



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO NITROSANTE EN TIMO DE RATÓN POR
LA INHALACIÓN DE VANADIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

LÓPEZ ÁNGEL MARISOL



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARTHA LUZ USTARROZ CANO
CIUDAD DE MÉXICO, 2020**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

López

Ángel

Marisol

5521355451

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312277587

2. Datos del tutor

Dra.

Martha Luz

Ustarroz

Cano

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Teresa Imelda

Fortoul

Van der Goes

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Marcela

Rojas

Lemus

5. Datos del sinodal 4

Dra.

Patricia

Rivas

Manzano

6. Datos del sinodal 5

Dra.

María Isabel

García

Peláez

7. Datos del trabajo escrito.

Efecto nitrosante en timo de ratón por la inhalación de vanadio

67

2020

AGRADECIMIENTOS

A nuestra máxima casa de estudios UNAM que ha sido mi segundo hogar todos estos años y que me ha brindado tantas oportunidades.

A mi hermosa Facultad de Ciencias por encaminar mi formación profesional y por tantas aventuras dentro y fuera de esos pasillos.

A la Facultad de Medicina por abrirme sus puertas y dejarme continuar mi formación como bióloga al permitir la realización de esta tesis.

A mi tutora, la Dra. Martha Luz Ustarroz Cano por su guía y esfuerzo en el desarrollo de esta tesis, ya que gracias a todos sus consejos y su conocimiento logramos obtener este trabajo.

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes por el apoyo brindado desde que llegamos al taller y durante todo nuestro camino, que siempre fue más placentero con una taza de café, gracias por todo el conocimiento compartido.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Marcela Rojas Lemus, Dra. Patricia Rivas Manzano y Dra. María Isabel García Peláez, gracias por todas las correcciones que permitieron tener una mejor versión de este trabajo y que enriquecieron mi aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A todos y cada uno de los miembros de mi familia, quienes me llevarían páginas y páginas mencionar, en especial a mi madrina Amira, mis tías y tíos Mayita, Cuty, Yoli, Vivian, Antares, Checho y Nancy, a mi tío Luis y mi prima Xime, ustedes son mis raíces y mi más grande soporte siempre.

A los integrantes del laboratorio Nelly, Adri, Marce, Paty, Maru, Brenda, Gaby, Juan Carlos, Paco y Armando, por siempre estar ahí para ayudarnos y guiarnos cuando lo necesitamos, gracias por recibirnos en un ambiente tan alegre y hacer más dulce ésta travesía.

A mis compañeras de taller Fer, Montse, Shamir y Lupita por ser tan buenas compañeras y amigas, en especial Tania, por compartir conmigo tantas risas y conversaciones enriquecedoras.

A mis mejores amigos Joss, Omar, Verito, Anna, Karen, Misael, Fanny, Dahiana, Sammy, Katia y Jesús por hacer mi vida universitaria más feliz, por estar ahí para mí y compartir tantos momentos que siempre llevaré en mi corazón.

A todas mis hula sisters por echarme porras siempre, compartir tantas risas conmigo y enseñarme el trabajo en equipo y el valor de la verdadera amistad ante todo. Gracias a mis maestros por convertirse en mis guías espirituales y mantenerme sana en cuerpo y alma.

A Kiara, quien se convirtió en una de las integrantes más importantes de mi familia, gracias por mantenerme cuerda todo este tiempo y por enseñarme el amor incondicional.

A Kalid, tú amistad fue una parte importante de mi carrera y tú cariño ahora lo es en mi vida, gracias por darme tú apoyo, por impulsarme todo el tiempo a intentar cosas nuevas y superarme cada día.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi padre, tú me impulsaste a ser lo que soy ahora y porque gracias a ti estoy aquí. Eres mi más grande motor y tu cariño y fortaleza me han ayudado a atravesar este camino, gracias por darme tú mano y nunca dejarme caer. Sin ti mi vida no sería lo mismo y agradezco infinitamente todo el amor y las enseñanzas.

A mi mamá, gracias por compartir conmigo el cariño de tú familia y hacerme parte de ella, te recuerdo con mucho cariño e hiciste que me convirtiera en una persona más fuerte.

Para mi sobrina Devanny, gracias por iluminar mi vida con tú llegada y permitirme amar con tanta fuerza. Te acompañare en tú camino y estaré ahí para compartir todos tus logros.

Índice

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Contaminación atmosférica	9
1.2. Contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana del Valle de México. 10	
1.3. Partículas suspendidas totales (PST).....	12
1.4. Vanadio (V).....	13
1.5. Antecedentes con el modelo de inhalación	17
1.6. Antecedentes directos	18
1.7. Sistema inmune y su importancia.....	20
1.8. El Timo como parte del sistema inmune.....	24
1.9. Enfermedades autoinmunes y la contaminación atmosférica.....	31
1.10. Radicales libres y estrés oxidante/nitrosante.....	33
1.11. Formación de radicales libres derivados del oxígeno y nitrógeno	34
1.12. Importancia del óxido nítrico (NO) como uno de los principales radicales libres derivados nitrógeno	35
1.13. Funciones de los radicales libres derivados del nitrógeno en condiciones normales.....	36
1.14. Principales efectos tóxicos generados por estrés nitrosante	37
1.15. La producción de la Nitrotirosina (3-NT) y su papel como marcador de estrés nitrosante.....	38

2.	Planteamiento del problema	40
3.	Hipótesis	40
4.	OBJETIVOS	40
4.1.	Objetivo General.....	40
4.2.	Objetivos Particulares.....	40
5.	Material y Métodos	41
5.1.	Modelo biológico.....	41
5.2.	Protocolo de inhalación	41
5.3.	Sacrificio y procesamiento de tejidos	42
5.4.	Inmunohistoquímica para 3-NT	43
5.5.	Densitometría	45
5.6.	Análisis estadístico	46
6.	Resultados	47
7.	Discusión	53
8.	Conclusiones	60
9.	Bibliografía	61

RESUMEN

En la Ciudad de México, la contaminación atmosférica es un problema para la salud y es considerada un factor de riesgo para el desarrollo o agravamiento de las enfermedades autoinmunes (EA), las cuales han sido comúnmente asociadas con el aumento de la concentración de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERON). Uno de los contaminantes presentes en la atmósfera es el vanadio, el cual es un metal de transición liberado al ambiente por la actividad industrial y por la quema de combustibles fósiles. Los estudios del grupo de Fortoul y colaboradores, han reportado efectos adversos en diferentes órganos por la inhalación de vanadio y sus compuestos, un ejemplo es el timo, el cual es uno de los principales órganos implicados en la regulación del sistema inmune. En este órgano se reportó un cambio en el número de células dendríticas y células epiteliales tímicas medulares, así como alteraciones en su morfología, mediante un modelo de inhalación subaguda a vanadio en ratones. Una de las causas podría ser el estrés nitrosante, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el estrés nitrosante mediante el marcador 3-nitrotirosina (3-NT) en el timo de ratón por la inhalación subaguda de vanadio. Para este estudio se utilizaron 40 ratones machos de la cepa CD-1 de 4-6 semanas de edad. 20 como el grupo control inhalaron solución salina al 0.9% y 20 del grupo experimental inhalaron V_2O_5 al 0.02M (con una concentración en caja de 2.57mg/m^3 V), 1h, 2 veces por semana durante 4 semanas. Se realizó inmunohistoquímica para identificar la 3-NT y se realizó un análisis de varianza ANOVA (*post hoc* Tukey) con un nivel de significancia estadística de $p \leq 0.05$. Se observaron células 3-NT+ en corteza y en médula de ratones control y experimentales. La 3-NT+ incrementó significativamente a partir de la semana 2 con respecto al control. La inhalación de vanadio produjo un aumento de estrés nitrosante en el timo, el cual podría incidir en el deterioro de la respuesta inmune.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica, se define como cualquier modificación indeseable del ambiente causada por la introducción de agentes físicos, químicos o biológicos en cantidades superiores a las naturales, de modo que excede la capacidad de los procesos naturales de la atmósfera para transformarlos, afectando el bienestar humano, así como cualquier componente del ecosistema. Esta puede ser clasificada según su origen por causas naturales y antropogénicas (Romero *et al.*, 2006; Oyarzún, 2010).

La contaminación atmosférica antropogénica, se refiere a la causada por la actividad humana y es la que más atención ha tenido debido a que es un problema que ha venido acompañando al ser humano desde tiempo atrás y la cual se ha visto en aumento en las últimas décadas (Rosales-Castillo *et al.*, 2001). Gran parte de esta problemática, es la consecuencia de un rápido y descontrolado crecimiento urbano que lleva a la industrialización. Siendo así la contaminación atmosférica, un factor al que se le atribuyen diversos problemas en la salud humana, así como perturbaciones irreversibles en el equilibrio ecológico (Lacasaña-Navarro *et al.*, 1999).

En los países latinoamericanos el proceso de urbanización ha aumentado significativamente durante el siglo XX. La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es una de las ciudades que ha presentado niveles altos de contaminación en el aire y para sus habitantes la exposición continua a estos contaminantes por largos periodos de tiempo, es un fenómeno que se presenta cotidianamente (Rosales-Castillo *et al.*, 2001).

La exposición a la contaminación atmosférica incrementa la incidencia de una amplia gama de enfermedades en los habitantes de la ZMVM, las cuales pueden tener efectos tanto a corto como a largo plazo. Se ha estimado que la contaminación representa una fracción significativa de la mortalidad a nivel mundial, debido a

enfermedades cardiovasculares como causa más común de muerte, seguida de las enfermedades respiratorias y el cáncer (Pozzer *et al.*, 2019). A nivel mundial, se estimaron 7 millones de muertes prematuras por exposición a la contaminación del aire en el año 2012 y la mayor parte de estas fueron en países en desarrollo (Kumar y Attri, 2016).

1.2. Contaminación atmosférica en la Zona Metropolitana del Valle de México

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) cuenta con ciertas características que favorecen la contaminación atmosférica. Esto debido a que es una cuenca hidrológica situada a 2,240m sobre el nivel del mar y rodeada por montañas, por lo que la concentración de oxígeno se ve disminuida en un -23% en relación con el nivel del mar. De igual manera, la dirección de los vientos provoca una mayor concentración de los contaminantes en la zona sur de la ciudad, zona en la que se obstaculiza su disipación a causa de la sierra del Ajusco (Vallejo *et al.*, 2003).

Estas características convierten a la población de la ZMVM en una población susceptible, por presentar altos niveles de contaminación atmosférica y pertenecer a un país en desarrollo. Las principales fuentes de contaminación atmosférica son el uso de vehículos automotores y la industria, los cuales queman grandes cantidades de combustibles fósiles, liberando al ambiente diversas partículas capaces de causar efectos nocivos en las poblaciones, esto lo podemos ver representado en la figura 1 (Lacasaña-Navarro *et al.*, 1999).

La creciente urbanización y el consecuente aumento industrial y del parque vehicular, que a su vez resultan en desechos poblacionales tóxicos para la vida, siguen aumentando progresivamente, se calculan 21 millones 581,000 habitantes en la Ciudad de México, población que continuara expandiéndose con un estimado de 24 millones 490,000 habitantes para el 2035, según la Revisión 2018 de las Perspectivas de Urbanización Mundial de la ONU.

En la Ciudad de México se han identificado una gran cantidad y variedad de contaminantes con efectos adversos para la salud humana y para los cuales se han establecido normas de concentraciones permisibles en la atmósfera. Aquí encontramos al ozono (O_3), el monóxido de carbono (CO), el bióxido de azufre (SO_2), el bióxido de nitrógeno (NO_2), el plomo (Pb) y las partículas suspendidas totales (PST), (Vallejo *et al.*, 2003).

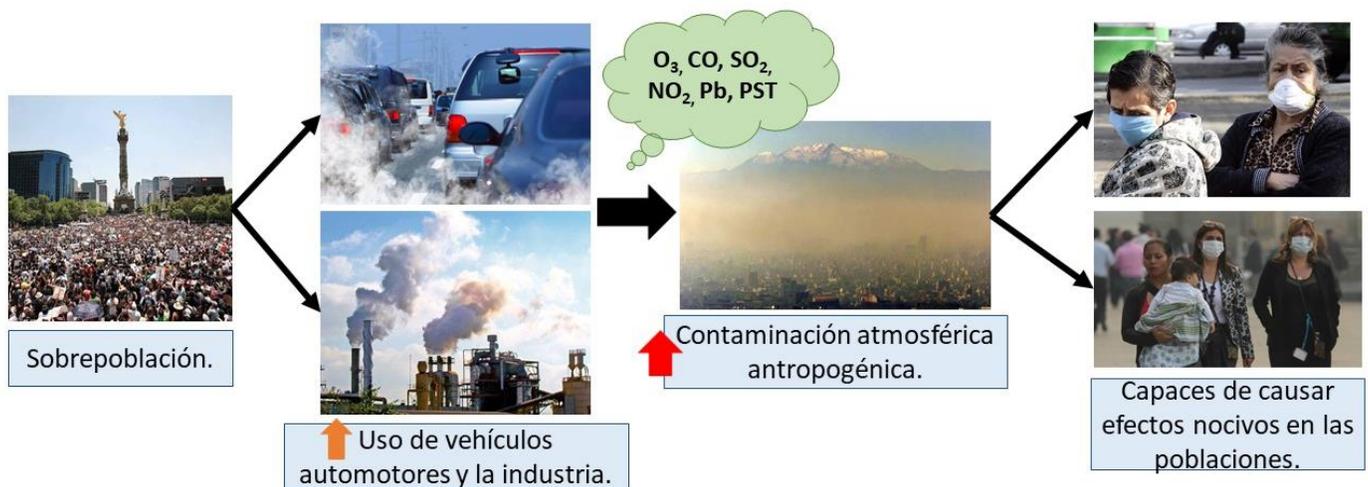


Figura 1. Esquema de la problemática que representa la contaminación atmosférica en la ZMVM.

1.3. Partículas suspendidas totales (PST)

Uno de los principales contaminantes, debido a su relación con el incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad, son las partículas suspendidas (PS), también conocidas como material particulado (PM) (Lacasaña-Navarro, *et al.*, 1999). Las cuales consisten en núcleos de carbón a los cuales se adosan compuestos como hidrocarburos aromáticos, gases, polvos, iones, material biológico y metales de transición (Fortoul *et al.*, 2009).

El PM proviene de una mezcla compleja de partículas sólidas y líquidas que se liberan en el aire durante la combustión de carbón, madera, gasolina, diésel o combustibles fósiles, así como de fuentes naturales como incendios forestales, emisiones volcánicas y la erosión del suelo y se clasifican de acuerdo a su diámetro aerodinámico (Gawda *et al.*, 2017).

El PM se clasifica en: partículas gruesas; aquellas con un diámetro aerodinámico menor de 10 μm y mayor de 2.5 μm (PM_{10}), partículas finas; con un diámetro igual o menor a 2.5 μm ($\text{PM}_{2.5}$) y las partículas ultrafinas; que tienen un diámetro menor de 1 μm ($\text{PM}_{1.0}$), en la figura 2 podemos observar una comparación en el tamaño de sus diámetros con algunos ejemplos (Vallejo *et al.*, 2003). Cabe destacar, que las partículas finas suelen ser más tóxicas que las más burdas, esto debido a que tienen mayor posibilidad de ingresar al espacio alveolar y de ahí a la circulación. Y se encuentran asociadas a un incremento en las enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Fortoul y Rojas-Lemus, 2007).

Las poblaciones sometidas a una exposición prolongada del material particulado han mostrado una exacerbación en los síntomas respiratorios, disminución de la función pulmonar y uso recurrente de atención médica. La Organización Mundial de la Salud estima que la concentración de $\text{PM}_{2.5}$ contribuye aproximadamente a 800,000 muertes prematuras por año, lo que la sitúa como la 13^a causa de mortalidad en el mundo (Anderson *et al.*, 2012).

