



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA INHALACIÓN DEL VANADIO EN
LOS LINFOCITOS T REGULADORES (TREG) DEL
TIMO DE RATÓN**

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:

PILAR TANIA PEÑA LÓPEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARTHA LUZ USTARROZ CANO
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 de jurado

1. Datos del alumno
Peña
López
Pilar Tania
5540921189
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
099247225
2. Datos del asesor
Dra.
Martha Luz
Ustarroz
Cano
3. Datos de sinodal 1
Dr.
Teresa Imelda
Fortoul
Van der Goes
4. Datos de sinodal 2
Dra.
Patricia
Rivas
Manzano
5. Datos de sinodal 3
Dra.
Gabriela
Piñón
Zárate
6. Datos de sinodal 4
Dra.
Citlalli
Osorio
Yáñez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la inhalación de vanadio en los linfocitos T reguladores (Treg) del timo de ratón.
77 p
2021

AGRADECIMIENTOS

A las sinodales que conforman el jurado para mi examen profesional

Dra. Martha Luz Ustarroz Cano, Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes, Dra. Patricia Rivas Manzano, Dra. Gabriela Piñón Zárata y Dra. Citlalli Osorio Yáñez.

Agradecimientos Técnicos

Al personal académico y administrativo del laboratorio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por su asesoría y apoyo durante la realización del presente trabajo.

Agradecimientos Personales

Nuevamente, a la Doctora Teresa Imelda Fortoul Van der Goes por su apoyo y orientación, así como su calidad humana y sus palabras durante mi estadía como estudiante en el laboratorio. Sin su presencia este trabajo no habría visto la luz.

A la Doctora Martha Luz Ustarroz Cano por su labor como tutora, así como su guía durante la realización de este trabajo.

A la Doctora Nelly por su paciencia y su instrucción

A los investigadores del laboratorio, a la Doctora Marcela, la Doctora Paty, la Doctora Gaby, al Doctor Armando y al Doctor Francisco con mi mayor admiración por su invaluable trabajo en la investigación.

A los profesores y profesoras de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México que sin saberlo fueron una luz en momentos de mucha adversidad. Sus conocimientos, calidad humana y su compromiso con el conocimiento fueron el soporte que me permitió llevar a cabo mis estudios.

Especialmente a Alejandra Abigail González Valdez, Estefanía Arroyo Jilote, Mónica Elías González, María Magdalena López Ramírez, Jovanny Fernando Yonatan Olvera Bautista, María Teresa Rubio Monroy y José Luis Martínez Trujillo.

A mis compañeras en el laboratorio de biología tisular de la facultad de medicina que empezaron este camino conmigo Fernanda, Gaby y especialmente a Marisol López Ángel por toda su ayuda, por escucharme, por su empatía y por su amistad.

Empecé la carrera como estudiante de biología con mucha gente, pero al final la terminé con un par de personas valiosas que espero me acompañen por mucho tiempo. Gracias a Laura Rivero y Ana Lucía Castrejón por ser mis compañeras y amigas, por escuchar mis quejas y permitirme oír las suyas. Las quiero.

Y por último a Luis Enrique Juárez, José Ramón García, Alain Briseño y a la señora Norma Ortega por todo su apoyo.

DEDICATORIA

A mis padres por darme la oportunidad de regresar a la escuela después de tantos años y tantos tropiezos. Gracias por ver en mí lo que muchas veces yo no puedo y gracias por apostar por mi futuro y por mi capacidad. Doy gracias a la vida que aún están conmigo para dar juntos este paso.

Gracias a mi mamá, Adriana, por luchar por mí desde el vientre.

A mi papá, Alfredo, por su presencia

A mi papá Noel, por su apoyo

A mi pequeña Tako, a mi abuelita Pili y a Ernesto que me acompañan como recuerdo. Aunque no se encuentran conmigo y no pueden celebrar este logro a mi lado, los años que me regalaron son parte integral de la persona que soy.

Nitimur in vetitum semper cupimusque negata – Ovidio

露と落ち露と消えにし我が身かな浪速のことも夢のまた夢 –
豊臣 秀吉

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	8
1. Introducción.....	10
1.1. Zona Metropolitana del valle de México.....	10
1.2. Contaminación atmosférica en la ZMVM.....	10
1.3. Contaminación atmosférica.....	12
1.3.1. Composición del aire.....	12
1.4. Partículas suspendidas.....	20
1.4.1. Efecto de las partículas suspendidas.....	22
1.5. Vanadio.....	25
1.5.1. Generalidades del Vanadio (V).....	25
1.5.2. Vanadio como contaminante.....	27
1.5.3. Efectos del vanadio en la salud.....	27
1.5.4. Efecto del vanadio en el sistema inmunológico.....	28
1.6. Generalidades del sistema inmunológico.....	31
1.7. Timo.....	33
1.7.1. Poblaciones celulares del timo.....	38
1.7.2. Linfocitos T reguladores.....	41
1.8. Marcadores de poblaciones celulares FOXP3.....	43
2. Justificación.....	45
3. Hipótesis.....	45
4. Objetivos.....	45
4.1. Objetivos generales.....	45
4.2. Objetivos particulares.....	45
5. Método.....	46
6. Resultados.....	56
7. Discusión.....	64
8. Conclusión.....	69
9. Bibliografía.....	70

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1: Mapa de la ZMVM.....	11
Figura 2: Patrón de viento.....	18
Figura 3: Inversión térmica.....	19
Figura 4: Clasificación PM.....	21
Figura 5: PM por tamaño.....	23
Figura 6: Ruta de efectos adversos por PM.....	24
Figura 7: Vanadio en estado puro.....	26
Figura 8: Pentóxido de vanadio.....	26
Figura 9: Clasificación de órganos linfoides.....	32
Figura 10: Fotomicrografía del timo de ratón.....	36
Figura 11: Capacitación de timocitos en el timo.....	37
Figura 12: Origen de Treg.....	43
Figura 13: Protocolo de inhalación.....	47
Figura 14: Nebulizador.....	50
Figura 15: Protocolo de inmunohistoquímica y densitometría.....	55
Figura 16: Fotomicrografías de inmunohistoquímica vs FOXP3.....	57
Figura 17: Fotografía de inmunohistoquímica semana 2 control.....	58
Figura 18: Fotografía de inmunohistoquímica semana 2 experimental.....	59
Figura 19: Fotografía de inmunohistoquímica semana 4 control.....	60
Figura 20: Fotografía de inmunohistoquímica semana 4 experimental.....	61
Figura 21: Gráfica de análisis estadístico.....	62
Figura 22: Efecto de CETm y CD en Treg.....	66
Tabla 1: Comparación de la composición del aire.....	13
Tabla 2: Antecedentes de efectos de V en el S.I.....	30
Tabla 3: Tipos de CET en el timo.....	40

RESUMEN

En las últimas décadas la contaminación atmosférica ha ido en aumento en la zona metropolitana del valle de México (ZMVM) con graves consecuencias para la salud. Los seres vivos se encuentran expuestos a dicha contaminación por la quema de combustibles fósiles que liberan partículas contaminantes a las que se adhieren algunos elementos, como el vanadio (V), que entran al organismo principalmente por la inhalación. El sistema inmunológico, del que depende la defensa del organismo contra agentes patógenos, es uno de los más afectados. De acuerdo con los antecedentes se han observado alteraciones en células relacionadas con la respuesta inmune por efecto de la exposición a V como son las células presentes en el timo: las células dendríticas y las células epiteliales tímicas, así como en sus marcadores. Estas células se relacionan con la producción de linfocitos T reguladores (Treg) los cuales se encargan de regular la actividad de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, así como linfocitos NK y B.

En el timo las células dendríticas tímicas (CDt) y las células epiteliales tímicas medulares (CETm) tiene un papel redundante en la regulación de la eliminación de clonas autorreactivas.

De acuerdo con los antecedentes, la exposición a V por inhalación genera alteraciones en CDt y CETm. Se observó una disminución en el número de CDt y un aumento en las CETm. La acción de CETm en la regulación y producción de Treg es relegada en favor del proceso de eliminación de clonas reactivas.

El propósito de este trabajo es estudiar el efecto de la inhalación de V sobre la cantidad de los Treg presentes en el timo en ratón.

