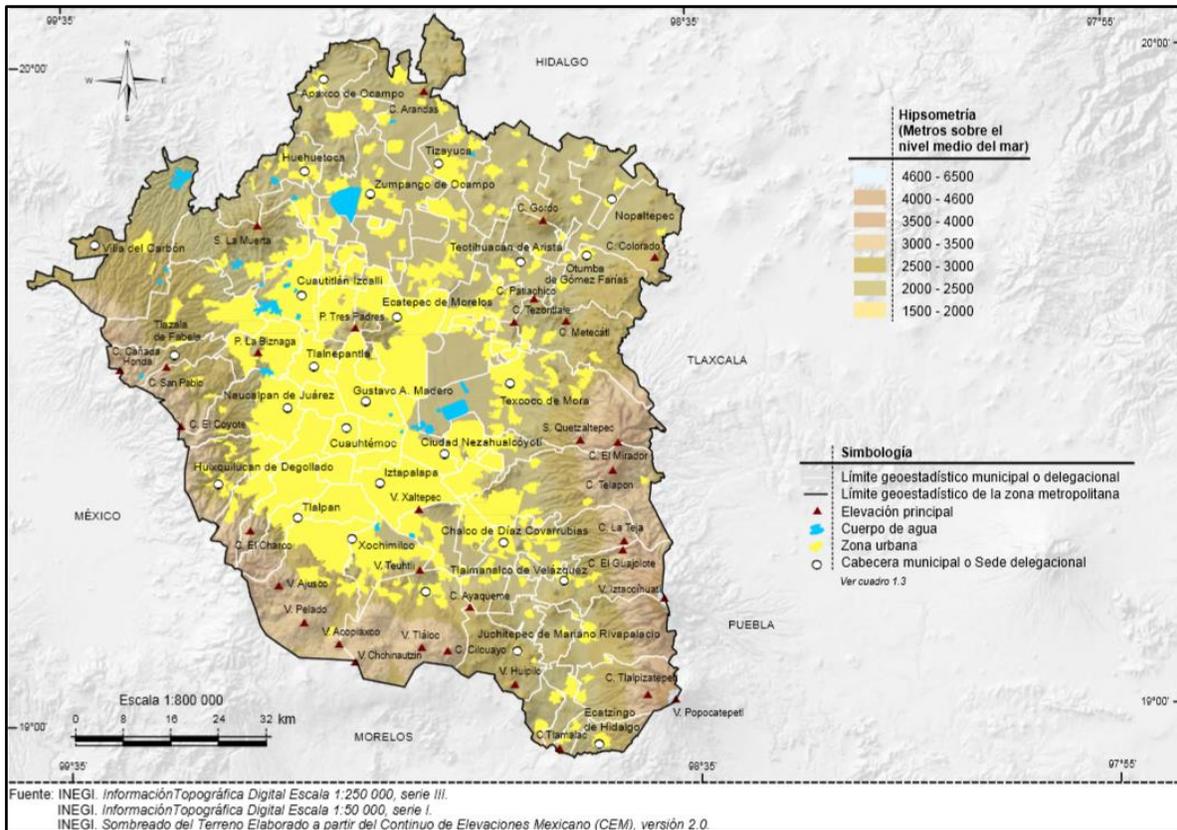


Figura 1. Zona Metropolitana del Valle de México. Limita al norte con el estado de Hidalgo, al oriente con los estados de Tlaxcala y Puebla, al sur con el estado de Morelos y al poniente con la Cuenca del Pánuco; se encuentra rodeada por diversas elevaciones y a una altitud promedio de 2240 msnm. Tomado de INEGI. Cuaderno estadístico y geográfico de la zona metropolitana del valle de México 2014. Mapa 2.

Entre los diversos factores fisiográficos y climáticos que influyen en la calidad del aire de la ZMVM podemos destacar los siguientes:

- Orografía: Al encontrarse rodeada por diversas elevaciones se forma una barrera natural en la que los fenómenos meteorológicos que confluyen dificultan la circulación del aire, propiciando la acumulación de los contaminantes (Comisión Ambiental Metropolitana, 2000; SMA-GDF, 2008).
- Altitud: Debido a los 2,240 msnm iniciales de la cuenca, los procesos de combustión operan deficientemente y emiten mayor cantidad de contaminantes a la atmósfera, esto como consecuencia del bajo contenido de oxígeno en el aire, el cual es aproximadamente 23% menor que a nivel del mar. Además, a mayor altitud se debe inhalar una mayor cantidad de aire para obtener suficiente O_2 y como consecuencia también se inhala una mayor dosis de contaminantes. (Molina y Molina, 2004; SMA-GDF, 2008; PROAIRE, 2002).

- Posición latitudinal: Esto ocasiona que reciba una radiación solar intensa, gracias a la cual se acelera la formación fotoquímica de contaminantes atmosféricos como las partículas secundarias y el ozono, esto como resultado de complejas reacciones que la luz ultravioleta del sol desencadena entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos emitidos a la atmósfera, los cuales son precursores del ozono (SMA-GDF 2008; PROAIRE, 2002).
- Ubicación en la región centro del país: Propicia que a lo largo del año resulte afectada por sistemas anticiclónicos generados tanto en el Golfo de México como en el Océano Pacífico, los cuales tienen la capacidad de generar cápsulas de aire inmóvil, que incluso pueden abarcar regiones mayores que el Valle de México; dichas cápsulas mantienen el cielo despejado, aumentan la capacidad fotoquímica de la atmósfera e inducen la disminución de la velocidad de los vientos cerca de la superficie del suelo, inhibiendo el movimiento vertical y horizontal del aire lo cual dificulta la dispersión de gases y partículas contaminantes (SMA-GDF, 2008; Comisión Ambiental Metropolitana, 2000; PROAIRE, 2002).
- Posición geográfica, morfología del valle de México y sistemas de alta presión: Como resultado de la asociación de estos factores se presentan frecuentes inversiones térmicas; estas se producen con el aumento de la temperatura en ciertas capas de la atmósfera que frenan el movimiento del aire (el aire frío de las capas inferiores no puede elevarse), produciendo una estabilidad atmosférica temporal que induce el estancamiento de masas de aire en la atmósfera, esto inhibe la capacidad de autodepuración atmosférica y favorece la acumulación de los contaminantes (SMA-GDF, 2008; PROAIRE, 2002).
- Actividad volcánica: Vulcanismo cercano a la ZMVM emite principalmente roca pulverizada y vapores de ácidos minerales.

Mientras que los factores antropológicos que provocan la aparición de contaminantes encontramos el uso desmedido del automóvil y vehículos de combustión en general (para el 2012 se reportó el uso de 47 millones de litros de gasolina), el funcionamiento de las fábricas e industrias, los suelos carentes de cubierta vegetal o asfáltica, así como una gran variedad de actividades en donde se utilizan solventes (SMA-GDF, 2013).

Estas fuentes emiten diversos tipos de contaminantes dentro de los que destacan el monóxido de carbono (CO), los compuestos orgánicos volátiles (COV), óxidos de nitrógeno (NOx), partículas suspendidas totales (PST) y, dentro de éstas, las partículas menores a 10μ (PM_{10}), las partículas menores a 2.5μ ($PM_{2.5}$) y las menores a 1μ o ultrafinas ($PM_{.1}$) (PM por sus siglas en inglés *Particulate Matter*) que terminan en la atmósfera (SEMARNAT, 2013).

CONTAMINACIÓN

El aire está compuesto de manera natural por nitrógeno (78%), oxígeno (21%) y pequeñas cantidades de otros gases (1%), sin embargo, en muchos lugares, principalmente en las grandes urbes, como la Ciudad de México, esta estructura se encuentra alterada por diversos componentes como sustancias químicas o polvos emitidos en su mayoría por la actividad humana (SMA-GDF, 2013).

La contaminación atmosférica es una mezcla altamente variable y compleja de sustancias sólidas, líquidas y gaseosas que interactúan entre sí y que pueden resultar dañinas para la salud de los seres vivos. Dichas sustancias o contaminantes pueden ser producidos de dos maneras: ya sea al ser emitidos directamente a la atmósfera o ser formados en la atmósfera a partir de reacciones de los contaminantes ahí presentes, por lo que se clasifican en dos categorías: primarios y secundarios (Figura 2) (WHO, 2006).

- Contaminantes primarios: Son aquellos que se emiten a la atmósfera a partir de una fuente como las chimeneas de las fábricas, incendios forestales o agrícolas, volcanes o a través de la suspensión de polvo por acción del viento o el paso de vehículos, así como sus emisiones de combustión.
- Contaminantes secundarios: Son aquellos que se forman por reacciones de los contaminantes primarios y los componentes naturales de la atmósfera como el oxígeno y el agua.

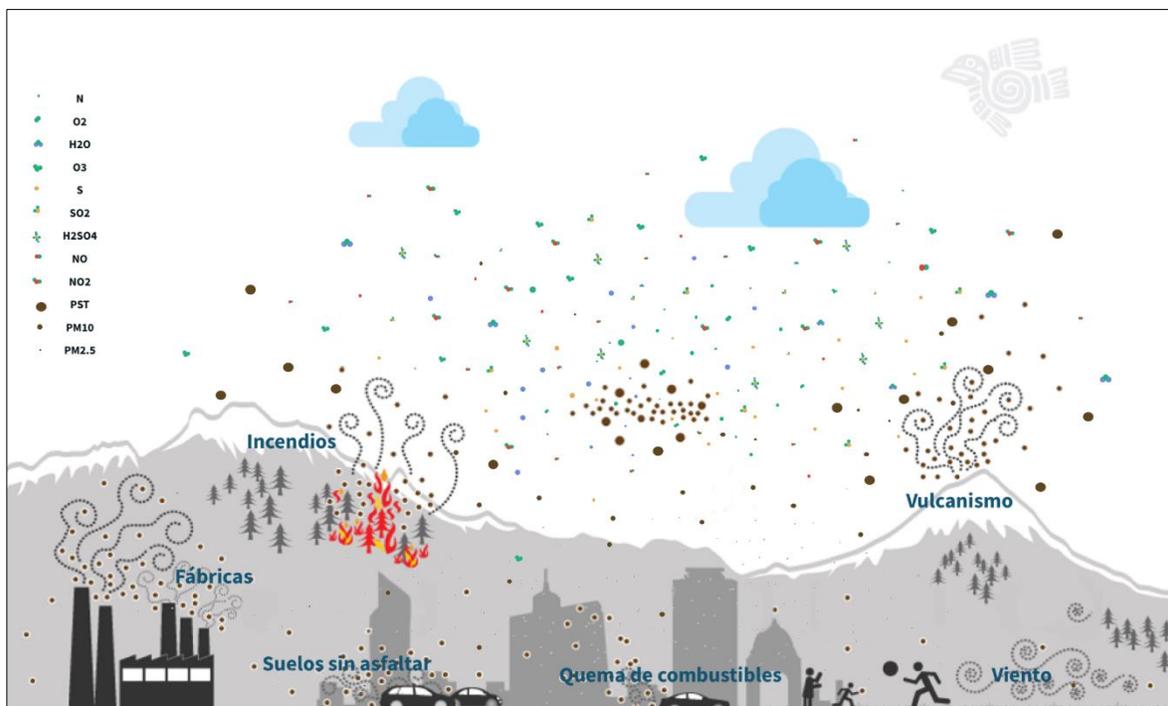


Figura 2. Los contaminantes primarios son emitidos a partir de diversas fuentes (azul) y los secundarios se forman a partir de diversas reacciones en la atmósfera, por ejemplo: ($O_2 \rightarrow O_3$); ($SO_2 \rightarrow H_2SO_4$); ($NO \rightarrow NO_2$). Imagen tomada y editada de <http://www.aire.df.gob.mx/default.php?opc=%27Y6BhmKkZg==%27>

Muchos de los contaminantes atmosféricos son generados y respirados por los seres humanos y son potencialmente dañinos para su salud de diversas maneras, desde sutiles cambios bioquímicos y fisiológicos, hasta enfermedades severas, lo que produce un aumento en la morbilidad y mortalidad; sus efectos perjudiciales se atribuyen a óxidos de nitrógeno (NO_x), ozono (O_3), monóxido de carbono (CO) y óxidos de azufre (SO_x), sin embargo, las partículas suspendidas y en especial las $PM_{2.5}$ son el contaminante atmosférico más estudiado y frecuentemente usado como un indicador proxy -medición indirecta que representa un fenómeno en ausencia de un método directo de medición- de exposición a contaminación aérea (Alfaro-Moreno, *et al*, 2002; WHO, 2016).

PARTÍCULAS SUSPENDIDAS (PM)

Las partículas suspendidas son una mezcla compleja de materiales sólidos y líquidos generalmente asociados a un núcleo de carbón que se encuentran suspendidos en la atmósfera provenientes tanto de contaminantes primarios como secundarios por lo que su composición y tamaño pueden variar significativamente. El tamaño de las partículas puede ir desde 0.005 hasta $100\mu m$ de diámetro aerodinámico, sin embargo, las partículas de

mayor tamaño tienen tiempos cortos de presencia en la atmósfera, ya que se depositan rápidamente por la acción de la gravedad, por lo que su presencia es más frecuente en áreas cercanas a las fuentes de emisión; debido a lo anterior, en el aire hay pocas partículas que exceden los 20 μm de diámetro, mientras que las menores a 10 μm las que representan mayor riesgo para la salud debido a que por su tamaño pueden ingresar fácilmente al sistema respiratorio (Zuk, *et al.*, 2007; Vallejo, *et. al*, 2002; WHO, 2006).

Para su estudio, la clasificación de las partículas suspendidas se ha elaborado con base en su tamaño aerodinámico; dicha clasificación comenzó en los años 70 con el estudio de las partículas suspendidas totales (PST), que son aquellas con un diámetro menor de 100 μm y en 1994 se implementaron normas para las PM₁₀ en México y poco más de una década más tarde, en 2005 para las PM_{2.5} (Zuk, *et. al.*, 2007).

Actualmente, la clasificación de las partículas suspendidas es la siguiente (Vallejo, *et. al.*, 2002):

- PM₁₀. Partículas burdas: Tienen un diámetro menor de 10 μm , pero mayor de 2.5 μm . Tienen algunos componentes como silicatos, Ti, Al, Na, Fe y cloruros.
- PM_{2.5}. Partículas finas: Tienen un diámetro igual o menor a los 2.5 μm . Están compuestas por productos derivados principalmente de la combustión de diesel, como C, Pb, V, SO₂ y NO₂.
- PM₁. Partículas ultrafinas: Tienen un diámetro igual o menor a 1 μm . Están compuestas por productos de quema agrícola y forestal y combustión de gasolina y diesel.

-Por definición, las PM₁₀ incluyen a las PM_{2.5} y a las PM₁.

Esta clasificación de las partículas suspendidas de acuerdo a su tamaño aerodinámico sirve para determinar los procesos de transporte y remoción en el aire y los sitios de deposición y limpieza en el tracto respiratorio de las partículas (WHO, 2006).

El sistema respiratorio es el medio de entrada para las partículas inhaladas, lo que se ve reflejado en sus potenciales efectos clínicos o subclínicos en las diferentes regiones del tracto respiratorio como resultado de las distintas interacciones con las partículas. Se sabe que entre más pequeña sea una partícula, mayor será la posibilidad de entrada a zonas profundas en las vías respiratorias. Las PM₁₀ pueden entrar directamente a las vías aéreas

conductoras y se depositan en sus diferentes regiones, mientras que las $PM_{2.5}$ y las partículas ultrafinas pueden alcanzar las vías aéreas respiratorias y depositarse en los alveolos, aunado a esto, se han observado muchas asociaciones epidemiológicas entre las exposiciones, tanto de corto como largo plazo a partículas de menor tamaño y un aumento en la incidencia de enfermedades pulmonares y cardiovasculares y de mortalidad; globalmente, 3 millones de muertes fueron atribuibles a la contaminación ambiental aérea en 2012 (Figura 3) (Harrison y Yin, 2000; Alfaro-Moreno, *et. al.*, 2002; WHO, 2006; Zuk, *et. al.*, 2007).

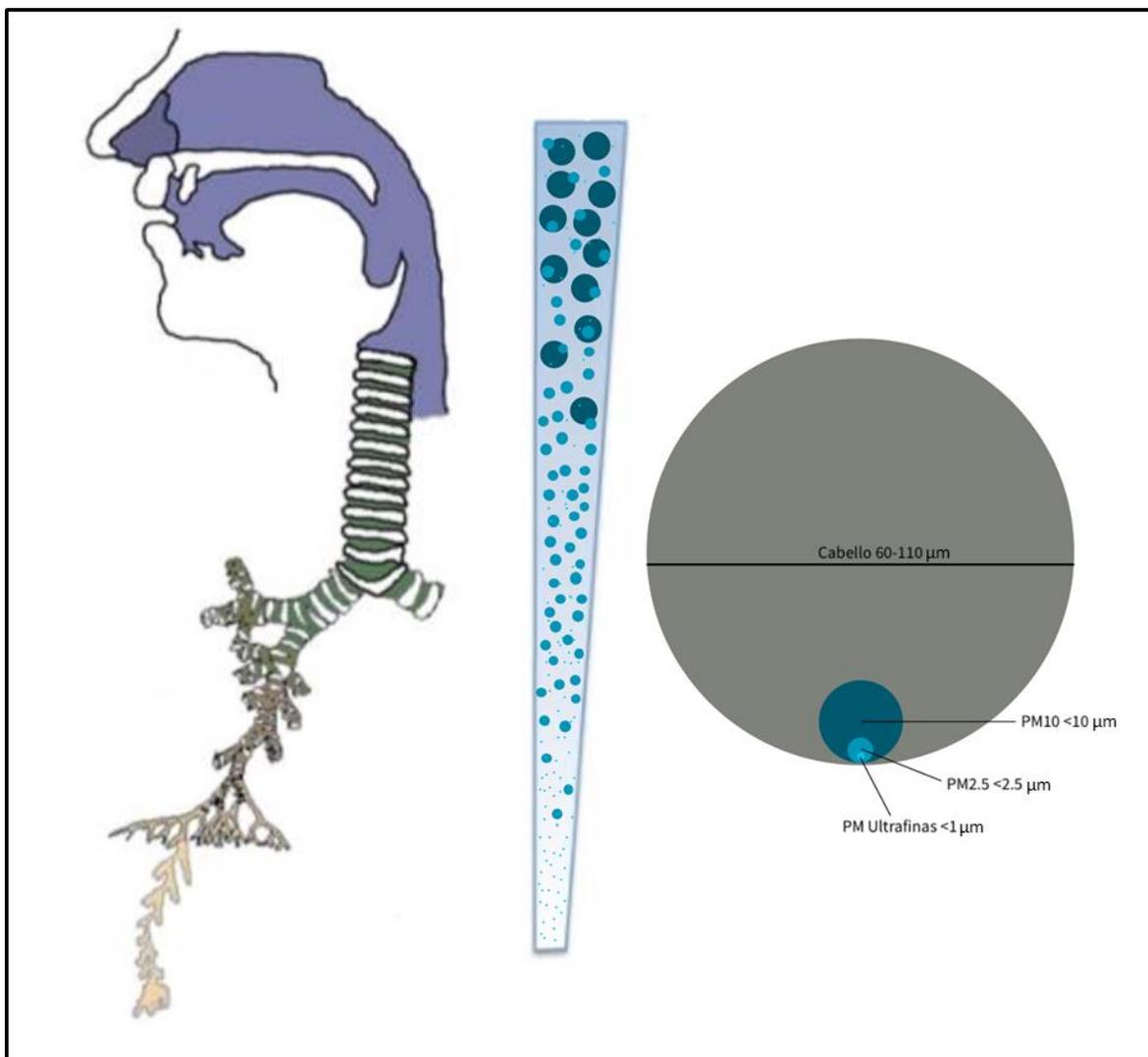


Figura 3. Diámetro de las partículas suspendidas y su deposición en las vías aéreas. Composición propia.

Las partículas suspendidas pueden actuar como vehículo de sustancias tóxicas absorbidas o adheridas a su superficie, lo que complica su investigación y la interpretación de los hallazgos en los riesgos de exposición debido a su gran heterogeneidad; son muchos los factores presentes en la composición que definen su toxicidad relativa (como el área de superficie y su composición), juegan un rol en la promoción y perpetuación en la respuesta inflamatoria pulmonar asociada al desarrollo o exacerbación de enfermedades como asma, bronquitis crónica o cáncer de pulmón y con esto favorecen la obstrucción de las vías aéreas y la disminución del intercambio gaseoso. Los efectos en la salud producidos por las partículas se presentan en todas las edades, sin embargo, hay sectores de la población con mayor sensibilidad, como niños, adultos mayores y personas con problemas respiratorios o cardiovasculares (Figura 4). Dentro de esta gran heterogeneidad, elementos metálicos como el vanadio (V), níquel (Ni), o plomo (Pb) son conocidos causantes de inflamación o cáncer, y también han sido reportados como elementos tóxicos presentes en las partículas producidas durante la quema de combustibles y han sido detectados con frecuencia en las PM₁₀ de la Ciudad de México. De acuerdo a la revisión realizada por Cohen y colaboradores en 2007, varios estudios han relacionado la presencia de V como un factor significativo en la inmunomodulación pulmonar tras la inhalación de PM. (Alfaro-Moreno, *et. al.*, 2002; WHO, 2006; De Haar, *et. al.*, 2008; Rondini, *et. al.*, 2010; SIMAT, 2015).



Figura 4. Grupos sensibles de la población ante la exposición a contaminantes como las partículas suspendidas. Tomada del informe de calidad del aire en la Ciudad de México 2014, SIMAT 2015.

Fortoul y colaboradores en 2002 realizaron el análisis de muestras de tejido pulmonar de personas que murieron en las décadas de 1960 y 1990 y observaron un aumento de aproximadamente 20% en las concentraciones de vanadio en las muestras: había $1.04 \pm 0.05 \mu\text{g/gm}$ en los tejidos de 1960 y $1.36 \pm 0.08 \mu\text{g/gm}$ en los de 1990; esto podría ser un reflejo del incremento en el consumo de gasolina como consecuencia del crecimiento del parque vehicular de la ZMVM, ya que la única correlación encontrada fue la década, ni el género, edad, causa de muerte, ocupación, hábitos tabáquicos o área de residencia fueron factores significativos. Esta tendencia implica el aumento de las concentraciones de V en el ambiente y con ello un riesgo para la salud humana por lo que resulta un metal de interés para la evaluación de los efectos adversos de los contaminantes.