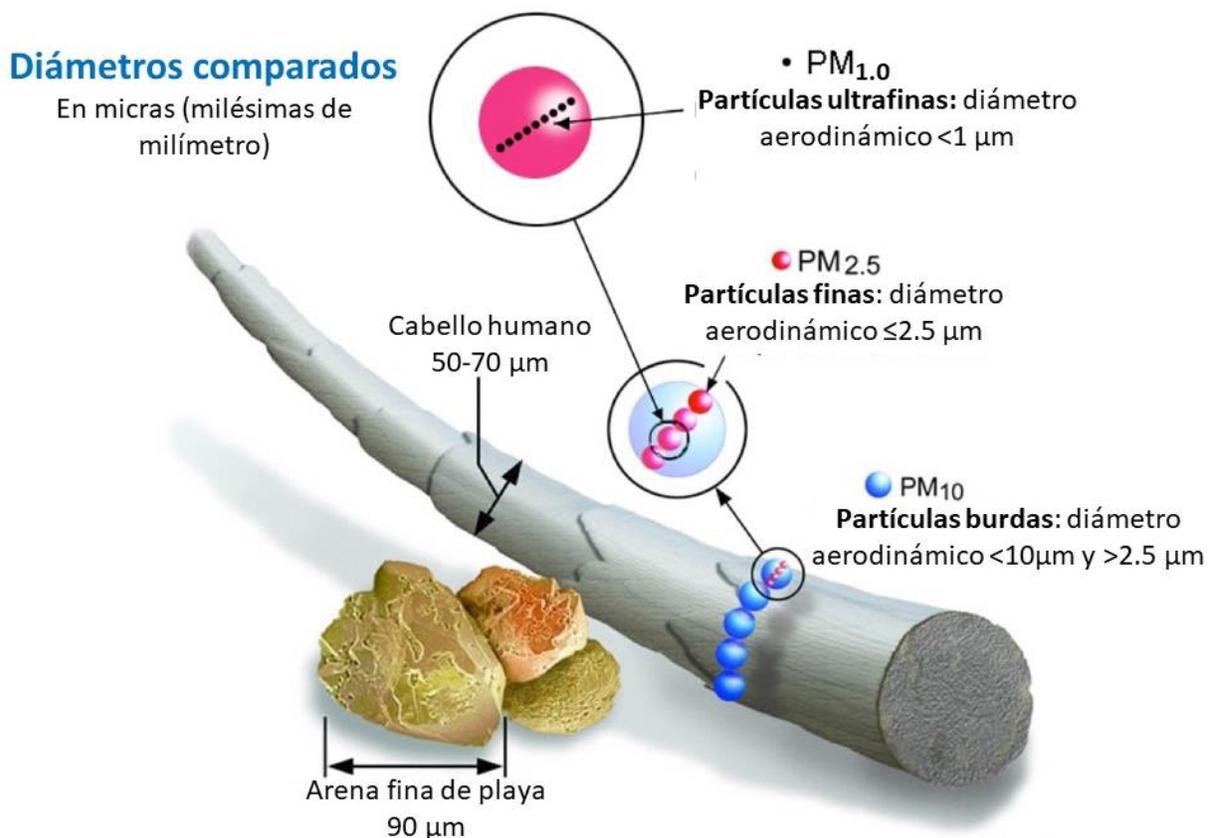


Figura 2. Comparación del tamaño de las partículas suspendidas con un cabello humano y un grano de arena fina de playa en micras (imagen modificada de Greenhub, 2017).

1.4. Vanadio (V)

Uno de los contaminantes atmosféricos adosado a las partículas finas (PM_{2.5}), es el vanadio. El vanadio es un elemento de transición color grisáceo con número atómico 23 que podemos encontrar en la corteza terrestre con una presencia del 0.014% al 0.02%. Participa en la síntesis de clorofila de organismos fotosintéticos y como micronutriente de varias especies marinas y terrestres, aunque su requerimiento en humanos aún no ha sido demostrado (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Sus estados de oxidación van del -1 al +5, pasando

generalmente de un estado a otro por la transferencia de un electrón a través de reacciones de óxido-reducción y su toxicidad aumenta conforme aumenta la valencia y de los cuales, el pentóxido de vanadio (V_2O_5) es uno de los compuestos más tóxicos, así como más abundantes. El V_2O_5 es una sal de color amarillo-rojizo con punto de ebullición de $690^\circ C$ y se considera un agente químico peligroso (Ustarroz-Cano *et al.*, 2012), en la figura 3 podemos observar una imagen del V_2O_5 .



Figura 3. Pentóxido de vanadio, V_2O_5 (Imagen tomada de Made-in-China, 2019).

El vanadio lo podemos encontrar en grandes cantidades en forma de complejos metálicos y organometálicos en todos los petróleos crudos y materiales de origen fósil, mientras que en el gas natural se encuentra en muy pequeñas cantidades. Su concentración en los petróleos es muy variable; sin embargo, en los países latinoamericanos ésta suele ser más alta, con niveles de $243 \mu g/g$ para México y de 282 a $1,180 \mu g/g$ para Venezuela.

El vanadio es liberado a la atmósfera principalmente por la actividad humana, por lo que es considerado un contaminante ambiental. Aquí encontramos que el 91% del vanadio en el ambiente, es producto de la actividad industrial, la combustión del petróleo, de carbón y de aceites pesados y el resto se deriva de la erosión del suelo, emisiones volcánicas e incendios forestales.

Los niveles de vanadio en la atmósfera dependen de ciertos factores, como las condiciones climáticas, la posición geográfica y las condiciones de urbanización como se mencionó anteriormente. En la Ciudad de México, se han reportado valores que alcanzan $0.114 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en aeropartículas de $10 \mu\text{m}$ y $0.093 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en las de $2.5 \mu\text{m}$, estos datos coinciden con los niveles de vanadio encontrados en localidades con intensa actividad industrial de Europa y Estados Unidos de América (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Para la población, la principal vía de exposición a este contaminante es a través del sistema respiratorio, o sea, por vía inhalada, aunque también puede entrar mediante el tracto gastrointestinal y a través de la piel. El 10% del vanadio ingerido y el 25% del vanadio inhalado es absorbido, mientras que en la piel su absorción es mínima y se da más por una exposición laboral, posteriormente entra al sistema circulatorio y es capaz de distribuirse a los diferentes órganos y tejidos (Mukherjee *et al.*, 2004).

Una vez que el vanadio es absorbido, se puede encontrar en los estados de oxidación III, IV y V. Es transportado por la albúmina y por la transferrina, se conoce que el V^{V} entra a la célula por mecanismos de transporte aniónico como los canales de fosfato. Se acumula exclusivamente como V^{VI} (VO^{2+}) en hígado, riñón, hueso y bazo, así como en pulmones y testículos en menor cantidad. Otros órganos en los que se ha detectado vanadio son corazón, tiroides, cerebro, músculo esquelético, médula ósea y tejido graso (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Se ha demostrado que el vanadio en los estados de oxidación IV y V es capaz de interactuar en concentraciones de micromoles (μM) con moléculas orgánicas como proteínas, péptidos, aminoácidos, nucleótidos y azúcares. En las células, el vanadio tiene preferencia por los grupos fosfato, carboxilo y amino de las biomoléculas. Una vez que el vanadio es absorbido, se desecha rápidamente por riñones o a través de

la bilis y es excretado vía orina o por las heces. En la orina, la cinética de eliminación del vanadio sigue un comportamiento bifásico, debido a que es excretada la mayor cantidad en las primeras 20 hrs y de 40 a 50 días se excreta el resto. (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Esto se puede ver ejemplificado en el esquema de la figura 4, el cual representa la entrada del vanadio a la circulación por la vía inhalada.

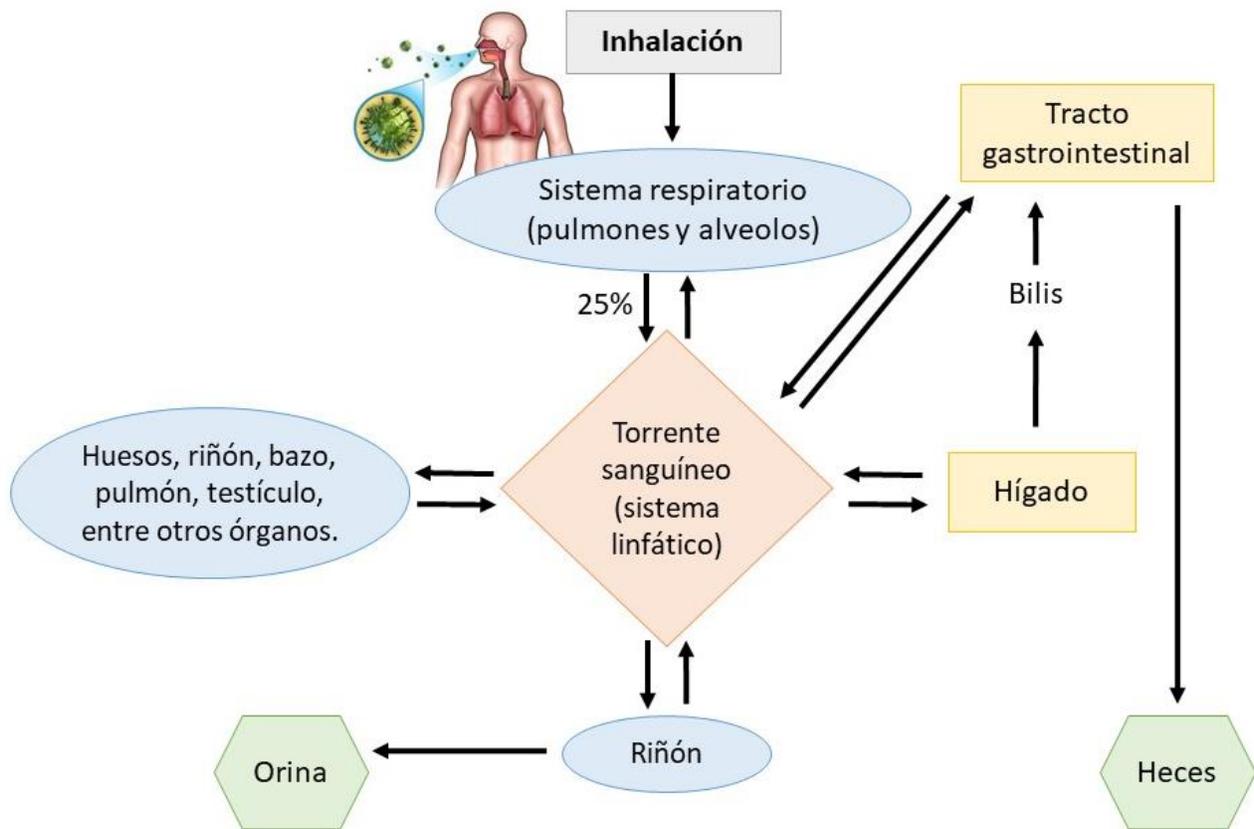


Figura 4. Principal vía de exposición al vanadio y su toxicocinética (esquema modificado de Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

1.5. Antecedentes con el modelo de inhalación

Diversos estudios han encontrado efectos tóxicos a causa del vanadio o sus compuestos en una variedad de sistemas y órganos. Tales como alteraciones en la membrana celular de los hepatocitos por daño oxidativo (destrucción oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana celular) e infiltrado inflamatorio en hígado, así como un incremento en el número de células binucleadas con meganúcleo y modificaciones que indican actividad regenerativa (Fortoul *et al.*, 2011).

Con respecto a la toxicidad pulmonar, se observó que la inhalación de vanadio causó un aumento en las citoquinas (IL-6 y TNF- α) del epitelio bronquiolar en ratones que llevó a un engrosamiento de la capa muscular bronquiolar. Así como cambios en el núcleo de células bronquiales no ciliadas (NCBC) y células ciliadas que tenían un aspecto de pseudoinclusiones (Fortoul *et al.*, 2011).

Otros estudios demostraron deterioro de la función pulmonar, abundancia de células inflamatorias en el lavado bronquiolar y cambios fibróticos en pulmones de primates y roedores. En los seres humanos, la exposición en lugares de trabajo accidental o involuntaria se ha asociado con respuestas inflamatorias en el tracto respiratorio como bronquitis, neumonía, rinitis y faringitis (Fortoul *et al.*, 2011).

De igual forma, se ha determinado neurotoxicidad a causa del vanadio debido a la alta vulnerabilidad del sistema nervioso central ante el estrés oxidante. Se han reportado alteraciones funcionales, citológicas y ultraestructurales en bulbo olfatorio, corteza motora, hipocampo, sustancia *nigra*, el estriado y en el epitelio endimario. En las células granulares del bulbo olfatorio, se detectó una disminución de la densidad de las espinas, así como alteraciones asociadas a disfunción olfatoria (Fortoul *et al.*, 2014).

Este modelo de estudio mostró también daños en el sistema dopaminérgico nigroestriatal, que se vieron reflejados en una disminución en el número de neuronas inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa en la sustancia *nigra* compacta

y pérdida de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas de tamaño mediano en el estriado de ratones expuestos (Fortoul *et al.*, 2014).

En el hipocampo se observaron alteraciones morfológicas y funcionales en neuronas piramidales CA1 y en células granulares, como disminución de las espinas dendríticas y necrosis de células granulares y piramidales. Mientras que en la barrera hematoencefálica se observó la pérdida de cilios en el cuarto ventrículo, desprendimiento de células y disolución de las uniones estrechas entre células endodiales y la membrana basal (Fortoul *et al.*, 2014).

Se han reportado cambios ultraestructurales en testículos de ratones por exposición a vanadio (V_2O_5), como necrosis de espermatogonias, espermatocitos y células de Sertoli. Se observaron alteraciones en la espermatogénesis, bajo recuento de espermatozoides, así como disminución en su motilidad y un aumento en la frecuencia en las anomalías morfológicas que sugieren daño al citoesqueleto. Estos daños se han reflejado en la disminución de la gamma-tubulina y en menor medida la actina en células de Sertoli, Leydig y células germinales (Fortoul *et al.*, 2011).

1.6. Antecedentes directos

Además de estos efectos tóxicos a los órganos mencionados, se ha observado que el vanadio también es capaz de afectar órganos relacionados con el sistema inmune. González-Villalva y colaboradores (2006), reportaron un aumento en el número de los neutrófilos, monocitos, así como de las plaquetas. Con respecto a la morfología, se observaron alteraciones en el tamaño, forma y color de los eritrocitos, presencia de micronúcleos y células eritroides inmaduras. En el timo, se observó necrosis de linfocitos con edema de organelos (mitocondrias, retículos, aparato de Golgi) e infiltrado inflamatorio (con macrófagos y neutrófilos), pérdida de la relación corteza-médula y presencia de nódulos linfoides con células plasmáticas y linfocitos con características atípicas. En médula ósea se observó el aumento del número y del tamaño de los megacariocitos, así como el aumento en la lobulación nuclear de

los mismos (poliploidía), relacionado con el aumento plaquetario observado en sangre periférica y con el daño endotelial en vasos sanguíneos (González-Villalva *et. al.*, 2006)

Piñón-Zárate y colaboradores (2008), observaron que el vanadio provoca hiperplasia en centros germinales de bazo, debido al aumento de células CD19+ (linfocitos B), así como supresión de la respuesta inmune humoral y un aumento en el número y tamaño de megacariocitos con la pulpa roja pobremente delimitada.

González-Villalva y colaboradores (2011), observaron un aumento de JAK2 y STAT3 en megacariocitos en ratones expuestos a vanadio, células precursoras de plaquetas. Así como una disminución en el receptor para el gen *Mpl*, el cual es el gen encargado de la producción de la proteína trombopoyetina, proteína encargada de controlar a su vez la producción de plaquetas. En este mismo estudio se reportó una inhibición en la agregación plaquetaria a las 4 semanas de exposición, la cual se revertía a las 8 semanas de exposición y en el periodo post-exposición.

Ustarroz-Cano y colaboradores (2011), reportaron cambios en la morfología del timo de ratones, en el cual se observó una distribución irregular de la médula a través de los lóbulos tímicos, la cual ocupaba a su vez una menor área. Ustarroz-Cano y colaboradores (2012), observaron una disminución en la presencia y en la expresión del CD11c, marcador de células dendríticas (CDs) y del MHCII, marcador de células presentadoras de antígeno, en la médula del timo, así como una disminución en el porcentaje de CDs (CD11c+ MHCII+) tímicas medulares en el timo de ratones expuestos a Vanadio (específicamente V_2O_5) a una concentración de 0.02M.

Finalmente, Ustarroz-Cano y colaboradores (2017), observaron la desorganización en la citoarquitectura tímica del ratón, la distribución errática de la expresión de la citoqueratina 5 (K5⁺), marcador para células epiteliales tímicas medulares, así como un incremento en la expresión del marcador K5⁺, el cual aumentaba después de 1 semana, lo que sugiere que pueda afectar el proceso de selección negativa y provocar alteraciones en la inmunidad.

En el estudio de Ustarroz Cano y colaboradores 2017 se observó que no hubo cambios significativos en el peso del timo entre los ratones control y los expuestos a la inhalación de vanadio durante las cuatro semanas de experimentación. Todos los efectos mencionados se observaron en ratones machos de la cepa CD-1 de 4-6 semanas de edad, utilizando el modelo de inhalación a vanadio del grupo descrito por Fortoul y colaboradores (2011).

Estos antecedentes nos indican que el vanadio es un contaminante ambiental capaz de dañar una variedad de órganos y tejidos, así como tiene diversos efectos adversos en los órganos implicados en la generación y mantenimiento del sistema inmune.

1.7. Sistema inmune y su importancia

El sistema inmune es el que nos permite discriminar entre lo propio y lo no-propio, así como es el principal sistema de defensa contra los microorganismos patógenos. Comprende una serie de factores humorales y celulares que actúan en conjunto y que no solo le permiten la defensa del huésped, si no que están involucrados en desarrollo, homeostasis y reparación de los tejidos (Sattler, 2017).

Las diversas células y proteínas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune y la respuesta orquestada para defenderse de sustancias extrañas (no-propias) se conoce como la respuesta inmune. La respuesta inmune se puede dividir en innata y adaptativa según la velocidad y la especificidad de la reacción (Tomar y De, 2014).

La respuesta innata es con la que nacemos, ésta incluye cuatro tipos de barreras defensivas; la anatómica como la piel y las membranas mucosas que recubren la nariz, garganta y tracto gastrointestinal, la fisiológica que comprende la temperatura y el pH, la fagocítica en la cual actúan células como los neutrófilos, macrófagos y monocitos de la sangre y la inflamatoria por proteínas séricas. Algunas otras células que forman parte del sistema inmune innato son las células *Natural Killers*,

mastocitos, basófilos, las células dendríticas, y los eosinófilos. Estas se consideran la primera línea de defensa ya que proveen una respuesta inmediata del hospedero (Parkin y Cohen 2001; Tomar y De, 2014).