Se realizó un protocolo de inhalación de V_2O_5 , a una concentración de 0.02 M durante 4 semanas, con 20 ratones control y 20 experimentales de la cepa CD1, machos, con peso de $32 \pm 2g$, ciclo de luz-oscuridad de 12-12h y alimento *ad libitum*. Al final de cada semana se disectaron los timos de 5 ratones del grupo experimental y 5 del control, los cuales se procesaron con la técnica histológica, y se realizó la

inmunohistoquímica contra FOXP3, marcador de los Treg. Se tomaron fotomicrografías para realizar un análisis densitométrico seguido de un análisis por ANOVA del grupo control contra los experimentales de cada semana.

Las células FOXP3+ se encontraron en corteza, médula y zona corticomedular tímica, en el grupo control y en el experimental, no se observaron cambios estadísticamente significativos. Sin embargo, esto no implica que estos linfocitos se encuentren activos o que funcionen adecuadamente, por lo que se tendrían que hacer estudios con marcadores de activación de Treg.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)

Se denomina zona metropolitana al espacio geográfico urbanizado o municipio que cuenta con al menos 50 mil habitantes, donde la actividad y funciones exceden el espacio del municipio por lo que incluyen a municipios vecinos, en el que el municipio más grande toma el papel de municipio central y contempla también a aquellos municipios con un 50 por ciento de su población unida socioeconómicamente al municipio central (Consejo Nacional de Población 2012; CONAPO, 2013).

La Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM), llamada también de manera indistinta Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), comprende las 16 alcaldías de la Ciudad de México, 59 municipios del Estado de México y un municipio del estado de Hidalgo, con una superficie aproximada de 7,866 km² y alberga aproximadamente al 17% de la población total del país (OCDE, 2015).

1.2. Contaminación atmosférica en la ZMVM

La composición del aire en zonas urbanas, los diversos procesos relacionados con el viento en asentamientos urbanizados y las condiciones geográficas han propiciado el incremento de la contaminación atmosférica en la ZMVM.

Por otra parte, de acuerdo con la OCDE, el incremento de motorización; la falta de opciones de movilización dentro de la ZMVM; el interés en la construcción de vías destinadas a vehículos automotores; el crecimiento urbano no planificado y la irregularidad en el cumplimiento de las leyes ambientales, así como el mal manejo de desperdicios sólidos han derivado en una disminución en la calidad del aire en las últimas décadas (OCDE, 2013, 2015).

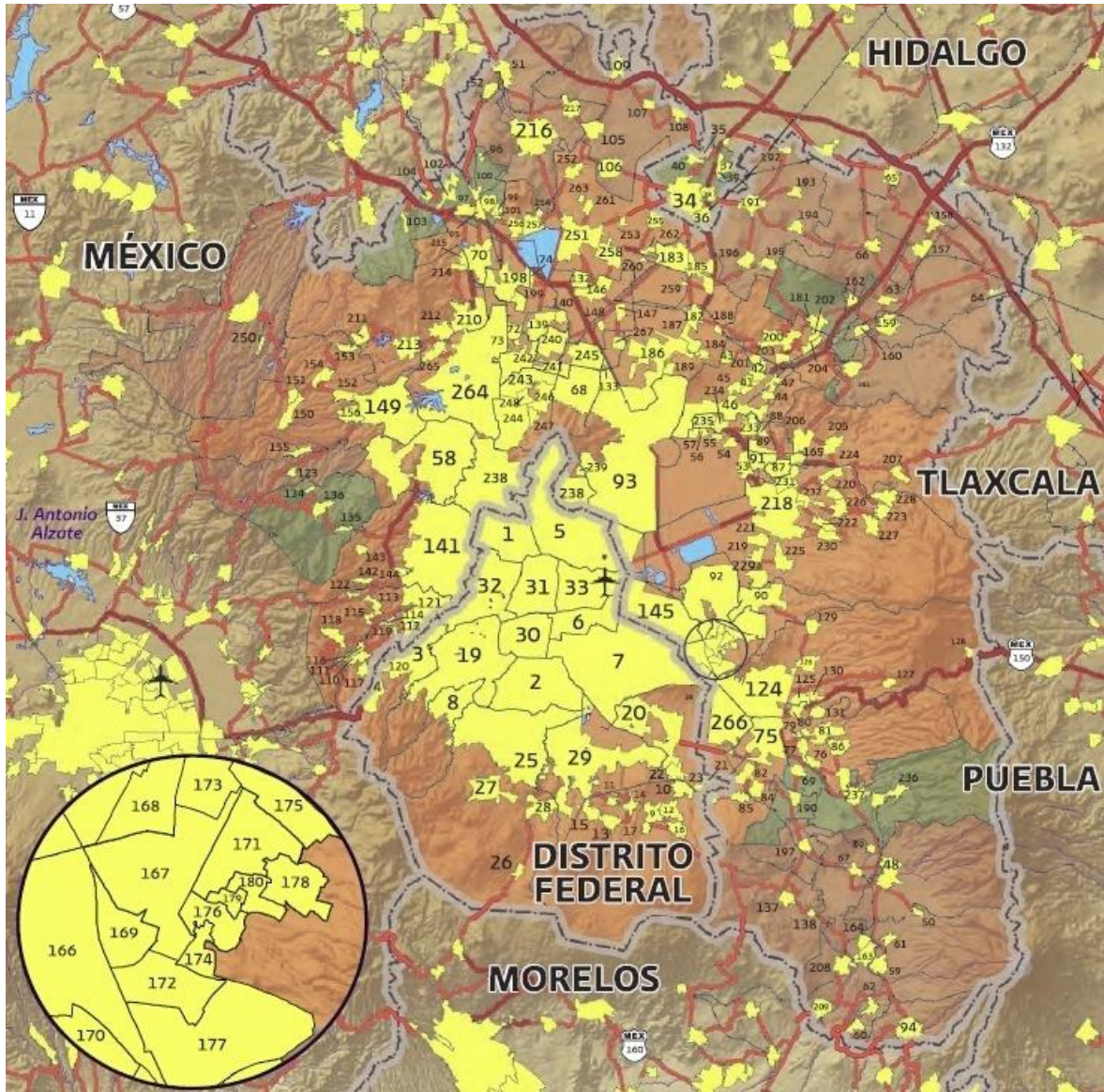


Figura 1. Mapa del Valle de México (Modificado de INEGI-SEDESOL-CONAPO 2012).

1.3. Contaminación atmosférica

1.3.1. Composición del aire

En condiciones normales, como es el caso de las zonas rurales, la composición del aire está conformada por nitrógeno (N), oxígeno (O), argón (Ar) y dióxido de carbono (CO_2) entre otros gases y por material particulado en estado sólido o en suspensión como son el agua, polvo, sales y microorganismos como bacterias y algas aerobias entre otros. Mientras que la composición atmosférica en zonas urbanas contienen además otros gases como dióxido de azufre (SO_2), óxido de nitrógeno (NO), dióxido de nitrógeno (NO_2), monóxido de carbono (CO); por smog fotoquímico (reacción química desencadenada por la interacción de la luz solar, diversos óxidos y compuestos volátiles) como el ozono, otro material particulado en suspensión (aerosoles) o en estado sólido como polvos, cenizas, sales entre otros, dando como resultado una contaminación del aire o contaminación atmosférica. Cuando las concentraciones de estos componentes son altas representan un peligro para la salud de las diversas formas de vida, así como para los ecosistemas. Estos efectos pueden presentarse inmediatamente o con el paso del tiempo dependiendo del tipo, duración y dosis de la exposición (Moreno, 2010, Oke *et al.*, 2017; Tesón *et al.*, 2016; Tomasi *et al.*, 2017).

La diferencia entre los componentes del aire tipo (rural) y el aire urbano es propiciada por la quema de combustibles fósiles por parte de vehículos automotores, la actividad industrial, el uso de calefactores, refinerías y otras actividades antropogénicas (Moreno, 2010).

Compuesto	Aire Tipo	Aire Urbano
Mezcla de gases	✓	✓
Partículas en suspensión	✓	✓
SO ₂ , NO, NO ₂ , CO etc.		✓
Compuestos orgánicos		✓
Ozono (O ₃)		✓
Aerosoles		✓

Tabla 1. Comparación de la composición del aire tipo (rural) y el aire urbano (basado en Moreno, 2010).

Algunas particularidades notables del aire en zonas urbanas son:

Dióxido de carbono (CO₂) – Es un gas emitido por seres vivos y por el suelo; es el producto principal de la quema de combustibles. Aunque no es tóxico para los seres humanos *per se*, su acumulación desplaza y reduce el oxígeno. Es un gas de efecto invernadero de vida larga implicado en el proceso del cambio climático (Oke *et al.*, 2017).