VANADIO

El V es el primer metal de transición del grupo Vb y como tal puede existir en un amplio rango de estados de oxidación, desde -1 y hasta +5, tanto de forma aniónica como catiónica, siendo las formas tetravalente y pentavalente las más comunes en los sistemas biológicos, este elemento de número atómico 23 puede ser un metal de color gris-blanquecino o un polvo blanco lustroso o gris claro; el V elemental no se encuentra en la naturaleza, sin embargo, compuestos de V se encuentran en aproximadamente 65 minerales y forman parte de rocas y suelos ricos en azufre y también se encuentran en depósitos de petróleo crudo. La forma comercial más común es el pentóxido de vanadio (V_2O_5), en el cual se encuentra de forma pentavalente como un polvo de color amarillo-rojizo (Cohen, 1998; Costigan, *et. al.*, 2001; IARC, 2006; López, 2008; ATSDR, 2012; Assem y Levy, 2012).

El V, principalmente como V_2O_5 , es usado en muchas áreas, por ejemplo: en la manufactura de aleaciones metálicas (acero y titanio), como catalizador oxidante en la producción de químicos industriales (ácido sulfúrico a partir de dióxido de azufre), en la producción de pigmentos o colorantes (amarillo y azul), como inhibidor de corrosión en procesos de producción de hidrógeno o despolarizante de luz UV en vidrios, entre otros usos industriales; algunos compuestos con este metal también se han usado a lo largo de la historia en tratamientos médicos para anemia, diabetes, tuberculosis, leishmaniasis, sífilis, para mejorar el rendimiento de los atleta o disminuir el colesterol, sin embargo, se ha

observado la manifestación de signos y síntomas tóxicos tanto en los tratamientos como en los trabajadores expuestos a este metal en entornos industriales. (Barceloux, 1999; Fortoul, *et. al.*, 2002; IARC, 2006; Ingram, *et. al.*, 2007; Assem y Levy, 2009; Black, *et. al.*, 2015).

Musk, y Tees en 1982 y posteriormente Irsigler, *et al.* en 1999 observaron la inducción de asma e hiperreactividad bronquial en trabajadores expuestos ocupacionalmente a compuestos de V que previamente se encontraban sanos, sentando interés en el efecto adverso de dicho metal en la salud humana. La exposición ocupacional a partículas de V_2O_5 se da principalmente durante la limpieza de calderas de quema de petróleo y hornos, ya que compuestos orgánicos con V presentes en el petróleo y carbón pueden ser liberados; las exposiciones clínicas más significativas ocurren cuando los trabajadores inhalan V_2O_5 , casi como una regla, se ha observado que la toxicidad de vanadio aumenta conforme su valencia aumenta, siendo el V_2O_5 siendo la forma más tóxica. (Pierce, *et. al.*, 1996; Barceloux,, 1999; Assem y Levy, 2009).

En el petróleo se puede encontrar al V como un compuesto organometálico, su concentración varía dependiendo de la fuente de extracción; petróleos como el Western venezolano o el Maya mexicano tienen las concentraciones más altas de V. La fuente más importante de contaminación ambiental con V es la quema de petróleo (como gasolina en vehículos automotores) y carbón con aproximadamente el 90%. Las partículas de V en la atmósfera suelen depositarse en el suelo o son despejadas del aire por la lluvia, sin embargo con frecuencia tienden a encontrarse como V_2O_5 adheridas en las fracciones de partículas suspendidas más pequeñas, principalmente en las $PM_{2.5}$ ya que mientras más pequeña es la partícula, mayor es la cantidad de metales que se le puede adosar, y de esta manera pueden permanecer en el aire por periodos de tiempo más largos y ser transportadas lejos del sitio de emisión. El V no puede ser destruido en el ambiente, solo puede cambiar su forma o unirse o separarse del material particulado (Barceloux, 1999; Costigan, *et. al.*, 2001; Rheder, 2003; Fortoul, *et. al.*, 2011; ATSDR, 2012). Las principales fuentes naturales y antropogénicas de V en la atmósfera se ilustran en la figura 5.

México consume grandes cantidades de combustibles ricos en V y el V_2O_5 que se emite a la atmósfera en este proceso entra al cuerpo a través del sistema respiratorio adosado a partículas suspendidas en el aire, ésta es la principal forma en que la población general se ve expuesta; mientras que la absorción de compuestos de V es pobre después de la administración oral, la exposición por inhalación es la principal forma de absorción, con

aproximadamente 25% (Fortoul, *et. al.*, 2002; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Black, *et. al.*, 2015).

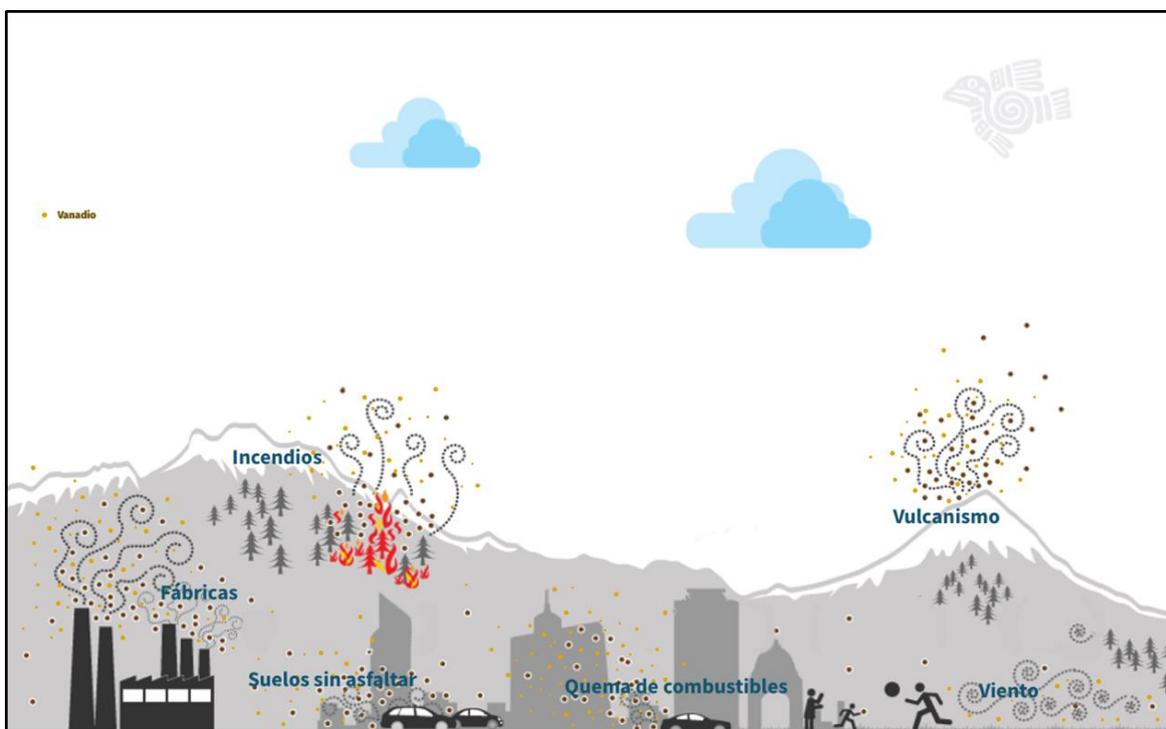


Figura 5. Principales fuentes de vanadio en la atmósfera. Fuentes naturales: intemperismo de suelos y rocas, actividad volcánica, incendios forestales y procesos biogénicos. Fuentes antropogénicas: combustión en vehículos automotores, generación de energía y agricultura. (Costigan 2001; Fortoul, 2002; Imagen tomada y editada de <http://www.aire.df.gob.mx/default.php?opc=%27Y6BhnmKkZg==%27>)

Como reflejo del aumento en la quema de combustibles fósiles se ha observado la emisión de grandes cantidades de vanadio a la atmósfera, dando como resultado que la concentración de este elemento en el aire de las grandes ciudades se incremente. Se ha reportado que en zonas urbanas las concentraciones de V en el aire van de 0.05 a 1.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ mientras que en áreas rurales se llegan a alcanzar 0.0024 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, para la Ciudad de México se han encontrado valores de hasta 0.114 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en PM_{10} y 0.093 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en las $\text{PM}_{2.5}$. Los suelos con poca actividad antropogénica poseen bajos niveles de V, a diferencia de suelos asociados a actividades industriales, los cuales presentan un aumento significativo de estos niveles, alcanzando hasta 19.3 μg de V por gramo de suelo en la vecindad de una refinería de crudo en Cataluña. Byrne y Kosta (1978) estimaron que se presenta una ingesta diaria de 1 μg de vanadio por inhalación, asumiendo que la concentración de V en el aire sea de aproximadamente 0.05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Cohen, 1998; Nadal, *et. al.*, 2004; Gutiérrez-Castillo, *et. al.*, 2006; IARC, 2006).

La intoxicación por V se refleja en síntomas como: irritación ocular, de nariz y pulmones, tos, sibilancias, disnea, dolor de pecho y disminución de la función pulmonar; se ha observado que otros órganos como riñón, hígado, sangre y tejidos formadores de sangre, tracto reproductivo y algunos órganos linfoides también se pueden ver afectados como resultado de transporte sistémico de V (Fortoul, *et. al.*, 2002; IARC, 2006; Turpín, *et. al.*, 2010). Algunos efectos observados en un modelo murino de exposición a V_2O_5 se enlistan en la tabla 1 (Fortoul, *et. al.*, 2014).

La mayor parte de los efectos tóxicos de la exposición a V se observan en el sistema respiratorio, que es la principal vía de entrada, los compuestos de V pueden llegar a las vías aéreas más profundas y alcanzar la zona alveolar donde pueden traslocarse y entrar al sistema circulatorio donde se oxidan a iones vanadato que son transportados por transferrina o albúmina, proteínas que contienen hierro y con el cual probablemente se asocia selectivamente; pueden entrar a células a través de canales aniónicos de fosfatos y cromatos y son reducidos de vanadato a vanadil (IV) por reductores celulares como el glutatión, ácido ascórbico y NADPH, entre otros; el vanadil puede unirse a proteínas o de nuevo ser oxidado fácilmente a vanadato. Estos cambios oxido-reductivos representan un medio significativo de toxicidad, ya que durante estos procesos no sólo se ven disminuidas las cantidades de reductores en la célula, sino que también se producen otras alteraciones, como el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en el balance fosforilativo de muchas proteínas como consecuencia de la inhibición de fosfatasa y la inhibición de sistemas enzimáticos por el parecido de los iones vanadato con los restos de fosfato (Cohen, 1998; Pierce, *et. al.*, 1996; Evangelou, 2002; Goc, 2006; Cooper, 2007; Korbecki, *et. al.*, 2012).

Los compuestos de V se distribuyen principalmente en riñones, hígado, sangre y hueso estos órganos tienen sus propios mecanismos de limpieza, sin embargo, parece que el sitio de mayor retención a largo plazo es el hueso; al actuar como depósito, la posibilidad de sufrir efectos tóxicos aumenta, no sólo en la función y bioquímica del hueso, sino en las funciones hematopoyéticas que realiza, incluyendo el desarrollo y función de las células del sistema inmune (Cohen, 1998; Pierce, *et. al.*, 1996; Evangelou, 2002; Cooper, 2007; Korbecki, *et. al.*, 2012).

ORGANO	ENFERMEDAD	SÍNTOMAS CLÍNICOS	HISTOLOGIA	BIOQUÍMICA	
				Aumento	Disminución
PULMÓN	Asma Hiperreactividad bronquial Bronquitis Neumonía	Tos persistente Dificultad para respirar Sibilancias Irritación pulmonar	Inflamación en el parénquima y epitelio bronquiolar Hiperplasia de células bronquiales no ciliadas Engrosamiento de la capa de músculo liso.	IL-6 TNF α	
SISTEMA NERVIOSO	Neurodegeneración	Alteraciones neuro comportamentales Disfunción olfatoria Discapacidad de memoria espacial	Perdida de espinas dendríticas Muerte neuronal Perdida de cilios y desprendimiento celular del epitelio ependimal de la membrana basal en la barrera hematoencefálica Daño oxidativo en el pleuro coroideo	4-hidroxinonenal Actividad de MMP- 9 y MMP-2 en corteza, bulbo olfatorio, hipocampo y cuerpo estriado	
TEJIDO HEMATOPOYETICO	Anemia normocítica y normocromica		Hemolisis Estrés oxidativo Peroxidación lipídica Leucocitosis (neutrófilos) Linfocitosis Trombocitosis Megacariocitosis en bazo y medula ósea Plaquetas gigantes	Fosforilación proteica P-selectina	ATPasa Na/K Agregación plaquetaria Proteínas tirosin fosfatasas
TIMO			Medula más delgada y distribuida en los lóbulos tímicos		CD11c MHCII
BAZO Y NODULOS LINFATICOS			Esplenomegalia Aumento de la pulpa blanca, con centros germinales grandes no delimitados claramente y proliferación de linfocitos Aumento en número y tamaño de los centros germinales en nódulos linfáticos Activación de linfocitos independiente de antígeno Aumento en número y reactividad de células B Cambios en la morfología nuclear y aumento de nucléolos	Ki67 IL-12 CD25	
SISTEMA REPRODUCTIVO	Baja fertilidad	Bajo conteo y malformaciones de espermias	Reabsorciones y disminución de sitios de implantación Aumento del estado de anestro Baja viabilidad y malformaciones fetales Aumento de folículos atresicos Disrupción en túbulos seminíferos Apoptosis de células germinales Inhibición de la espermatogénesis	4-hidroxinonenal	Gamatubulina Actina
HÍGADO		Inflamación	Meganúcleos en los hepatocitos Aumento de células inflamatorias Peroxidación lipídica	TBARS	
PANCREAS			Aumento de granulos de zimógeno e hinchazón en células acinarias	Amilasa Triglicéridos	
CANCER		Disminución del área y tamaño de los tumores	Muerte por apoptosis en células tumorales	P53 Bax	Bcl2

TABLA 1. Efecto de la exposición a la inhalación de V₂O₅ en un modelo murino. Se describen los efectos en varios órganos a través de los cambios observados en diversos marcadores (bioquímica), cambios en los tejidos (histología) y síntomas clínicos observados. En los recuadros en blanco no se han observado ese tipo de efectos. (Fortoul, 2014)

VANADIO Y EL SISTEMA RESPIRATORIO

Se ha reportado que la inhalación de V causa irritación tanto en garganta como en las vías respiratorias superiores e inferiores, produce tos, sibilancias, mayor producción de moco y flujo nasal, opresión en el pecho, hiperreactividad bronquial y limitación de flujo de aire en las vías aéreas (Pierce, *et. al.*, 1996; Rondini, *et. al.*, 2010; Fortoul, *et. al.*, 2014).

Estos síntomas pueden ser reflejo de diversos cambios histológicos causados por el V; en trabajadores crónicamente expuestos se observó aumento de neutrófilos en la mucosa nasal y en primates no humanos el aumento de neutrófilos se observó en pulmón; en ratas se ha reportado hiperplasia de las células bronquiolares no ciliadas, aumento de músculo liso en vías aéreas y fibrosis peribronquial; en ratones el flujo de leucocitos polimorfonucleares y aumento en la síntesis de mediadores proinflamatorios y la presencia de focos inflamatorios en el parénquima pulmonar (Figura 6) (Pierce, *et. al.*, 1996; Ingram, *et. al.*, 2007; Cooper, 2007; López, 2008; Fortoul, *et. al.*, 2014).

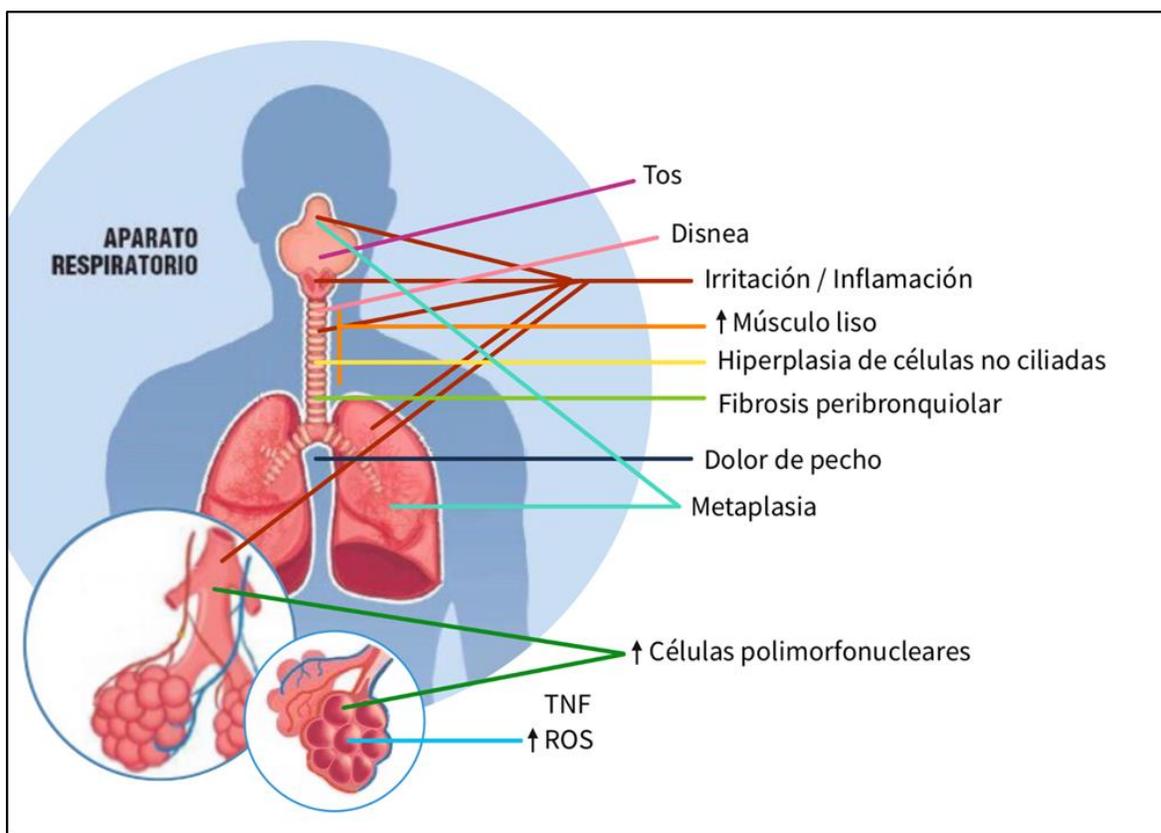


Figura 6. Efectos de la exposición a Vanadio en las vías respiratorias. Elaboración propia.

Aunque la eliminación inicial de V en pulmón es rápida (40% en una hora), no se ha registrado que ocurra la depuración total, por lo que las partículas permanecen en los pulmones y sus sitios inmunológicamente activos por largos periodos de tiempo; si bien son muchos los efectos que se han descrito tras la inhalación de V en el pulmón, son pocos los trabajos que se han enfocado al estudio de las células encargadas de la defensa del sistema respiratorio, como los macrófagos o las células dendríticas (CD); los macrófagos constituyen la primer línea de defensa contra partículas extrañas o microorganismos inhalados, y las CD son el primer paso para desencadenar una respuesta inmune adaptativa. Tanto las células dendríticas como los macrófagos alveolares se encuentran en contacto directo con los contaminantes inhalados, por lo que son blancos importantes en sus efectos tóxicos (Cohen, *et. al.*, 1996).

Como se mencionó anteriormente, la inhalación de V aumenta la incidencia de enfermedades como asma, bronquitis o neumonía en el tracto respiratorio; enfermedades que están relacionadas con alteraciones en la modulación de la respuesta de las células del sistema inmune mediante la liberación de citocinas y quimiocinas o la interacción entre los diversos tipos celulares. Por ejemplo, se ha sugerido que muchas de las neumonías agudas resultado de la exposición industrial a la inhalación de V pueden ser de origen químico-bacterial, podría parecer que la exposición a V resulta en el deterioro de la resistencia pulmonar a infecciones (Waters, *et. al.*, 1974). Dado el rol central de los macrófagos alveolares en la respuesta innata y de las células dendríticas en la inmunidad adaptativa, cualquier alteración en número, viabilidad o función de estas células como resultado de la inhalación de V podría esperarse que altere las defensas pulmonares con la posible inducción de alteraciones en el tejido.

SISTEMA RESPIRATORIO Y SUS MECANISMOS DE DEFENSA

El sistema respiratorio trabaja en conjunto con el sistema circulatorio para llevar a cabo la respiración, proceso vital en el que se lleva a cabo el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono, entregando oxígeno de los pulmones a las células y regresando el dióxido de carbono a los pulmones de donde es exhalado (Bérubé, *et. al.*, 2010).

Para su estudio, el sistema respiratorio se divide en: vías aéreas conductoras, las cuales incluyen las regiones del tracto respiratorio donde no se lleva a cabo el intercambio gaseoso, se dividen en superiores (cavidades nasales, faringe y laringe) e inferiores

(tráquea, bronquios y bronquiolos terminales), y vías aéreas respiratorias (bronquiolos respiratorios y alveolos).

A continuación se describen brevemente los elementos del sistema respiratorio que se esquematizan en la Figura 7 con base en la información de Pilette, *et. al.* (2001) y Ross (2007).