El sistema inmune adaptativo es aquel que desarrollamos a lo largo de nuestra vida y consiste en reacciones de antígenos específicas a través de dos tipos de respuestas. La humoral, que está mediada por macromoléculas que se encuentran en los fluidos extracelulares, en este tipo de respuesta actúan los linfocitos B y está mediada por anticuerpos, las proteínas del complemento (que también actúan en la respuesta innata) y algunos péptidos antimicrobianos. Y la celular, mediada por la activación de macrófagos, y de linfocitos T, los cuales pueden ser CD4+ o cooperadores y CD8+ o citotóxicos, mediante la liberación de varias citoquinas. Éstas respuestas son muy específicas, pero pueden tardar varios días y semanas en desarrollarse. La respuesta adaptativa tiene memoria, que se refiere a que una exposición posterior lleva a una respuesta más exacta y rápida, pero no inmediata (Parkin y Cohen 2001; Tomar y De, 2014). La división de la respuesta inmune innata y adaptativa se puede ver ejemplificada en la figura 5, así como las diferencias que hay entre cada una de ellas y sus ejemplos.

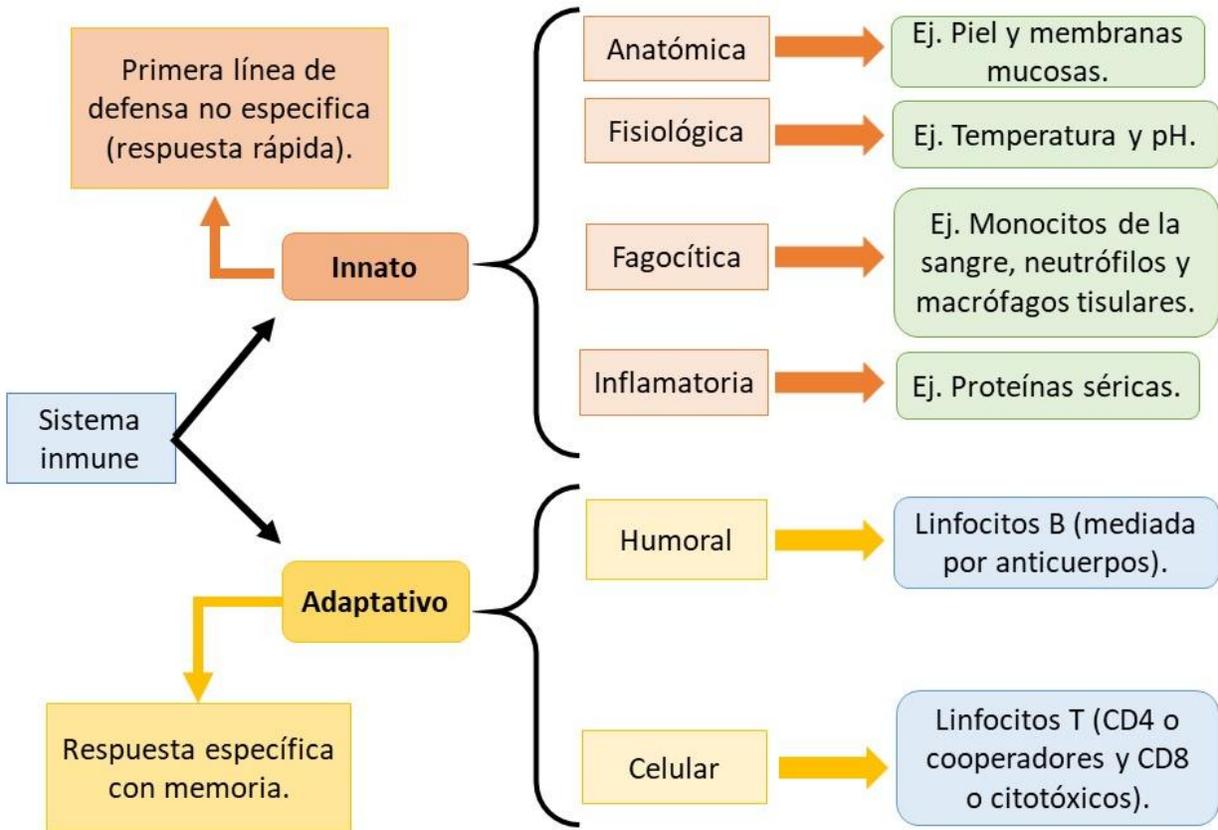


Figura 5. División del sistema inmune con ejemplos de cada uno de ellos (esquema modificado de Tomar y De, 2014).

Las células que forman parte del sistema inmune se organizan en tejidos y órganos linfoides y son la médula ósea, el timo, los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Estos son parte integral del sistema inmune, por lo que los trastornos que los afectan pueden causar inmunodeficiencia (Nosenko *et al.*, 2016).

Los tejidos y órganos linfoides pueden ser clasificados según su función en órganos linfoides primarios, que son aquellos encargados de la producción y maduración de los linfocitos B y T. Aquí encontramos a la médula ósea, encargada de la producción y maduración de los linfocitos B y de la producción de los linfocitos T y el timo, encargado de la maduración de los linfocitos T. Y en órganos linfoides secundarios

o periféricos, cuya función es el reconocimiento de los patógenos y la producción de la respuesta inmune. Aquí encontramos a los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el MALT (Fortoul *et al.*, 2019).

Los órganos linfoides también podemos clasificarlos según su morfología, aquí tenemos a los encapsulados, que son aquellos rodeados por una capa de tejido conectivo como el timo, los ganglios linfáticos y el bazo. Y los no encapsulados, que presentan una capa periférica de tejido conectivo incompleta, como las amígdalas o que carecen completamente de ella como el MALT (Fortoul *et al.*, 2019). Los tipos de clasificación de los tejidos y órganos linfoides pertenecientes al sistema inmune, podemos observarlos en la figura 6.

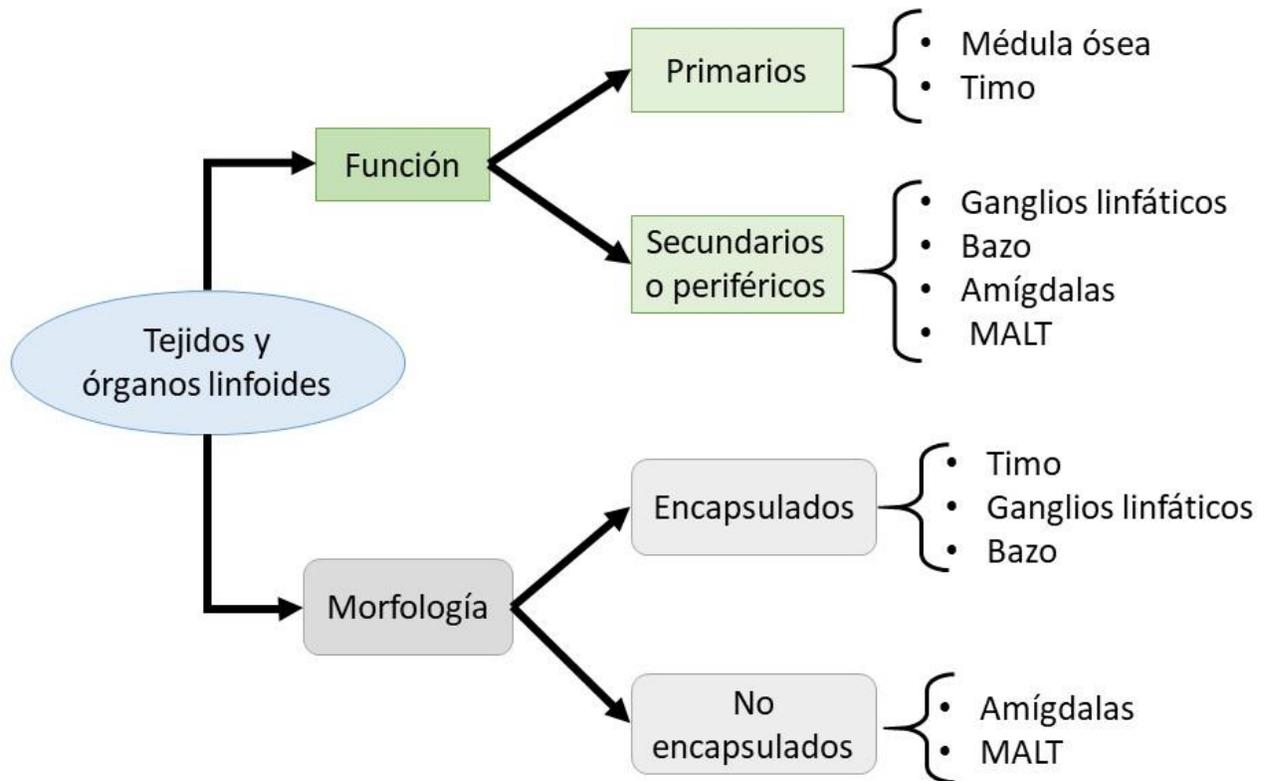


Figura 6. Clasificación de los tejidos y órganos linfoides (esquema modificado de Fortoul *et al.*, 2019).

1.8. El Timo como parte del sistema inmune

El timo es el principal sitio de maduración de las células T, por lo que es uno de los principales órganos implicados en la generación y mantenimiento del sistema inmune, debido a que se encuentra dotado de un amplio repertorio para el reconocimiento de antígenos que permiten la defensa contra infecciones y la eliminación de células malignas. De acuerdo con los antecedentes directos, el vanadio es capaz de afectar su organización, así como algunas de sus poblaciones celulares, debido a esto, el timo es el órgano en el que se enfoca este trabajo.

El timo es un órgano linfoide primario encapsulado por una capa de tejido conectivo denso irregular y bilobulado situado en el mediastino anterosuperior, por arriba del corazón y delante de los grandes vasos. En los ratones, este órgano se encuentra ubicado en la línea media de la columna vertebral, cerca de la base del corazón (Ross y Pawlina, 2007).

Cada lóbulo tímico está dividido a su vez por tabiques fibrosos formando lobulillos incompletos o pseudolobulillos. Éstos se encuentran poblados por linfocitos T en diferentes grados de maduración, conocidos como timocitos. Los lobulillos a su vez, están constituidos por una zona periférica denominada corteza, altamente poblada de timocitos en una fase más inmadura y una zona interna de menor densidad celular que recibe el nombre de médula, aquí se encuentran los timocitos en fases de maduración más avanzadas (Marsán Suárez *et al.*, 2013), en la figura 7 podemos observar un corte histológico del timo teñido con H-E, en el cual podemos apreciar los lobulillos con sus diferentes áreas (corteza y médula) pobladas de diversos tipos celulares.

Además de los timocitos, el estroma del timo está constituido por una red de células, como las células epiteliales, varias subpoblaciones de células dendríticas tímicas y los macrófagos encargados de fagocitar a los timocitos en apoptosis (Castell-Rodríguez *et al.*, 2017).

Las células epiteliales tímicas (CET) son las más abundantes en el estroma tímico y les proporcionan sostén a los timocitos. Actualmente se han descrito seis tipos (tres en la corteza y tres en la médula), según su localización, así como sus características fenotípicas:

- **Células epiteliales tipo I:** Se encuentran en la corteza aislando el parénquima cortical lobulillar tímico de la cápsula de tejido conjuntivo denso, de las trabéculas y de los vasos sanguíneos corticales, por lo que forman parte fundamental de la barrera hematotímica.
- **Células epiteliales tipo II:** Se encuentran en la corteza tímica, poseen máculas adherentes entre sus prolongaciones y expresan grandes cantidades de moléculas clase I y II del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), las cuales son un grupo de glicoproteínas importantes para el reconocimiento de antígenos de los linfocitos T.
- **Células epiteliales tipo III:** Se encuentran en la región cortico-medular y también expresan moléculas de ambos tipos del MHC aislando la corteza del resto del timo.
- **Células epiteliales tipo IV:** Se encuentran en la médula cerca de la región cortico-medular y ayudan a mantener aislada a la corteza, ya que poseen zónulas ocluyentes entre ellas y las células epiteliales tipo III.
- **Células epiteliales tipo V:** Se encuentran distribuidas en la médula y unidas mediante desmosomas formando una red de sostén para los timocitos.
- **Células epiteliales tipo VI:** Se encuentran en la médula formando complejos multicelulares unidos por desmosomas denominados corpúsculos de Hassall o corpúsculos tímicos. Estos representan una característica histológica distintiva para reconocer al timo de otros órganos linfoides y juegan un papel

importante en la maduración de los linfocitos T (Castell-Rodríguez *et al.*, 2010).

La barrera hematotímica es la que impide el contacto de los timocitos corticales en desarrollo con los antígenos que se encuentran circulando en la sangre, esto con el fin de evitar la formación de células autorreactivas a los antígenos propios (Castell-Rodríguez *et al.*, 2010).

Otras células presentes en el timo, son las células dendríticas (CD), mencionadas anteriormente, las cuales son células presentadoras de antígeno importantes en la inmunidad, ya que se encuentran involucradas en la selección negativa de clonas de linfocitos T potencialmente autorreactivos. Existen varias subpoblaciones según su linaje, origen y función:

- **Células dendríticas tímicas plasmacitoides (TpCD):** representan más del 65% de la población de CD tímicas.
- **Células dendríticas tímicas convencionales (TcCD);** representa el 35% de todas las CD tímicas y se han descrito dos subpoblaciones.
 - **TcCDI:** representan al 70% de todas las TcCD y son importantes para el desarrollo de la tolerancia central. Producen Interleucina-12 (IL-12p70) y la Quimiocina Expresada en Timo (TECK) e inducen proliferación de células T dependientes a la Reacción Mixta de Linfocitos (MLR).
 - **TcCDII:** representan al 25% de todas las TcCD y tienen la función de transportar, presentar antígenos periféricos, autoantígenos y posiblemente estén involucradas en la generación de los linfocitos T reguladores (Treg), (Castell-Rodríguez *et al.*, 2010).

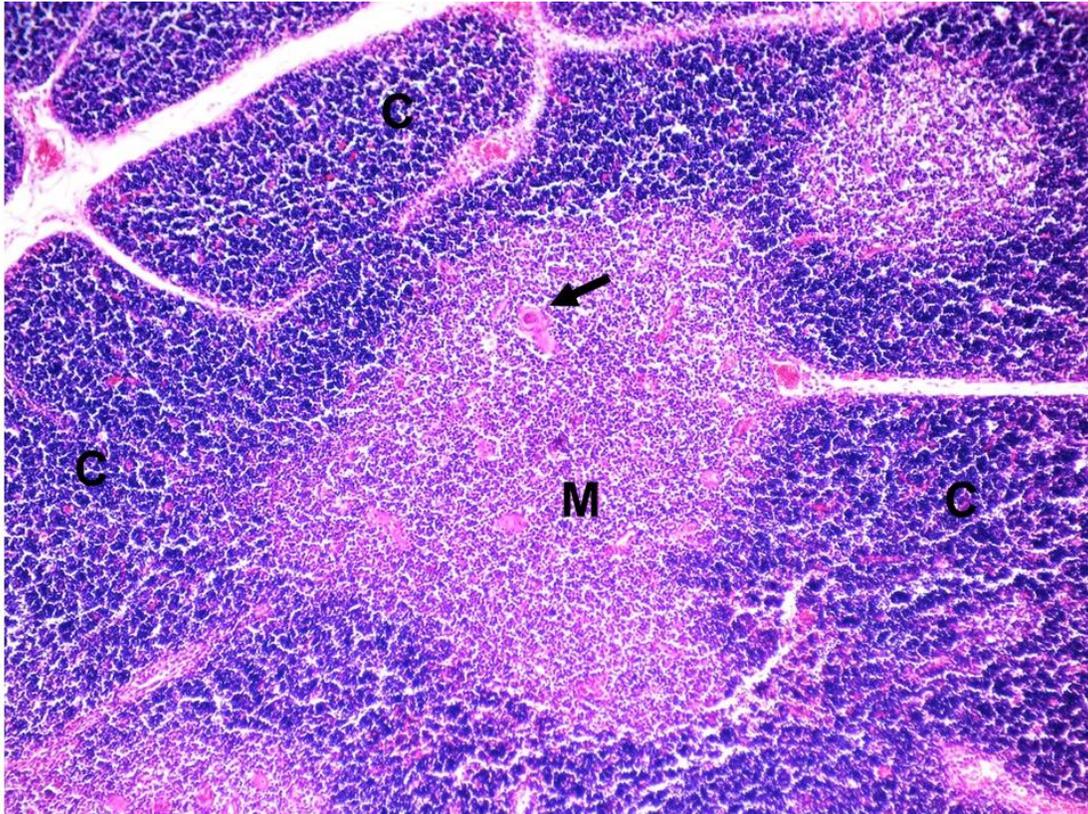


Figura 7. Fotomicrografía de timo. 10x. Teñida con H-E. Se puede observar la médula (M) en el centro rodeada por la corteza (C), la flecha negra señala un corpúsculo de Nasal, representativo de la médula tímica (Imagen proporcionada por la Dra. Ustarroz-Cano, 2019).