Monóxido de carbono (CO) – Contaminante derivado de la combustión incompleta en actividades antropogénicas (uso de vehículos, actividad industrial, uso de estufas y calentadores). Afecta tanto a seres humanos como a otros animales ya que interfiere con la absorción de O por parte de la hemoglobina causando falta de oxígeno. En bajas concentraciones pueden causar dolores de cabeza y reducir

funciones a nivel cerebral. En altas concentraciones puede ser letal. Contribuye a la formación de gases de efecto invernadero cuando se oxida (Oke *et al.*, 2017).

Halocarburos y gases halogenados – Son gases inertes, se utilizan como gases dieléctricos (o insulantes) que actúan como aislantes o refrigerantes en aparatos eléctricos; en la industria metalúrgica y en la fabricación de polímeros plásticos. Aunque hasta el momento no se conocen efectos directos sobre la salud, muchos de esos componentes son gases de efecto invernadero de vida larga y afectan la capa de O₃ al nivel de la estratosfera (Oke *et al.*, 2017; Tomasi *et al.*, 2017).

Plomo (Pb) – Se utiliza como aditivo para el petróleo y se libera por combustión en actividades antropogénicas. Por su toxicidad tiene efectos en diversos sistemas y órganos, como en riñones, hígado, sistema hematopoyético, en la capacidad reproductiva, puede causar daños en el cerebro, afectar el desarrollo mental y el crecimiento. En el ambiente, se deposita en los sistemas terrestres y acuáticos alterando los ecosistemas (Oke *et al.*, 2017).

Metano (CH₄) - Es un gas inflamable, se libera a la atmósfera como derivado de la quema de combustible y por descomposición anaeróbica. Hasta el momento no se conocen efectos directos sobre la salud, sin embargo, en dosis altas puede desplazar el oxígeno y provocar asfixia, en dosis menores se presentan mareos, somnolencia, salivación excesiva y vómito. Actúa como gas de efecto invernadero de vida larga (Oke *et al.*, 2017; Tomasi *et al.*, 2017; Hoja de seguridad, 2009).

Óxidos nitrogenados (NO, NO₂) – Contaminantes resultantes de la quema de combustible orgánico (carbón, aceite, gas, gasolina) y en menor medida como productos del ciclo del nitrógeno (N) llevado a cabo por la interacción entre organismos, suelo y atmósfera. La exposición crónica a los óxidos nitrogenados se relaciona con diversas enfermedades respiratorias. Ocasiona una hipertrofia o eutrofización (enriquecimiento exacerbado de nutrientes) de los sistemas acuáticos que provoca el crecimiento de algas, alterando la cantidad de oxígeno en el sistema y por tanto imposibilita el proceso de fotosíntesis (Oke *et al.*, 2017; Curtis *et al.*, 2008; Villaseñor *et al.*, 2001).

Óxido Nitroso (N₂O) – Derivado de la quema de combustible y por emisiones del suelo. Gas inflamable, se le conoce también como “gas de la risa” por su uso como sedante en el área de odontología. No se conocen efectos directos en la salud, pero, como el caso del metano, desplaza el oxígeno lo que puede causar mareos y somnolencia y en concentraciones altas puede ocasionar asfixia. Gas de efecto invernadero de vida larga (Oke *et al.*, 2017; Hoja de seguridad, 2015; Pubchem, 2019).

Compuestos orgánicos volátiles (VOC) – Son diversos compuestos de carbono que se encuentran volátiles a temperatura ambiente. La principal forma de emisión en zonas urbanas es por medio de residuos de gasolina, pinturas, limpiadores, pesticidas y solventes. Algunos de estos compuestos son carcinogénicos, otros pueden ocasionar irritación en la mucosa nasal y en ojos; fatiga, pérdida de coordinación, afectaciones en hígado, riñón, daño al sistema nervioso central entre

otros. Estos compuestos afectan también a la vegetación (Oke *et al.*, 2017; Cicolella *et al.*, 2008; EPA, 2019; Tomasi *et al.*, 2017).

Ozono (O₃) – Contaminante secundario, se deriva de VOC, Óxidos de nitrógeno (NO_x), Metano (CH₄) y CO. La exposición crónica deriva en daños al sistema respiratorio disminuyendo la capacidad pulmonar y potencialmente causando mortalidad prematura, también se ha ligado a alteraciones en la fisiología del sistema nervioso central. Es un gas de efecto invernadero de vida corta. Las concentraciones altas de O₃ afectan a la vegetación reduciendo el crecimiento en plantas (Oke *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

Dióxido de Azufre (SO₂) – Es el contaminante primario derivado de la ignición de combustibles que contienen Azufre (S) como el carbón, diésel y el petróleo; y como derivado de la actividad industrial. Entre los efectos en la salud humana se ha observado que promueven la inflamación de vías respiratorias agravando la intensidad de los ataques de asma. Por otra parte, presenta un efecto sinérgico positivo (un reforzamiento del efecto de dos o más componentes por separado) con el O₃ y partículas suspendidas totales (PM) de las cuales se hablará más adelante. Como efectos en los ecosistemas se presenta la acidificación de suelos y promueve la formación de partículas suspendidas totales PM (Oke *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2002; Tomasi *et al.*, 2017).

Las condiciones meteorológicas en zonas urbanizadas también juegan un papel sustancial en el incremento de la concentración de contaminantes atmosféricos.

Como son las condiciones anticiclónicas invernales, zonas de alta presión atmosférica mayor que la presión del aire circundante, que propician capas densas de aire frío encapsuladas entre capas de aire más cálido de menor densidad, dentro de un valle o cuenca urbana, fenómeno denominado inversión térmica. Este proceso mantiene los contaminantes atmosféricos atrapados en corrientes ascendentes, inhibiendo la acción de plumas de dispersión (modelo de dispersión de componentes y moléculas suspendidos en el aire, afectados por la dirección del viento) (Oxford, 2000; Spellman *et al.*, 2016).

La dirección y desplazamiento de los vientos en las zonas urbanas se encuentran afectados a su vez por la presencia de construcciones como edificios, los cuales crean obstáculos que alteran el patrón de dispersión del material transportado por el aire (Moreno, 2010; Oke *et al.*, 2017).

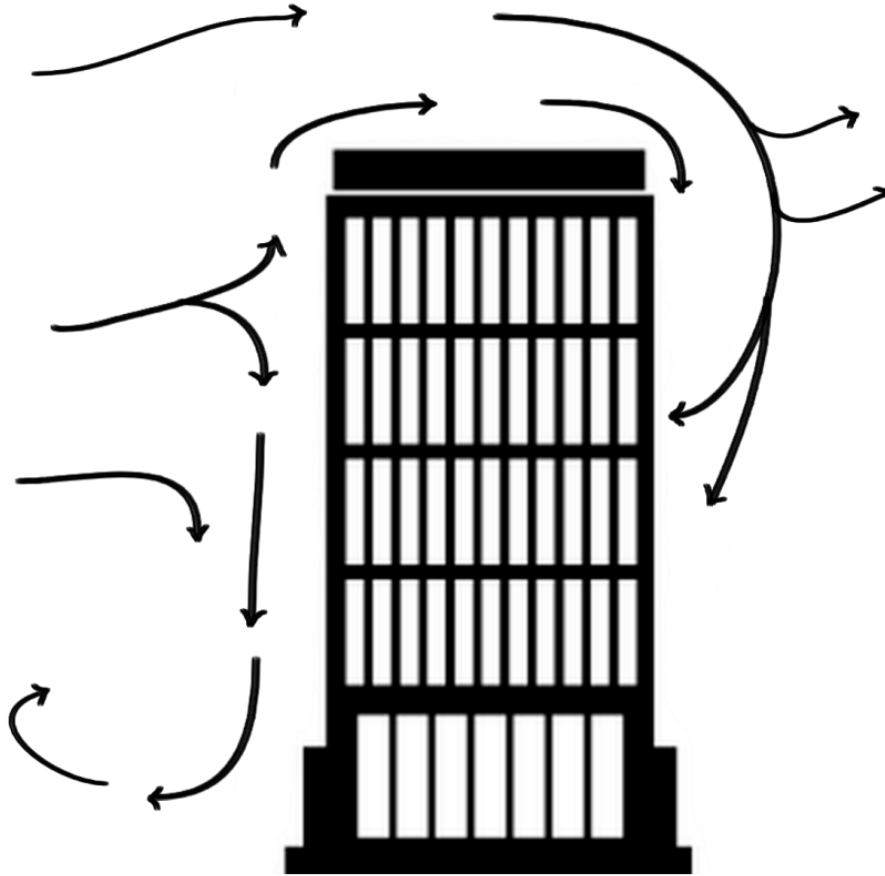


Figura 2. Patrón de dirección del viento perturbado por la presencia de un edificio. El curso de partículas contenidas en el aire es alterado por la presencia de construcciones de gran altura, modifica su dispersión y las concentra en la parte inferior (basado en Moreno, 2010).