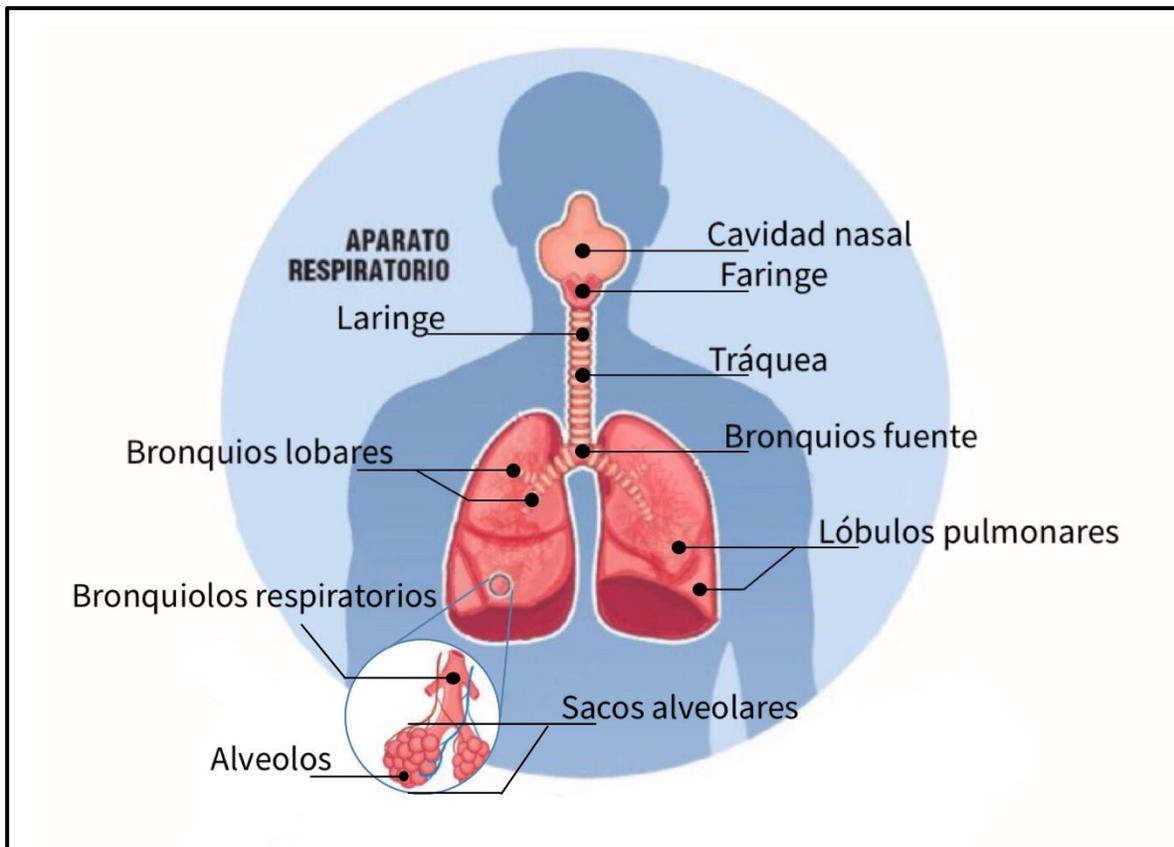


Figura 7. El sistema respiratorio. Elaboración propia.

CAVIDADES NASALES

Son cámaras pares separadas por un tabique óseo y cartilaginoso y se dividen en tres regiones: el vestíbulo, el segmento respiratorio y el segmento olfatorio. Las cavidades conectan con el medio externo y contienen gran cantidad de vibrisas o pelos rígidos que atrapan las partículas más grandes y glándulas sebáceas en la región del vestíbulo, posteriormente el epitelio estratificado plano se adelgaza y sufre una transición a epitelio cilíndrico pseudoestratificado característico del segmento respiratorio, aquí podemos encontrar diversos tipos celulares, como las células ciliadas (poseen cilios que proyectan dentro del moco), células caliciformes (sintetizan y secretan moco), células en cepillo

(poseen microvellosidades) o células basales (células madre de las que derivan los otros tipos celulares). El segmento olfatorio es muy similar al segmento respiratorio, carece de células caliciformes y tiene poblaciones de células olfatorias, células de sostén, células basales y en cepillo.

FARINGE

Une a las cavidades nasal y oral con la laringe y el esófago, permitiendo el paso del aire y los alimentos; también actúa como cámara de resonancia para la fonación y comunica con las trompas auditivas (de Eustaquio).

LARINGE

Es un segmento tubular complejo formado por placas irregulares de cartílago hialino y elástico, sirve de conducto para el aire y es el órgano de la fonación.

TRÁQUEA

Posee anillos cartilaginosos incompletos que sirven de sostén e impiden el colapso de la luz traqueal y tiene cuatro capas bien definidas: mucosa (epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes y una lámina propia con abundantes fibras elásticas), submucosa (tejido conjuntivo), cartilaginosa (cartílago hialino en forma de "C") y adventicia (tejido conjuntivo que la adhiere a estructuras contiguas). El tipo celular predominante en la tráquea son las células ciliadas, seguidas por las células mucosas. Esta estructura tubular va desde la faringe hasta la mitad del tórax, donde se divide en dos bronquios principales o primarios.

BRONQUIOS

Los dos bronquios principales formados a partir de la tráquea se designan generalmente como bronquios fuente derecho e izquierdo, los cuales a su vez se segregan en una serie de vías bronquiales intrapulmonares. A la primera división de los bronquios principales se les llama bronquios lobares (o secundarios), el bronquio derecho se divide en 3 ramas y el izquierdo en dos, una para cada lóbulo del pulmón; los bronquios secundarios se dividen en bronquios segmentarios o terciarios, y ya que el pulmón izquierdo está subdividido en 8 segmentos broncopulmonares y el derecho en 10, los bronquios lobares del pulmón izquierdo dan origen a 8 bronquios segmentarios y los del pulmón derecho a 10.

Al inicio los bronquios tienen la misma estructura histológica general que la tráquea, pero ésta cambia en el sitio donde los bronquios entran en los pulmones; los anillos de cartílago son remplazados por placas cartilaginosas que le dan a los bronquios una forma circular, conforme los bronquios se van ramificando van disminuyendo su tamaño y las placas de cartílago también se tornan más pequeñas y desaparecen donde la vía aérea alcanza un diámetro de alrededor de 1mm, y el bronquio comienza a llamarse bronquiolo.

En los bronquios se pueden definir cinco capas: mucosa (similar al epitelio traqueal), muscular (capa continua de músculo liso en bronquios mayores que se adelgaza y es menos organizada a medida que se reduce el diámetro de los bronquios), submucosa (tejido conjuntivo laxo con glándulas y tejido adiposo), capa cartilaginosa (placas de cartílago discontinuas que se disminuyen conforme se disminuye el tamaño de los bronquios), y la adventicia (tejido conjuntivo).

BRONQUIOLOS

Los segmentos broncopulmonares se subdividen en lobulillos pulmonares, y a cada lobulillo llega un bronquiolo. Estas vías aéreas de conducción miden 1mm o menos y sufren varias ramificaciones hasta dar origen a los bronquiolos terminales, los cuales a su vez dan origen a los bronquiolos respiratorios.

En la pared de todos los bronquiolos hay una capa de músculo liso relativamente grueso, no hay placas cartilaginosas como en los bronquios y células como las caliciformes se pueden encontrar en los bronquiolos más grandes, pero no en los bronquiolos terminales.

Los bronquiolos terminales están revestidos por epitelio cubico simple, en el cual hay células ciliadas y dispersas, entre ellas, células de Clara (células no ciliadas secretoras de agentes tensoactivos que impiden la adhesión luminal si la pared de la vía aérea colapsa y proteína de célula de Clara, la cual disminuye las lesiones pulmonares); las células de clara aumentan conforme disminuyen las células ciliadas a lo largo de los bronquiolos.

BRONQUIOLOS RESPIRATORIOS

Estos forman una zona de transición con características tanto de conducción como de intercambio gaseoso. El epitelio de los segmentos iniciales de esta porción contienen células ciliadas y células de Clara y, en menor cantidad, células en cepillo y células granulares. La pared del bronquiolo respiratorio tiene evaginaciones de paredes delgadas diseminadas en toda su longitud llamados alveolos.

ALVEOLOS

Son la unidad funcional de los pulmones, ya que en ellos ocurre el intercambio gaseoso, son la parte terminal de los bronquiolos respiratorios. Los alveolos están rodeados y separados unos de otros por una fina capa de tejido conjuntivo que tiene capilares sanguíneos, poniendo la sangre muy cerca del aire inspirado.

El epitelio alveolar se compone de varias células especializadas: los neumocitos de tipo 1 son células planas muy delgadas que facilitan el intercambio gaseoso; los neumocitos de tipo 2 o células de tabique son células cúbicas que secretan surfactante pulmonar y son progenitoras de los neumocitos tipo 1, tras una lesión proliferan y restauran ambos tipos de células alveolares; en cantidad escasa se pueden encontrar células en cepillo que funcionan como receptores que verifican la calidad del aire en los pulmones.

La superficie alveolar forma una interfaz biológica vulnerable, ya que está sometida a muchas fuerzas superficiales desestabilizantes y a la exposición continua a partículas, agentes patógenos y toxinas inhaladas presentes en el aire, por lo que sus mecanismos de defensa y la regulación de los mismos son muy importantes, ya que deben proteger al organismo de posibles daños, pero al mismo tiempo debe controlarse la reacción ante agentes inocuos para no generar una respuesta inmune o inflamatoria que comprometa el mantenimiento del delicado mecanismo de intercambio gaseoso llevado a cabo por los pulmones.

El tracto respiratorio parece estar bien equipado para la eficiente eliminación de posibles agentes dañinos y cuenta con diversos componentes para llevar a cabo esta defensa, la cual recae en dos mecanismos: los localizados principalmente en las vías aéreas (tanto superiores como inferiores) que son de tipo mecánico predominantemente y los del espacio alveolar que están mediados por células fagocíticas con capacidad de presentar antígenos que son capaces de regular la respuesta innata y la inmunidad adaptativa (macrófagos y células dendríticas).

La distribución anatómica y funcional de las poblaciones celulares permiten la filtración, limpieza y eliminación de agentes extraños, los cuales pueden ser diversos patógenos, material particulado procedente de la contaminación, alérgenos y antígenos inofensivos (entre otros) presentes en el aire, para lo cual se utilizan diferentes niveles de defensa.

Las vibrisas y las secreciones de las glándulas sebáceas en la primer porción de la cavidad nasal atrapan las partículas más grandes, posteriormente, los cornetes causan turbulencia

en el flujo aéreo, lo que ocasiona la precipitación de las partículas y su adhesión a la pared cubierta de moco producido por las células caliciformes; las partículas atrapadas en esta capa de moco son transportadas a la faringe por medio de movimientos de barrido ciliar y posteriormente son deglutidos o expectorados; lo mismo ocurre con las partículas atrapadas en el moco de los senos paranasales y de la cubierta mucosa de la tráquea y bronquios. Algunos elementos de las partículas inhaladas son solubles, por lo que se pueden eliminar mediante mecanismos de absorción; las moléculas liposolubles cruzan el epitelio respiratorio por transporte pasivo, mientras que las hidrosolubles pueden hacerlo a través de los espacios intercelulares o por transporte activo. Una vez cruzado el epitelio pueden entrar a la circulación sistémica. Los mecanismos de defensa en el tracto respiratorio se encuentran coordinados en relación al tamaño de la vía aérea, por ejemplo, una gruesa capa de moco es efectiva en los conductos grandes, sin embargo, puede resultar contraproducente en los conductos más pequeños ya que los puede obstruir, por lo que en las vías aéreas respiratorias predominan otro tipo de defensas; las células de Clara producen compuestos antimicrobianos y detoxificantes en el área bronquiolar, mientras que en la zona alveolar, los neumocitos tipo II producen diversas proteínas surfactantes (PS), de las cuales la PS-A, entre otras funciones, modula las respuestas inmunitarias contra virus, bacterias y hongos y la PS-D se une a diversos microorganismos (como bacterias gram negativas) y a linfocitos y participa en una respuesta inflamatoria local como consecuencia de una lesión aguda, tanto PS-A como PS-D modulan la respuesta alérgica ante varios antígenos inhalados. La eliminación de la mayor parte de los elementos que alcanzan esta zona recae en los macrófagos alveolares, los cuales barren la superficie para eliminar las partículas inhaladas (aunque también se pueden encontrar en las vías aéreas superiores). Algunos macrófagos distendidos por el material fagocitado ascienden por el moco del tracto respiratorio y son deglutidos o expectorados al llegar a la faringe, mientras que los otros se pueden quedar en el tejido pulmonar y permanecer durante gran parte de la vida de una persona, esto se ve claramente cuando se realizan autopsias de habitantes de grandes ciudades o fumadores los cuales suelen exhibir gran cantidad de macrófagos alveolares y septales repletos de material fagocítico como partículas de carbón o pigmento antracótico. Otro tipo celular importante en la defensa de este sistema son las células dendríticas (CD) las cuales se pueden localizar en todos los compartimientos del pulmón, incluyendo vías aéreas conductoras, parénquima pulmonar y en el intersticio pulmonar (el cual se define como el espacio entre las células del epitelio alveolar y los capilares alveolares) distribuidas en forma de una red de manera que pueden muestrear

los antígenos inhalados y posteriormente migrar a los nódulos linfáticos mediastinales; estas células juegan un rol importante tanto en la determinación de la inducción de tolerancia o inmunidad como en su regulación mediante la unión de una respuesta innata y la inmunidad adaptativa, sin embargo, la respuesta predominante ante la inhalación de elementos extraños es la tolerancia lo cual evita la inflamación de las vías aéreas ante la exposición constante a agentes inocuos. El desequilibrio en este control puede tener graves consecuencias, como el desarrollo de asma alérgico, deficiencias inmunitarias o enfermedades autoinmunes (Pilette, *et. al.*, 2001; Jan de Heer, *et. al.*, 2005; Von Garnier, *et. al.*, 2005; Ross, 2007; Blank, *et. al.*, 2008; Wikstrom y Stumbles, 2007; Fernández y Casa, 2012).

Los macrófagos son la mayor población celular en los alveolos, se encargan principalmente de fagocitar partículas, microorganismos, células apoptóticas y desechos celulares para mantener la homeostasis del tejido, por lo que son la primer línea de defensa. Además se ha observado la capacidad de presentar antígenos de esta población alveolar, esto se apoya en la observación de su capacidad de presentar similitudes con las CD, como la alta expresión de MHCII y la expresión de la integrina CD11c característica de CD, y que no es expresada generalmente por macrófagos de otros tejidos, se hipotetiza también que las células presentadoras de antígenos (CPAs) no migratorias como los macrófagos pueden presentar antígenos y activar ciertas poblaciones de células T, como las de memoria, dentro del parénquima pulmonar; aunado a esto se ha observado su migración a tejidos linfoides cercanos (Von Garnier, *et. al.*, 2005; Wikstrom y Stumbles, 2007; Kugathasan, *et. al.*, 2008; Poole, *et. al.*, 2012; Hoffmann, *et. al.*, 2016; Iwasaki, *et. al.*, 2016).

Las células dendríticas son CPAs indiscutibles, hay mucha evidencia que apoya el papel de las CD pulmonares en el transporte de antígenos a los nódulos linfáticos secundarios y su papel en la activación de células T *naïves*. En condiciones normales las poblaciones de CD comprenden una pequeña porción de las células alveolares, sin embargo, se expanden considerablemente tras una respuesta inmune, principalmente del tipo Th2; en enfermedades como el asma se da este tipo de respuesta mediada por linfocitos CD4 Th2 efectores que reaccionan ante alérgenos inocuos inhalados. Se ha observado tanto en humanos, ratas y ratones que las CD intersticiales son predominantemente CD11c+, estas capturan antígenos aéreos y los pueden retener por tiempo prolongado, manteniendo la capacidad de activar células T específicas aun cuando ha transcurrido mucho tiempo de la

exposición. (Jan de Heer, *et. al.*, 2005; Von Garnier, *et. al.*, 2005; Wikstrom y Stumbles, 2007; Kugathasan, *et. al.*, 2008).

El pulmón es uno de los órganos más comprometidos del cuerpo ya que se ve expuesto al ambiente externo con cada respiración; la velocidad y eficiencia en la defensa y funcionamiento del tracto respiratorio se pueden ver alterados por diversos factores tanto internos (enfermedades pulmonares, envejecimiento u obesidad) como externos (contaminación aérea por material particulado), y son células como los macrófagos y células dendríticas las que juegan un rol crítico en la defensa contra los retos ambientales, regulando el reclutamiento de otras células del sistema inmune y la intensidad de la respuesta mediante la liberación de diversos mediadores. Las CPAs y su ubicación en el tracto respiratorio se representan en la Figura 8. (Von Garnier, *et. al.*, 2005; Poole, *et. al.*, 2012; Iwasaki, *et. al.*, 2016).

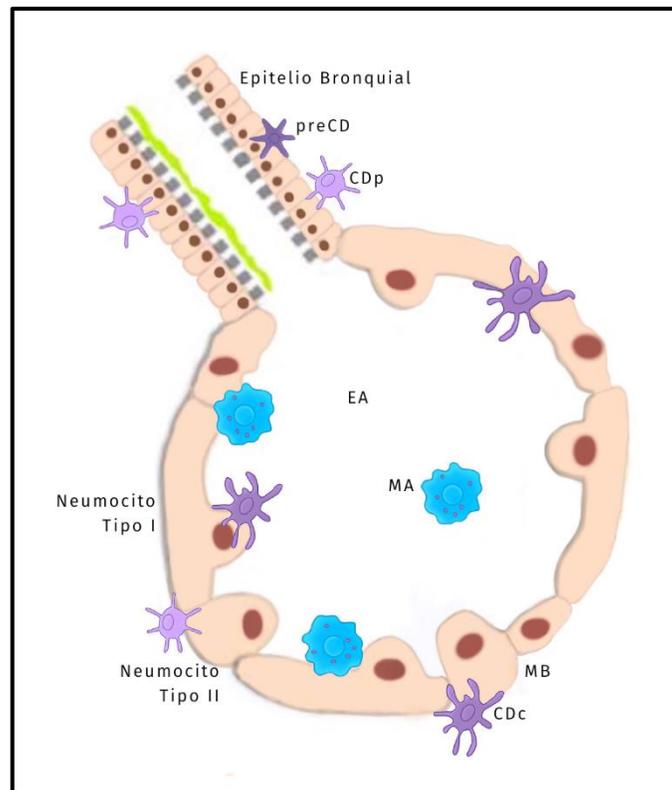


Figura 8. CPAs alveolares. Los Macrófagos alveolares (MA) son la principal población de células residentes en los alveolos y se ubican principalmente en los espacios alveolares (EA). De CD podemos encontrar dos poblaciones principalmente, las CDp y las CDc, se puede encontrar algunas CD en el EA, sin embargo, comúnmente se ubican en la membrana basal (MB) del epitelio alveolar. Modificado de Voss Condon, 2011

MACRÓFAGOS

Los macrófagos son células fagocíticas que tienen funciones importantes en la homeostasis y respuesta innata; se encargan de eliminar bacterias, cuerpos extraños, desechos celulares y células muertas o senescentes, de dirigir la reparación tisular, de reclutar monocitos, macrófagos o neutrófilos y también se ha observado su rol en la presentación de antígenos, regulando así la inflamación y la respuesta inmunitaria. Se ha observado que durante el desarrollo embrionario los macrófagos contribuyen en el correcto desarrollo vascular al actuar como células chaperonas endoteliales, promoviendo la fusión de los extremos de células endoteliales (Kadowaki, *et. al.*, 2012; Epelman, *et. al.*, 2014).

Los macrófagos se pueden encontrar distribuidos por todo el cuerpo de los mamíferos, ocupan nichos anatómicos precisos en los órganos y las membranas serosas que los rodean, especialmente cerca de la vasculatura y el epitelio y presentan funciones altamente específicas dependiendo de su ubicación anatómica y reciben diferentes nombres basados en su localización como: macrófagos alveolares o células del polvo en el pulmón, osteoclastos en hueso, histiocitos en tejido conectivo intersticial, células de Kupffer en el hígado, microglía en cerebro, células mesangiales en los riñones y macrófagos de la pulpa

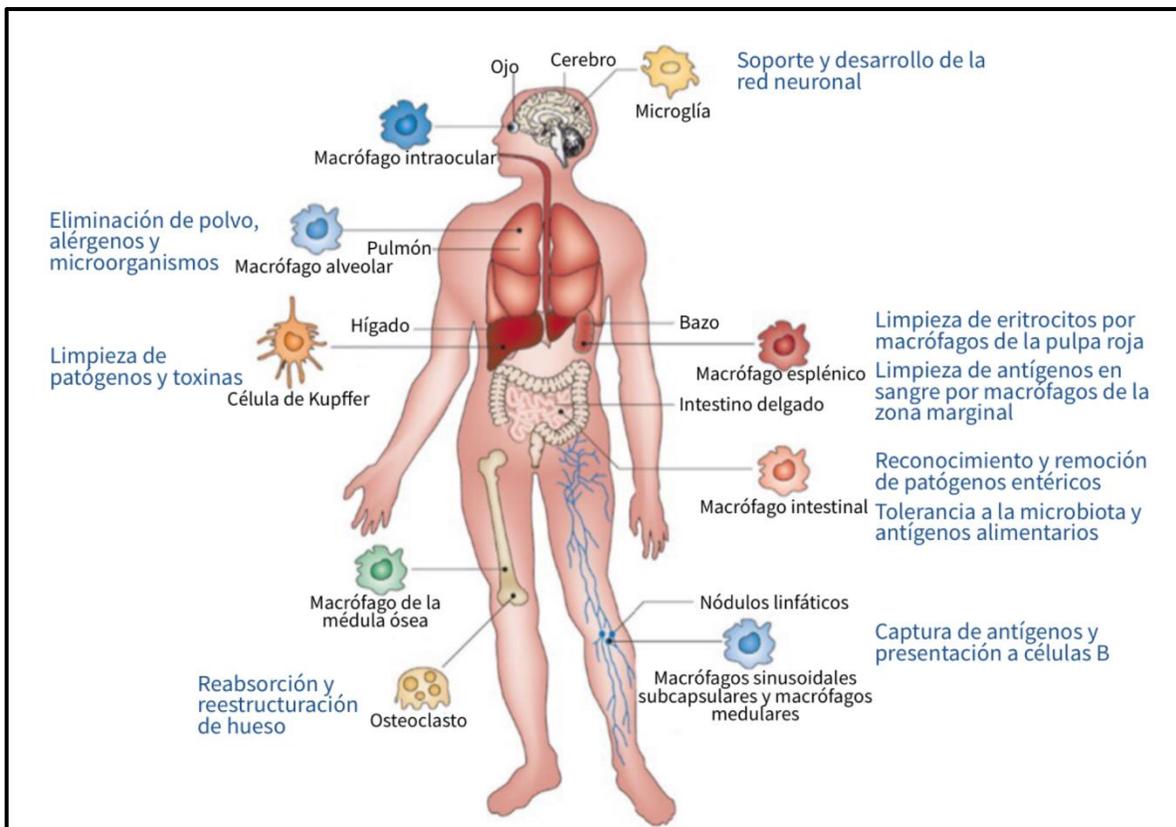


Figura 9. Ejemplos de macrófagos residentes de tejidos y sus funciones. Modificada de Kierdorf, 2015.

roja en bazo; aunque difieren en su morfología y tienen diversas capacidades funcionales y características transcripcionales, todas son células con una plasticidad importante, la cual les permite responder eficientemente ante varias señales y cambiar su fenotipo, por lo que todos son esenciales en la mediación de la inflamación, reparación de tejidos, homeostasis e inmunidad (Los diversos tipos de macrófagos residentes de tejidos y su función se describen de manera breve en la Figura 9) (Kadowaki, *et. al.*, 2012; Kierdorf, *et. al.*, 2015; Schultze, *et. al.*, 2015; Castañeda, *et. al.*, 2017; He, *et. al.*, 2017; Ross, 2017).