El desarrollo de las células T, es un proceso que implica una intercomunicación celular intensiva, en la que una serie de tipos de células estromales, principalmente las células epiteliales y en menor medida células mesenquimales, mieloides y vasculares, proporcionan las señales moleculares necesarias para la supervivencia de los progenitores linfopoyéticos, su adecuada diferenciación, maduración, expansión y selección de los timocitos (Nacka-Aleksić *et al.*, 2019).

Este proceso se divide en tres etapas:

- **Migración y proliferación:** las células pre-T que se originan en la médula ósea viajan hacia el timo, entrando a través de las venas postcapilares de la región corticomedular, aquí reciben el nombre de timocitos (Loyola *et. al.*, 2004).
- **Diferenciación:** los timocitos adquieren moléculas de superficie de las células T maduras con funciones de reconocimiento de antígenos y activación una vez que llegan al timo, con el fin de adquirir la capacidad de ejercer funciones cooperadoras o citolíticas (Loyola *et. al.*, 2004). Aquí encontramos a los dobles negativos (DN) CD4-CD8-, los cuales se dividen en 4 subpoblaciones según la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD25 que han adquirido, estos pueden ser DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+), DN3 (CD44-CD25+) y DN4 (CD44-CD25-). Y estos van a dar lugar a los timocitos llamados dobles positivos (DP) CD4+CD8+, este proceso ocurre en la corteza externa del timo (Castell-Rodríguez *et al.*, 2017).
- **Selección:** los timocitos dobles positivos pasan por dos procesos de selección.
 - La selección positiva; los timocitos DP que hayan generado sus receptores característicos TCR y sean capaces de reconocer moléculas MCH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) propias con una baja avidéz sobreviven y se convertirán en los sencillos positivos (SP) CD4+ o CD8+, esto se lleva a cabo por las células epiteliales tímicas corticales (CETc) en la corteza del timo (Castell-Rodríguez *et al.*, 2017).
 - Y la selección negativa, en la que serán eliminados por apoptosis aquellos timocitos que después de pasar por la selección positiva,

sean autorreactivos, es decir, aquellos que reconozcan con una alta avidéz a las moléculas presentadas por el MCH propio. Este proceso se lleva a cabo principalmente por las células dendríticas (CDs) y las células epiteliales medulares (CETm) en la médula del timo (Castell-Rodríguez *et al.*, 2017).

Tolerancia central: Solo los timocitos maduros que hayan generado autotolerancia, es decir, que no tengan inmunidad a las moléculas propias de cada individuo y que sean capaces de reconocer antígenos, o bien, moléculas extrañas al propio individuo sobreviven. Esta primera eliminación de clonas autorreactivas llevada a cabo en el timo se conoce como tolerancia central y es regulada en parte, por el factor regulador autoinmune (AIRE) expresado por las CETm (Heber *et al.*, 2013).

- **Salida:** Los linfocitos T maduros salen a la circulación, sin embargo, solo un pequeño porcentaje logra completar esta maduración, por lo que solo del 1 al 3% logra salir a la circulación y el 97% restantes muere por apoptosis (Castell-Rodríguez *et al.*, 2017). Los linfocitos T se distribuyen a los diferentes tejidos y órganos linfoides, en los cuales se lleva a cabo la tolerancia periférica, ésta se encarga de que aquellos linfocitos T autorreactivos que logren salir del timo y viajen hacia los órganos linfoides secundarios sean eliminados, con el fin de evitar que causen enfermedades (Heber *et al.*, 2013).

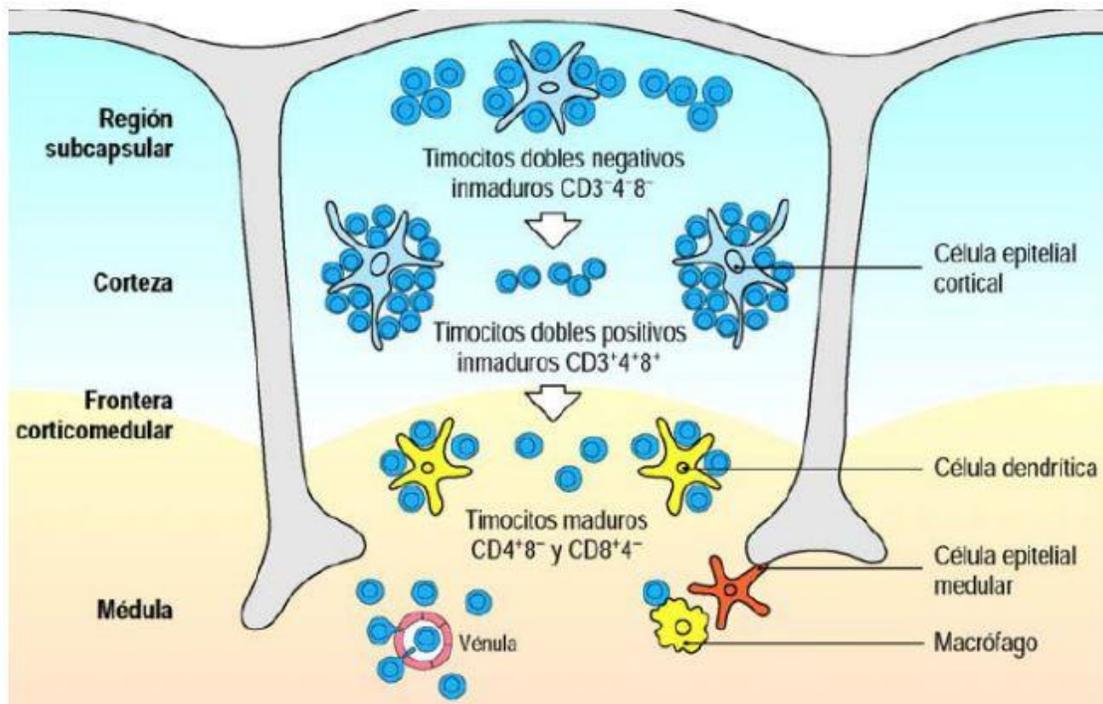


Figura 8. Selección positiva y negativa de los linfocitos T en el timo (imagen tomada de Universidad de Valencia, 2016).

En condiciones normales, el timo disminuye su tamaño, peso y actividad debido en gran medida a factores genéticos, así como a la influencia de los altos niveles de hormonas sexuales durante la pubertad, por lo que se considera un proceso multifactorial. Este proceso comprende la acumulación de tejido conjuntivo subcapsular, perivascular y la pérdida de células epiteliales tímicas debido a la transición epitelial-mesenquimatosa, la cual es seguida de una diferenciación previa al adipocito, por lo que en la etapa adulta gran parte del parénquima tímico es reemplazado por tejido adiposo, este proceso es denominado involución tímica (Nacka-Aleksić *et al.*, 2019).

En los ratones, el timo alcanza su máximo tamaño a partir de las seis semanas de edad, lo que coincide con su maduración sexual, mientras que en el ratón adulto el proceso de involución ha causado la disminución de su tamaño, por lo que en la vejez es difícil detectarlo macroscópicamente (Marsán Suárez *et al.*, 2013; Repetto *et al.*, 2010).

Cabe destacar, que la función del timo es vital para la maduración de los linfocitos T, ya que aquí se lleva a cabo la selección positiva y negativa de los mismos, por lo que cualquier alteración que pueda afectar este órgano podría llevar a la salida de clonas autorreactivas a la circulación, dando como resultado el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

1.9. Enfermedades autoinmunes y la contaminación atmosférica

Las enfermedades autoinmunes (EA) son patologías crónicas asociadas con la pérdida de tolerancia inmunológica a los antígenos propios y una activación inadecuada del sistema inmune, afectan al 5% de la población mundial de los cuales el 80% de los pacientes son mujeres. La predilección genética juega un papel importante en la inmunidad, ya que se han encontrado más de 200 loci involucrados en trastornos autoinmunes. Sin embargo, el impacto de sustancias químicas inorgánicas presentes en la contaminación atmosférica, se han considerado un factor de riesgo para el desarrollo o agravamiento de las EA (Gawda *et al.*, 2017).

Estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre la contaminación atmosférica y el desarrollo de enfermedades autoinmunes (EA), lo que convierte a la contaminación en un factor de riesgo para el timo y otros órganos implicados en el sistema inmune. Algunas de estas correlaciones se han visto en el lupus eritematoso sistémico (LES), que es una enfermedad autoinmune crónica en la cual la exposición laboral a sílice, pesticidas, disolventes y otras sustancias inhaladas se han relacionado con su desarrollo, así como varios componentes de las PM_{2.5} como los oligoelementos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos que se encuentran asociados con la prevalencia de esta enfermedad (Zhao *et al.*, 2019).

En la artritis reumatoide (AR), la cual es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la inflamación crónica y la destrucción de las articulaciones sinoviales, tanto el consumo de tabaco como la exposición a sílice se han asociado a un mayor riesgo para su desarrollo, de igual manera, las altas concentraciones de PM_{2.5} aumenta el riesgo de la artritis idiopática juvenil, así como se ha asociado con

la prevalencia de la AR sistémica. Los estudios realizados en el 2009 sugieren que las emisiones de contaminantes vehiculares pueden agravar la AR, de igual forma, las concentraciones de PM, SO₂, NO₂ y O₃ se han visto relacionadas con la prevalencia de esta enfermedad. La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) es una enfermedad autoinmune que resulta de la destrucción de las células beta productoras de insulina en el páncreas. Esta enfermedad se ha asociado con la exposición a altas concentraciones de ozono, sulfatos y otros contaminantes en niños (Gawda *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019).

La esclerosis múltiple (EM), es una enfermedad autoinmune en la que hay una desmielinización inflamatoria del sistema nervioso central mediada por células T específicas para un antígeno de mielina, en la que se ha visto que el aumento de la concentración de contaminantes como PM₁₀, SO₂, NO₂ y NO, pueden ser un factor de riesgo ambiental para el desarrollo y recaídas de la EM en adultos. La correlación entre la contaminación y el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, se puede explicar por el desequilibrio de las células T, la producción de citoquinas proinflamatorias, la inflamación pulmonar local, el estrés oxidante y cambios en la metilación provocados por la contaminación del aire y que se han observado en el desarrollo de las EA (Gawda *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019).

En la Ciudad de México, en un estudio llevado a cabo en niños se observó que la alta exposición a contaminantes atmosféricos aumentó las células T CD8+ y los monocitos CD14+, redujo el número de las células *natural killers*, del interferón gamma y el factor estimulante de las colonias de macrófagos y granulocitos, lo que indica su papel en la alteración del sistema inmune y la inflamación sistémica (Zhao *et al.*, 2019).

1.10. Radicales libres y estrés oxidante/nitrosante

Uno de los mecanismos asociados con el desarrollo de las enfermedades autoinmunes, ha sido el aumento en la concentración de radicales libres del oxígeno y del nitrógeno, relacionado con la respuesta pro-inflamatoria que estos provocan. Se ha observado que la presencia de ciertos contaminantes como el vanadio, pueden provocar alteraciones en el equilibrio *redox* citoplásmico y mitocondrial generando una alta producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton y mediante la inhibición de ciertas enzimas antioxidantes (Espinosa-Zurutuza *et al.*, 2018).

Los radicales libres son átomos, moléculas o compuestos que tienen un electrón desapareado en su orbital exterior, lo que les proporciona gran inestabilidad y un alto poder oxidante o reductor. Debido a esto, para alcanzar un estado químico más estable, reaccionan con átomos o moléculas cercanas, alterando así a biomoléculas como proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, entre otras. Los radicales libres, pueden reaccionar robando un átomo de hidrógeno, ligándose químicamente a otra molécula o actuando recíprocamente con otros radicales (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Los radicales libres pueden ser derivados del oxígeno (ROS) o del nitrógeno (RNS) según el átomo del que provengan. Si su producción sobrepasa las defensas antioxidantes ocasiona estrés oxidante y nitrosante respectivamente, este último capaz de dañar los componentes macromoleculares de la célula y provocar su muerte al activar el mecanismo de apoptosis, poniendo en riesgo al tejido y el órgano afectado (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

1.11. Formación de radicales libres derivados del oxígeno y nitrógeno

La mayoría de las especies reactivas del oxígeno (ERO) son generadas por la pérdida de electrones durante la producción de ATP por parte de las mitocondrias, así como por la NADPH oxidasa y otras oxidasas. Algunos de los ERO más importantes en los sistemas biológicos son anión superóxido, el peróxido de hidrogeno y el radical hidroxilo (Gawda *et al.*, 2017).

En el caso de las especies reactivas del nitrógeno (ERN), el óxido nítrico (NO) es la fuente principal de todas las ERN presentes en los sistemas biológicos. El NO es una molécula de señalización que se genera a partir una reacción de oxidación-reducción en el que un átomo de nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina se oxida de -3 a +2, aquí el oxígeno molecular actúa como agente oxidante y su estado de oxidación pasa de 0 a -2. Esta es una reacción dependiente de NADPH, que funciona como un segundo agente reductor y es catalizada por el óxido nítrico sintetasa (NOS). La reacción ocurre en dos etapas con la formación del intermediario N⁰-hidroxi-L-arginina y finalmente la L-citrulina, esta reacción la podemos observar en la figura 9 (Centelles *et al.*, 2004; La Padula, 2010).

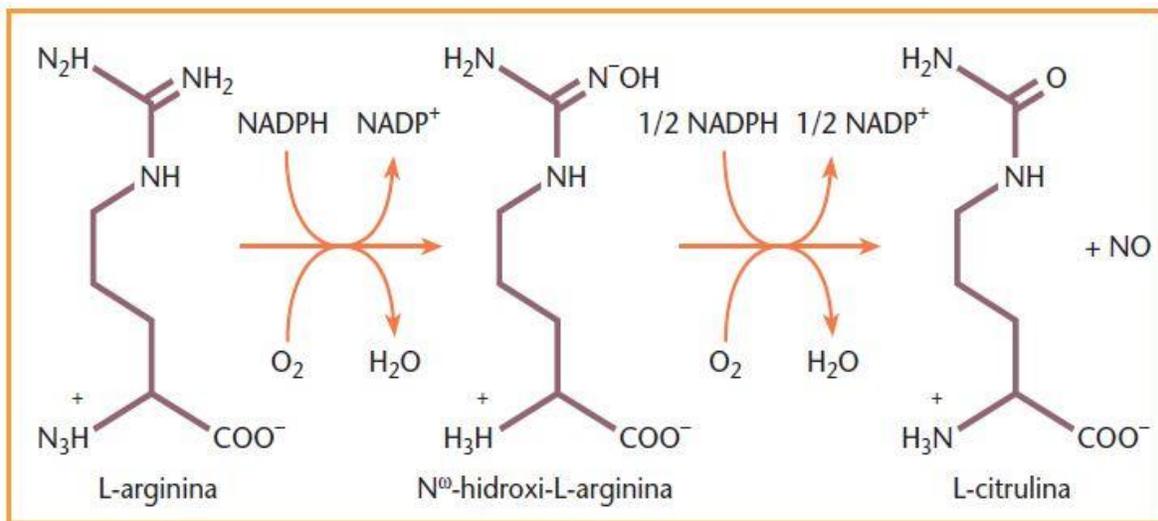


Figura 9. Formación de NO a partir de la L-arginina en una reacción catalizada por la NOS (esquema tomado de Centelles *et al.*, 2004).

Las enzimas NOS presentes en los mamíferos, son hemoproteínas de las que se conoce una isoforma inducible (iNOS), la cual no requiere de Ca^{2+} para su función y se expresa en varios tipos celulares, como macrófagos y células endoteliales, así como tres isoformas constitutivas dependientes de Ca^{2+} , que corresponden a la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la mitocondrial (mNOS), (Figuroa-Vega *et al.*, 2008; La Padula, 2010).

Las isoformas constitutivas producen cantidades más bajas de NO durante periodos cortos importantes para la homeostasis, como agente neurotransmisor y como vasodilatador, mientras que las isoformas inducibles actúan durante periodos más largos sintetizando cantidades mayores de NO en respuesta a citocinas como el interferón gamma (IFN), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y la interleucina 1 (IL). Todas las células del organismo contienen NOS constitutivas, por lo que son capaces de sintetizar óxido nítrico, así como muchos tipos celulares pueden inducir la NOS como respuesta a diferentes estímulos (Figuroa-Vega *et al.*, 2008; Centelles *et al.*, 2004).

1.12. Importancia del óxido nítrico (NO) como uno de los principales radicales libres derivados nitrógeno

El óxido nítrico (NO), es uno de los radicales libres derivados del nitrógeno que más atención ha tenido, esto debido a que es un gas altamente difusible involucrado en la citotoxicidad cuando se genera en exceso. Debido a que escapa a través de la membrana celular y se difunde a las proximidades afectando otras células sin necesidad de receptores en la superficie. Por lo que se considera una molécula-señal liberada desde cualquier parte de la célula y capaz de actuar en la misma o en otras células cercanas que puedan responder a ella (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

Esta molécula, es altamente reactiva en los centros hemos de las proteínas que controlan el tono vascular y es por eso que juega un papel importante en la regulación del calibre vascular. Para lograr su función, el NO es capaz de unirse

covalentemente a diversos metales de transición o a los grupos tiol de los aminoácidos de las proteínas y producir moléculas a las que la célula sea sensible, capaces de modificar directamente la actividad de una enzima o un receptor membranal que su vez, alteran la transcripción de una proteína determinada (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

El NO desempeña un papel importante en la vasodilatación y en la neurotransmisión, así como participa en la respuesta antimicrobiana de los fagocitos, sin embargo, el potencial del NO en la patogenia de las enfermedades proviene de su reacción con el superóxido, que da como resultado la formación de peroxinitrito, el cual es un potente agente nitrosante y oxidante (Gawda *et al.*, 2017).