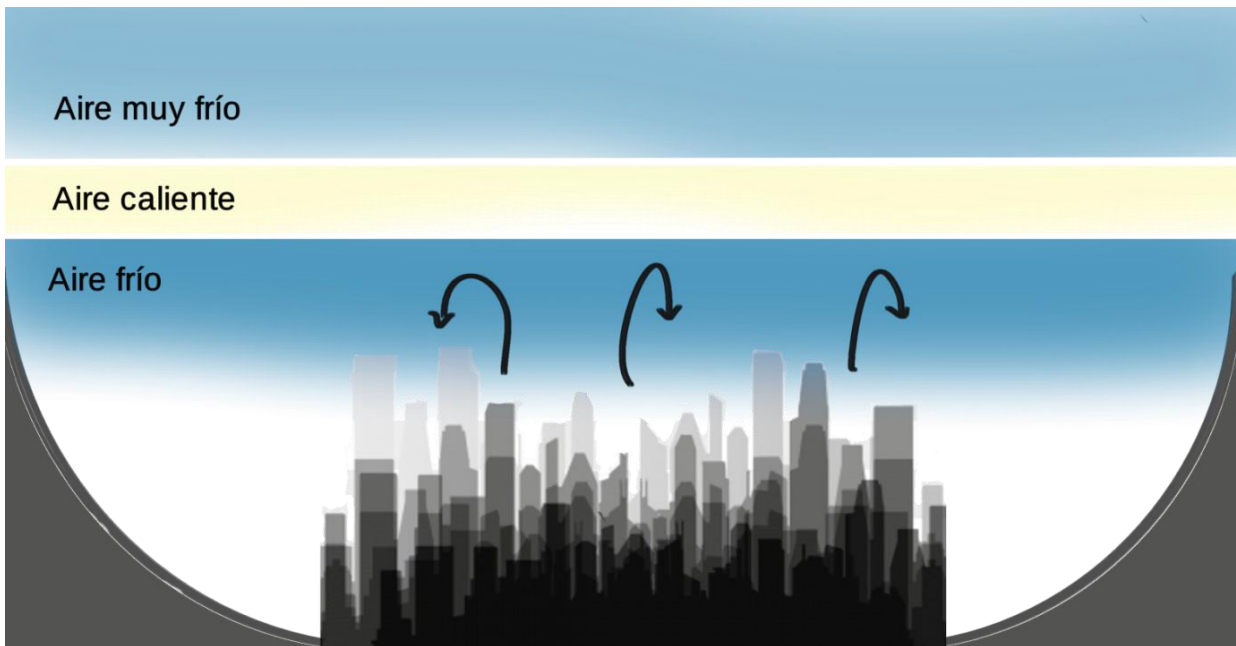


Figura 3. En la inversión térmica el aire frío se mantiene en la zona inferior del valle, atrapado por una capa media de aire caliente que no permite el flujo de aire fuera del valle, afectando la dispersión de contaminantes atmosféricos (basado en Moreno, 2010).

1.4. Partículas suspendidas

Se define como partículas suspendidas (PM) al material particulado o aeropartículas que no forman parte de la composición natural del aire. Está conformado por trazas de metales, suelo, químicos orgánicos, ácidos y polvo. De acuerdo con su origen se pueden catalogar como PM de fuentes naturales (material volcánico, material de origen marino, polvo disperso por vía aérea) y antropogénico (industrial, automotriz, etc.). De acuerdo con la fuente de la que provienen pueden dividirse a su vez en aquellas partículas provenientes de la erosión y aquellas provenientes de la combustión. Por último, las aeropartículas también pueden catalogarse de acuerdo con sus propiedades, como su contenido de carbón (C), el grado de solubilidad que presentan o la concentración de metales que contienen. Poseen un diámetro que abarca de $>100\mu\text{m}$ a $<0.1\mu\text{m}$ aproximadamente. Son producto de residuos metalúrgicos, *smog*, humo diésel (resultado de la combustión de combustible diésel), pigmentos y en la ceniza resultante de la quema de C. Están conformadas por trazas de derivados de C o sílica (SiO_2) usualmente, pero pueden contener Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Cobre (Cu), Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Berilio (Be), Níquel (Ni), V entre otros (Anderson 2011, Oke *et al.*, 2017, Fortoul *et al.*, 2014).

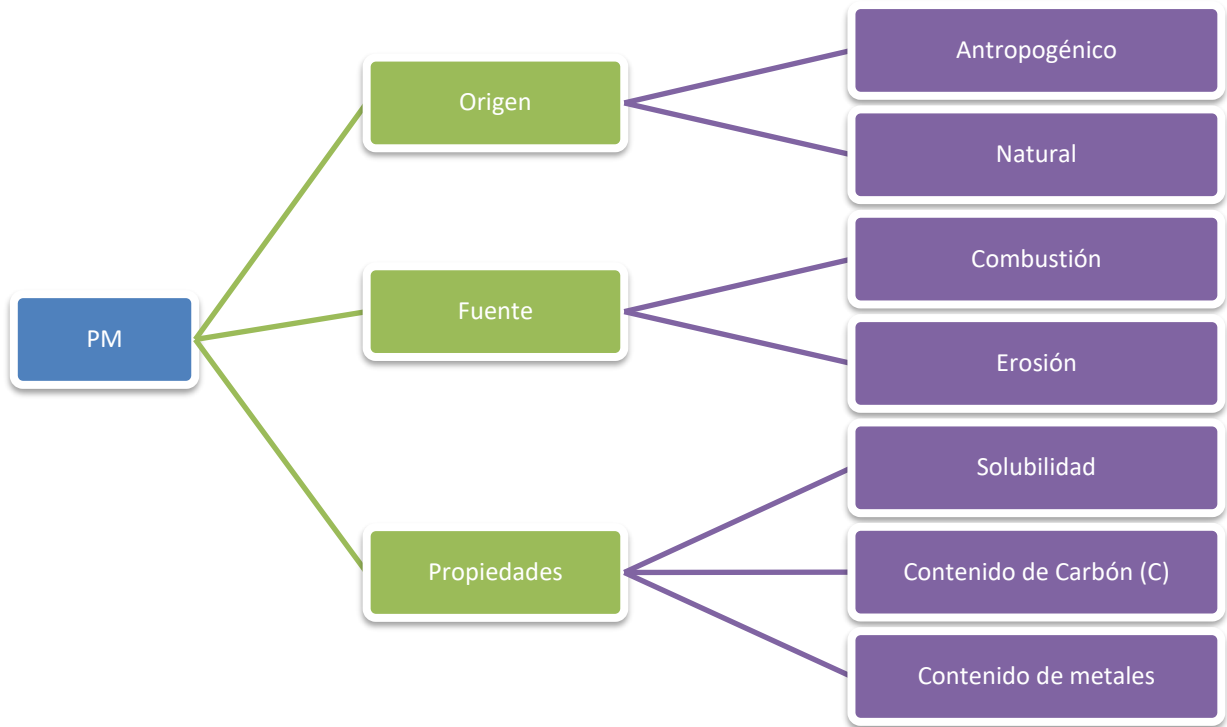


Figura 4. Clasificación de las partículas suspendidas por su tipo de origen, fuente de producción y propiedades (Tomasi *et al.*, 2017).

De manera empírica se han definido tres categorías para las partículas suspendidas de acuerdo con su tamaño:

- **PM₁₀** nomenclatura para definir a las partículas < 10 µm
- **PM_{2.5}** se utiliza para designar a las partículas < 2.5 µm
- **UFP** (Partículas ultrafinas) para aquellas trazas con un tamaño < 0.1 µm (Tomasi *et al.*, 2017).

1.4.1. Efecto de las partículas suspendidas

En los últimos 50 años se ha documentado el efecto de las partículas suspendidas, como contaminante, por su efecto en la salud, así como su rol a nivel ambiental ya que estas afectan la calidad del aire y pueden causar alteraciones en los ecosistemas (Tomasi *et al.*, 2017).

Debido a su tamaño, las PM se mantienen suspendidas en el aire por mayor tiempo que partículas más grandes antes de precipitarse. Entre menor sea el tamaño, se incrementa la posibilidad de exposición ya que las partículas más pequeñas pueden persistir suspendidas por semanas y pueden ingresar fácilmente al organismo por diversas vías, principalmente por inhalación, donde las trazas pueden acceder al sistema respiratorio.