Los macrófagos pueden reconocer patógenos asociados a moléculas y células apoptóticas o infectadas asociadas a ligandos endógenos por medio de receptores de patrones de reconocimiento, esto induce la activación de los macrófagos, la cual lleva a un cambio en la morfología celular que les permite fagocitar a los patógenos, desechos o partículas y degradarlos mediante su unión a fagosomas y la subsecuente resolución del daño. Esta activación suele ser acompañada por la liberación de quimiocinas que reclutan más macrófagos al sitio comprometido, además liberan también citocinas que intervienen en la activación del complemento, la producción de procoagulantes, lisis celular y para activar o reprimir la respuesta inmune. Los macrófagos pueden ser clasificados de acuerdo a su vía de activación: clásica (M1) o alternativa (M2) (Haniffa, *et. al.*, 2015; Castañeda, *et. al.*, 2017; He, *et. al.*, 2017).

Los M1, o macrófagos clásicamente activados, se caracterizan por su capacidad proinflamatoria y antitumoral; son activados por productos de una respuesta Th1, como IFN γ e IL-1 β o productos bacterianos como lipopolisacáridos, estos macrófagos expresan altos niveles de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-12, IL-23, así como óxido nítrico sintasa y MHC. En contraste, los M2 o macrófagos alternativamente activados son antiinflamatorios e incluso se han relacionado con macrófagos asociados a tumores (MAT) tras su polarización; son activados por citocinas Th2 como IL-4 o IL-13 y estímulos inmunoregulatorios como TGF β o la citocina antiinflamatoria IL-10, a su vez, estos expresan altos niveles de IL-10 y arginasa y muy poca IL-12 y MHCII. Por otro lado, la polarización de M2 a MAT se asocia con productos metabólicos derivados de células tumorales, como el factor estimulante de colonias (CSF-1), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), diversas citocinas (IL-6, IL-10, IL-13, TGF β) y el microambiente tumoral hipóxico, los MAT se caracterizan por promover en el tumor procesos como la angiogénesis, remodelamiento tisular y de matriz, inflamación, evasión inmune y la invasión, progresión y metástasis tumoral (Allavena, *et. al.*, 2008; Sica, *et. al.*, 2008; Grivennikov, *et. al.*, 2010; Allavena y

Mantovani, 2011; Kadowaki, *et. al.*, 2012; Marelli, *et. al.*, 2015; Xing, *et. al.*, 2015; He, *et. al.*, 2017).

Sin embargo los diversos macrófagos y sus estados de activación no son tipos celulares distintos, por el contrario, son los extremos de un continuo de características fenotípicas las cuales son definidas por un perfil de expresión génica dictado por señales específicas del microambiente en el que se desarrollan y que modulan sus características y no por vías de diferenciación determinísticas; son células con gran plasticidad (Grivennikov, *et. al.*, 2010; Marelli, *et. al.*, 2015; Xing, *et. al.*, 2015).

El papel de los macrófagos residentes de tejidos es amplio, durante la homeostasis éstos se encuentran activamente involucrados en el mantenimiento de la integridad del tejido a través de la remoción de células muertas o desechos, la regeneración tisular y en procesos fisiológicos como la angiogénesis; tras señales de daño en el tejido sus números aumentan significativamente por medio del reclutamiento y extravasación de monocitos que posteriormente maduran en el tejido, se ha observado también que muchas poblaciones de macrófagos residentes de tejido pueden proliferar localmente (Aggarwal, *et. al.*, 2014; Schultze, *et. al.*, 2015).

Recientemente se ha estudiado y propuesto que los macrófagos alveolares (así como las diversas poblaciones de macrófagos residentes de tejidos) se desarrollan a partir de monocitos fetales provenientes del saco vitelino o bien, del hígado fetal que colonizan el pulmón pocos días después del nacimiento; se ha observado también que la contribución de monocitos circulantes durante la vida del organismo a esta población es mínima, ya que los macrófagos alveolares se renuevan a sí mismos, otra característica distintiva de los macrófagos alveolares es que expresan la integrina de superficie CD11c, a diferencia de muchas poblaciones de macrófagos que no lo hacen. Estos macrófagos residen en la luz alveolar por lo que, a diferencia de las demás poblaciones de macrófagos, se encuentran en constante exposición al ambiente externo y los posibles riesgos que esto conlleva (Aggarwal, *et. al.*, 2014; Epelman, *et. al.*, 2014; Kierdorf, *et. al.*, 2015; Gibbings, 2017; Iwasaki, *et. al.*, 2016; Hoffmann, *et. al.*, 2016).

Durante la homeostasis, los macrófagos alveolares se encargan de fagocitar polvo, alérgenos, microorganismos y células senescentes, entre otras tareas tróficas; para realizar esta función, expresan altos niveles de receptores de patrones moleculares asociados a patógenos y de patrones moleculares asociados a peligro que les permiten censar el

potencial daño y definir un perfil de activación antiinflamatorio ante estímulos constantes y/o de bajo nivel, o bien, desencadenar una respuesta rápida y robusta proinflamatoria para limpiar las vías aéreas y propagar la respuesta innata mediante la secreción de quimiocinas que reclutan monocitos y neutrófilos necesarios para la limpieza. Cuando se da una respuesta inflamatoria incontrolada ante un agente inocuo o un estímulo persistente, o en ausencia de vías antiinflamatorias intrínsecas los macrófagos alveolares M1 pueden inducir daño en el tejido por la gran cantidad de especies tóxicas como óxido nítrico o las metaloproteinasas de matriz producidas, además de la gran cantidad de neutrófilos reclutados; la desregulación de la función e infiltración de macrófagos se ha caracterizado en casi todas las condiciones de inflamación crónica como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y crecimiento y metástasis de tumores malignos, obesidad, arteriosclerosis, enfermedades autoinmunes e infecciones crónicas (Aggarwal, *et. al.*, 2014; Epelman, *et. al.*, 2014; Schultze, *et. al.*, 2015; He, *et. al.*, 2017).

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas CD son un linaje celular inmune especializado en la presentación de antígenos, conocido por su habilidad migratoria y su potente capacidad de estimular linfocitos T e iniciar la respuesta inmune adaptativa, aunque también puede inducir respuestas tolerogénicas ante antígenos inocuos (Pribila, *et. al.*, 2003; Murphy, *et. al.*, 2009; Chung, *et. al.*, 2013; Rescigno, 2015; Schraml y Souza, 2015).

Las CD fueron descritas por primera vez por Paul Langerhans, sin embargo, fueron Steinman y Cohn quienes describieron sus funciones en el bazo de ratón y las distinguieron de los macrófagos por su morfología estelar y reciben su nombre por sus prolongaciones de membrana que se parecen a las dendritas de las neuronas (Valladeau y Saeland, 2005; Lewis y Reizis, 2012; Schraml y Sousa, 2015).

Se puede localizar a las CD como residentes de los órganos linfoides y como CD migratorias presentes en todos los órganos, principalmente en las interfases entre el medio interno y el medio externo como las superficies mucosas y piel, donde actúan como centinelas censando la presencia de patógenos a través de receptores especializados en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microbios; la unión de estos receptores con su ligando induce la activación de las CD, donde fagocita y procesa el antígeno, y para poder ser reconocida como célula presentadora de antígenos (CPAs)

potente atraviesa procesos de migración desde el sitio de infección (generalmente un órgano no linfoide) al órgano linfoide más cercano, y de maduración en el que se regula la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (mediante las cuales se da el reconocimiento del antígeno correspondiente para el linfocito T) y la liberación de moléculas coestimuladoras necesarias para la correcta activación de los linfocitos T *naïves*; la probabilidad de que una célula T *naïve* sea específica para un determinado antígeno es de 1 en 10⁵ aproximadamente y el desarrollo adecuado de la respuesta inmune adaptativa depende de la activación y expansión de estas células. Las CD también están implicadas en la prevención de la autoinmunidad mediante la inducción de apoptosis de linfocitos T autoreactivos en timo (tolerancia central) y por la inducción de anergia, deleción o tolerancia en la periferia a través de la cooperación con Treg (tolerancia periférica) (Blank, *et. al.*, 2008; Murphy, *et. al.*, 2009; Chung, *et. al.*, 2013; Rescigno, 2015; Schlitzer, *et. al.*, 2015; Schraml y Souza, 2015).

Las CD se han agrupado como una población con base en su morfología característica con dendritas y la expresión de grandes cantidades de moléculas específicas como el MHCII y la integrina CD11c, sin embargo, existen diversas subpoblaciones con características fenotípicas y funcionales distintas denominadas de la siguiente manera: células de Langerhans (CL), CD convencionales (CDc), CD plasmacitoides (CDp) y CD derivadas de monocitos (CDmo); recientemente, Guilliams y colaboradores en el 2014 propusieron la clasificación de las CDc en CDc1 y CDc2 (Pribila, *et. al.*, 2003; Wu y Dakic, 2004; Lewis y Reizis, 2012; Guilliams, *et. al.*, 2014; Haniffa, *et. al.*, 2015; Perié y Naik 2015; Schlitzer, *et. al.*, 2015; Schraml y Souza, 2015).

CÉLULAS DE LANGERHANS

Las CL juegan un papel crucial en la iniciación de las respuestas inmunes ante antígenos cutáneos. Esta población fue descrita en 1868 por Paul Langerhans cuando aplicó sales de oro en muestras de piel y reveló una red celular sorprendentemente organizada, pero fue hasta 1970 que se describieron las CD que se caracterizaron como células especializadas en la presentación de antígenos (Lucas y MacPherson, 2002; Wu y Dakic, 2004; Valladeau y Saeland, 2005; Lewis y Reizis, 2012).

Las CL migran a los nódulos linfáticos continuamente, incluso en condiciones normales, por lo que para mantener su red deben ser reestablecidas; en principio esto podría lograrse mediante la migración de células precursoras, sin embargo, se ha observado que las CL

son remplazadas a partir de precursores locales, muy probablemente a través de una constante, pero baja proliferación, mientras que durante procesos inflamatorios se da principalmente a través de precursores sanguíneos derivados de la médula ósea (Merad, *et. al.*, 2002; Lucas y MacPherson, 2002; Villadangos y Heath, 2005; Doebel, 2017).

Se ha observado que las CL, al igual que los macrófagos residentes de tejidos, surgen a partir de precursores embrionarios que se mantienen dentro de la epidermis a través de la proliferación local, por lo que actualmente se propone su clasificación como macrófagos (Doebel, *et. al.*, 2017)

CD CONVENCIONALES

a) CDc1

Las CDc1 expresan CD8 en órganos linfoides y CD103 en órganos periféricos y en la fracción migratoria de los órganos linfoides. Son células que presentan TLRs 3, 4, 11 y 13, los cuales les permiten censar una gran variedad de patrones moleculares; son las únicas que presentan TLR3, el cual reconoce dsRNA viral. Esta población es muy eficiente para inducir respuestas efectoras Th1 o inflamatorias potentes mediante la presentación de antígenos virales a través del MHC I a linfocitos TCD8 citotóxicos. Además se ha observado que las CD103 tienen un papel importante en la presentación de antígenos de material apoptótico a células TCD8 en sitios periféricos donde inducen tolerancia para prevenir la autoinmunidad (Guilliams, *et. al.*, 2014; Perié y Naik 2015; Schlitzer, *et. al.*, 2015).

b) CDc2

Las CDc2 coexpresan CD4 y CD11b en el bazo y CD24 y CD11b en órganos linfoides. Esta población celular se caracteriza por su alta expresión de IRF4 y TLRs 5, 6, 7, 9 y 13, ampliando el rango de patrones moleculares que reconocen las CD. Estas células se han especializado en la inducción de respuestas del tipo Th17 y Th2 mediante la presentación de antígenos a través de la vía clásica del MHCII de patógenos extracelulares durante infecciones bacterianas o micóticas. Los altos niveles de IRF4 expresado por las CD11b, tanto en pulmón como en la lámina propia intestinal favorecen la regulación primaria de la homeostasis Treg/Th17 altamente relacionada al mantenimiento del microambiente inmunológico en estos sitios de barrera (Guilliams, *et. al.*, 2014; Perié y Naik, 2015; Schlitzer, *et. al.*, 2015).

CD PLASMACITOIDES

Las CDp son morfológicamente muy parecidas a las células B plasmáticas, pero pueden asumir una apariencia dendrítica tras su activación; se reclutan rápidamente al tejido durante procesos inflamatorios y se caracterizan por su capacidad de secretar grandes cantidades de interferón de tipo 1 (INF- α/β) en respuestas víricas; expresan altos niveles de TLR 7 y 9 para el reconocimiento de ácidos nucleicos víricos y propios y expresan en cantidades muy bajas la integrina CD11c. Esta población es capaz de polarizar la diferenciación de linfocitos TCD4 a Th1 o Th2. La desregulación de las CDp se ha observado en enfermedades autoinmunes ligadas a la pérdida de tolerancia (Wu y Dakic, 2004; Barchet, *et. al.*, 2005; Kim, *et. al.*, 2010; Guilliams, *et. al.*, 2014; Haniffa, *et. al.*, 2015).

CD DERIVADAS DE MONOCITOS

Aunque el desarrollo temprano de sus precursores hematopoyéticos no es del todo claro, se sabe que las CD se originan a partir de progenitores tanto de origen linfoide como mieloide, estudios en modelos de rata indican que las redes de CD pulmonares no se desarrollan en el nacimiento, sino que la población del tracto respiratorio se va incrementando lentamente durante las primeras semanas de vida (Holt, 2000; Blank, *et. al.*, 2008).

Durante su diferenciación las CD comparten algunas características fenotípicas de monocitos y macrófagos, como la expresión de receptores Fc y la habilidad fagocítica, atributos que pierde cuando se diferencia completamente (Schneeberger, *et. al.*, 2000).

En pulmón y tejidos periféricos, principalmente en lugares susceptibles a la invasión de patógenos (interfases ambientales como el pulmón o intestino) residen CD inmaduras, las cuales se encuentran constantemente ingiriendo antígenos extraños que han logrado cruzar las barreras epiteliales, éstos antígenos son procesados y expresados en la superficie celular asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), esto inicia su transición de célula captadora de antígenos a célula presentadora de antígenos (CPA) y posteriormente, madura; las CD maduras inician su migración por medio de los vasos linfáticos a partir del tejido en el que se encuentran hacia el órgano linfoide periférico más cercano que es donde realizan la presentación de antígeno a las células T *naïve*; este proceso va acompañado del aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras, así como de citocinas cruciales para la diferenciación de las células T. Como la exposición a agentes extraños en órganos como el pulmón es constante, la reposición de CD es rápida,

por lo que se necesita una continua liberación de precursores de CD. A lo largo del tracto respiratorio se pueden encontrar CD en las vías aéreas conductoras y en el parénquima pulmonar, dentro de la pleura y las paredes alveolares y algunas cuantas en la luz alveolar. (Schneeberger, *et. al.*, 2000; Pedroza-González, *et. al.*, 2004; Wu y Dakic, 2004; Hume, 2008; Bérubé, *et. al.*, 2010; Lewis y Reizis, 2012; Chung, *et. al.*, 2013).

CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO

La respuesta inmune adaptativa se inicia en los tejidos linfoides secundarios, sin embargo, la mayoría de los patógenos se encuentran inicialmente en tejidos periféricos, por lo que los antígenos necesitan ser transportados a los nódulos linfáticos para llevar a cabo la presentación de antígenos. Este mecanismo es esencial para desencadenar una respuesta inmune ante un agente dañino y para establecer mecanismos de tolerancia para agentes inoocuos, dichas tareas son llevadas a cabo por las células presentadoras de antígeno (CPA), en esta familia encontramos a las CD y a los macrófagos (Lucas y MacPherson, 2002; Rescigno, 2015).

Las CD, macrófagos y monocitos son células funcionalmente especializadas que forman parte del sistema fagocítico mononuclear, el cual fue establecido en 1982 por Ilya Metchnikoff, quien fue el primero en comprender la capacidad de los fagocitos y demostrar que su importancia va más allá de la habilidad de fagocitar a un microorganismo extraño para eliminarlo intracelularmente, sino que también es un mecanismo que permite iniciar y regular las respuestas inmunes adaptativas a través del procesamiento y presentación de antígenos de los microorganismos fagocitados (Kugathasan, *et. al.*, 2008; Guilliams, *et. al.*, 2014; Haniffa, *et. al.*, 2015; Rescigno, 2015).

Se ha agrupado a los monocitos con las CD y macrófagos ya que han sido considerados como los precursores definitivos de los macrófagos y las CD; esto fue demostrado por primera vez con los experimentos de Ebert y Florey en 1939, quienes usando la cámara de la oreja de conejo mostraron que los monocitos sanguíneos en mamíferos migraban activamente a la herida y se diferenciaban en macrófagos *in vivo*; los monocitos son células leucocíticas que presentan el núcleo en forma arriñonada o con lóbulos, tras producirse en la médula ósea y migran a los tejidos a través del torrente sanguíneo. Los macrófagos a su vez se distinguen por ser células vacuolares grandes que son excelentes en la limpieza de células apoptóticas, restos celulares y patógenos, mientras que las CD son células con

morfología estelar que realizan la presentación de antígenos de manera eficiente y activan células T. Estas poblaciones celulares se encuentran en casi todos los tejidos, incluyendo la sangre periférica; los macrófagos se encuentran como residentes en los tejidos, mientras que las CD tienen capacidad migratoria, sin embargo, juegan un rol de vital importancia en las mucosas del organismo como pulmones o intestino, ya que es en estos órganos donde ocurre la mayoría de los encuentros con microorganismos potencialmente dañinos. En la figura 10 se muestra de manera simplificada un esquema del desarrollo de las CPAs (Wu y Liu, 2007; Murphy, *et. al.*, 2009; Kugathasan, *et. al.*, 2008; Haniffa, *et. al.*, 2015; Hoffman, *et. al.*, 2016; Rescigno, 2015; Famili, *et. al.*, 2017).

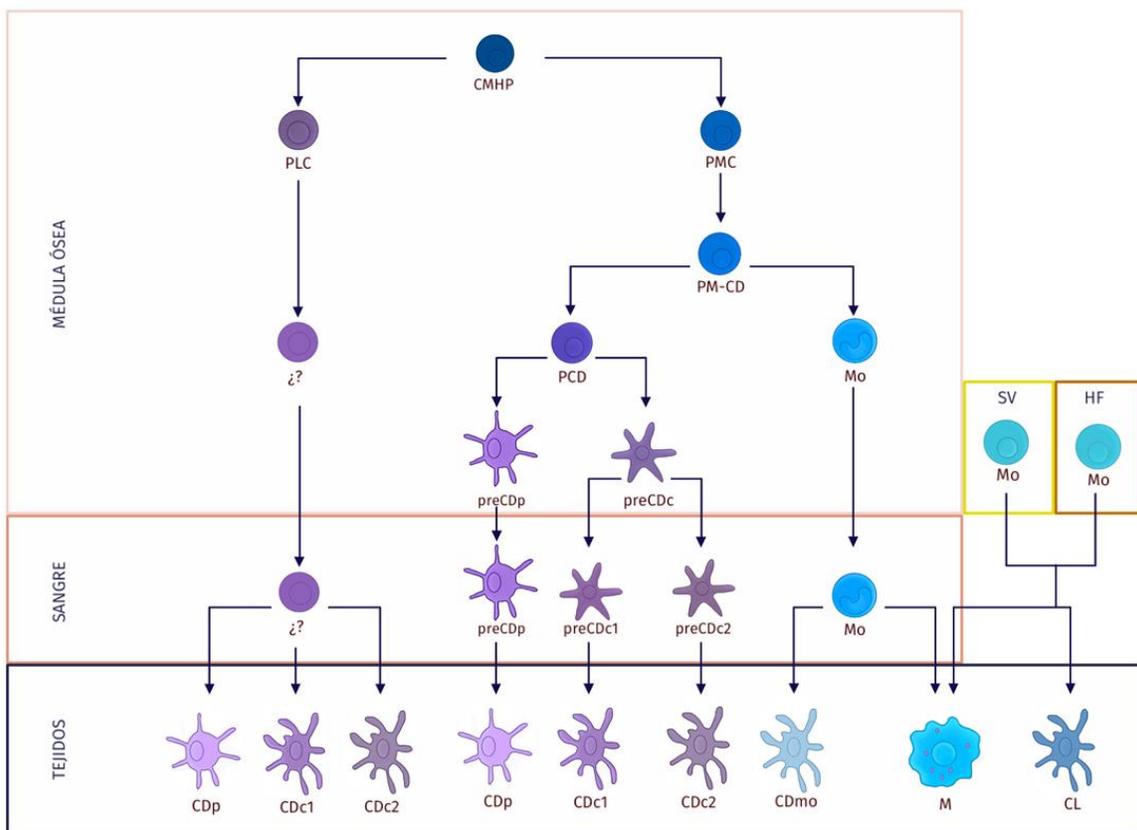


Figura 10. Desarrollo de las CPAs. Todas las poblaciones de CPAs se originan a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales (CMHP) presentes en la médula ósea, las cuales se diferencian en dos linajes: el progenitor linfóide común (PLC) y el progenitor mieloide común (PMC). El PLC da lugar tanto a CDp (CD plasmacitoides) como a las diferentes poblaciones CDc (CD convencional): CDc1 y CDc2. Por otra parte, el PMC se diferencia en el progenitor de monocitos y CD (PM-CD), del cual a su vez surgen el progenitor de CD (PCD) y los monocitos. El PCD genera precursores tanto para CDp como para CDc (preCDp y preCDc) y posteriormente, al llegar al tejido, maduran hacia pCD, CDc1 y CDc2. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo y entran a los tejidos donde se diferencian tanto en macrófagos como en CD, dependiendo del microambiente al que se ven sometidos. Se ha observado que la población de macrófagos alveolares, así como de otros macrófagos residentes de tejidos y de células de Langerhans (CL) derivan de progenitores provenientes del saco vitelino (SV) y del hígado fetal (HF), los cuales colonizan los tejidos a los pocos días del nacimiento, estas poblaciones son mantenidas mediante la auto renovación durante condiciones normales. Elaboración propia.