1.13. Funciones de los radicales libres derivados del nitrógeno en condiciones normales

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno son moléculas que se producen naturalmente durante los procesos metabólicos de las células y están involucradas en numerosos procesos fisiológicos como el mecanismo respiratorio de células fagocíticas, la señalización celular y la síntesis de hormonas tiroideas (Gawda *et al.*, 2017).

El NO, es un importante mensajero biológico tanto en animales como en plantas, ya que está involucrado en diversos procesos fisiológicos como la neurotransmisión, la coagulación sanguínea, el control de la presión sanguínea, la regulación del tono vascular y la modulación de procesos inflamatorios, (Campolo, 2013).

El NO es sintetizado en el endotelio, que es un epitelio plano simple, formado por células que recubre el interior de los vasos sanguíneos y actúa como vasodilatador de las arterias, ya que impide que las células vecinas se ensanchen para poder controlar el tamaño de su luz y por lo tanto la cantidad de sangre que pasa por ellas, controlando así la presión sanguínea (Gawda *et al.*, 2017; Centelles *et al.*, 2004).

Algunas otras de las funciones que posee el NO, es como neurotransmisor en el aprendizaje, la memoria y la fase cefálica de la excitación sexual, ya que funciona como regulador del musculo liso y actúa en la vasodilatación, vaciamiento gástrico y erección del pene y funciona como regulador vascular de corazón y riñones. Tiene un papel importante en la inmunidad, tolerancia, inflamación y agregación plaquetaria y como regulador de la liberación hormonal y de neurotransmisores. En el timo y en los órganos linfoides periféricos, por ejemplo, los ganglios linfáticos, el NO juega un papel fundamental debido a que es un factor proapoptótico para linfocitos T autorreactivos, tanto a nivel central, en forma coactiva con el factor de crecimiento para células T derivado del estroma tímico, como periféricamente (García *et al.*, 2006).

1.14. Principales efectos tóxicos generados por estrés nitrosante

Sin embargo, los radicales libres derivados del nitrógeno y del oxígeno se ven relacionados con la toxicidad cuando se generan en exceso, provocando estrés nitrosante y oxidante respectivamente. Algunos de estos efectos se derivan de la interacción entre los radicales libres derivados del oxígeno y del nitrógeno con lípidos de las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014).

La producción en exceso de los ERN, como lo es el NO, provoca relajación en las arterias y una presión sanguínea excesivamente baja (vasodilatación excesiva). De esta forma, los efectos tóxicos de la sobreproducción del NO pueden venir por la acción directa de esta molécula sobre las proteínas o el ADN, o bien, debido a la combinación del NO con otros radicales, iniciando procesos oxidantes en cadena que pueden conducir a la muerte de las células afectadas (Centelles *et al.*, 2004). Un ejemplo de esto, es la formación de nitrito y nitrato por la interacción del NO con el oxígeno. El nitrato, es capaz de reaccionar de forma rápida con el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para generar peroxinitrito ($ONOO^-$), molécula capaz de hidroxilar o nitrosilar los grupos sulfhidrilos y tioéster de las proteínas y lípidos. Esto daña a la

célula e induce la oxidación de lipoproteínas, así como fragmenta las moléculas de DNA, disminuye los sistemas antioxidantes de la célula y ocasiona nitración de proteínas clave en los sistemas de señalización inter e intracelulares (Hernández-Rodríguez, *et al.*, 2014).

1.15. La producción de la Nitrotirosina (3-NT) y su papel como marcador de estrés nitrosante

La tirosina es un aminoácido no esencial perteneciente al grupo de los aminoácidos aromáticos. Es levemente hidrófila, rasgo que se explica por la presencia de un anillo de benceno aromático e hidrófobo con un grupo hidroxilo. La tirosina se encuentra expuesta en la superficie de las proteínas y está disponible para modificaciones, como lo es la nitración por diversos factores, lo que resulta en la formación de 3-nitrotirosina (3-NT). Por lo que la 3-NT, es una modificación postraducciona en proteínas que ocurre mediante la acción de un agente nitrante y que resulta en la adición de un grupo $-\text{NO}_2$, lo que conduce a la nitración del aminoácido tirosina, como se puede ver en la figura 10 (Ahsan, 2013).

En ciertas condiciones como en procesos inflamatorios, los radicales libres derivados del nitrógeno, como el NO, participan en la nitración del aminoácido tirosina de las proteínas formando la 3-nitrotirosina (3-NT), la cual es un reflejo de estrés nitrosante. Así mismo, el peroxinitrito no puede reaccionar directamente con los residuos de tirosina, sin embargo, puede producir especies oxidantes y nitrosantes como el radical hidroxilo ($+\text{OH}$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2), que pueden reaccionar promoviendo la formación de la 3-NT (Rojas de la Fuente, 2015).

Además de la nitración de la tirosina por generación de radicales de dióxido de nitrógeno por varias hemoperoxidasas en presencia de H_2O_2 y nitrito, otras reacciones que llevan a su formación son por la interacción del óxido nítrico con un radical tirosilo, la acción directa del dióxido de nitrógeno, la formación de ácido nitroso por acidificación del nitrito, la oxidación del nitrito por ácido hipocloroso para formar cloruro de nitrilo (NO_2Cl), la acción de nitratos de acilo o alquilo y acción de

nitratos de metal, por lo que la presencia de 3-NT se considera un marcador de estrés nitrosante (Ahsan, 2013).

De igual forma, en condiciones normales es posible observar niveles bajos de 3-nitrotirosina libre o unida a proteínas, lo que indica un bajo estado estacionario de especies oxidantes y nitrosantes que son producidas en condiciones basales (Campolo, 2013).



Figura 10. Formación de la 3-NT a partir de la L-tirosina mediante agentes nitrosantes; peroxinitrito (ONOO^-), cloruro de nitrilo (NO_2Cl), óxido nítrico (NO), ácido nitroso (HNO_2), ácido nítrico (HNO_3), nitrito (NO_2^-), ácido hipocloroso (HOCl), dióxido de nitrógeno (NO_2), (esquema tomado de Ahsan, 2013).

Lo anteriormente expuesto muestra la importancia del buen funcionamiento del timo y del balance del estrés nitrosante, cualquier factor que influya en esto, puede tener como resultado un deterioro de la respuesta inmune y facilitar la salida de clonas autorreactivas a la circulación, y así favorecer la incidencia de enfermedades autoinmunes en las poblaciones expuestas a la contaminación atmosférica.

2. Planteamiento del problema

La contaminación atmosférica se ha convertido en un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades autoinmunes en la ZMVM. Los estudios previos del grupo demostraron que la inhalación de vanadio produce diversas alteraciones en el timo de ratones. El estrés nitrosante produce efectos adversos en el timo, por lo que es importante determinar si hay cambios en su producción a causa de la inhalación de vanadio en este órgano.

3. Hipótesis

Si la inhalación de vanadio produce estrés nitrosante mediante un aumento en la síntesis de radicales libres derivados del nitrógeno, entonces se observará un incremento en el marcador 3-NT en el timo de los ratones expuestos a vanadio comparados con los controles conforme aumentan las semanas de exposición durante 4 semanas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el estrés nitrosante mediante el marcador 3-NT en el timo de ratón por efecto de la inhalación subaguda de vanadio

4.2. Objetivos Particulares

Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para el marcador 3-NT.

Identificar por inmunohistoquímica y cuantificar mediante densitometría la producción de la 3-NT en el timo de ratones control y expuestos a vanadio.

5. Material y Métodos

5.1. Modelo biológico

Se utilizaron 40 ratones de la cepa CD-1 machos con un peso de 33-35 g y de aproximadamente 4 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del vivario de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los ratones se colocaron en cajas de acrílico (5/caja) en una instalación certificada (animales libres de patógeno) a una temperatura de 21°C con humedad relativa del 57% y un fotoperiodo de 12:12 (luz/oscuridad). Los ratones fueron mantenidos con agua filtrada y *pellets* de Purina “rodent Chow” *ad libitum*.

Todos los protocolos experimentales se realizaron acorde a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio, Comisión en Ciencias de la Vida y Concejo Nacional de Investigación, así como la Guía para el Bienestar Animal (NOM-062-200-1999).

5.2. Protocolo de inhalación

En el presente trabajo de investigación, se ocupó el modelo de inhalación descrito por Fortoul *et al.* en 2011 para las exposiciones, en el cual:

- 20 ratones como el grupo experimental fueron expuestos a pentóxido de vanadio (V_2O_5) disuelto en solución salina al 0.9%, a una concentración de 0.02M (2.57mg/m³ V) vía inhalada, 1 hora 2 veces por semana durante 4 semanas.
- 20 ratones como el grupo control inhalaron solo el vehículo, solución salina al 0.9%, 1 hora 2 veces por semana durante 4 semanas.

El procedimiento de inhalación se realizó en una caja de acrílico transparente de 45x21x35 cm³ con un volumen de 3.3 L conectada a un ultranebulizador Yuehua WH 2000® con una tasa de nebulización máxima de 4 mL/min, con 80% de las partículas nebulizadas con diámetros aerodinámicos de 1-5 µm.

5.3. Sacrificio y procesamiento de tejidos

Se sacrificó un lote de 5 ratones por grupo cada semana. Los ratones fueron anestesiados con una inyección de pentobarbital sódico intraperitoneal, se perfundieron por el ventrículo izquierdo con solución salina (pH 7.4 al 0.9%) para el lavado de los órganos y se fijaron con paraformaldehído al 4% en *buffer* de fosfatos (figura 11).

Posteriormente se extrajeron los timos, lo cuales se colocaron en paraformaldehído y fueron procesados para su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 8 μ m de grosor y se montaron en portaobjetos cargados positivamente. Finalmente fueron desparafinados y rehidratados con agua destilada durante 5 minutos para realizar la técnica de inmunohistoquímica para 3-NT

El anti-nitrotirosina es un anticuerpo que funciona bien en cortes incluidos en parafina, por congelación y preparaciones celulares, por lo que se escogió la inclusión en parafina debido a que los bloques se pueden guardar por mucho tiempo para su uso posterior.

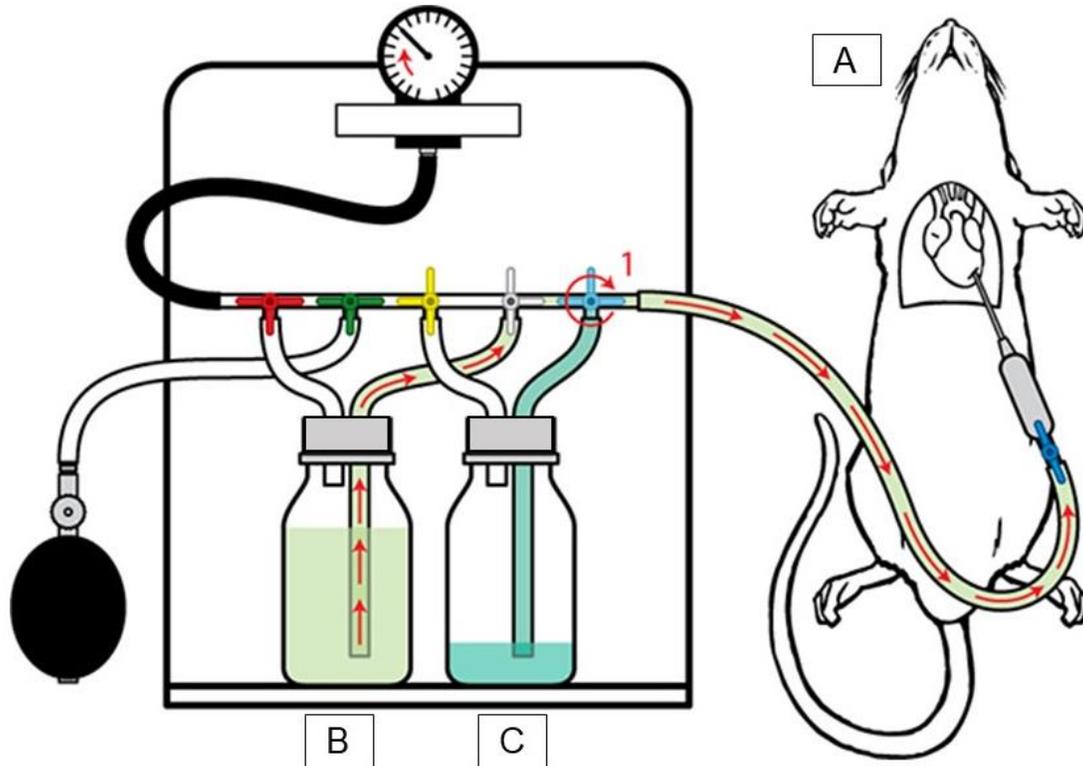


Figura 11. Perfusión y disección del timo. En este esquema podemos observar en el cuadro A la figura de un ratón al cual se le abre la caja torácica y se le inserta una cánula por el ventrículo izquierdo, primero se deja pasar la solución salina (B) para el lavado de órganos y después se fijan con paraformaldehído al 4% (C) para la posterior extracción del timo.

5.4. Inmunohistoquímica para 3-NT

La inmunohistoquímica se realizó con el fin de localizar moléculas específicas, que en este caso corresponden a los radicales libres derivados del nitrógeno, en el tejido mediante el uso de anticuerpos, en este caso la nitrotirosina (3-NT), ya que poseen una gran especificidad y alta afinidad a estos.

Para su realización, después de haber desparafinado y rehidratado los cortes, se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% durante 10 minutos, se escurrió el exceso y se enjuagó con agua destilada dos veces. Los cortes se colocaron en una solución amortiguadora (4mL de *buffer* + 36mL H_2O

destilada) y después se reactivaron los sitios antigénicos con calor mediante la olla exprés a 15° C durante 3 minutos, con cuidado de que los cortes no se despegaran, se dejaron enfriar y se realizaron 2 lavados en PBS por 3 minutos.

Posteriormente, se inhibió la peroxidasa endógena durante 10 min, se escurrió el exceso y se enjuagaron los cortes con agua destilada (2 veces) y se colocaron en una solución amortiguadora de fosfatos. Después, se inhibieron los sitios inespecíficos del anticuerpo secundario con un suero normal bloqueador anti-ratón, el cual se dejó incubar durante 15 min, se escurrieron y fueron colocadas en la cámara húmeda. Aquí se les puso el anticuerpo para 3-Nitrotirosina, se tapó la cámara húmeda y se dejó incubar 30 min para luego ser guardadas en el refrigerador durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron 2 enjuagues con PBS y se colocó el anticuerpo secundario (Anti IgG biotinilado) durante 30 minutos. Se quitó el exceso y se realizaron 2 enjuagues con PBS por 2 minutos. Después se escurrieron bien las muestras y se secaron con gasa, se incubó el complejo de estreptavidina por 30 minutos y se realizaron dos lavados con PBS por 2 minutos.

Se les colocó la Diaminobencidina (1 gota DAB + 1 mL de *Buffer*) por 5 minutos aproximadamente o hasta que las muestras desarrollaran color. Posteriormente las muestras se lavaron con agua destilada, fueron contrateñidas con Hematoxilina y se lavaron con agua corriente para que viren.

Las muestras se enjuagaron con solución amortiguadora durante 1 minuto, se dejaron escurrir y se lavaron con agua corriente, finalmente se lavaron con agua destilada y se dejaron escurrir. Por último, los cortes se deshidrataron en 3 cambios de alcohol al 100%, se limpiaron en 3 cambios de xileno y fueron montados con un cubreobjetos para ser observados en el microscopio. Los lavados realizados entre cada paso se hicieron con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con pH de 7.4. En la figura 12 podemos ver un resumen del proceso de inmunohistoquímica.