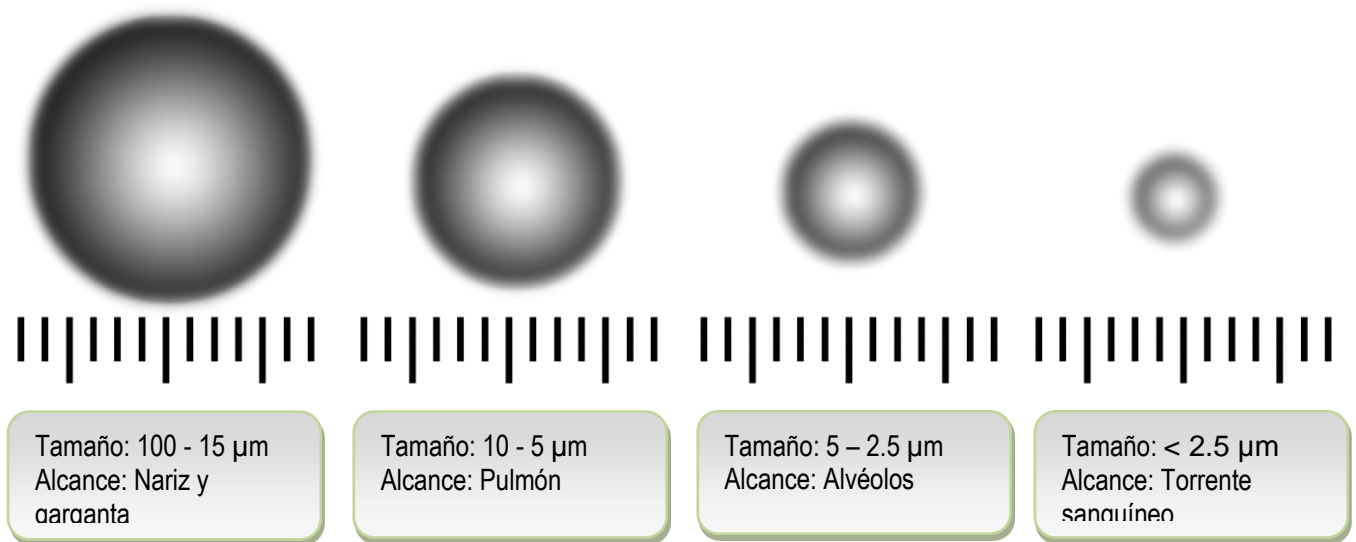


Figura 5. Tras su inhalación, las partículas suspendidas totales ingresan al organismo, alcanzando diferentes partes del sistema respiratorio dependiendo de su tamaño. En el caso de las PM < 2.5 μm , debido a su reducido tamaño, ingresan fácilmente al torrente sanguíneo, lo que les permite desplazarse a diferentes órganos (Oke *et al.*, 2017; Fortoul *et al.*, 2014).

Se ha documentado que la exposición crónica a las PM está relacionada con perturbaciones en el organismo como daño celular, disminución en las funciones cardiacas y respiratorias; desarrollo de bronquitis crónica y asma; incremento del estrés oxidante; así como alteraciones al sistema inmunológico (Fortoul 2014, Oke *et al.*, 2017; Tomasi *et al.*, 2017; Khaniabadi *et al.*, 2017).

Los efectos del incremento en la concentración de las PM no se limitan solo a alteraciones a la salud humana y animal. Se han observado alteraciones en la morfología de las hojas (daños en cutícula, disminución del tamaño de los estomas,

de las células del tejido epidérmico y un menor tamaño de la hoja en general) de algunas especies de plantas herbáceas, así como una reducción en la capacidad de algunos árboles de capturar y retener partículas suspendidas (PM_{2.5}) (Rai *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2017; Tomasi *et al.*, 2017).

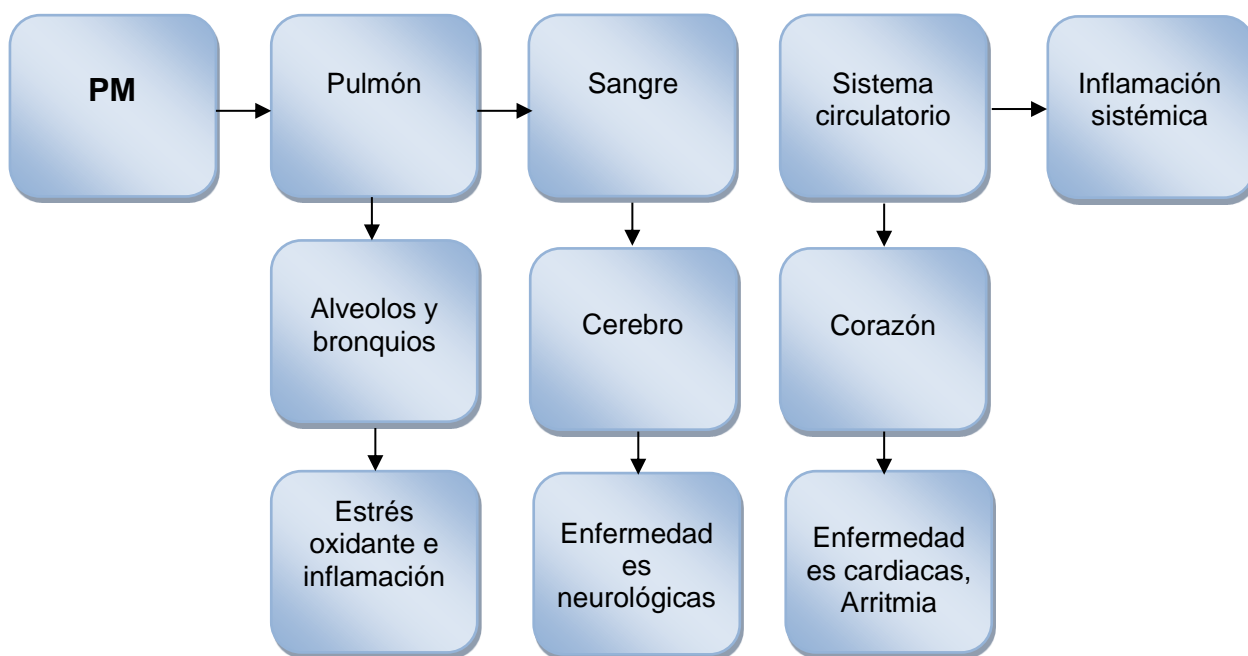


Figura 6. Ruta de efectos adversos a la salud asociados con la exposición a PM (basado en Tomasi *et al.*, 2017).

1.5. Vanadio

1.5.1 Generalidades del Vanadio

Fue descubierto en 1801 por el químico español-mexicano Andrés Manuel del Río Fernández, originalmente le dio el nombre de “pancromo” por la variedad en la coloración del elemento en disolución, en precipitados y en sus óxidos. Nombre que fue cambiado después por “eritronio” por la coloración rojo escarlata que adquirían las sales de este elemento al calentarse (Rivas 1985; Burriel *et al.*, 2002).

Este descubrimiento no tuvo gran impacto y en 1930 el sueco Nils Sefstrom (químico) descubrió el mismo elemento al cual denominó “Vanadio” en honor de una deidad escandinava (Vanadis o Freyja), el cual fue estipulado como el nombre oficial (Rivas, 1985; Burriel *et al.*, 2002).

El V es un metal de transición con el número atómico 23 y una masa atómica de 50.94 con una valencia de +2, +3, +4 y +5; posee estados de oxidación que van de -1 a +5, con un punto de fundición de 1715°C. No se encuentra en su forma metálica en la naturaleza. Posee un color plateado, con textura dura, dúctil en estado puro, pero quebradizo con la presencia de impurezas. Es utilizado en aleaciones como en acero para la fabricación de maquinaria y herramientas (Barceloux, 1999; Burriel *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2013).



Figura 7 y 8 a) Vanadio en estado puro, b) Pentóxido de vanadio (tomado de chemistrylearner.com/vanadium.html y [Materialscientist: shorturl.at/cASWX](http://Materialscientist:shorturl.at/cASWX)).