A pesar de que tanto CD como macrófagos son CPAs realizan virtualmente las mismas funciones, no las llevan a cabo de la misma manera. La capacidad fagocítica de las CD inmaduras es menor a la de los macrófagos, y pierden esta función tras su maduración, además, ya que su principal función es la presentación de antígenos, su capacidad de acidificación y degradación fagosomal son menores, permitiéndoles preservar la información derivada del patógeno, a diferencia de los macrófagos que son células fagocíticas profesionales con alta capacidad de internalizar y eliminar microorganismos siendo la primer línea de defensa del sistema respiratorio. En contraste, las células presentadoras de antígeno por excelencia son las CD, ya que pueden activar a las células T indiferenciadas por medio de la secreción de moléculas coestimuladoras, mientras que los macrófagos generalmente activan células T de memoria que han sido reclutadas al sitio del daño; en el área del epitelio pulmonar se ha sugerido que los macrófagos realizan una transferencia de antígenos a las CD, haciendo más eficiente el procesamiento y presentación de éstos; lo anterior sugiere que los macrófagos y las CD presentes en el tracto respiratorio colaboran de manera cercana como centinelas contra los antígenos inhalados, también se ha demostrado la influencia supresora de los macrófagos alveolares sobre las CD para evitar la exacerbación de respuestas inflamatorias dañinas en el pulmón frente a antígenos inocuos mediante la limpieza de los antígenos del espacio alveolar (Tsirogianni, 2006, Blank, *et. al.*, 2008; Kadowaki, *et. al.*, 2012; Hoffmann, *et. al.*, 2016; Jawhara, *et. al.*, 2016; Lukácsi, 2017).

Las CPAs pulmonares comparten la expresión de la integrina de superficie CD11c. Esta integrina se utiliza generalmente para definir fenotípicamente las poblaciones de CD ya que la expresan en altos niveles, sin embargo, los macrófagos alveolares (a diferencia de muchas otras poblaciones de macrófagos residentes de tejidos) también la expresan (Wu y Dakic, 2004; Aggarwal, *et. al.*, 2014; Rescigno, 2015).

Es sabido que la activación de células inmunes, especialmente las CPAs, como macrófagos o CD, pueden ayudar en la resolución tanto como exacerbar diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, por lo que la correcta activación y regulación de su actividad son de vital importancia (Kadowaki, *et. al.*, 2012).

CD11c

El CD11c fue el primer marcador identificado para CD. Es la subunidad α de la integrina $\alpha\beta$ 2, cuyo ligando natural es el fragmento iC3b del complemento; se une también al fibrinógeno e ICAM-1, facilitando su adhesión celular y migración. La CD11c también puede mediar la fagocitosis de partículas inactivadas del complemento C3b opsonizadas. Se han descrito como ligandos para CD11c componentes de la pared celular bacteriana (LPS), proteínas del complemento, proteínas de la matriz, moléculas de adhesión y proteínas desnaturalizadas que podrían estar actuando como señales de peligro. La integrina $\alpha\beta$ 2 está involucrada en la eliminación de muchos patógenos bacterianos y micóticos a cargo de los macrófagos (Pribila, *et. al.*, 2003; Sadhu, *et. al.*, 2007; Singh-Jasuja, *et. al.*, 2012; Kamphuis, 2016; Qualai, *et. al.*, 2016; Jawhara, *et. al.*, 2016; Luckasi, 2017).

Las CPAs CD11c+ pueden diferir tanto en función como en ontogenia, ya que se pueden diferenciar tanto de precursores de CD como de monocitos, siendo miembros de esta familia los macrófagos y CD, aunque a diferencia de las demás CD, las CDp se caracterizan por una expresión disminuida de esta integrina (Jan de Heer, *et. al.*, 2005; Haniffa, *et. al.*, 2015; Rescigno, 2015).

JUSTIFICACIÓN

El Vanadio es un contaminante ambiental producto de la actividad industrial y la quema de combustibles fósiles que es liberado principalmente como V_2O_5 , su forma más tóxica por lo que las concentraciones atmosféricas de este metal han aumentado en la ZMVM en las últimas décadas, y ya que entra de forma inhalada al sistema respiratorio y se deposita directamente en los pulmones puede comprometer la respuesta inmune. Resultados previos del grupo muestran que el número y la expresión del marcador CD11c+ en CD tímicas se encuentra disminuido en ratones expuestos a la inhalación de V; con base en lo anterior, nos preguntamos si el V también afectará a las CPA CD11c+ de pulmón.

HIPÓTESIS

Si la inhalación de V produce disminución en el número de CD tímicas, que son CPAs, así como disminución en la expresión del marcador CD11c, entonces la inhalación de V también afectará a las CPAs de pulmón.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la exposición a V_2O_5 en las células presentadoras de antígeno (CPAs) CD11c+ de pulmón de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar a las CPAs mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-CD11c.
- Cuantificar a las CPAs CD11c+ presentes en pulmón de ratones expuestos a V_2O_5 .
- Identificar cambios en la expresión del CD11c mediante densitometría tras la exposición a V_2O_5 .
- Identificar diferencias en el número de CPAs CD11c+ en el pulmón de ratones expuestos a V_2O_5 en 4 semanas.
- Identificar diferencias en la expresión del CD11c+ en las CPAs de pulmón de ratones expuestos a V_2O_5 durante 4 semanas

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo biológico

El modelo empleado en la presente investigación ha sido ampliamente estudiado en relación a la exposición a V_2O_5 . Se utilizaron 40 ratones macho de la cepa CD1, de aproximadamente 8 semanas de edad y de entre 30 y 35 g de peso, alimentados con Purina rat chow y agua *ad libitum* y en condiciones de luz-oscuridad (12:12h).

Los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

- Semana 0 o control (S0): 20 ratones que inhalan solamente vehículo (solución salina 0.9%). 5 organismos por semana, 1 hora, dos veces por semana, durante 4 semanas.
- Semana 1 (S1): 5 ratones que inhalan $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de pentóxido de vanadio (V_2O_5) [0.2M], 1 hora, 2 veces por semana durante 1 semana.
- Semana 2 (S2); 5 ratones que inhalan $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de pentóxido de vanadio (V_2O_5) [0.2M], 1 hora, dos veces por semana durante 2 semanas.
- Semana 3 (S3): 5 ratones que inhalan $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de pentóxido de vanadio (V_2O_5) [0.2M], 1 hora, dos veces por semana durante 3 semanas.
- Semana 4 (S4): 5 ratones que inhalan $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de pentóxido de vanadio (V_2O_5) [0.2M], 1 hora, dos veces por semana durante 4 semanas.

Protocolo de Inhalación

Ávila-Costa en el 2005 propuso un modelo con la concentración mínima de V_2O_5 que produce cambios observables en microscopio óptico (0.02M), así como la frecuencia de las exposiciones con base en la vida media del V (48 horas). Bajo el mismo modelo de exposición, en el 2002, Fortoul *et. al.* calculó el volumen de V_2O_5 en la cámara, siendo éste de $1.4\text{ mg } V_2O_5/\text{m}^3$. En el presente trabajo de investigación se siguió el mismo protocolo para las exposiciones.

Los ratones experimentales fueron expuestos a la inhalación de $1.4\text{mg}/\text{m}^3$ de pentóxido de vanadio (V_2O_5 , pureza 99.99%, Sigma, St. Louis, MO) suspendido en solución salina 0.9% a una concentración de 0.2M. El grupo control fue expuesto a solución salina 0.9%.

La exposición se realizó en una cámara 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 (Figura 11). Lo anterior durante 1 hora, 2 veces por semana, por un periodo de 4 semanas; al final de cada semana se sacrificaron 5 ratones expuestos y 5 ratones control.



Figura 11. Cámara de acrílico y nebulizador empleados para las exposiciones

Sacrificio y disección pulmonar

Al finalizar el periodo de exposición, los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal con Pisabental (pentobarbital sódico) y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con solución salina (0.9%) para el lavado de los órganos y posteriormente con paraformaldehído a temperatura ambiente al 4% para su fijación.

La perfusión es una técnica en la cual se introduce una solución fijadora a través del sistema circulatorio y gracias a la red de capilares ésta puede llegar a todos los tejidos del organismo, permitiendo la fijación de un animal completo. Antes de introducir el fijador en el sistema es necesario eliminar la sangre con una solución de lavado para evitar la formación de trombos tras la interacción del fijador con la sangre (Figura 12).

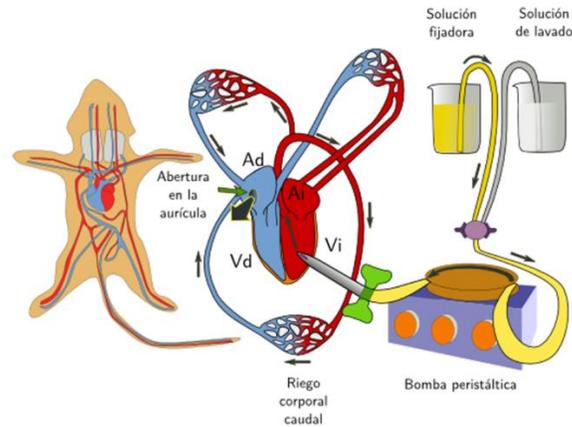


Figura 12. Fijación por perfusión. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente para permitir a las soluciones entrar a través del ventrículo izquierdo (Vi) y pasar a la aorta, desde la cual se distribuyen por todo el cuerpo. Después de pasar por la red capilar, pasan a los vasos venosos que terminan en la aurícula derecha (Ad) en la cual se hace una abertura para permitir la salida de las soluciones. Modificado de Universidad de Vigo, España, 2016.

Se realizó de la siguiente manera:

- Inyección intraperitoneal de 1.5 unidades de Pisabental por ratón.
Esperar a que el ratón se encuentre totalmente sedado.
- Fijar el ratón a un soporte que sostenga todas sus extremidades.
- Hacer una incisión de la piel para exponer la caja torácica.
- Realizar dos incisiones a la parrilla costal en las líneas axilares anteriores y levantar la parrilla costal.
- Exponer el corazón .
- Realizar un pequeño corte en la aurícula derecha del corazón para permitir el drenaje de la sangre y posteriormente de la solución salina y el fijador.
- Introducir la cánula conectada a la bomba peristáltica en el ventrículo izquierdo, la cual debe estar previamente preparada para evitar la presencia de burbujas.
- Permitir el flujo de solución salina (0.9%) hasta que, a su salida por la aurícula derecha, ésta sea transparente de nuevo.
- Cambiar el flujo de solución salina por el de paraformaldehído (4%).
Interrumpirlo pasados 30 minutos.

Se extrajeron los pulmones y el pulmón izquierdo se colocó en paraformaldehído; posteriormente se sometió a un gradiente de sacarosa del 10%, 20% y 30% para realizar cortes por congelación. Aunque sólo se utilizó el pulmón izquierdo para realizar el análisis

del presente trabajo, también se extrajeron y fijaron otros órganos (como el pulmón derecho, hígado, riñón e intestino) para su análisis en otros proyectos.

El proceso de extracción se realizó de la siguiente manera:

- Realizar un corte en la tráquea e introducir una cánula plástica.
- Fijar los pulmones vía intratraqueal con paraformaldehído (4%), insuflando a su capacidad total.
- Asegurar la tráquea con un hilo para evitar la salida del fijador.
- Colocarlos en paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, por 24 h a -4°C.
- Cambiarlos a una solución de sacarosa 10% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 a -4°C. Dejar por 24 horas.
- Cambiarlos a una solución de sacarosa 20% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 a -4°C. Dejar por 24 horas.
- Cambiarlos a una solución de sacarosa 30% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 a -4°C. Dejar por 24 horas.
- Realizar cortes en el criostato de 10 µm de grosor, sólo del pulmón izquierdo.

Se utiliza la congelación de las muestras cuando los procesos histológicos (por ejemplo, la perfusión en parafina) alteran las características de la muestra que se quiere estudiar, como moléculas sensibles a dichos tratamientos, en este caso, el CD11c es una proteína sensible a la inclusión en parafina.

Inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica se emplea para localizar moléculas específicas en los tejidos mediante el uso de anticuerpos, ya que poseen una gran especificidad y alta afinidad; además, su conjugación con enzimas o con sustancias fluorescentes permite detectar cantidades muy pequeñas de moléculas presentes en el tejido.

Se realizó una inmunohistoquímica convencional para analizar la expresión del CD11c. Se utilizó el anticuerpo primario anti-mouse CD11c de BioLegend (catálogo #117301; clona N418). Para el anticuerpo secundario se utilizó Biotin Goat anti-hamster (armenian) de

BioLegend (catálogo #405501; clona Poly4055). Se bloqueó la peroxidasa endógena con HIO_4 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 (Figura 13).

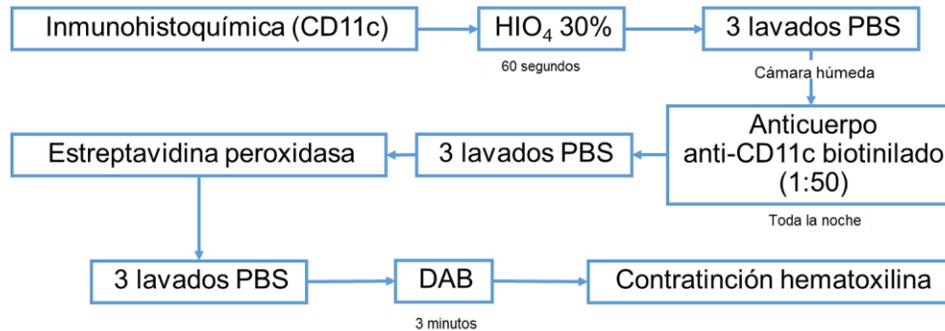


Figura 13. Diagrama del método de inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera:

- Descongelar los cortes:
 - Dejar a temperatura ambiente por 15 minutos.
 - Poner en acetona por 10 minutos.
 - Dar dos baños en PBS por 5 minutos cada uno.
- Colocar la muestra en HIO_4 al 30% durante 60 segundos para bloquear la peroxidasa endógena.
- Enjuagar con PBS por 3 minutos y escurrir.
- Poner albúmina sérica bovina al 5% y dejar por 2 horas a temperatura ambiente.
- Escurrir.
- Diluir el anticuerpo primario 1:100 en albúmina sérica bovina y colocar en la muestra. Dejar incubar en refrigeración por 24 horas.
- Enjuagar con PBS por 5 minutos y escurrir.
- Diluir el anticuerpo secundario 1:500 en albúmina sérica bovina y colocar en la muestra. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.
- Enjuagar con PBS por 5 minutos y escurrir.
- Dejar 45 minutos con Avidina.
- Enjuagar 2 veces con PBS por 3 minutos y escurrir.
- Colocar el DAB chromogen por 5 minutos.
- Enjuagar 2 veces con PBS por 3 minutos y escurrir.

- Poner en H₂O_d.
- Realizar contratinción con hematoxilina:
 - Enjuagar con agua corriente por 3 minutos.
 - Poner en hematoxilina por 4 minutos.
 - Enjuagar con agua corriente por 3 minutos.
 - 10 baños rápidos en etanol 80%.
 - 10 baños rápidos en etanol 96%.
 - 10 baños rápidos en etanol absoluto.
 - 10 baños rápidos en solución de xilol/alcohol.
 - 2 baños rápidos en xilol.
 - Montar el corte con una gota de resina y un cubreobjetos del número 1.

Análisis

De la inmunohistoquímica realizada en los pulmones de los ratones expuestos a Vanadio y los controles se tomaron 15 fotomicrografías / pulmón de 5 ratones / grupo de manera aleatoria y enfocadas en zonas alveolares con una cámara Olympus Camedia C-7070.

En la inmunohistoquímica las CPAs CD11c+ eran aquellas marcadas de color ocre y se contabilizaron todas las presentes en cada fotomicrografía previamente tomada mediante el programa ImageJ (Rasband, W.) (Figura 14).

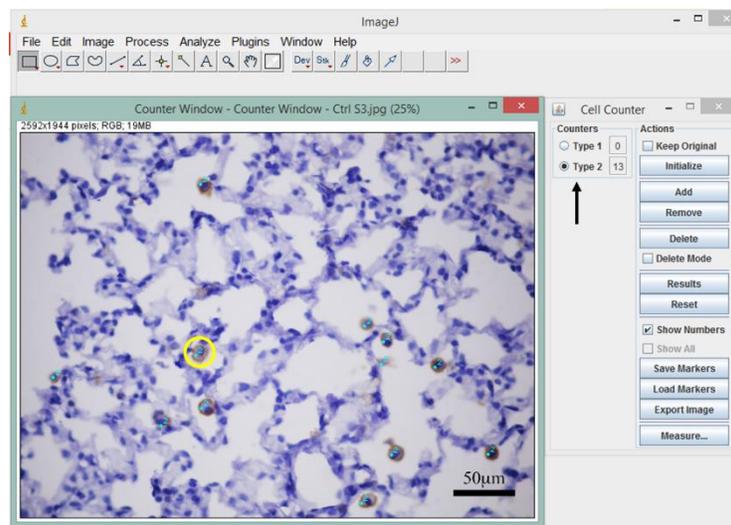


Figura 14. Ejemplo del uso de Image J para el conteo celular. Se puede llevar el conteo de varios tipos celulares (flecha negra), cada tipo se marca con un color y número para diferenciarlos entre sí (circulo amarillo). (Se usó el tipo dos para que el color contrastara más)

Cuando se realiza una densitometría se determina la densidad de la muestra a partir de diferencias en las lecturas. Con ayuda del programa DensiFe (MATLAB central) se puede realizar el cálculo de los pixeles correspondientes a la marca ocasionada por la DAB en la inmunohistoquímica.

Se realizó un análisis de densitometría de marca positiva, para esto se separaron los canales mediante Photoshop, se utiliza el amarillo ya que en éste se encuentra la marca producida por la DAB de la inmunohistoquímica en las células CD11c+, dichas imágenes fueron procesadas con el programa DensiFe (MATLAB central) con un *threshold* promedio de 0.4. Se realizó un análisis de varianza, ANOVA con una prueba *post hoc* de Dunnet para determinar diferencias significativas con respecto al control, considerando la significancia cuando $p < 0.05$.

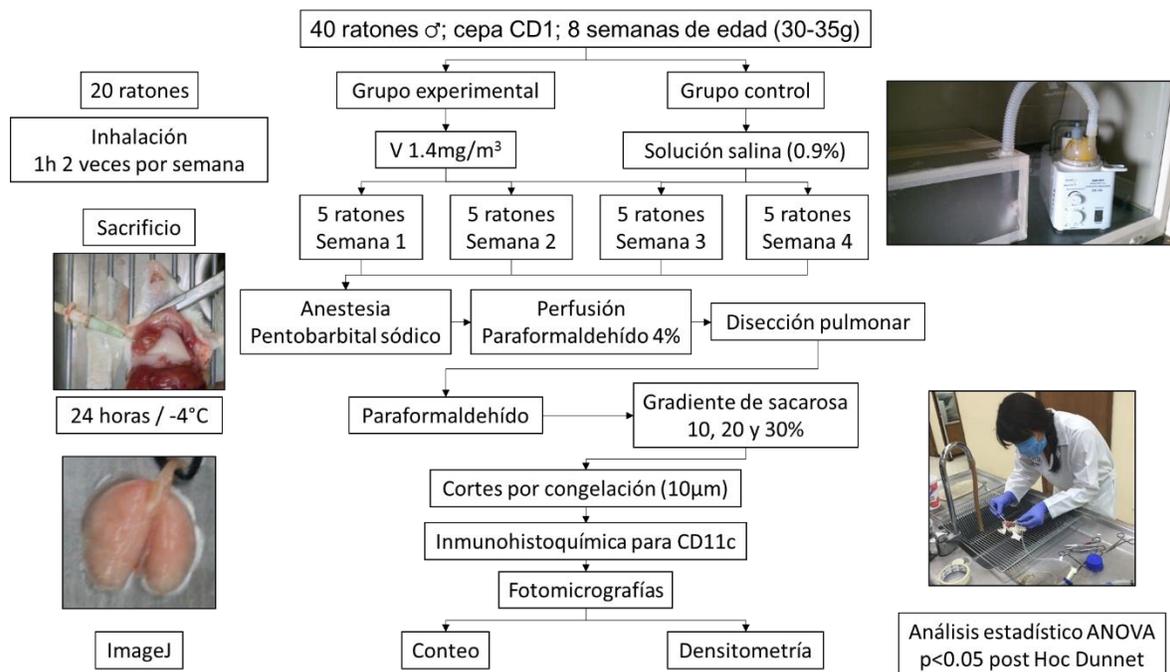


Figura 15. Resumen del método

RESULTADOS

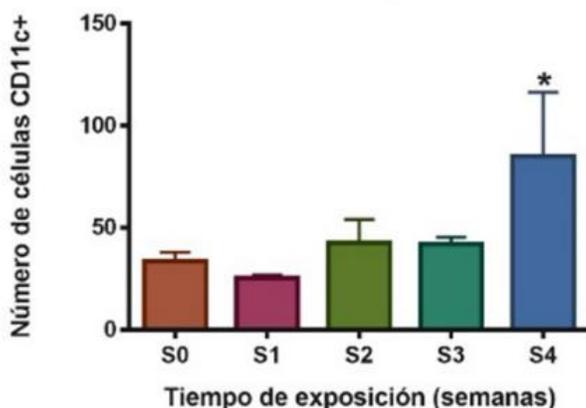
De los experimentos realizados se obtuvieron los pulmones izquierdos de 20 organismos control, 5 expuestos una semana, 5 expuestos por dos semanas, 5 expuestos por tres semanas y 5 expuestos por 4 semanas. A estos pulmones se les realizaron cortes por congelación de manera longitudinal; se utilizó un corte de la región media para su análisis mediante inmunohistoquímica.

CONTEO CELULAR

De la inmunohistoquímica realizada en los pulmones de los ratones expuestos a Vanadio se observaron las CPAs CD11c+ marcadas de color ocre (Figura 16). Se contabilizaron todas las células marcadas positivamente (15 fotomicrografías / pulmón x 5 ratones / grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas del número de células en los organismos controles de las cuatro semanas de tratamiento, por lo que se juntaron los datos en un solo grupo denominado S0 o control con una media de 33.66 (± 12.42) células.

Con respecto a las semanas 1, 2 y 3 se obtuvo un promedio de 25.5 (± 2.4), 42.5 (± 16.26) y 42.07 (± 6.47) células respectivamente, y no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a la S0 (o control) aunque aparentemente se observe una tendencia a aumentar el número celular; es hasta la semana 4 que se presentó una diferencia estadísticamente significativa, con un aumento de aproximadamente 2.5 veces el número de células (85.12 ± 53.95) (Gráfica 1).