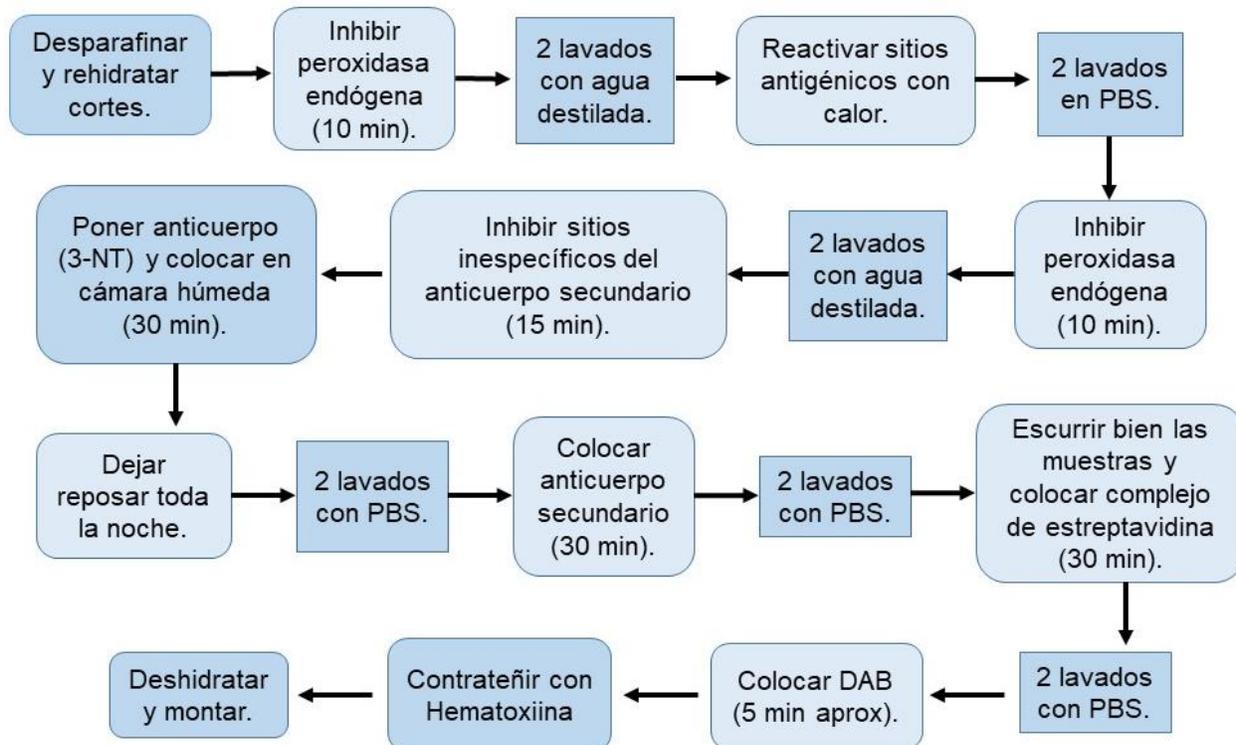


Figura 12. Resumen de la inmunohistoquímica.

5.5. Densitometría

Para la densitometría primero se realizó la toma de fotomicrografías con una cámara Olympus C5050-ADU. Se tomaron 5 campos por animal (25 campos por grupo) a 40x, tanto de corteza como de médula, las cuales se eligieron al azar y fueron procesadas con el programa Photoshop 2015 para separar los canales, ya que el programa trabaja en escala de grises, por lo que se utilizó el filtro amarillo (*yellow*) debido a que en éste se observa la marca producida por el DAB de la inmunohistoquímica.

Posteriormente, se pasaron a través del programa DensiFe para la realización de la densitometría, este *software* nos permitió cuantificar a las células 3-NT+ en los ratones control y expuestos a vanadio, las cuales se observaron como una marca color ocre. Los datos fueron registrados en una hoja del programa Excel 2016, para su posterior análisis.

5.6. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados para determinar si cumplían una distribución normal. Finalmente se realizó un análisis de varianza ANOVA con una prueba *post hoc* de Tukey con los datos obtenidos en la densitometría, esto con la finalidad de determinar las diferencias significativas entre grupos, la cual se consideró cuando $p \leq 0.05$. Todos los datos fueron reportados con error estándar (SE). El análisis se realizó con el programa Prism V 6.0.

El error estándar nos permite estimar cuánto varían nuestros valores de la muestra, cuantificando las oscilaciones de la media muestral alrededor de la media poblacional. En la figura 13 podemos ver un resumen del método utilizado en este proyecto.

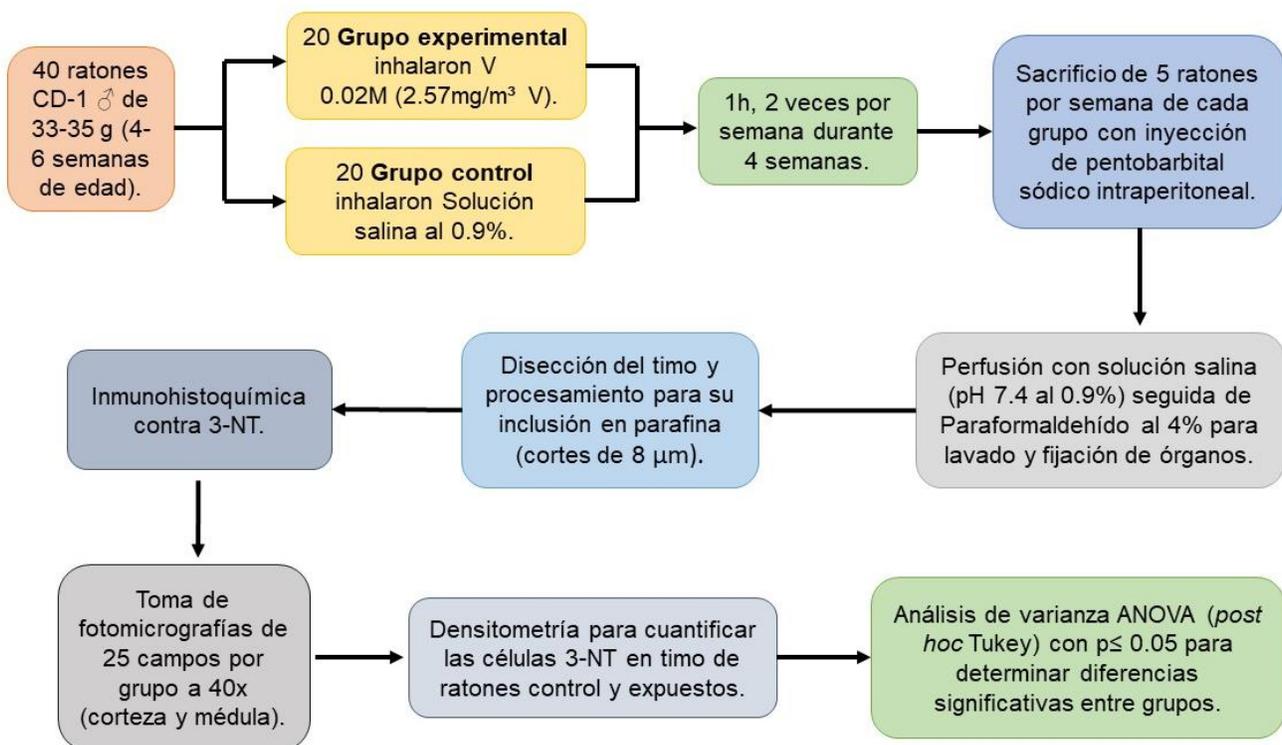


Figura 13. Diagrama de flujo del método.

6. Resultados

Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se estandarizó con un control de la semana 1 (S1), con dilución de 1:100 y se incubó toda la noche a una temperatura de 4°C. En la figura 14 se puede ver una fotomicrografía del resultado de la estandarización de la técnica en un control S1.

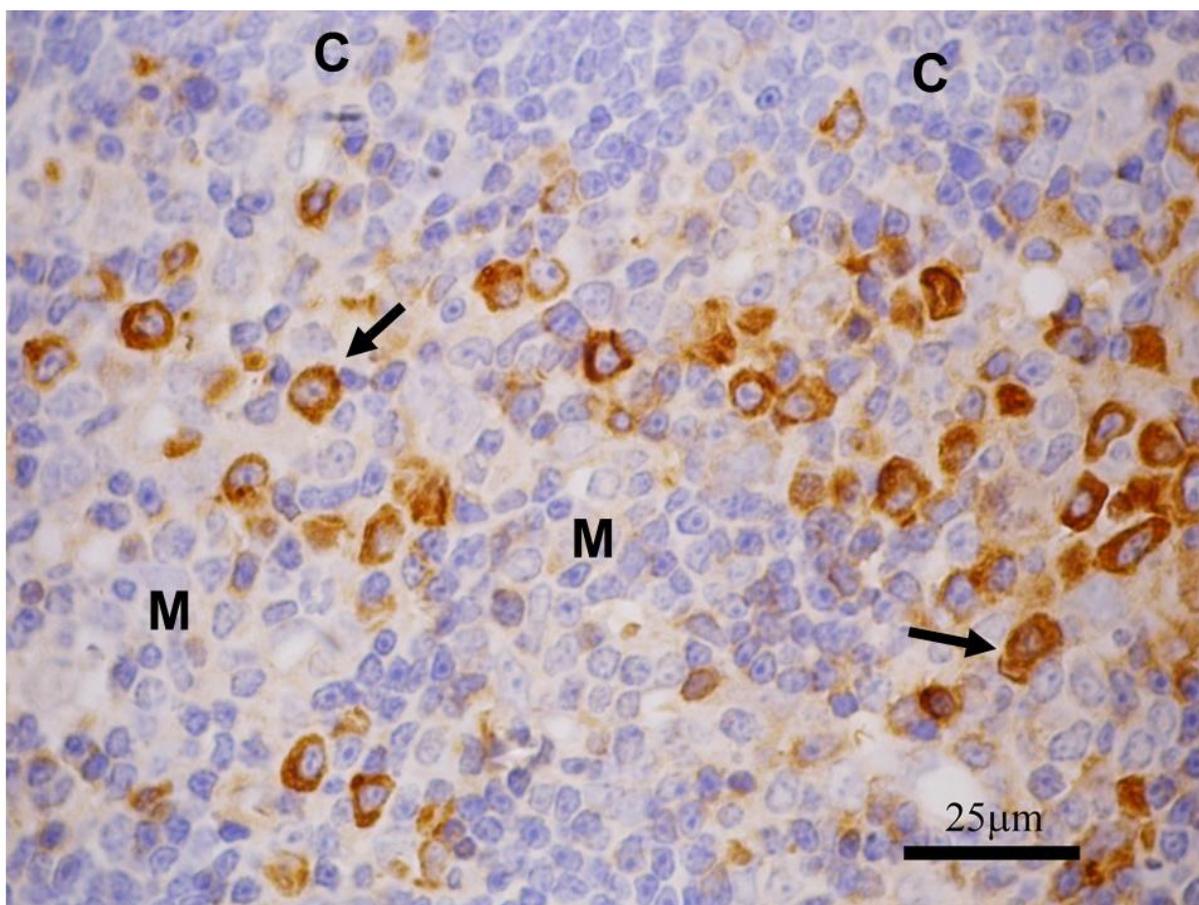


Figura 14. Fotomicrografía 100x de un control de la S1 para la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica contra 3-NT. Se puede ver representada la médula (M) tímica en el centro y un poco de la corteza (C) en las orillas. Las flechas negras marcan las células positivas contra la 3-NT (3-NT+) que se pueden observar en color ocre.

Presencia de 3-NT en el timo de ratones expuestos a la inhalación de vanadio

Descripción morfológica:

Las células positivas a la 3-nitrotirosina (3-NT+) se observaron en color ocre sobre una contratinción azul, estas células positivas tienen forma redonda y podrían ser linfocitos y también se observaron algunas células de forma dendrítica, que pudieran ser células dendríticas o células epiteliales, esta positividad se observó en el timo de los ratones controles como en los expuestos a la inhalación de vanadio. La expresión de 3-NT+ se observó desde la semana 1 de exposición a vanadio hasta la semana 4, así como en todos los controles. La expresión de la 3-NT+ en los controles se observa en cantidades menores a comparación de los expuestos a la inhalación de vanadio. La expresión de 3-NT+ se observó en mayor cantidad en las semanas 3 y 4 en los timos de los animales expuestos a vanadio (figura 15).

Las células 3-NT+ se encontraron distribuidas tanto en la corteza como en la médula del timo, con una distribución aparentemente igual en ambas regiones (figura 15).

En la figura 16 se puede apreciar con mayor detalle la fotomicrografía de la inmunohistoquímica para 3-NT del timo de ratón expuesto a la inhalación de vanadio de la semana 4 (ES4), en la cual podemos observar diferentes células 3-NT+, tales como posibles linfocitos, los cuales se observan de forma redonda y con un color ocre, distribuidos en la médula y en la corteza del timo representados con las flechas negras. En esta misma figura, podemos observar otro tipo de células 3-NT+ con una forma dendrítica y de color ocre, las cuales pueden ser células dendríticas o células epiteliales, estas se encuentran distribuidas tanto en la corteza como en la médula tímica y están señaladas con una cabeza de flecha.

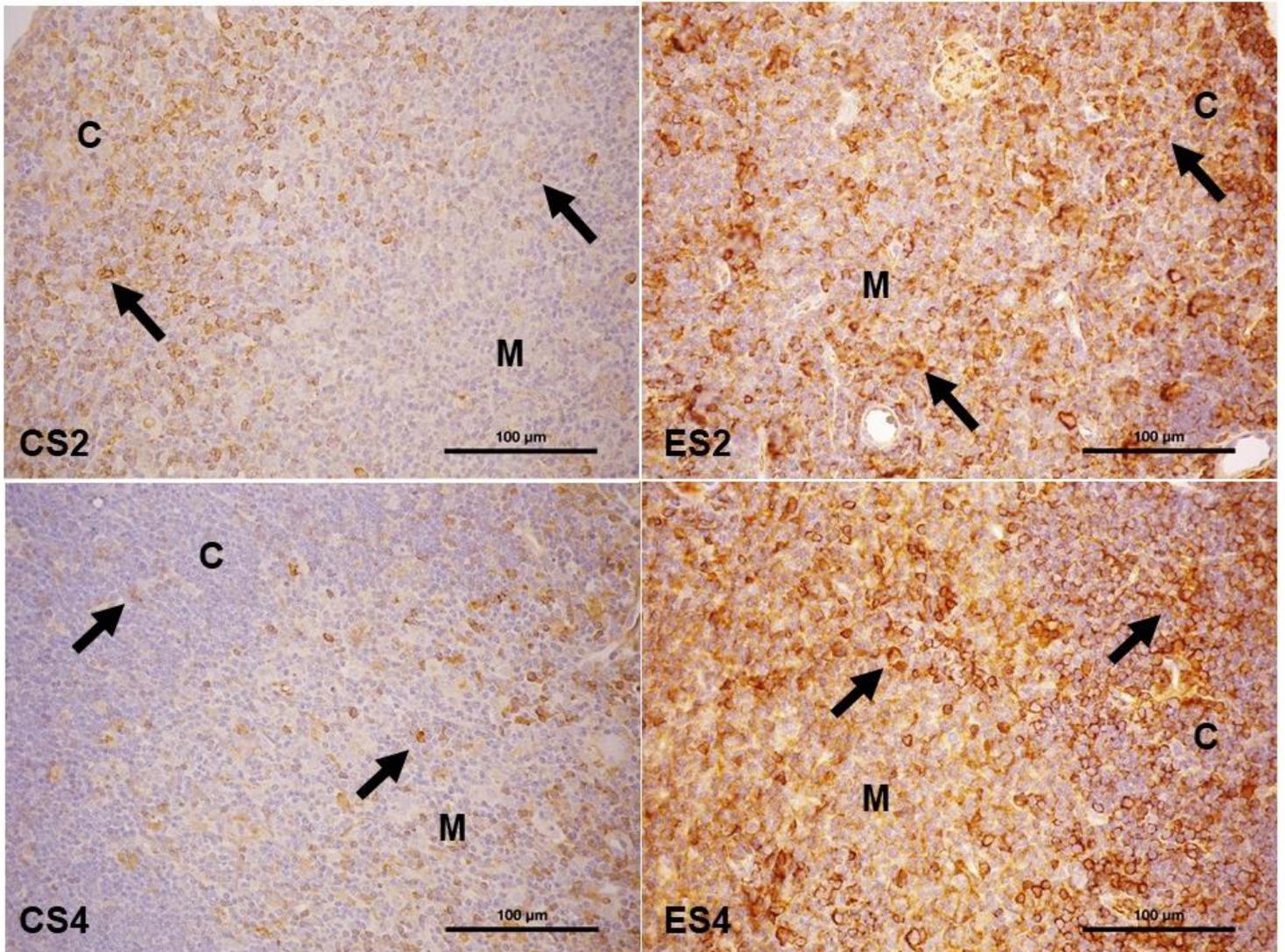


Figura 15. Fotomicrografías a 40x de la inmunohistoquímica para 3-NT en timos de ratones control y expuestos a la inhalación de vanadio. Se observan en color ocre y con una forma redonda las células positivas para la 3-NT (3-NT+). En estas fotomicrografías se pueden comparar los timos controles de la semana 2 (**CS2**) contra el experimental de la semana 2 (**ES2**), así como el control de la semana 4 (**CS4**) contra el experimental de la semana 4 (**ES4**). Las flechas negras marcan diferentes tipos de células 3-NT+ (como células dendríticas, linfocitos, células epiteliales y macrófagos), las cuales se encuentran distribuidas tanto en médula (M) como en la corteza (C). Se observa mayor cantidad de células 3-NT+ en el ES2 a comparación del CS2 y en ES4 en comparación del CS4.