1.5.2. Vanadio como contaminante

El V se puede encontrar en los depósitos de petróleo, principalmente en yacimientos de Venezuela, Kuwait y México. La combustión incompleta de este carburante, de carbón y fuelóleo o HFO (remanentes de la destilación fraccionada de petróleo crudo, utilizado principalmente en el área marítima y de transportación) resulta en PM_{2.5} con trazas de V, en forma de pentóxido de Vanadio (V₂O₅) asociadas, entre otros metales. Así como resultado de los hornos de fundición en la industria metalúrgica. Las PM quedan suspendidas en el aire e ingresan al organismo por la vía respiratoria en primera instancia con la capacidad de ingresar en el sistema circulatorio (Barceloux, 1999; Fortoul *et al.*, 2014).

De acuerdo con la edición más reciente del inventario de emisiones de la ZMVM (2018) publicado por la Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México, se emiten aproximadamente 362.43 kilogramos anuales de V en la ZMVM (SEDEMA 2021).

1.5.3. Efectos del vanadio en la salud

La exposición crónica a V está relacionada con diversos efectos adversos en la salud que han sido ampliamente documentados. Entre ellos, en el sistema respiratorio está asociado a procesos inflamatorios, asma, daño en el tracto respiratorio. En el sistema nervioso se ha observado incremento de estrés oxidante a nivel tisular y en las neuronas se observó pérdida de espinas dendríticas, entre otros efectos, que podrían relacionarse con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, se han registrado alteraciones en el tejido hematopoyético, presentándose toxicidad en los eritrocitos; en el tejido testicular en las células de Sertoli (células involucradas en el proceso de espermatogénesis); el V, como promotor de estrés oxidante, fomenta el avance de enfermedades hepáticas e inflamación en hígado y páncreas (Ávila *et al.*, 2006; Fortoul *et al.*, 2007; Fortoul *et al.*, 2012; Fortoul *et al.*, 2014; González *et al.*, 2009).

Por otra parte, se han encontrado evidencias del papel de la exposición a V en la teratogénesis, en modelos biológicos de ratón, hámster y pollo. Se observó letalidad en embriones, toxicidad en fetos y embriones, así como acumulación de V en placenta y tejidos (Ávila *et al.*, 2005; Fortoul *et al.*, 2014).

Por último, se han registrado también diversas alteraciones en el sistema inmunológico que se tratarán a continuación.

1.5.4. Efecto del vanadio en el sistema inmunológico

La inhalación de V se relaciona con diversas alteraciones en el sistema inmunológico tanto en los órganos linfoides primarios como en los secundarios. Se observó un cambio en la citoarquitectura de la corteza y de la médula del timo; así como un cambio en la cantidad y expresión de sus marcadores en las diversas poblaciones celulares del timo (Ustarroz *et al.*, 2017).









A partir de 2008 Fortoul y colaboradores observaron alteraciones en bazo y en médula ósea con un modelo de inhalación de V en un periodo de 12 semanas. Encontraron un aumento de la pulpa blanca del bazo y en la cantidad y tamaño de los megacariocitos y establecieron las implicaciones en el sistema inmunológico y la producción de plaquetas como posible potenciador de eventos tromboembólicos (bloqueo de la circulación por presencia de coágulos).

De acuerdo con el trabajo de Piñón y colaboradores en el 2008, se encontraron cambios histológicos y funcionales en bazo (órgano linfóide secundario). En un modelo de inhalación de V durante 12 semanas observaron que el bazo de los ratones expuestos tuvo un incremento en el número y en el tamaño de los centros germinales, un incremento de las células CD19+, y la pulpa roja no estaba bien delimitada, todo esto comparado con los controles. Estas alteraciones morfológicas y funcionales en bazo pueden suprimir la respuesta inmune humoral.

Fortoul y colaboradores (2009) identificaron un aumento en el tamaño de los megacariocitos de bazo y en médula ósea (órgano linfoide primario, cuya función es la hematopoyesis, es decir, la producción de células sanguíneas); como resultado de la inhalación a V durante 12 semanas de exposición en un modelo murino.

En 2012, el trabajo de Ustarroz y colaboradores registran que como resultado de la inhalación de V se presenta una disminución en el número de células dendríticas tímicas (CD) así como en sus marcadores CD11c y MHCII (presentes en las células presentadoras de antígenos).

Por último, en el 2017 Ustarroz y colaboradores corroboran un desarreglo en la distribución de las poblaciones medulares y corticales, lo que ocasionó un cambio en la citoarquitectura del timo, como resultado de la exposición a la inhalación de V_2O_5 durante 4 semanas, así como un cambio en la expresión de K5, marcador de las células epiteliales tímicas medulares (CETm), con un aumento de este marcador en la primera semana, en ratones expuestos a V contra ratones control, para después observar una disminución en la semana 3 y 4, sin que alcanzara los valores basales (grupo control). Estas alteraciones pueden permitir la salida a la circulación de clonas autorreactivas que deriven en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y otros padecimientos relacionados con la alteración de las funciones del sistema inmunológico (Fortoul *et al.*, 2008; Piñón *et al.*, 2008; Fortoul *et al.*, 2009; Ustarroz *et al.*, 2012; Ustarroz *et al.*, 2017).

Autor – Año	Título	Conclusiones
Fortoul et al., 2008	Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled Vanadium	 De la pulpa blanca en el bazo  En el número y tamaño de los megacariocitos.
Piñón et al., 2008	Vanadium pentoxide inhalation provokes germinal center hyperplasia and suppressed humoral immune responses	 En el número de centros germinales (bazo)  De la afinidad funcional de los anticuerpos
Fortoul et al., 2009	Ultrastructural megakaryocyte modifications after Vanadium inhalation in spleen and bone marrow	 En el tamaño de los megacariocitos
Ustarroz et al., 2012	Efecto de la inhalación del pentóxido de vanadio (V ₂ O ₅) en la morfofisiología de las células dendríticas (CD) del timo de ratón	 En el número de CD de timo y en la intensidad del marcador CD11c y MHCII
Ustarroz et al., 2017	Thymic cytoarchitecture changes in mice exposed to Vanadium	Cambios en el número de CET _m (K5)  Semana 1,  3 y 4 (mayor que el control)


López, M. 2020	Efecto nitrosante en el timo de ratón por la inhalación de V	 Estrés nitrosante
-----------------------	--	---

Tabla 2. Antecedentes de efectos de la inhalación de V en el sistema inmunológico (Fortoul *et al.*, 2008; Piñón *et al.*, 2008; Fortoul *et al.*, 2009; Ustarroz *et al.*, 2012; Ustarroz *et al.*, 2017; López, 2020).

1.6. Generalidades del sistema inmunológico

El sistema inmunológico se define como un conjunto de órganos, tejidos y células que reconocen entre “lo propio” y “lo no propio”. La respuesta de este conjunto ante elementos propios y no propios se denomina respuesta inmunológica. Esta puede ser desencadenada por moléculas llamadas inmunógenos. Principalmente proteínas y carbohidratos, aunque casi cualquier molécula del cuerpo puede actuar como inmunógeno (Abbas *et al.*, 2018; Fortoul *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2007).

Los órganos linfoides que conforman el sistema inmunológico pueden clasificarse de acuerdo con su función, en primarios o secundarios, o de acuerdo con su morfología, en encapsulados o no encapsulados.

En mamíferos los órganos linfoides primarios están compuestos por la médula ósea y el timo, los cuales se encargan de la producción y maduración de las células involucradas en la respuesta inmunológica, y los secundarios, que se encargan del reconocimiento de los estímulos y generar una respuesta, y son los ganglios linfáticos, el bazo y los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT).

Por otra parte, de acuerdo con su forma, los órganos linfoides encapsulados reciben ese nombre porque poseen una capa de tejido conectivo, este grupo está conformado por el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. Mientras que los órganos linfoides no encapsulados carecen de capa de tejido conectivo. Pueden presentarse

como tejido linfoide difuso (MALT y amígdalas) y tejido linfoide nodular (nódulos linfoides como las placas de Peyer o los nódulos en apéndice) (Abbas *et al.*, 2018; Fortoul *et al.*, 2019).