Efecto de la inhalación de Vanadio sobre el número de células CD11c+ de pulmón



GRÁFICA 1. Efecto de la exposición a V_2O_5 sobre el número de células CD11c+ de pulmón a lo largo de 4 semanas. Semana 0 o control (S0, 33.6 células); Semana 1 (S1, 25.5 c.); Semana 2 (S2, 42.5 c.); Semana 3 (S3, 42.1 c.); Semana 4 (S4, 85.1 c.). Promedio de 15 fotomicrografías/pulmón de 5 ratones/grupo, $p < 0.05$ ANOVA (*post hoc* Dunnet). * denota diferencia significativa con respecto al control.

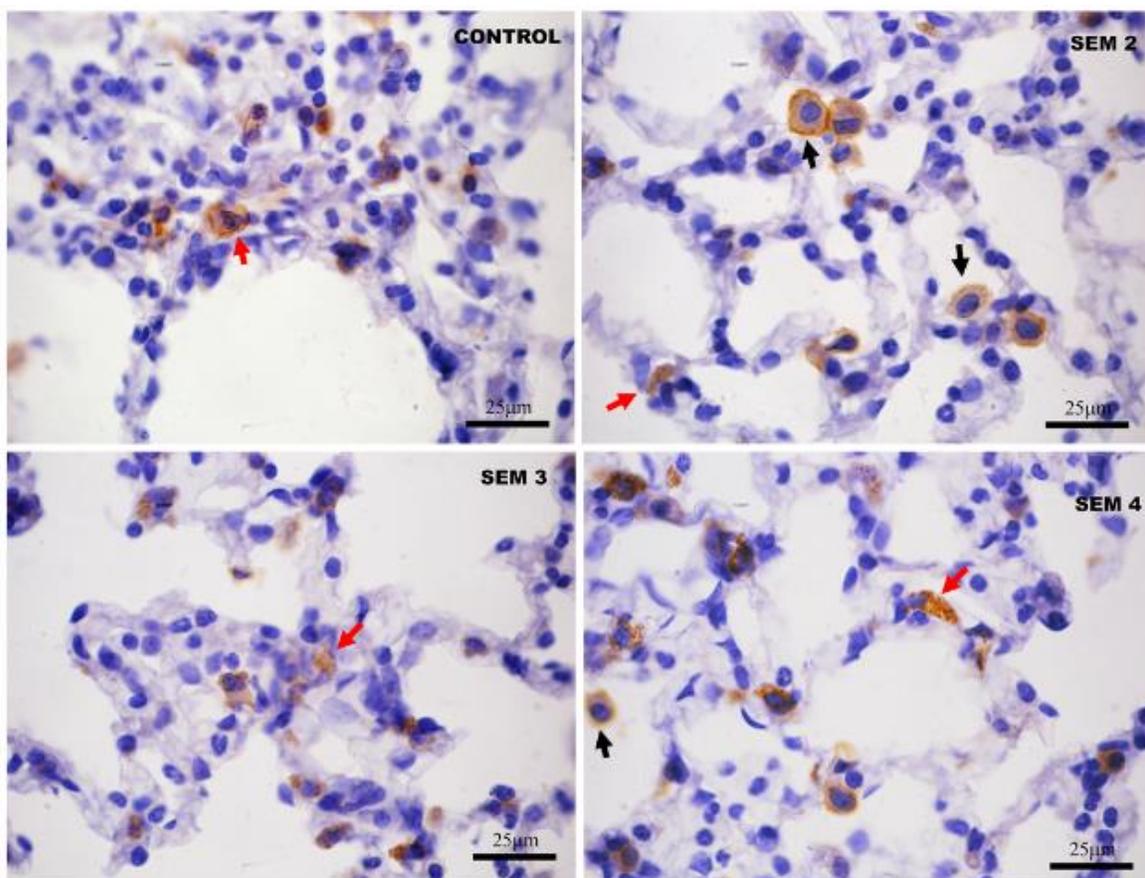


Figura 16. Fotomicrografías representativas del control y semanas 2, 3 y 4 de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón. Con la flecha negra se señalan CPAs en espacios alveolares y con la flecha roja las CPAs intersticiales.

DENSITOMETRÍA

En las mismas fotomicrografías empleadas para el conteo celular se realizó el análisis para la densitometría. Para dicho análisis se obtuvieron las imágenes del canal amarillo de las fotos mediante Photoshop (Figura 17) para separar los canales de la imagen, de la cual se utiliza el amarillo ya que en éste se encuentra la marca producida por la DAB en las células CD11c+; tras analizar estas imágenes con el programa DensiFe (MATLAB central) obtenemos el número de píxeles provenientes de la marca positiva, es decir, de las células marcadas en color ocre.

Debido a que los organismos controles no mostraron diferencias significativas entre ellos, a lo largo del tratamiento se agruparon los datos en el grupo S0 o control, presentando una densidad media de 8312 ± 4442 . En el análisis de densitometría se observó el mismo comportamiento que el conteo celular, las semanas 1, 2 y 3 no mostraron diferencias significativas con respecto a la S0 con densidades medias de $7773 (\pm 1278)$, $15354 (\pm 1359)$

y 15234 (± 7558) respectivamente; por el contrario, la semana 4 si mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, con un aumento de aproximadamente 5 veces en la intensidad de la marca (42564 ± 47707) (Gráfica 2).

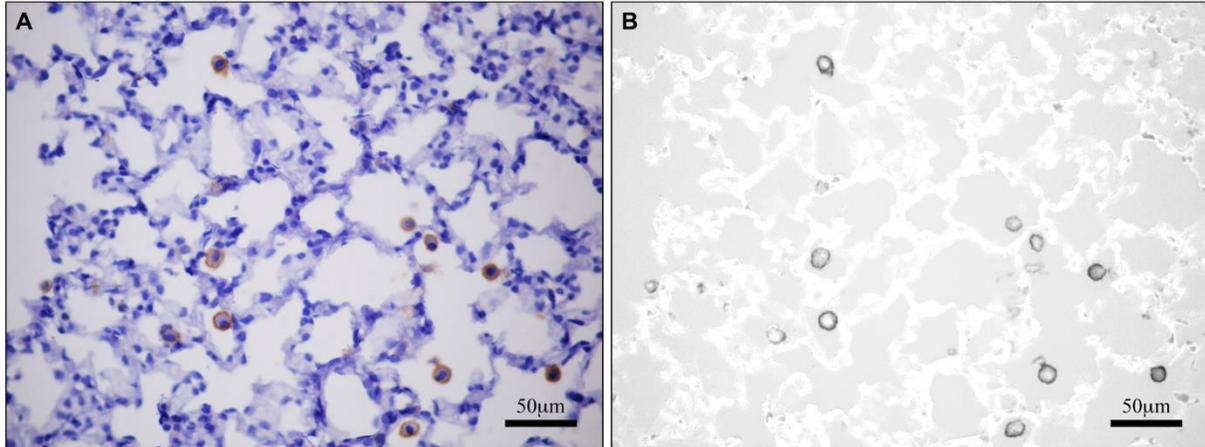
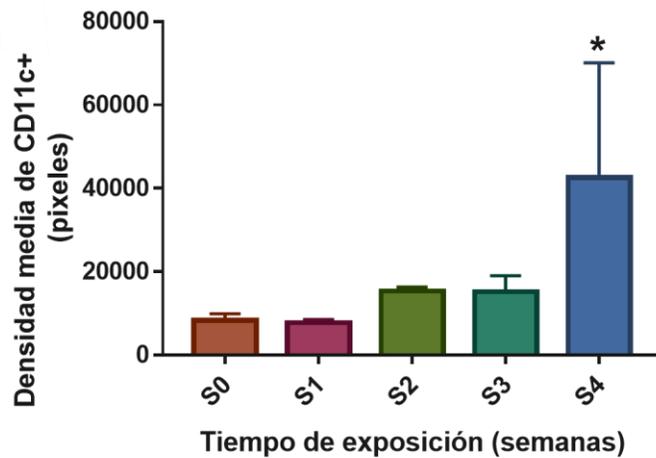


Figura 17. Se muestra en A) fotomicrografía de inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón de un organismo control. B) Imagen procesada en Photoshop para obtener el canal amarillo.

Efecto de la inhalación de Vanadio sobre la densidad media de CD11c+ en CPAs de pulmón



$p < 0.05$ ANOVA (post hoc Dunnet)

* Diferencia significativa vs. control

GRÁFICA 2. Efecto de la exposición a V_2O_5 sobre la densidad media de la marca de CD11c expresada en pixeles en las CPAs de pulmón a lo largo de 4 semanas. Semana 0 o control (S0, 8312); Semana 1 (S1, 7773); Semana 2 (S2, 15354); Semana 3 (S3, 15234); Semana 4 (S4, 42562). Promedio de 15 fotomicrografías/pulmón de 5 ratones/grupo, $p < 0.05$ ANOVA (post hoc Dunnet).

* denota diferencia significativa con respecto al control.

En el análisis de la inmunohistoquímica realizada se observó la presencia de células representativas del proceso inflamatorio, tanto de linfocitos desde la semana 1 y durante el periodo de exposición, así como un gran número de células polimorfonucleares en la semana 4 (Imágenes 18-22). También se observó la presencia de CPAs binucleadas, principalmente en la semana 4 (Imagen 23).

La presencia de los linfocitos en los pulmones de los organismos controles y los expuestos a V en las primeras semanas se puede explicar por las poblaciones de linfocitos residentes de tejidos, éstos funcionan como controladores intermediarios que integran las señales de citocinas para reclutar células efectoras y llevar a cabo una respuesta adecuada; estas células se encuentran presentes en el tejido en el momento en que se da el reto, a diferencia de los linfocitos efectoras que son reclutados como consecuencia de la activación de la inmunidad adaptativa días después (Iwasaki, *et. al.*, 2016).

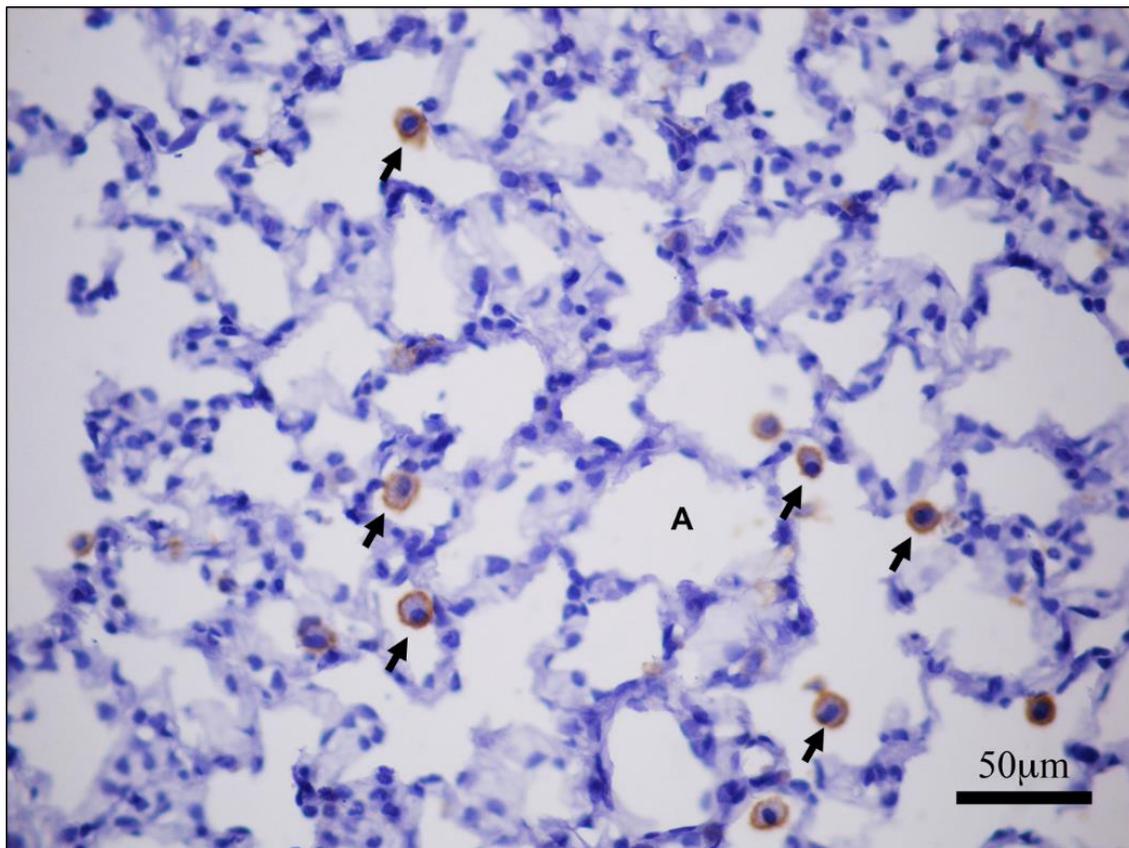


Figura 18. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón realizada en un organismo control. Se observan algunas CPAs CD11c+ (flecha negra), en su mayoría en la luz alveolar (A).

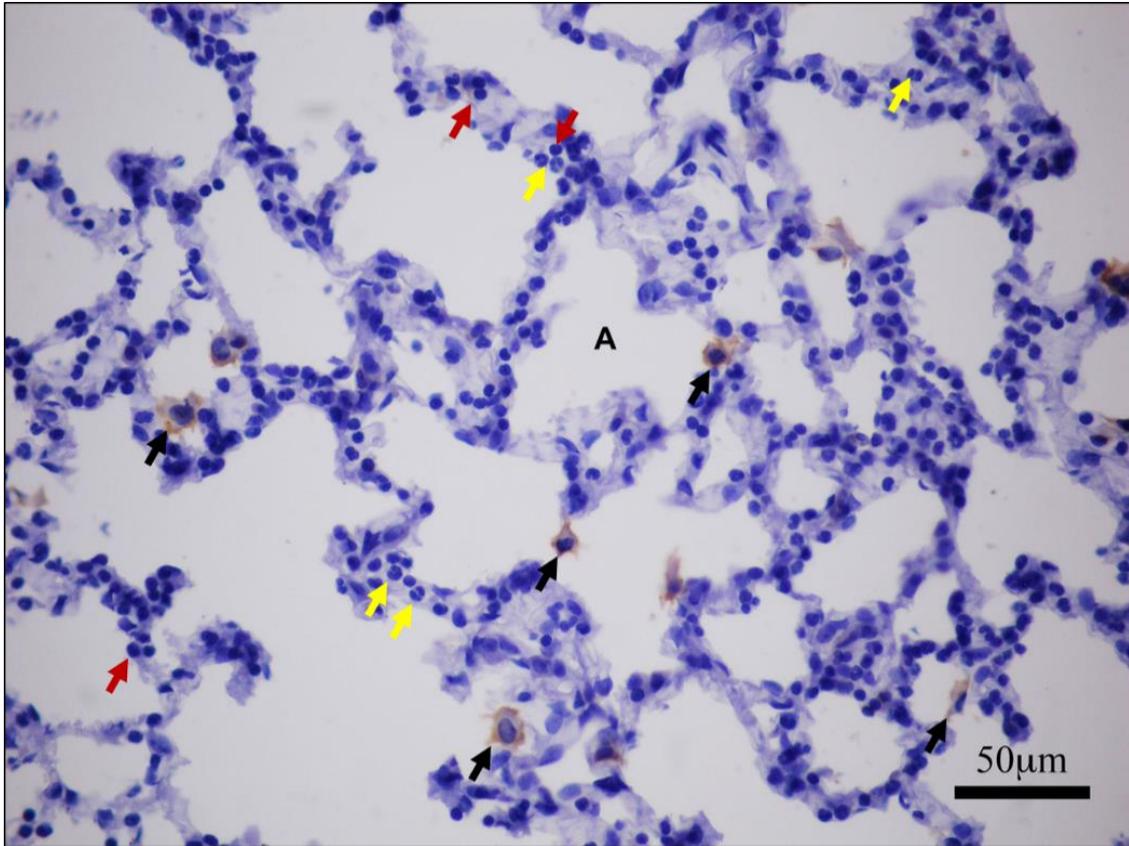


Figura 19. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón realizada en un organismo expuesto a V_2O_5 por una semana. Se observan algunas CPAs CD11c+ (flecha negra) en su mayoría en la luz alveolar (A); la cantidad de células no es estadísticamente significativa con respecto al control. Se observan leucocitos polimorfonucleares (flecha amarilla) y linfocitos (flecha roja).

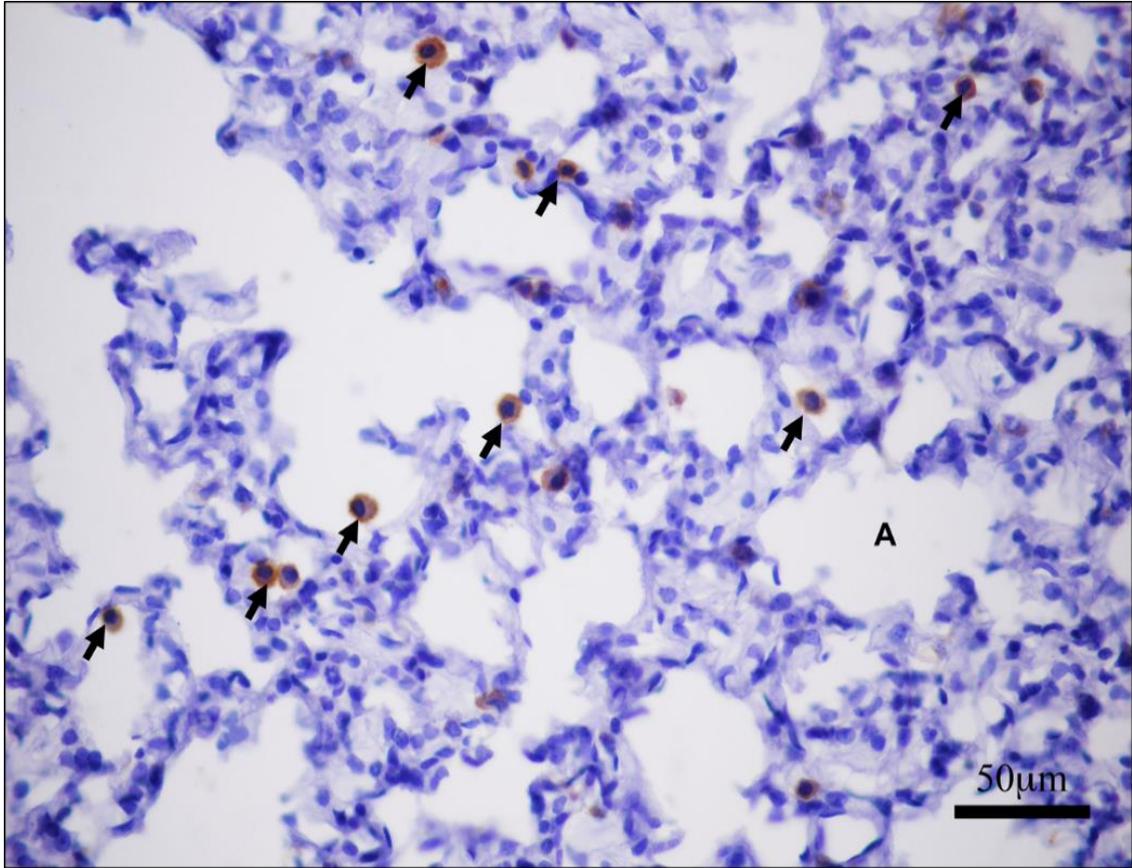


Figura 20. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón realizada en un organismo expuesto a V_2O_5 por dos semanas. Se observan algunas CPAs CD11c+ (flecha negra) en su mayoría en la luz alveolar (A); la cantidad de células no es estadísticamente significativa con respecto al control.

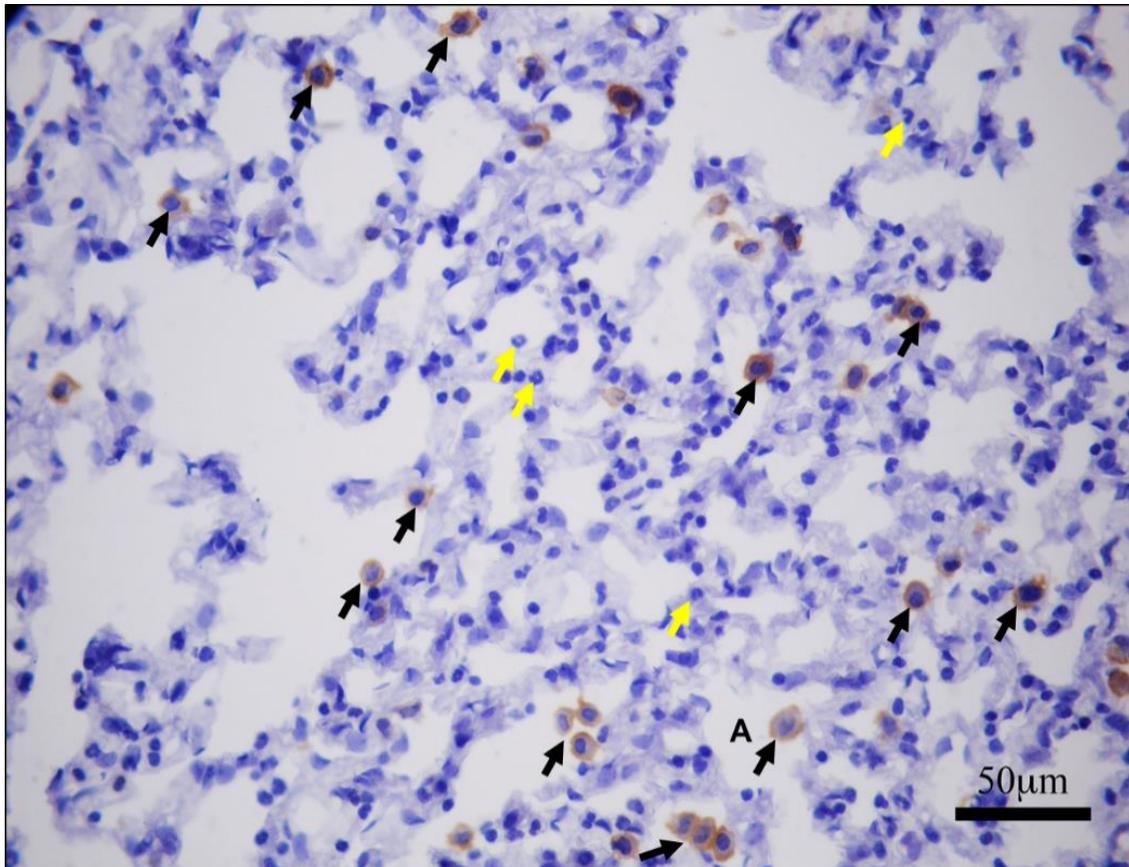


Figura 21. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón realizada en un organismo expuesto a V_2O_5 por tres semanas. Se observan algunas CPAs CD11c+ (flecha negra) en su mayoría en la luz alveolar (A), también se observan leucocitos polimorfonucleares (flecha amarilla); la cantidad de células no es estadísticamente significativa con respecto al control.