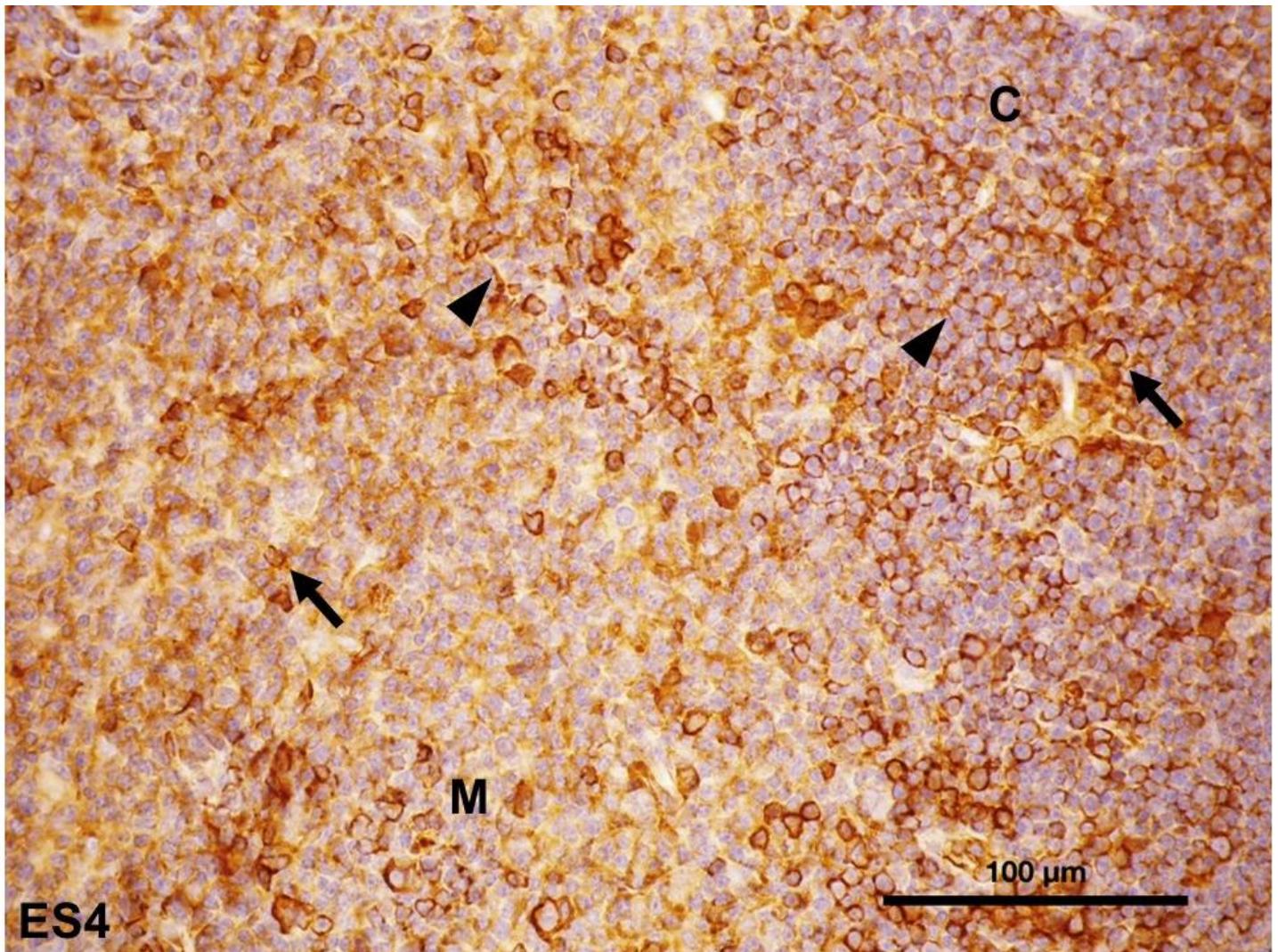


Figura 16. Fotomicrografía a 40x de la inmunohistoquímica para 3-NT en el timo de un ratón expuesto a la inhalación de vanadio de la semana 4 (ES4). En esta imagen podemos ver con mayor detalle las células 3-NT+ en color ocre y con una forma redonda, las cuales pueden ser linfocitos, representados con las flechas negras y los cuales se encuentran presentes en la médula (M) y en la corteza (C) tímica. También podemos observar en color ocre y con una forma dendrítica a las células 3-NT+ que pueden ser células dendríticas o células epiteliales, señaladas con una cabeza de flecha, tanto en la corteza como en la médula del timo.

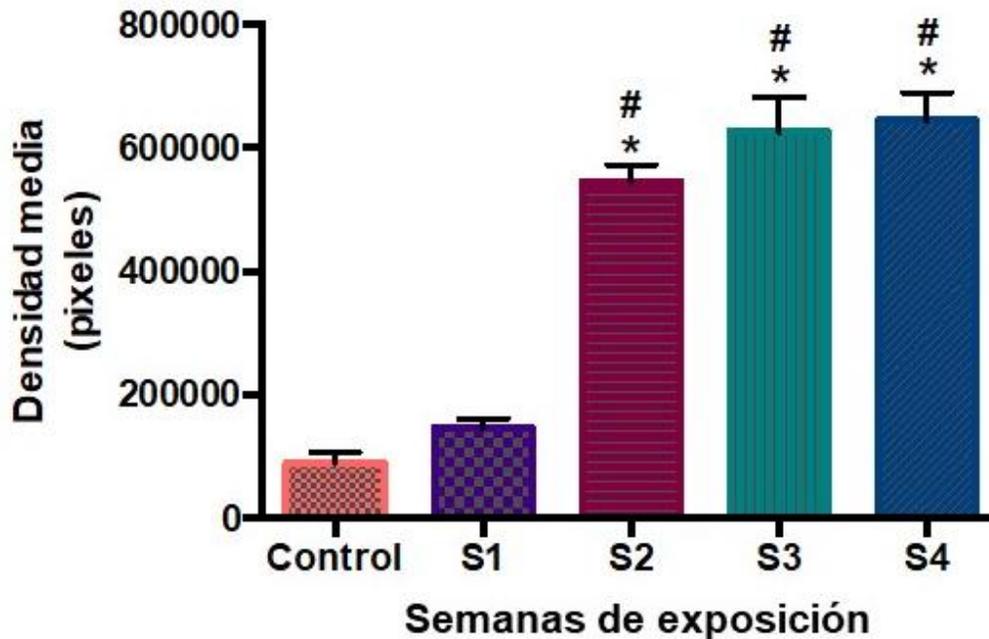
Análisis estadístico:

En la figura 17 podemos observar en el eje de las X la expresión de la 3-NT+ en el timo de todos los ratones controles (en la primera barra de color rosa) y de los expuestos a la inhalación de vanadio a través de las semanas de exposición, desde la semana 1 (S1) hasta la semana 4 (S4), mientras que en el eje de las Y podemos observar la densidad media en pixeles de la cantidad de 3-NT+ expresada en el timo de los ratones controles y expuestos a la inhalación de vanadio.

Con respecto al análisis estadístico, en la figura 17 se puede observar el análisis de varianza ANOVA con una prueba *post hoc* de Tukey para determinar las diferencias significativas entre grupos ($p \leq 0.05$) reportado con Error Estándar (SE).

El análisis estadístico determinó que hay mayor producción de 3-NT+ en el timo de los ratones expuestos a la inhalación de vanadio en comparación con los controles, que es estadísticamente significativa a partir de la semana 2 de exposición en adelante, la cual se puede ver representada con un asterisco (*), también se observa una mayor concentración de 3-NT+ en las semanas 3 y 4 de los ratones expuestos a la inhalación de vanadio. De igual forma, hay una mayor expresión de la 3-NT+ estadísticamente significativa desde la semana 2 de exposición a vanadio en adelante con respecto a la semana 1 de exposición, la cual se ve representada con un símbolo de gato (#), (figura 17). La expresión de la 3-NT+ se mantuvo igual en los ratones controles a lo largo de las 4 semanas que duró el experimento.

3-NT+ en timos de ratones control y expuestos a Vanadio.



ANOVA $p \leq 0.05$ (*post hoc* Tukey)

* Diferencia significativa vs Control
Diferencia significativa vs S1
SE

Figura 17. Análisis estadístico de la densitometría para 3-NT+ en el timo de ratones control y expuestos a vanadio. ANOVA $p \leq 0.05$ (*post hoc* Tukey) reportados con SE (error estándar). *Diferencia significativa vs **Control** y #Diferencia significativa vs **S1** (semana 1). Se observa un incremento en la densidad media en pixeles desde la S1 de inhalación que se mantiene constante a partir de la S3 hasta la S4. Hay una diferencia significativa en el aumento de la marca para 3-NT+ a partir de la S2 en adelante con respecto al control, así como de la S2 en adelante con respecto a la S1.

7. Discusión

El timo juega un papel esencial en el desarrollo de la inmunidad mediada por células (linfocitos T). Cualquier daño en este órgano, puede causar el deterioro de la defensa inmune, que depende en gran medida de la actividad de los linfocitos T. Por lo tanto, es necesario la búsqueda y generación de información actualizada que nos permita proporcionar elementos que contribuyan a un mejor conocimiento de este órgano.

De acuerdo con nuestros antecedentes, el vanadio es un contaminante atmosférico capaz de afectar órganos relacionados al sistema inmune como lo es el bazo, la médula ósea y en este caso el timo. Los trabajos anteriores reportaron que la inhalación de vanadio produce cambios en la relación corteza-médula, disminución en la expresión de los marcadores CD11c y MHCII, disminución en el número de CDs, así como un aumento de las CETm y una distribución errática en la expresión del marcador K5⁺ en el timo de ratones. Por lo que nos preguntamos si algunos de estos efectos podrían ocasionar un cambio en la producción de radicales libres derivados del nitrógeno en las células, que condujeran al estrés nitrosante. Ya que el estrés oxidante y nitrosante, son dos factores que han sido relacionados con el desarrollo de las enfermedades autoinmunes (González-Villalva *et al.*, 2006; Piñón-Zárate *et al.*, 2008; Fortoul *et al.*, 2014; Ustarroz-Cano *et al.*, 2017).

Ustarroz-Cano y colaboradores (2012), mencionan que la disminución del CD11c puede deberse al gran potencial del vanadio de inducir estrés oxidante, al liberar especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), las cuales pueden traer como consecuencia la modificación de la actividad de factores de transcripción en la respuesta inflamatoria. Para este trabajo nos dimos a la tarea de corroborar la presencia de estrés nitrosante en el timo, lo que nos ayudará a conocer los posibles mecanismos y rutas de acción que llevan al daño en este órgano causado por la inhalación de vanadio.

Ahsan, H. (2013), reportó que los macrófagos, presentes en la corteza y en la médula tímica, expresan especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERON) como el anión superóxido (O_2^-) y el NO, los cuales son capaces de convertirse en peroxinitrito (ONO_2^-), el cual promueve de forma indirecta la formación de la 3-NT. La formación de 3-NT también puede deberse a la expresión de dióxido de nitrógeno, ácido nitroso, cloruro de nitrilo y ciertas peroxidasas derivadas de células inflamatorias, como lo son; linfocitos (presentes en corteza y médula) y las células dendríticas (presentes solo en la médula tímica), células que pueden mediar en la nitración de la tirosina para formar 3-NT. De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se observó producción de 3-NT por la inhalación de vanadio conforme avanzó el tiempo de exposición tanto en la corteza como en la médula del timo de ratones, la cual podría ser producida por macrófagos, linfocitos y células dendríticas (figura 15 y 16).

Así mismo, Regal y colaboradores (2015), reportaron que el interferón gamma, el cual es un promotor para la producción de NO por parte de los macrófagos, puede ser producto de los linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, células NK, linfocitos B, linfocitos TNK, monocitos, los mismos macrófagos o las células dendríticas. Estas células se encuentran distribuidas en diferentes partes del timo, tanto en corteza como en médula, lo que podría explicar la expresión de 3-NT en todo el timo como se pudo observar en los resultados (figura 15 y 16).

El aumento en la producción de ERN conduce al estrés nitrosante, y se puede ver reflejado en el incremento del marcador 3-NT en todo el timo, esto puede deberse a que diversos compuestos de vanadio incrementan la fosforilación y la actividad de la NOS, lo que estaría relacionado con el incremento de la 3-NT en el timo de ratones expuestos a la inhalación de vanadio y lo que concuerda con nuestros resultados (figura 17), en los cuales se observa un aumento de la 3-NT+ conforme aumentan las semanas de exposición y el cual es estadísticamente significativo a partir de la semana 2 de exposición a la inhalación de vanadio comparado con los controles (Bhuiyan *et al.*, 2009).

El aumento de las ERN como el NO, también puede estar asociado con la muerte por apoptosis de los linfocitos T, debido a que los macrófagos producen NO como factor proapoptótico para linfocitos T autorreactivos y así evitar que éstos salgan a la circulación (García *et al.*, 2006).

Además de evitar la salida de clonas autorreactivas de linfocitos T a la circulación, el aumento del NO puede provocar un deterioro en la respuesta inmune, debido a la disminución de poblaciones celulares como las CD4 y CD8, las cuales son las principales encargadas de dar una respuesta ante la presencia de un antígeno, como un microorganismo patógeno, lo que resultaría en un deterioro del organismo (Herbin *et al.*, 2016; Kocic *et al.*, 2010).

Como mencionamos anteriormente, en condiciones normales, el NO se encuentra relacionado con la muerte de linfocitos T autorreactivos, sin embargo, en este estudio no sabemos si todas las clonas de linfocitos T autorreactivas están muriendo por apoptosis, una sobreproducción de NO que provoque estrés nitrosante puede dañar a todas las poblaciones celulares presentes en el timo, tanto a los linfocitos T como a las poblaciones encargadas de su maduración, como lo son las CET y las CD, y tal vez no todos los linfocitos T autorreactivos mueran, dando paso a que algunos logren salir a la circulación.

De acuerdo con los resultados reportados por Ustarroz-Cano (2017) y Fortoul, *et al.*, (2011) la inhalación de vanadio provoca un aumento en las CETm, así como una distribución errática en el marcador de citoqueratina 5 (K5+) y cambios en la relación corteza-médula, en la cual la médula ocupaba una menor área y se encontraba distribuida a través de los lobulillos tímicos y no en el centro como debería; estos resultados sugieren que también las CETc pueden estar alteradas y por lo tanto la barrera hematotímica (conformada por CET) también. Esta barrera es la encargada de evitar la entrada de antígenos circulantes al timo, los cuales podrían formar clonas autorreactivas de linfocitos T.

González-Villalva (2004), con microscopía electrónica de transmisión observó estructuras similares a nódulos linfoides y presencia de células plasmáticas, lo que sugería la presencia de linfocitos B activados en el timo de ratones expuestos a la inhalación de vanadio, sin embargo, la presencia de linfocitos B en el timo ha sido reportada en condiciones normales en la médula tímica (Perera y Huang, 2015; Herbin *et al.*, 2016).

Se ha descrito que la actividad citotóxica del NO por sí sola es débil, sin embargo, esta molécula es capaz de reaccionar con los aniones superóxido producidos por los macrófagos y causarle un daño al tejido al generar peróxidos de nitritos (Figuroa-Vega, 2008). Hernández-Rodríguez y colaboradores (2014), han reportado que el NO tiene la propiedad de atravesar fácilmente las membranas sin necesidad de receptores en la superficie, así como tiene la capacidad de unirse covalentemente a metales de transición. Estos mecanismos permiten que el NO pueda modificar directamente la actividad de una enzima o un receptor membranaral y alterar la transcripción de proteínas.

Por lo tanto, el estrés nitrosante es capaz de dañar proteínas, ácidos grasos, carbohidratos y ácidos nucleicos (como DNA y RNA) de las células, dañando su estructura y su función biológica. Estos daños promueven a su vez diversas alteraciones en los procesos bioquímicos de la célula y llevan a la activación del mecanismo de muerte celular programada, o mejor conocido como apoptosis, lo que podría explicar la disminución en la expresión de los marcadores CD11c y MHCII, así como en el número de CDs y a su vez la pérdida de relación en la corteza-médula, ya que la médula está constituida en gran medida por las CDs (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2014; García *et al.*, 2006).

La sobreproducción de NO puede llevar a una alteración en las poblaciones celulares del timo, sin embargo, el aumento de las CETm y la expresión errática en su marcador K5+ puede deberse a que la disminución de las CDs provoque una alteración en la selección negativa de los linfocitos T, por lo que las CETm aumenten para realizar la selección negativa, pues la función de las CD y las CETm es redundante (Herbin *et al.*, 2016).

González-Villalva (2006) menciona la presencia de necrosis de linfocitos e infiltrado inflamatorio en timo por inhalación de vanadio, el cual se debe a una posible alteración en el citoesqueleto de los linfocitos, así como por la inhibición de la enzima PTP (proteína tirosina fosfatasa). Esto puede ser una de las causas del aumento del estrés nitrosante en el timo, al ser la nitración de la tirosina la principal fuente de las ERN.

En las imágenes de la figura 15 y 16, así como en la gráfica de la figura 17, pudimos observar la presencia de células 3-NT+ en el timo de todos los ratones controles, lo que concuerda con lo descrito por Figueroa-Vega y colaboradores (2008), quienes mencionan que las isoformas constitutivas eNOS y nNOS producen NO en pequeñas cantidades, esto resulta importante durante la homeostasis como agente neurotransmisor y como regulador de la vasodilatación y permeabilidad vascular. En contraste, la iNOS permite que las células liberen grandes cantidades de NO en respuesta a ciertas citocinas, como el interferón (IFN) gamma, el factor de necrosis tumoral (TFN) alfa y la interleucina (IL) 1.