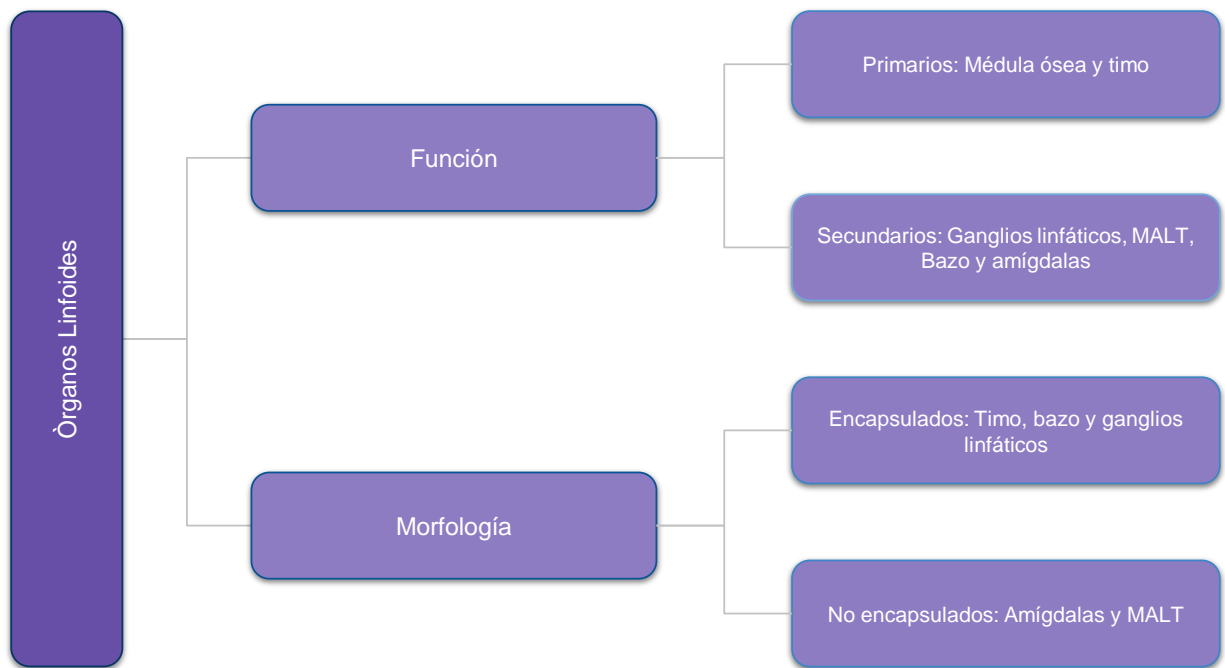


Figura 9. Clasificación de los órganos linfoides por su función y su morfología (basado en Fortoul 2019).

La respuesta inmunológica se divide en innata (también llamada natural o nativa), y en adaptativa (específica o adquirida).

La respuesta innata es la primera línea de defensa, tiene nula o muy limitada memoria, es de acción rápida, no tiene especificidad y promueve la acción de la respuesta adaptativa. Está conformada por las barreras epiteliales, macrófagos, células dendríticas (CD), mastocitos, linfocitos NK (Natural Killer) y complementos. Se encarga de bloquear la entrada de microorganismos potencialmente patógenos con barreras químicas y físicas, así como la eliminación de estos en caso de que atraviesen las barreras físicas (piel) así como la eliminación de células afectadas.

Por su parte la respuesta adaptativa genera memoria inmunológica, su acción es más lenta y tiene especificidad frente a antígenos, está conformada por los linfocitos B, los linfocitos T, anticuerpos y los linfocitos T efectores. (Cooperadores, o linfocitos Th). Es importante mencionar a las CD que son células presentadoras de antígenos, constituyen la mediación entre la respuesta innata y la adaptativa (Abbas *et al.*, 2018, Fortoul *et al.*, 2019).

1.7. Timo

El timo es un órgano linfoide primario, encapsulado, es decir cubierto por una cápsula de tejido conjuntivo, bilobulado, se localiza en mediastino anterior. Este involuciona con la edad.

Cada lóbulo está rodeado por una delgada capa de tejido conjuntivo denso irregular (cápsula), con nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos eferentes. En el tejido también se presentan células típicamente asociadas a tejido conjuntivo como son las células cebadas (mastocitos), células plasmáticas, adipocitos, linfocitos, granulocitos y macrófagos.

La cápsula del timo emite prolongaciones, también llamadas trabéculas formando lobulillos incompletos, éstos están constituidos por dos zonas: una externa de alta densidad celular de linfocitos T inmaduros o timocitos, llamada corteza, y una zona interna con una densidad menor de timocitos, en estados más avanzados de maduración, denominada médula, Dentro de estas zonas se observa un gradiente de diferenciación celular, relacionado con su funcionalidad. Tiene como característica histológica la presencia de organización típica de células epiteliales tímicas medulares tipo VI bautizadas con el nombre de corpúsculo de Hassall, el cual tiene un papel en la maduración de los linfocitos T. Al interior de la médula se observa presencia de macrófagos y Células dendríticas medulares (CDm). En la zona cortical la presencia de células epiteliales tímicas corticales (CETc) (Abbas *et al.*, 2018; Fortoul *et al.*, 2017).

El timo tiene la función de liberar linfocitos inmunocompetentes, así como eliminar la mayor parte de la clonas autorreactivas, proceso que recibe el nombre de tolerancia central en los órganos linfoides primarios.

Los linfocitos inmaduros provenientes de la médula ósea son capacitados (maduran) por medio de una serie de procesos denominados selección positiva y selección negativa. Los linfocitos inmaduros ingresan al timo por la unión cortico-medular. En este estado carecen de receptores CD4 (Cooperadores) y C8 (Citotóxicos) por lo que se les denomina doble negativas (DN), mediante procesos de reordenamiento génico expresan TcR (Receptor de linfocito T), CD y CD8 simultáneamente, recibiendo el nombre de doble positivas (DP).

Se lleva a cabo un simulacro de la presencia de un antígeno dentro del estroma tímico en el que los linfocitos interactúan con moléculas del MHC I y II que expresan las CETc, si los linfocitos DP no reaccionan al estímulo del MHC propio, se activa la vía apoptótica asegurándose que el linfocito muera; El linfocito seguirá su proceso de maduración de acuerdo a la avidez con la que TcR reconozca la molécula de MHC ya que tanto baja avidez como una avidez exacerbada darán como resultado

la muerte del linfocito, buscando que solo los timocitos de avidéz media sean liberados al sistema inmunológico periférico.

La selección positiva se encarga de facilitar la supervivencia de los linfocitos cuyos receptores hayan respondido al estímulo del MHC y cuyo correceptor del linfocito CD4 o CD8 coincida con el MHC (tipo I o II) correspondiente (Abbas *et al.*, 2018, Chávez *et al.*, 2017; Fortoul *et al.*, 2017).

Por otra parte, aquellos linfocitos que reaccionen de manera exacerbada al simulacro pasarán por el proceso de selección negativa activando la vía apoptótica del linfocito T (o eliminación clonal). Durante este proceso se lleva a cabo una migración celular hacia el centro del timo; desde la corteza, cerca de la zona de unión corticomedular, en la zona corticomedular y hacia la médula. Dentro de la médula, los linfocitos DP son expuestos a antígenos propios, cuando estos presentan gran avidéz por los autoantígenos son eliminados. Una porción reducida de linfocitos que presentan alta avidéz, escapa el proceso de apoptosis y se diferencian en Treg.

De esta manera las CETc y las CETm en conjunto con las CD eliminan a los linfocitos T potencialmente autorreactivos y regulan la producción de los linfocitos T. De estos procesos solo sobreviven del 3% al 4% de los linfocitos (Abbas *et al.*, 2018, Chávez *et al.*, 2017; Fortoul *et al.*, 2017).