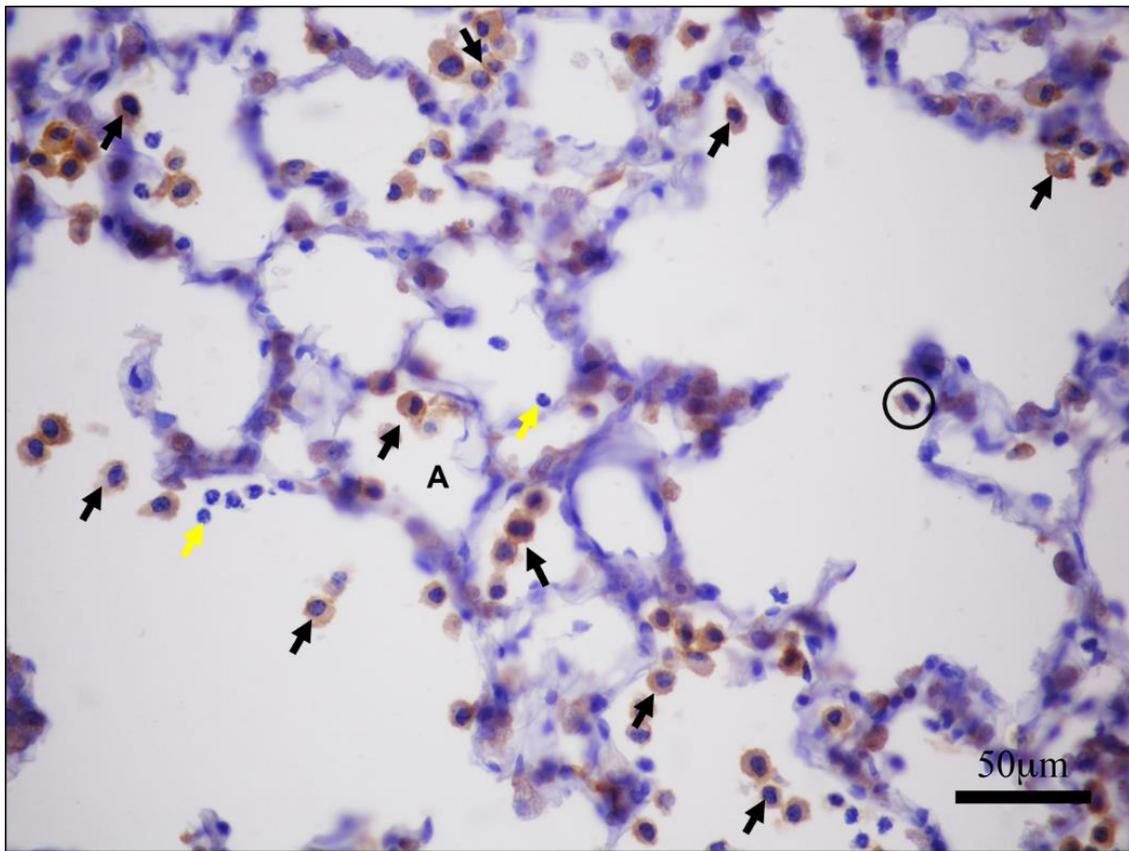


Figura 22. Fotomicrografía representativa de la inmunohistoquímica para CPAs CD11c de pulmón realizada en un organismo expuesto a V_2O_5 por cuatro semanas. Se observa mayor cantidad de CPAs CD11c+ (flecha negra) con respecto al control, la diferencia es estadísticamente significativa. Se observan leucocitos polimorfonucleares (flecha amarilla) en la luz alveolar (A). Hay también CPAs CD11c+ binucleadas (círculo negro).

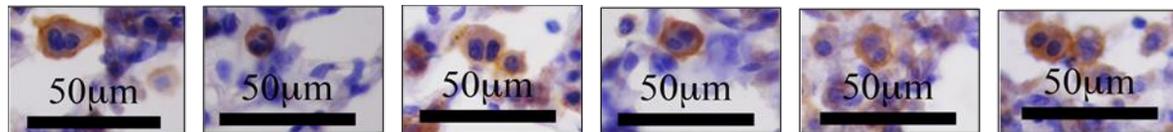


Figura 23. Fotomicrografías representativas de CPAs CD11c binucleadas observadas en organismos expuesto a V_2O_5 por cuatro semanas.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos en la presente investigación encontramos que existe aumento tanto en el número de CPAs CD11c+ como en el marcador CD11c en pulmón de ratón después de cuatro semanas de exposición a la inhalación de V, esto contrasta con lo reportado por Ustarroz y colaboradores en el 2012, quienes reportan una disminución tanto en el número de células como en el marcador en CD tímicas, a pesar de haber utilizado el mismo modelo de exposición a V. Esto podría explicarse principalmente por las diferentes vías de interacción del V con ambos órganos; mientras que las partículas de V pueden ser depositadas en el pulmón y actuar de manera directa, el V que llega a timo ha sufrido diversos procesos de óxido-reducción y ha interactuado con diversas moléculas en la circulación sistémica, por lo que el V que llega al timo puede ser más reactivo, además, el efecto puede verse influido por las diversas secreciones de citocinas y factores de transcripción inducidos por V en otros órganos que llegan a timo a través de torrente sanguíneo. Aunado a esto, se ha sugerido (Kugathasan, *et. al.*, 2008) que las locaciones o microambientes tisulares diferentes influyen profundamente el fenotipo y función de las poblaciones de CPAs, produciendo variaciones en la susceptibilidad de las poblaciones de CD tímicas y CPAs alveolares que generan respuestas diferentes ante un mismo reto, por ejemplo, que haya un aumento de CPAs alveolares mientras que las CD tímicas disminuyan en el mismo modelo de inhalación de V.

Se ha reportado que el reclutamiento y acumulación de CD en las mucosas de las vías aéreas es una respuesta común ante infecciones virales locales como neumonía, asma, o ante retos por alérgenos y a la exposición crónica de irritantes aéreos, como el polvo de pino o contaminantes, siendo aparentemente una característica universal la respuesta celular aguda ante un reto (Blank, *et. al.*, 2008; Veres, *et al.*, 2013). Se ha demostrado el aumento de CD en la mucosa nasal en rinitis tras el reto a alérgenos ambientales (Fokkens, 1989 revisado en Holt, 2000) y cambios en el número y fenotipo de CD en personas con asma atópica (Tunon-de-Lara, 1996 y Hoogsteden, 1999 revisados en Holt, 2000); Jan de Heer y colaboradores en 2005 mostraron que las CD CD11c+ de vías aéreas son esenciales en el mantenimiento de los rasgos característicos del asma, como la eosinofilia, hiperplasia de células mucosas e hiperreactividad bronquial, características que han sido descritas tras la exposición a V por el grupo de Fortoul y colaboradores; Roa *et. al.* en 2015 reportaron el aumento de CD CD11c+ pulmonares tras la exposición a PM_{2.5} y Holt y colaboradores en el 2000 encontraron asociación entre los niveles de inflamación crónica en fumadores y el

incremento en el número de CD tanto en la superficie alveolar como en las mucosas bronquiales. Los datos anteriores demuestran la concordancia entre el aumento de CD con procesos inflamatorios crónicos, esto relaciona el aumento de CPAs encontrado en el presente trabajo con los procesos de inflamación descritos previamente por el grupo de Fortoul en el mismo modelo de exposición a V empleado en esta investigación.

La expansión de las poblaciones de CD en mucosas, como los alveolos, es atribuida generalmente al reclutamiento tanto de CD como de sus precursores sanguíneos, mientras que el aumento en las poblaciones de macrófagos alveolares se atribuye a su proliferación local; sin embargo, se ha observado que la población de CD en las vías aéreas puede aumentar por su constante proliferación en estado basal y que este mecanismo es potenciado en las mucosas tras la inhalación de alérgenos, sugiriendo que la proliferación local contribuye de manera importante en el aumento de CD en condiciones inflamatorias; así mismo las poblaciones de macrófagos alveolares pueden ser repuestas por monocitos (Veres, *et. al.*, 2013).

Se ha observado la reducción en el reclutamiento de macrófagos derivados de monocitos tras la eliminación de $\alpha\beta 2$, lo que sugiere que esta integrina tiene un papel importante en el reclutamiento de monocitos a sitios de infección (Jawhara, *et. al.*, 2016). Además Sadhu *et. al.* en 2007 describieron la adhesión celular mediada por CD11c, la cual se une a las integrinas I-CAM y V-CAM, esto es relevante, ya que Alfaro Moreno y colaboradores han reportado que la exposición a contaminantes atmosféricos, como PM_{10} y $PM_{2.5}$ produce un aumento en las selectinas P y E y las integrinas I-CAM, V-CAM y P-CAM involucradas en la adhesión celular, en líneas celulares tanto epiteliales (A549) como endoteliales (HUVEC). Este aumento de integrinas en modelos pulmonares refuerza la idea de que el aumento de CPAs observado podría deberse a los monocitos circulantes reclutados al pulmón siendo así uno de los posibles mecanismos mediante el cual se dio el aumento de las CPAs aquí descrito, además, se tiene conocimiento de que las CPAs diferenciadas a partir de monocitos son CD11+ (Iwasaki, *et. al.*, 2016).

Como se observó en la presente investigación, el aumento de las CPAs durante las primeras semanas de inhalación de V no fue significativo estadísticamente, esto podría deberse a que el V_2O_5 es la forma menos soluble de V, por lo que se elimina de los

pulmones a una tasa muy baja, lo que podría desencadenar un patrón de deposición y acumulación de V, el cual induciría un aumento gradual en el número de células como resultado de los procesos inflamatorios/irritativos que se observan en el pulmón, representado por un aumento significativo de CPAs CD11c+ en la cuarta semana de exposición a V₂O₅ (Waters, *et. al.*, 1974; Cooper, 2007). Es posible también que el aumento en el número celular observado en la cuarta semana como respuesta ante la acumulación de las partículas de V en el pulmón y el reclutamiento o división de las poblaciones de células residentes sea resultado del intento de las CPAs de “limpiar” dicha acumulación de partículas.

Otra posible explicación para el tiempo que tomó encontrar diferencias significativas (cuatro semanas) en el aumento del número de CPAs podría ser que la respuesta inmune del pulmón ante los diversos elementos que pueden llegar a esta zona debe ser regulada de manera que, tanto su intensidad como duración, puedan llevar a cabo la neutralización del antígeno, así, los mecanismos operativos locales deben mantener los niveles de actividad dentro de límites definidos que controlen la respuesta sin comprometer la integridad de la función pulmonar; uno de estos mecanismos involucra las funciones de inhibición de los macrófagos residentes de pulmón. En concordancia con esta línea de acción del sistema inmune alveolar, podríamos atribuir el aumento de CPAs CD11c+ observado en la cuarta semana a una regulación de la respuesta ante un agente que, aunque puede resultar dañino por la generación de especies reactivas de oxígeno, no tiene potencial infeccioso, por lo que genera una respuesta de tolerancia.

Si bien el aumento de CPAs observado ocurre después de cuatro semanas de exposición a V, sugiriendo una regulación en la inmunidad pulmonar, puede que su viabilidad y funciones se encuentren alteradas, por ejemplo, Waters y colaboradores en 1974 analizaron el efecto de diversos compuestos de V sobre macrófagos alveolares de conejo *in vitro* y observaron disminución en la viabilidad celular, así como en el número de células expuestas a concentraciones de 1 a 20 µg/ml de V₂O₅; en las concentraciones más bajas el número celular disminuyó, sin embargo, en concentraciones altas observaron muchas células intactas, a pesar de esto, no eran viables; los investigadores atribuyeron este fenómeno a la posible “fijación” de membranas celulares que previene la lisis celular, y aunque no explican el mecanismo potencial si lo atribuyen al V, ya que observaron el mismo fenómeno con trióxido y dióxido de vanadio. Este fenómeno de “fijación” de membrana

descrito por Waters y colaboradores podría explicar el aumento de CPAs reportado en el presente trabajo, sin embargo, no realizamos el análisis de la viabilidad de las CPAs en el tejido pulmonar; no obstante, las concentraciones empleadas en ambos estudios son distintas: nosotros usamos $1.4\text{mg}/\text{m}^3$, lo que equivale a $0.0014\mu\text{g}/\text{ml}$, la cual es mucho menor a la empleada por Waters *et. al.*, y según lo reportado, a esta concentración habría una disminución del número celular, contrario a lo que se observó. Estas diferencias pueden ser resultado del tipo de exposición, pues ellos utilizaron un modelo *in vitro* mientras que el presente trabajo se realizó *in vivo*; en un modelo *in vivo* el microambiente generado por factores secretados por los diversos tipos celulares que interactúan en el pulmón pueden actuar sobre la regulación de células como los macrófagos, además, las poblaciones de CPAs alveolares tienen la capacidad de autorrenovarse, y durante procesos infecciosos se ha observado el reclutamiento de monocitos que pueden diferenciarse tanto en macrófagos y células dendríticas y así aumentar el número de CPAs.

Similar a los resultados del aumento de CPAs en el pulmón en la cuarta semana que observamos, Pedroza-González y colaboradores (2004) encontraron que durante una infección pulmonar de tuberculosis murina inducida experimentalmente mediante la inoculación intratraqueal con la cepa virulenta H37Rv hubo un aumento en el flujo de CPAs CD11c+ en los pulmones, siendo este más aparente en la tercer semana de infección. Las posibles explicaciones atribuidas a este mecanismo que los autores discuten se relacionan en primer lugar a la baja tasa de tuberculosis y el tiempo que le toma a la infección diseminarse, también podría ser atribuido a la presencia *sui generis* de compuestos antigénicos con efectos inmuno regulatorios, al efecto supresor de los macrófagos alveolares, o bien, a la alteración en la expresión de quimiocinas y sus receptores en el tejido pulmonar, alterando el flujo de células durante la fase temprana. A pesar de ser retos completamente distintos, en ambos trabajos se observa que durante las primeras semanas no hubo aumento de CPAs, por lo que atribuimos este tipo de respuesta al efecto regulatorio de los macrófagos, o bien, a algún mecanismo que regula la expresión de quimiocinas y sus receptores en la fase temprana, sin embargo, un estudio profundo sobre este tema es necesario.

Evidencias clínicas de personas ocupacionalmente expuestas a la inhalación de V sugieren que muchas de las neumonías agudas resultantes de dicha exposición pueden tener un origen químico-bacterial, es decir, la exposición a V puede dar lugar a la desregulación de

la resistencia pulmonar a infecciones secundarias y dado el rol central de los macrófagos y células dendríticas en la defensa de este órgano, es posible que los efectos del V sobre estas CPAs sean los motivos del daño a la resistencia pulmonar (Waters, *et. al.*, 1974). Cohen y colaboradores en 1989 (revisado en Cohen, 2007) reportaron un aumento en la mortalidad y disminución en la resistencia a infección por *Listeria monocytogenes* en ratones expuestos de manera aguda/subcrónica intraperitoneal a metavanadato de amonio; los macrófagos peritoneales expuestos a este compuesto de V disminuyeron su capacidad de fagocitar las bacterias *Listeria* opsonizadas y eliminar a las pocas ingeridas; por lo que Cohen *et. al.* sugieren que el V podría modificar directamente las proteínas que constituyen algunos receptores de superficie de citocinas/opsoninas de los macrófagos.

Por otro lado, Singh-Jasuja *et. al.* en el 2012 reportaron que en las CD murinas *in vitro* se disminuye la cantidad de CD11c en la superficie celular mientras que aumentan sus niveles intracelulares tras la activación de la CD mediante algunos ligandos TLR. Sugieren que, tras la activación de la célula, el CD11c de la membrana es internalizado, o bien, se desencadena la producción de CD11c y/o se inhibe el transporte de la integrina a la membrana plasmática, en relación con el aumento observado tras la inhalación de vanadio, esto podría implicar que las CPAs CD11c no estén siendo activadas y por lo tanto su participación en la respuesta inmune se vea alterada; estos resultados abren un área de oportunidad para estudiar el efecto del V sobre la activación de la respuesta inmune mediada por CPAs.

Las modificaciones en los receptores celulares podrían estar relacionadas con los cambios inducidos por el V en las actividades de proteínas cinasas/fosfatasa. El V puede inducir fosforilaciones prolongadas de proteínas receptoras, y los segundos mensajeros inducidos por citocinas podrían producir estados prolongados de activación celular, los cuales a su vez modulan la expresión de los receptores. Esta fosforilación prolongada de proteínas celulares podría alterar las vías normales de transducción de señales y la subsecuente activación de elementos de respuesta a citocinas del DNA, lo cual a su vez lleva a la baja regulación de la expresión y función de receptores de citocinas. Aunado a este papel del V, se ha reportado su papel en la generación de ROS y se sabe que éstas pueden modular respuestas fisiológicas en macrófagos, lo cual puede afectar significativamente la expresión de mediadores inflamatorios actuando como segundos mensajeros (Forman y Torres, 2001; Cohen, 2007).

Estas alteraciones en el CD11c parecieran contrastar con su papel en el reclutamiento de monocitos, sin embargo, los monocitos CD11c+ podrían ser reclutados al espacio alveolar, donde entran en contacto con el V depositado y ahí sufrir las alteraciones en sus receptores. Se ha observado que alteraciones en la afinidad de receptores de superficie (alteraciones en la afinidad de linfocitos a hormonas y citocinas) son una característica común de la toxicología del V, por lo que, a pesar del aparente aumento del marcador CD11c, alteraciones en su expresión/función/afinidad podrían estar implicadas en la disminución de la fagocitosis de bacterias opsonizadas (Cohen, 1996; Torossian, 1988 y Evans, 1994 revisados en Cohen, 2007; Sadhu, *et. al.*, 2007; Luckasi, 2017).

A pesar de que el modelo propuesto por Singh-Jasuja y colaboradores en el que la CD disminuye sus niveles de CD11c extracelular tras la activación aún no ha sido descrito por completo y parece ser que no todas las poblaciones de CD se comportan de la misma manera ante la activación, dada la evidencia del efecto de V en la regulación inmune pulmonar y los resultados del presente trabajo podría parecer que en la población pulmonar de CPAs si actúan de esta manera y que las funciones de las CPAs podrían estar siendo afectadas *in situ* por el metal a través de alteraciones en la afinidad de receptores como el CD11c. Las infecciones en el tracto respiratorio, y las alteraciones en la regulación de la respuesta inmune pulmonar representan un gran reto para el organismo, en 2015 las infecciones de vías respiratorias fueron la tercer causa de muerte a nivel mundial y la enfermedad transmisible más letal (WHO, 2017), por lo que el estudio más detallado de la contaminación atmosférica, sus diversos componentes y sus efectos en la inmunidad pulmonar son de vital importancia. Por lo que creemos que, en relación al estudio del V y sus compuestos, es necesaria la evaluación de: a) citocinas que induzcan la proliferación local de las CPAs y el análisis de la migración de monocitos para diferenciar cual es el mecanismo que induce el aumento de las CPA b) moléculas de activación, tanto de monocitos, CD y macrófagos para analizar la correcta maduración de las CPA, así como el análisis de los perfiles de activación (M1/M2, tolerogénicas/CPA) c) de la secreción de las moléculas coestimuladoras por parte de las CD y el perfil de citocinas de los macrófagos para analizar su correcta función d) la evaluación de la respuesta inmune en adición de un agente infeccioso al modelo de inhalación de V que ayudaría a dilucidar todos los cuestionamientos planteados a partir del presente trabajo.

CONCLUSIONES

- La inhalación de V produce un aumento significativo tanto en el número de CPAs CD11c+, así como del marcador de la integrina CD11c en las CPAs de pulmón de ratones en la cuarta semana de exposición.

REFERENCIAS

- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., Mantovani, A. 2008. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66(1) : 1-9.
- Allavena, P., Mantovani, A. 2011. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *J Trnsl Immunol.* 167 () : 195-205.
- Aggarwal, N. R., King, L. S., D'Alessio, F. R. 2014. Diverse macrophage populations mediate acute lung inflammation and resolution. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 306(8) : L709–L725.
- Alfaro Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J. C., Clifford, M. J., Rosas, I., Ponce de León, R. S., Osornio-Vargas, A. R. 2002. Biologic Effects Induced in Vitro by PM10 from Three Different Zones of Mexico City. *Environ Health Perspect.* 110 (7) : 715-720.
- ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2012. *Toxicological profile for vanadium.* US Department of health and human services. Atlanta, Georgia. 255 p.
- Assem, F. L., Levy, L. S. 2009. A Review of Current Toxicological Concerns on Vanadium Pentoxide and Other Vanadium Compounds: Gaps in knowlege and Directions for Future Research. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 12 (4) : 289-306.
- Assem, F. L., Levy, L. S. 2012. Inhalation Toxicity of Vanadium. En VANADIUM Biochemical and Molecular Biological Approaches. Editado por Hitoshi Michibata. Springer. Japón. 209-224 pp.
- https://books.google.com.mx/books?id=1VjOhdziZJoC&pg=PA160&lpg=PA160&dq=S.+B.+Etcheverry+and+A.+M.+Cortizo,+Bioactivity+of+vanadium+compounds+on+cells+in+culture&source=bl&ots=YxJOctiFE7&sig=fzo9_I3GCNpKttecycb3LV28pkSM&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiv0bL747jVAhWFLyYKHVxfDs8Q6AEIRjAF#v=onepage&q&f=true
- Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Zepeda-Rodríguez, A., Antuna, S. V., Saldivar, L., Espejel-Maya, G., Mussali-Galante, P., Avila-Casado, M. C., Reyes-Olivera, A., Anaya-Martinez, V., Fortoul, T. I. 2005. Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation A mice experimental model. *Neurosci Lett.* 381 (1-2) : 21-25.
- Bakás, L., Verza, G., Cortizo, A. 2001. Effect of vanadium compounds on the lipid organization of liposomes and cell membranes. *Biol Trace Elem Res.* 80 (3) : 269-279.