Figueroa-Vega y colaboradores (2008) también mencionan que el NO es capaz de mediar algunos de los efectos citotóxicos y citostáticos del sistema inmune, lo que concuerda con lo reportado por Trujillo y Tovar (2008), donde se habla del NO como un factor importante para la inmunidad, debido a que es efector de la citotoxicidad mediada por macrófagos, inhibe la proliferación de linfocitos T, en especial los T cooperadores tipo 1 (Th1), así como ayuda a mantener el balance entre los Th1 y Th2, importantes en la respuesta inflamatoria y función inmune. La sobreexpresión del NO es importante para evitar la expansión de las células Th1, involucradas en el desarrollo de inflamación persistente o no controlada. Esto corrobora la presencia de 3-NT en el timo de ratones controles, ya que hay expresión de NO en condiciones normales.

Existen muchos estudios que han demostrado la fuerte relación entre el desarrollo de enfermedades autoinmunes con la exposición a la contaminación atmosférica, especialmente, al material particulado (PM), caracterizado por el aumento en la mortalidad y morbilidad a causa de enfermedades respiratorias y cardiovasculares.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por una activación prolongada del sistema inmune innato y una respuesta inflamatoria crónica. Estas han sido comúnmente asociadas con un aumento en la concentración de ERON en las células. Esto se relaciona no solo con el inicio de la respuesta pro-inflamatoria por parte de las ERON, sino también con la modificación estructural de los autoantígenos que resulta en la generación de nuevos epítomos (determinantes antigénicos) potencialmente autorreactivos. Estas alteraciones ocurren en la peroxidación dependiente de las ERON de lípidos dentro de las células, lo que conduce a la formación de aldehídos altamente reactivos que pueden formar enlaces covalentes con proteínas y alterar tanto su estructura como su función biológica. Y los productos de modificación oxidativa presentes en la sangre se consideran biomarcadores potenciales del estrés oxidativo sistémico, de la inflamación y de las enfermedades autoinmunes (Gawda *et al.*, 2017).

Kyogoku y colaboradores (2019), mencionan que respuestas inmunes e inflamatorias provocan una excesiva producción del NO, lo que conduce a la formación de ERN como el peroxinitrito y el dióxido de nitrógeno. Esta sobreproducción de ERN lleva al estrés nitrosante, el cual causa inflamación de vías respiratorias y daño tisular en pulmón entre otras cosas. De igual forma, Sugiura (2008) muestra que hay numerosos mediadores proinflamatorios biológicamente activos responsables en la patología del asma, entre los cuales hay mayor evidencia que indica que las ERON endógenas o exógenas son responsables de la inflamación en vías respiratorias de individuos con asma.

Monteiro y colaboradores (2019) explican que el cáncer promueve una condición inflamatoria crónica sin solución, en la cual las ERO y el NO son mediadores y moduladores de diversos procesos de señalización celular que llevan al desarrollo

de los tumores, ya que juegan un papel esencial en el mantenimiento del estrés oxidante y nitrosante en los mismos.

Las patologías mencionadas anteriormente nos indican la existencia de un daño en la respuesta inmune, la cual puede conducir a enfermedades pulmonares y al desarrollo de melanomas, en las que se ha observado un papel importante de las especies reactivas del nitrógeno. En el timo se ha observado un daño en las poblaciones celulares encargadas de la selección positiva y negativa de los linfocitos T por la inhalación de vanadio, lo que nos hace pensar que el aumento de estrés oxidante y nitrosante en este órgano puede afectar la respuesta inmune.

El timo, es un órgano linfoide esencial no solo para el desarrollo de los linfocitos T, sino que es un órgano fundamental en la linfocitopoyesis y en la inmunogénesis, controla la función inmune de otros órganos linfoides (ganglios, bazo y nódulos) y juega un papel importante en la inmunidad del recién nacido, por los que estas alteraciones pueden comprometer sus funciones a lo largo del desarrollo y desencadenar diversos tipos de enfermedades autoinmunes (Loyola *et al.*, 2004).

Es la primera vez que se reporta que la inhalación de vanadio produce un aumento en la expresión de 3-NT en el timo de ratones conforme avanza el tiempo de exposición a este metal, ahora tenemos un reto muy importante, demostrar los mecanismos de acción que nos permitan relacionar los cambios observados anteriormente en el timo por la inhalación de este metal con el aumento en la expresión de 3-NT.

8. Conclusiones

La expresión de la 3-NT es mayor en el timo de los ratones expuestos a vanadio a comparación de los ratones controles, lo que se observó a partir de la semana 2 de exposición.

La expresión de la 3-NT en el timo de ratones controles y experimentales se observó tanto en corteza como en la médula tímica.

La inhalación de vanadio produjo un aumento en la 3-Nitrotirosina (3-NT), marcador para estrés nitrosante, en el timo de ratones conforme aumentan las semanas de exposición.

9. Bibliografía:

Ahsan, H. (2013). 3-Nitrotyrosine: a biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human Immunology*, 74(10), 1392-1399.

Anderson, J. O., Thundiyil, J. G., y Stolbach, A. (2012). Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of Medical Toxicology*, 8(2), 166-175.

Bhuiyan, M. S., Shioda, N., Shibuya, M., Iwabuchi, Y., y Fukunaga, K. (2009). Activation of endothelial nitric oxide synthase by a vanadium compound ameliorates pressure overload-induced cardiac injury in ovariectomized rats. *Hypertension*, 53(1), 57-63.

Campolo, N. (2013). Nitración y oxidación de tirosina por peroxinitrito mediada por metales de transición: mecanismos de reacción y relevancia biológica. *Facultad de Medicina, Universidad de la República; Montevideo, Uruguay*.

Castell-Rodríguez, A., Herrera-Enríquez, M. y Ustarroz-Cano, M. (2010). Capítulo 8; Tejido y órganos linfoides. En *Histología y Biología Celular*. *Mc Graw Hill*. Ciudad de México, pp 161-176.

Castell-Rodríguez, A., Herrera-Enríquez, M., Ustarroz-Cano, M. (2017). Capítulo 11; Tejido y órganos linfoides. En *Histología y biología celular*, 3era edición. *Mc Graw Hill*, Ciudad de México, pp 175-189.

Centelles, J. J., Redondo, C. E., y Imperial, S. (2004). Óxido nítrico: un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *Offarm: farmacia y sociedad*, 23(11), 96-102.

Espinosa-Zurutuza, M., González-Villalva, A., Albarrán-Alonso, J. C., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., Rojas-Lemus, M., López-Valdéz, M. y Fortoul, T. I. (2018). Oxidative Stress as a Mechanism Involved in Kidney Damage After Subchronic Exposure to Vanadium Inhalation and Oral Sweetened Beverages in a Mouse Model. *International journal of toxicology*, 37(1), 45-52.

Figuroa-Vega, N., Majano, P., Larrañaga, E., Bravo, J. M., Rodríguez-Ramos, R., González-Amaro, R., y Marazuela, M. (2008). Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias. *Endocrinología y Nutrición*, 55(8), 340-345.

Fortoul, T.I. *et al.* (2019). Capítulo 3; Soporte, movimiento, transporte y defensa. En *Biología de la Salud. Universidad Autónoma de Nuevo León*. Nuevo León, México, pp. 130.

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

Fortoul, T.I., Rodríguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutiérrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colin-Barenque, L., Montañó, L.F., García-Pelez, I., Bizarro-Nevarés, P., López-Valdez, N., Falcon-Rodríguez, C. I., Jiménez-Martínez, R.S., Ruiz-Guerrero., M.L., López-Zepeda., L.S., Morales-Rivero, A. y Muñiz-Rivera-Cambas, A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* .2011:952043

Fortoul, T.I., Rodríguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutiérrez, G., Ustarroz-Cano, M. y Jiménez-Martínez, R.S. (2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chimica Acta*, 420, 8-15.

Fortoul, T.I. y Rojas-Lemus M. (2007). Vanadium as an air pollutant. In: Fortoul TI, Ávila-Costa MR, editors. *Vanadium: Its Impact on Health.* New York: Nova Science Publishers; pp. 1-6. ISBN: 1-60021-609-9.

García, G. A., Clavijo, D., Mejía, O. R., Casariego, C. A., García Cardona, A., Hernández-Vela, S., Anunciación, S. y Cobos, C. (2006). *Biología, patobiología,*

bioclínica y farmacoterapéutica de la di-metil-arginina asimétrica (ADMA) en la especie humana. *Universitas Médica*, 47(4).

Gawda, A., Majka, G., Nowak, B., y Marcinkiewicz, J. (2017). Air pollution, oxidative stress, and exacerbation of autoimmune diseases. *Central-European journal of immunology*, 42(3), 305.

González Villalva, A. (2004). Alteraciones morfológicas secundarias a la inhalación aguda, subcrónica y crónica de vanadio en médula ósea, timo y sangre periférica. Modelo en ratón. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

González Villalva, A., Fortoul, T. I., Ávila-Acosta, M. R., Piñón-Zarate, G., Rodríguez-Lara, V., Martínez-Levy, G., Rojas-Lemus, M., Bizarro-Nevarés, P., Díaz-Bech, P., Mussali-Galante, P., and Colín-Barenque, L. (2006). Thrombocytosis induced in mice after subacute and sub-chronic V₂O₅ inhalation. *Toxicol. Ind. Health*. 22:113–116.

González-Villalva, A., Piñón-Zarate, G., De la Pena-Díaz, A., Flores-García, M., Bizarro-Nevarés, P., Rendón-Huerta, E., Colín-Barenque, L., and Fortoul, T. I. (2011). The effect of vanadium on platelet function. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32:447–456.

Heber, S. M., Valero, O., y Antonio, I. G. (2013). Tolerancia inmunológica, un recorrido en el tiempo: ¿cómo discriminar entre lo propio y lo extraño?. *Revista Colombiana de Reumatología*, 20(4), 237-249.

Herbin, O., Bonito, A. J., Jeong, S., Weinstein, E. G., Rahman, A. H., Xiong, H., Merad, M. y Alexandropoulos, K. (2016). Medullary thymic epithelial cells and CD8 α ⁺ dendritic cells coordinately regulate central tolerance but CD8 α ⁺ cells are dispensable for thymic regulatory T cell production. *Journal of autoimmunity*, 75, 141-149.

Hernández-Rodríguez, S., Gutiérrez-Salinas, J., García-Ortiz, L., Mondragón-Terán, P., Ramírez-García, S. y Núñez-Ramos, N. (2014). Estrés oxidativo y nitrosativo como mecanismo de daño al hepatocito producido por el metabolismo del etanol. *Medicina Interna de México*, 30(3).

Kocic, G., Sokolovic, D., Jevtovic, T., Veljkovic, A., Kocic, R., Nikolic, G., Basic, J., Stojanovic, D., Cencic, A. y Stojanovic, S. (2010). Hyperglycemia, oxidative and nitrosative stress affect antiviral, inflammatory and apoptotic signaling of cultured thymocytes. *Redox Report*, 15(4), 179-184.

Kumar, A., y Attri, A. K. (2016). Correlating respiratory disease incidences with corresponding trends in ambient particulate matter and relative humidity. *Atmospheric Pollution Research*, 7(5), 858-864.

Kyogoku, Y., Sugiura, H., Ichikawa, T., Numakura, T., Koarai, A., Yamada, M., Fujino, N., Tojo, Y., Onodera, K., Tanaka, R., Sano, H., Yamanaka, S., Itakura, K., Mitsune, A., Tamada, T., Akaike, T., Ichinose, M. y Sato, K. (2019). Nitrosative stress in asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Lacasaña-Navarro, M., Aguilar-Garduño, C. y Romieu, I. (1999). Evolución de la contaminación del aire e impacto de los programas de control en tres megaciudades de América Latina. *Salud Publica de México*; Vol. 41, No. 3, pp. 203-215.

La Padula, P. (2010). Adaptación del miocardio de rata a la hipoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares. *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; Argentina*.

Loyola, C. N. P., Rumbaut, G. I. P., Hernández, D. R., y Leónn, M. S. G. (2004). Glándula timo: aspectos morfofuncionales y clínicos. Medisur: *Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos*, 2(3), 44-52.

Marsán Suárez, V., del Valle Pérez, L. O., y Macías Abraham, C. (2013). Aspectos actuales de la organogénesis. Función e involución del timo. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(4), 349-358.

Monteiro, H. P., Rodrigues, E. G., Reis, A. K. A., Longo Jr, L. S., Ogata, F. T., Moretti, A. I., da Costa, P.E., Teodoro, A. C. S., Toledo, M. S y Stern, A. (2019). Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of

melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide* 25(2), 138-144.

Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., & Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology letters*, 150(2), 135-143.

Nacka-Aleksić, M., Pilipović, I., Kotur-Stevuljević, J., Petrović, R., Sopta, J., y Leposavić, G. (2019). Sexual dimorphism in rat thymic involution: a correlation with thymic oxidative status and inflammation. *Biogerontology*, 1-25.

Nosenko, M. A., Drutskaya, M. S., Moisenovich, M. M., & Nedospasov, S. A. (2016). Bioengineering of Artificial Lymphoid Organs. *Acta naturae*, 8(2), 10–23.

Oyarzún, M. (2010). Contaminación aérea y sus efectos en la salud. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 26(1), 16-25.

Parkin, J., y Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777-1789.

Perera, J., & Huang, H. (2015). The development and function of thymic B cells. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(14), 2657–2663. doi:10.1007/s00018-015-1895-1.

Piñón-Zarate, G., Rodríguez-Lara, V., Rojas-Lemus, M., Martínez-Pedraza, M., González-Villalva, A., Mussali-Galante, P., y Fortoul, T.I. (2008). Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses. *Journal of immunotoxicology*, 5(2), 115-122.

Pozzer, A., Bacer, S., Sappadina, S. D. Z., Predicatori, F., y Caleffi, A. (2019). Long-term concentrations of fine particulate matter and impact on human health in Verona, Italy. *Atmospheric Pollution Research*, 10(3), 731-738.

Regal, M., Borges, A., de Armas García, J., Alvarado, L., Cedeño, J., y del Sol, J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62.

Repetto, E., Aliendo, M. M., y Biasutto, S. N. (2010). CAMBIOS MORFOLÓGICOS DEL TIMO EN LA ETAPA FETAL Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA. *Revista Argentina de Anatomía Clínica*, 2(1), 7-16.

Rodríguez-Mercado, J. y Altamirano-Lozano, A. (2006). Vanadio; contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22 (4) 173-189.

Rojas de la Fuente, C. V. (2015). Determinación de nitración de proteínas en tirosina en membrana sinovial de articulación metacarpofalángica de equino como posible marcador de osteoartritis en etapa inicial. *Universidad de Chile; Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Santiago, Chile.*

Romero Placeres, M., Diego Olite, F., y Álvarez Toste, M. (2006). La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. *Revista cubana de higiene y epidemiología*, 44(2), 0-0.

Rosales-Castillo, J., Torres-Meza, V., Olaiz-Fernández, G., y Borja-Aburto, V. (2001). Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*, 43(6), 544-555.

Ross, M. y Pawlina, W. (2007). Capítulo 14; Sistema Linfático. En *Histología: Texto y atlas color con biología células y molecular*, 5ta edición. *Editorial médica panamericana*, pág. 457.

Sattler S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. In: Sattler S., Kennedy-Lydon T. (eds) *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1003. Springer, Cham

Sugiura, H. y Ichinose, M. (2008). Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma. *Antioxidants & redox signaling*, 10(4), 785-798.

Tomar, N. y De, R. K. (2014). A Brief Outline of the Immune System. *Immunoinformatics*, Vol. 1184, 3–12.

Trujillo, M. y Tovar, A. (2008). Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36(1), 45-52.

Ustarroz-Cano, M., García-Peláez, I., Cervantes-Yépez, S., López-Valdez, N. y Fortoul, T. (2017) Thymic cytoarchitecture changes in mice exposed to vanadium, *Journal of Immunotoxicology*, 14:1, 9-14.

Ustarroz-Cano, M., García-Peláez, I., Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M., Soldevila, G., y Fortoul, T. I. (2012). CD11c decrease in mouse thymic dendritic cells after vanadium inhalation, *Journal of Immunotoxicology*, 9:4, 374-380.

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

Zhao, C. N., Xu, Z., Wu, G. C., Mao, Y. M., Liu, L. N., Qian-Wu, Dan, Y. L., Tao, S.S., Zhang, Q., Sam, N. B., Fan, Y. G., Zou, Y. F., Ye, D.Q. y Pan, H.F. (2019). Emerging role of air pollution in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*.

Páginas de internet

Figura 2. Greenhub (2017). El tamaño importa: las partículas más pequeñas del aire. Recuperado de: <http://www.greenhub.cat/el-tamano-importa-las-particulas-mas-pequenas-del-aire/> [Revisado: 2019-12-04].

Figura 3. Made-in-China (2019). Pentóxido de vanadio. Recuperado de: https://es.made-in-china.com/co_wjmlxyly/image_Vanadium-Pentoxide_rsonsrhg_cAyTGihKEPol.html [Revisado: 2019-12-04].

Figura 8. Univesidad de Valencia (2016). Tema 66. Recuperado de: <http://mural.uv.es/monavi/disco/primero/bioquimica/Tema66.pdf> [Revisado: 2019-12-04].