- Barceloux, D. G. 1999. Vanadium. *Clin Toxicol.* 37(2) : 265-278.
- Barchet, W., Blasius, A., Cella, M., Colonna, M. 2005. Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res.* 32 (1-3) : 75-83.
- Bérubé, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T. 2010. Human primary bronchial lung cell constructs: The new respiratory models. *Toxicology.* 278 (3) : 311-318.
- Black, M., Dodd, D. E., McMullen, D., Pensde, S., McGregor, J. A., Gollapudi, B. B., Andersen, M. E. 2015. Using gene expression profiling to evaluate celular responses in mouse lungs exposed to V2O5 and a group of other mouse lung tumorigens and non-tumorigens. *Regul Toxicol Pharmacol.* 73 (1) : 339-347.
- Blank, F., von Garnier, C., Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gehr, P., Nicod, L. 2008. Role of dendritic cells in the lung: in vitro models, animal models and human studies. *Expert Rev Respir Med.* 2 (2) : 215-233.
- Byrne, A. R., Kosta, L. 1978. Vanadium in foods and in human body fluids and tissues. *Sci Total Environ.* 10 (1) : 17-30.
- Castañeda, O. A., Lee, S., Ho, C. 2017. Macrophages in oxidative stress and models to evaluate the antioxidant function of dietary natural compounds. *J Food Drug Anal.* 25 (1) : 111-118.
- Chung, C. Y., Ysebaert, D., Berneman, Z. N., Cools, N. 2013. Dendritic Cells: Cellular Mediators for Immunological Tolerance. *Clin Dev Immunol.* vol. 2013, Article ID 972865, 8 pags.
- Cohen, M. D., McManus, T. P., Yang, Z., Qu, Q., Schlesinger, R. B., Zelikoff, J. T. 1996. Vanadium Affects Macrophage Interferon- γ -Binding and -Inducible Responses. *Toxicol Appl Pharmacol.* 138 (1) : 110-120.
- Cohen, M. D. 2007. Toxicity of Vanadium Compounds: Pulmonary and Immune System Targets. En *Vanadium: The Versatile Metal*. Editado por Kustin, K., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2007. Capítulo 16.
- Cohen, M. D., 1998. Vanadium. En *Immunotoxicology of environmental and occuppational metals* editado por Zelikoff, J. T., Thomas, P. T. Taylor & Francis, UK. 205-228 pp. https://books.google.com.mx/books?id=khY_xJmQR6EC&pg=PA213&dq=vanadium+macrophage&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi05sa95LjVAhXK7SYKHZdvBPMQ6AEINTAC#v=onepage&q=vanadium%20macrophage&f=true

- Comisión Ambiental Metropolitana. 2000. *Programa rector metropolitano integral de educación ambiental, Premia, 2001—2003*. INECOL, México D.F. 141 págs.
- Cooper, R. G. 2007. Vanadium pentoxide inhalation. *Indian J Occup Environ Med.* 11 (3) : 97 -102.
- Costigan, M., Cary, R., Dobson, S. 2001. *Vanadium pentoxide and other inorganic vanadium compounds*. Concise International Chemical Assessment Document 29. 51 págs.
- De Haar, C., Kool, M., Bol, M., Lambertch, B. N., Pieters, R. 2008. Lung dendritic cells are stimulated by ultrafine particles and play a key role in particle adjuvant activity. *J Allergy Clin Immunol.* 121 (5) : 1246-1254.
- Doebel, T., Voisin, B., Nagao, K. 2017. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol.* 38 (11) : 12 págs.
- Ebert, R. H. y Florey, H. W. 1939. The extravascular development of the monocyte observed in vivo. *Br J Exp Pathol.* 20 (4) : 342–356.
- Epelman, S., Lavine, K. J., Randolph, G. J. 2014. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *J Immuni.* 41 (1) : 21–35.
- Evangelou, A. M. 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 42 (3) : 249-265.
- Famili, F., Wiekmeijer, A. S., Staal, F. J. T. 2017. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Sci OA.* 3 (3) : 15 págs.
- Fernández, A., Casan, C. P., 2012. Deposition of Inhaled Particles in the Lung. *Arch Bronconeumol.* 48 (7) : 240-246.
- Forman, H. J., Torres, M. 2001. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 22 (4-5) : 189-216.
- Forman, H. J., Torres, M. 2001b. Signaling by the Respiratory Burst in Macrophages. *IUBMB Life.* 51 (6) : 365–371.
- Fortoul, T. I., Quan-Torres, A., Sánchez, I., López, I. E., Bizarro, P., Mendoza, M. L., Saldivar, O. L., Espejel-Maya, G., Ávila-Casado, M. C., Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Navarro, V. D., Olaiz-Fernandez, G. 2002. Vanadium in Ambient Air: Concentrations in Lung Tissue from Autopsies of Mexico City Residents in the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health.* 57 (5) : 446-449.

- Fortoul, T. I., Rodríguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colín-Barenque, L., Montaña, I. F., García-Pelez, I., Bizarro-Nevarés, P., López-Valdez, N., Falcon-Rodríguez, C. I., Jimenez-Martínez, R. S., Ruiz-Guerrero, M. L., López-Zepeda, L. S., Morales-Rivero, A., Muñiz-Rivera-Cambas, A. 2011. Vanadium Inhalation in a Mouse Model for the Understanding of Air-Suspended Particle Systemic Repercussion. *J Biomed Biotechnol.* vol. 2011, Article ID 951043, 11 pags.
- Fortoul, T. I., Rodríguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., García-Pelez, I., Montaña, I. F., Jimenez-Martínez, R. S., López-Valdez, N., Ruiz-Guerrero, M. L., Meléndez-García, N. A., García-Ibarra, F. A., Martínez-Baez, V., Zapata-Alfaro, D., Muñiz-Rivera-Cambas, A., López-Zepeda, L. S., Quezada-Maldonado, E. M., Cervantes-Yépez, S. 2014. Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chim Acta.* 420 : 8-15.
- Garnotel, R., Rittié, L., Poitevin, S., Monboisse, J., Nguyen, P., Potron, G., Maquart, F., Randoux, A., Gillery, P. 2000. Human Blood Monocytes Interact with Type I Collagen Through $\alpha\beta 2$ Integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J Immunol.* 164 (11) : 5928-5934.
- Gibbing, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., Jakubzick, C. V. 2017. Three unique interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *AJRCMB* Articles in Press. Published on 03-March-2017 as 10.1165/rcmb.2016-0361OC.
- Goc, A. 2006. Biological activity of vanadium compounds. *Cent Eur J Biol.* 1 (3) : 314-332.
- González-Villalva, A., Rodríguez-Lara, V., Montaña, I. F., Lima-Melo, A., Ramirez, G., Fortoul, T. I. 2009. Blood changes generated after vanadium inhalation. *Curr Topics Toxicol.* 6 (4) : 31-38.
- Griffiths, K. L., Tan, J. K. H., O'Neill, H. C. 2014. Characterization of the effect of LPS on dendritic cell subset discrimination in spleen. *J Cell Mol Med.* 18 (9) : 1908-1912.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. 2010. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 140 (6) : 883-899.
- Guerau-de-Arellano, M., Alroy, J., Bullard, D., Huber, B. T., 2005. Aggravated Lyme Carditis in CD11a^{-/-} and CD11c^{-/-} Mice. *Infect Immun.* 73 (11) : 7637-7643.

- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., Yona, S. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 14 (8) : 571–578.
- Gutiérrez-Castillo, M. E., Roubicek, D. A., Cebrián-García, M. E., De Vizcaya-Ruíz, A., Sordo-Cedeño, M., Ostrosky-Wegman, P. 2006. Effect of Chemical Composition on the Induction of DNA Damage by Urban Airborne Particulate Matter. *Environ Mol Mutagen.* 47 (3) : 199-211.
- Haniffa, M., Bigley, V., Collin, M., 2015. Human mononuclear phagocyte system reunited. *Semin Cell Dev Biol.* 41 : 59-69.
- Harrison, R. M. y Yin, J. 2000. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effectson health?. *Sci Total Environ.* 249 (1-3) : 85-101.
- He, H., Ghosh, S., Yang, H. 2017. Nanomedicines for dysfunctional macrophage-associated diseases. *J Control Release.* 247 : 106-126.
- Hoffmann, F., Ender, F., Schmutde, I., Lewkowich, I. P., Köhl, J., König, P., Laumonnier, Y. 2016. Origin, Localization, and Immunoregulatory Properties of Pulmonary Phagocytes in Allergic Asthma. *Front Immunol.* 7 (107) : 16 pags.
- Holt, P. G. 2000. Antigen Presentation in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 162 : S151-s156.
- Hume, D. A. 2008. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol.* 181 (9) : 5829-35.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 2006. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. VOLUME 86, Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. Lyon, France. 353 págs.
- INEGI. 2014. *Cuaderno estadístico y geográfico de la zona metropolitana del Valle de México 2014.* México. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 324 págs.
- Ingram, J. L., Antao-Menezes, A., Turpin, E. A., Wallace, D. G., Mangum, J. B., Pluta, L. J., Thomas, R. S., Bonner, J. C. 2007. Genomic analysis of human lung fibroblasts exposed to vanadium pentoxide to identify candidate genes for occupational bronchitis. *Respir Res.* 8 (34) : 13 pags.
- Irsigler, G. B., Visser, P. J., Spangenberg, P. A. 1999. Asthma and chemical bronchitis in vanadium plant workers. *Am J Ind Med.* 35 (4) : 366-374.

- Iwasaki, A., Foxman, E. F. y Molony, R. D. 2016. Early local immune defenses in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol.* 17 (1) : 7-20.
- Jan de Heer, H., Hammad, H., Kool, M., Lambertch, B. N. 2005. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol.* 17 (4) : 295-303.
- Jaspers, I., Samet, J. M., Erzurum, S., Reed, W. 2000. Vanadium-induced kB dependent transcription depends upon peroxide-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23 (1) : 95-102
- Jawhara, S., Pluskota, E., Cao, W., Plow, E. F., Soloviev, D. A. 2016. Distinct Effects of Integrins $\alpha\beta 2$ and $\alpha M\beta 2$ on Leukocyte Subpopulations during Inflammation and Antimicrobial Responses. *Infect Immun.* 85 (1) : 17 pags.
- Kadowaki, T., Shimada, M., Inagawa, H., Kohchi, C., Hirashima, M., Soma, G. 2012. Reconsideration of Macrophage and Dendritic Cell Classification. *Anticancer Res.* 32 (6) : 2257-2262.
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Schetters, S., Orre, M., Hol, E. M. 2016. Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1862 (10) : 1847-1860.
- Kierdorf, K., Prinz, M., Geissmann, F., Gomez, P. E. 2015. Development and function of tissue resident macrophages in mice. *Semin Immunol.* 27 (6) : 369-378.
- Kim, M., Boo, C. S., Ko, Y. S., Lee, H. Y., Cho, Y. W., Kim, H. K., Jo, S. 2010. Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 25 (9) : 2908-2921.
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D. 2012. Biochemical and medical importance of vanadium compounds. *Acta Biochim Pol.* 59 (2) : 195-200.
- Kugathasan, K., Roediger, E. K., Small, C., McCormick, S., Yang, P., Xing, Zhou. 2008. CD11c+ antigen presenting cells from the alveolar space, lung parenchyma and spleen differ in their phenotype and capabilities to activate naïve and antigen-primed T cells. *BCM Immunol.* 9 (48) : 12 pags.
- Lewis, K. L., Reizis, B. 2012. Dendritic Cells: Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 4 (8) : 14 pags.

- López, V. N. 2008. *Efecto de la inhalación de pentóxido de vanadio en el modelo de adenomas pulmonares inducidos por uretano. Estudio en ratón*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 66 págs.
- Lucas, A. y MacPherson, G. 2002. Langerhans cells: immigrants or residents?. *Nat Immunol.* 3 (12) : 1125-6.
- Lukácsi, S., Nagy-Baló, Z., Erdei, A., Sándor, N., Bajtai, Z. 2017. The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol Lett.* 189 (9) : 64-12.
- Marelli, G., Allavena, P., Erreni, M. 2015. Tumor-associated macrophages, multi-tasking cells in the cancer landscape. *Cancer Research Frontiers.* 1 (2) : 149-161.
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I. L., Cyster, J. G., Engleman, E. G. 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol.* 3 (12) : 1135-41.
- Molina, M. J., Molina, L. T. 2004. Megacities and Atmospheric Pollution. Critical Review. *J Air Waste Manag Assoc.* 54 (6) : 644-680.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2009. *Inmunobiología de Janeway*. McGrawHill, Séptima edición. 887 págs.
- Mussali-Galante, P., Rodríguez-Lara, V., Hernández-Tellez, B., Ávila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarez, P., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Piñón-Zarate, G., Saldivar-Osorio, L., Diaz-Beck, P., Herrera-Enríquez, M. A., Tovar-Sánchez, E., Fortoul, T. I. 2005. Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicol Ind Health.* 21 (9) : 215-222.
- Musk, A. W. y Tees, J. G. 1982. Asthma caused by occupational exposure to vanadium compounds. *Med J Aust.* 1 (4) : 183-184.
- Mutsaers, S., Bishop, J. E., McGrouther, G., Laurent, G. J. 1997. Mechanisms of Tissue Repair: from Wound Healing to Fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 29 (1) : 5-17.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J. L. 2004. Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Sci Total Environ.* 321 (1-3) : 59-69.

- Pedroza-González, A., García-Romo, G. S., Aguilar-León, D., Calderon-Amador, J., Hurtado-Ortiz, R., Orozco-Estevez, H., Lambertch, B. N., Estrada-García, I., Hernández-Pando, R. y Flores-Romo, L. 2004. "In situ analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*". *Int J Exp Path.* 85 (3) : 135–145.
- Perié, L., Naik, S. H. 2015. Toward defining a "lineage" – The case for dendritic cells. *Semin Cell Dev Biol.* 41 (2015) : 3-8.
- Pierce, L. M., Alessandrini, F., Godleski, J. J., Paulauskis, J. D. 1996. Vanadium-Induced Chemokine mRNA Expression and Pulmonary Inflammation. *Toxicol App Pharmacol.* 138 (1) : 1-11.
- Pilette, C., Ouadrhiri, Y., Godding, V., Vaerman, J. P., Sibille, Y. 2001. Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. *Eur Respir J.* 18 (3) : 571-588.
- Poole, J. A., Gleason, A. M., Bauer, C., West, W. W., Alexis, N., van Rooijen, N., Reynolds, S. J., Romberger, D. J., Kielian, T. L. 2012. CD11c+/CD11b+ Cells Are Critical for Organic Dust Elicited Murine Lung Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47 (5) : 652–659.
- Pribila, J. T., Itano, A. A., Mueller, K. L., Shimizu, Y. 2003. The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha E\beta 7$ Integrins Define a Subset of Dendritic Cells in Peripheral Lymph Nodes with Unique Adhesive and Antigen Uptake Properties. *J Immunol.* 172 (1) : 282-291.
- PROAIRE: Secretaría de Ecología Gobierno del Estado de México, Secretaría de Medio Ambiente Gobierno del Distrito Federal, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Secretaría de Salud. 2002. Programa para mejorar la calidad del aire ZMVM 2002-2010. http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/gestion-ambiental-aire-memoria-documental-2001-2006/descargas/proaire_2002-2010.pdf
- Qualai, J., Li, L., Cantero, J., Tarrats, A., Fernández, M. A., Sumoy, L., Rodolosse, A., McSorley, S. J., Genescà, M. 2016. Expression of CD11c Is Associated with Unconventional Activated T Cell Subsets with High Migratory Potencial. *PLoS ONE.* 11 (4) : 22 pages.
- Rescigno, M. 2015. Dendritic Cell functions: Learning from microbial evasion strategies. *Semin Immunol.* 27 (2) : 119-124.
- Rheder, D., 2003. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg Chem Commun.* 6 (5) : 604-617.

- Roa, X., Patel, P., Puett, R., Rajagopalan S. 2015. Air Pollution as a Risk factor for Type 2 Diabetes. *Toxicol Sci.* 143 (2) : 231-241.
- Rodríguez-Mercado, J. J., Altamirano-Lozano, M. 2006. Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev Int Contam Ambient.* 22 (4) : 173-189.
- Rondini, E. A., Walters, D. M., Bauer, A. K. 2010. Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner. *Part Fibre Toxicol.* 7 (9) : 13 pags.
- Ross, M. H., Pawlina, W. 2007. *Histología Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular.* Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 5ª edición.
- Sadhu, C., Ting, H. J., Lipsky, B., Hensley, K., García-Martínez, L. F., Simon, S. I., Staunton, D. E. 2007. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol.* 81 (6) : 1395-1403.
- Sankar, J. M., Gosh, B., Rana, A., Chatterjee, M. 2006. Suppression of cell proliferation induction of apoptosis and cell cycle arrest: Chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer.* 120 (1) : 13-23.
- Schneeberger, E. E., Vu, Q., LeBlanc, B. W., Doerschuk, C. M. 2000. The accumulation of Dendritic Cells in the Lung is Impaired in CD18-/- But Not in ICAM-1-/- Mutant Mice. *J Immunol.* 164 (5) : 2472-2478.
- Schraml, B. U., y Sousa, C. R. 2015. Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 32 : 13-20.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Ginhoux, F. 2015. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin Cell Dev Biol.* 41 (2) : 9-22.
- Schultze, J. L., Freeman, T., Hume, D. A., Latz, E. 2015. A transcriptional perspective on human macrophage biology. *Semin Immunol.* 27 (1) : 44-50.
- SEDESOL, CONAPO, INEGI. 2012. *Delimitación de las zonas metropolitanas de México 2010.* México. Secretaría de Desarrollo Social, Consejo Nacional de Población e Instituto Nacional de estadística y Geografía. 216 págs.
- SEMARNAT. 2013. *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental.* México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Edición 2012. 382 págs.

- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Avellana, P., Mantovani, A. 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 18 (5) : 349-355.
- SIMAT. 2015. *Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2014*. www.aire.df.gob.mx. Revisado en mayo del 2017.
- Singh-Jasuja, H., Thilat, A., Ribon, M., Boissier, M., Bessis, N., Rammensee, H., Decker, P. 2012. The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology.* 218 (1) : 28-39.
- SMA-GDF, RAMA. 2005. *Informe climatológico ambiental del Valle de México 2005*. México. Secretaría de Medio Ambiente, Gobierno del Distrito Federal y Red Atmosférica de Monitoreo Ambiental. 198 págs.
- SMA-GDF. 2008. *Inventario de Emisiones de Contaminantes Criterio de la ZMVM 2006*. México. Secretaría de Medio Ambiente y Gobierno del Distrito Federal. 160 págs.
- SMA-GDF. 2013. *Inventario de Emisiones Contaminantes y de Efecto Invernadero. Zona Metropolitana del Valle de México 2012*. México. Secretaría de Medio Ambiente y Gobierno del Distrito Federal. 122 págs.
- Tsirogianni, A. K., Moutsopoulos, N. M., Moutsopoulos, H. M. 2006. Wound healing: Immunological aspects. *Injury.* 37 (1) : S5-S12.
- Turpin, E. A., Antao-Menezes, A., Cesta, M. F., Mangum, J. B., Wallace, D. G., Bermudez, E., Bonner, J. C. 2010. Respiratory syncytial virus infection reduces lung inflammation and fibrosis in mice exposed to vanadium pentoxide. *Respir Res.* 11 (20) : 11 págs.
- Ustarroz-Cano, M., Garcá-Peláez, I., Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M., Soldevila, G., Fortoul, T. I. 2012. CD11c decrease in mouse thymic dendritic cells after vanadium inhalation. *J Immunotoxicol.* 9 (4) : 374-380.
- Valladeau, J. y Saeland, S. 2005. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* 17 (4) : 173-83.
- Vallejo, M., Jáuregui-Renaud, K., Hermosillo, A. G., Márquez, M. F. y Cárdenas, M. 2002. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gac. Med. Mex.* 139 (1) : 57-63.

- Veres, T. Z., Voedisch, S., Spies, E., Valtonen, J., Prenzler, F., Braun, A. 2013. Aeroallergen Challenge Promotes Dendritic Cell Proliferation in the Airways. *J Immunol.* 190 (3) : 897-903.
- Villadangos, J. A., Heath, W. R. 2005. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol.* 17 (4) : 262-272.
- Von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J. A., Stricklad, D. H., Holt, P. G., Stumbles, P. A. 2005. Anatomical Location Determines the Distribution and Function of Dendritic Cells and Other APCs in the Respiratory Tract. *J Immunol.* 175 (3) : 1609-1618.
- Voss Condon, T., Sawyer, R. T., Fenton, M. J., y Riches, D. W. H. 2011. Lung dendritic cells at the innate-adaptive immune interface. *J Leukoc Biol.* 90 (5) : 883-895.
- Waters, M. D., Gardner, D. E., Coffin, D. L. 1974. Cytotoxic Effects of Vanadium on Rabbit Alveolar Macrophages in Vitro. *Toxicol app pharmacol.* 28 (2) : 253-263.
- Wikstrom, M. E., Stumbles, P. A. 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol.* 85 (3) : 182-188.
- Wu, L. y Dakic, A. 2004. Development of Dendritic Cell System. *Cell Mol Immunol.* 1 (2) : 112-118.
- Wu, L. y Liu, Y. J. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 26 (6) : 741-50.
- WHO. 2006. Air Quality Guidelines, Global Update 2005. Particulate matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide. <http://www.euro.who.int/pubrequest>.
- WHO. 2016. Ambient Air Pollution: a global assessment of exposure and burden of disease. WHO library Cataloguing-in-Publication Data. <http://www.who.int>.
- Xia, I., Gu, W., Zhang, M., Chang, Y., Chen, K., Bai, X., Yu, L., Li, J., Li, S., Xing, G. 2016. Endocytosed nanoparticles hold endosomes and stimulate binucleated cells formation. *Part Fibre Toxicol.* 13 (63): 12 págs.
- Xing, Y, Zhao, S., Zhou, B. P. y Mi, J. 2015. Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment. *FEBS J.* 282 (20) : 3892-8.
- Zhang, Z., Huang, C., Li, J., Shi, X. 2002. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg Biochem.* 89 (18) : 142-148.

Zuk, M., Tzinzun, C. M. G. y Rojas, B. L. 2007. *Tercer Almanaque de Datos y Tendencias de la Calidad del Aire en nueve Ciudades Mexicanas*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. CDMX, México. 116 págs.