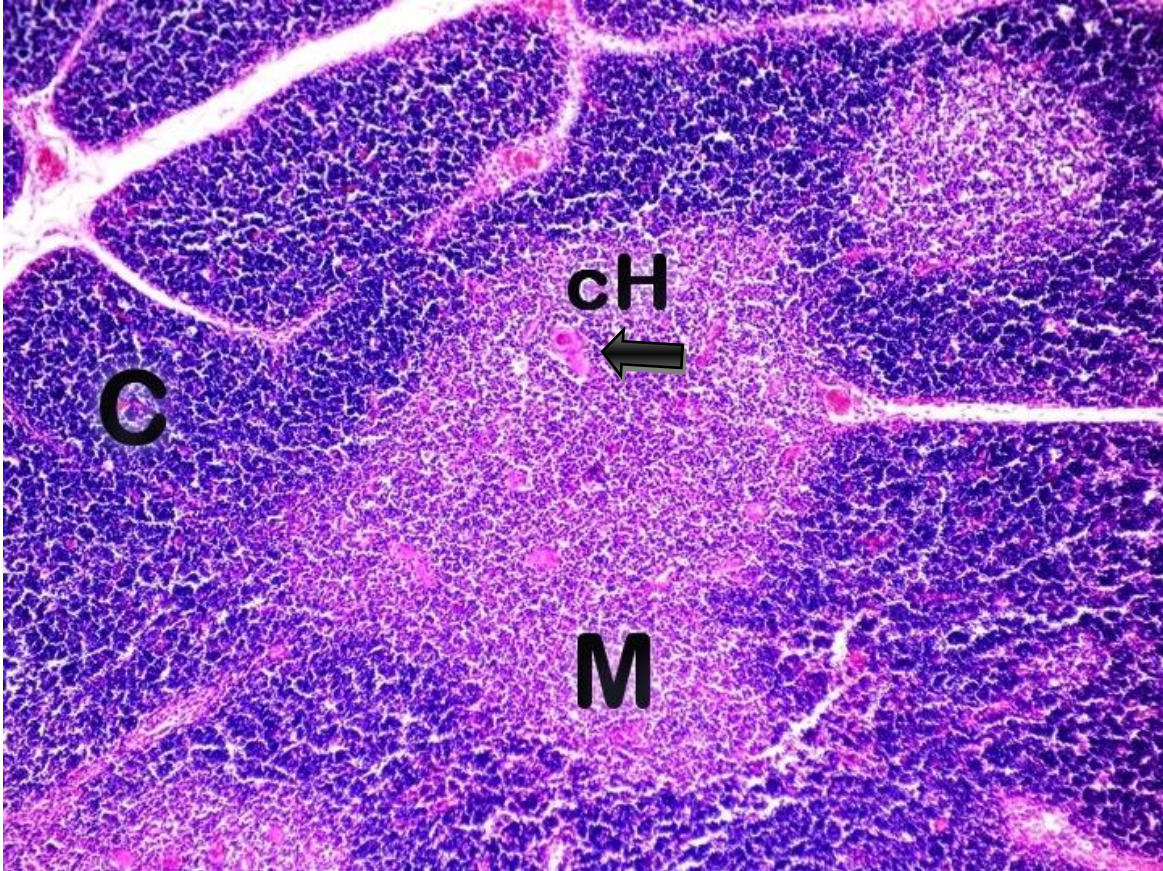


Figura 10. Fotomicrografía de timo de ratón con tinción de H-E a un aumento de 10x. Se observa la zona cortical (**C**) con una tonalidad violeta (zona más basófila) y la zona medular (**M**) con una tonalidad rosácea (zona más acidófila), al interior de la médula se pueden observar agrupaciones celulares en todo rosa como característica histológica típica (corpúsculos de Hassall) (**cH**) señalado con una flecha (Autora: Martha Ustarroz Cano).

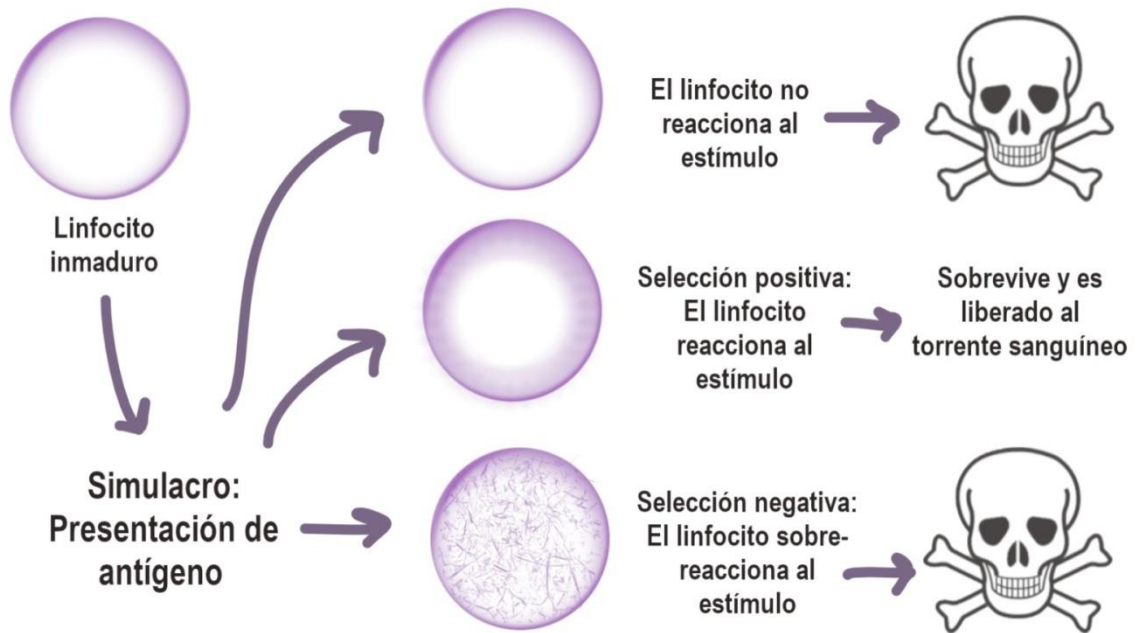


Figura 11. Proceso de capacitación de los timocitos inmaduros dentro del timo (basado en Abbas *et al.*, 2018).

1.7.1. Poblaciones celulares del timo

Dentro del timo se encuentran diversas poblaciones celulares como son:

Linfocitos T o timocitos. Son linfocitos que reconocen los antígenos de microorganismos asociados a células, su función es facilitar el trabajo de los fagocitos para destruir microorganismos patógenos, así como células propias del organismo que hayan sido infectadas. Son responsables de mediar la respuesta inmunitaria en la inmunidad celular. Tienen especificidad restringida, reconocen proteínas unidas al MHC. Reconocen y responden a antígenos asociados a superficie. Dentro del timo se encuentran en proceso de maduración o capacitación como CD4 o CD8, para después integrarse al sistema inmunológico periférico por medio del sistema circulatorio.

Macrófagos. Son fagocitos activos encargados de defender y llevar la limpieza celular, ya que se encargan de ingerir patógenos, restos celulares (detritos), células apoptóticas, células dañadas o viejas y material que no es propio del organismo. Una vez llevada a cabo la fagocitosis realiza la función de célula presentadora de antígenos, mostrando en su membrana moléculas antigénicas para ser reconocidas por linfocitos.

Los macrófagos también llevan a cabo la producción de citocinas, proteínas que se encargan de la comunicación intercelular, denominadas monocinas; llevan a cabo la regulación de los procesos inflamatorios, ya sea promoviendo la inflamación (proinflamatorias) o restringiéndola (antiinflamatorias). También secretan enzimas lisosómicas en poca cantidad en comparación con otros fagocitos dentro del organismo.

Las CET. Son células de origen endodérmico, presentadoras de antígenos. Se dividen en corticales o CETc, del tipo I, II y III (involucradas en la selección positiva) y las medulares o CETm, del tipo IV, V y VI (involucradas en la selección negativa).

Las CETm VI forman espirales compactas que reciben el nombre de corpúsculo de Hassall.

CET I – Células que aíslan el parénquima cortical de los lobulillos de las trabéculas y vasos sanguíneos de la corteza. Esto crea una zona aislada, libre de antígenos dentro de la corteza. Forman parte de la barrera hematotímica

CET II – Células de citoplasma abundante y núcleos grandes con abundante eucromatina. Tienen máculas adherentes entre sus prolongaciones y expresan MHCI y MHCII

CET III – Presentes en el límite corticomedular, se entrelazan a través de zónulas ocluyentes, aislando la corteza del resto timo. Expresan tanto MHC I como MHC II. Las CET I y II rodean a los timocitos corticales por su gran cantidad de citoplasma, creando nichos microambientales en la corteza, los cuales reciben el nombre de complejos de células nodrizas del timo. Estos expresan grandes cantidades de MHC I y II y tienen organelos necesarios para la presentación de antígenos. Lo que los convierte en un sitio primario para la selección positiva.

CET IV – Se encuentran en el límite corticomedular, en la zona medular, mantienen aislada la médula de la corteza. Cuentan con zónulas ocluyentes entre ellas y las CET III

CET V – Se distribuyen ampliamente en la zona medular, se encuentran sostenidas por desmosomas (uniones celulares que enlazan las membranas celulares y los filamentos plasmáticos intermedios celulares), construyen un sostén para los timocitos.

CET VI – Forman complejos unidos por desmosomas, de forma concéntrica y núcleos aplanados, que reciben el nombre de corpúsculos de Hassall. Presentan filamentos intermedios de queratina (Abbas *et al.*, 2018; Fortoul *et al.*, 2017).

Corteza	Médula
I. Localizadas debajo de la cápsula. Parte de la barrera hematotímica. Presenta zónulas ocluyentes	IV. En la zona corticomedular. Con uniones estrechas con las CET III.
II. Corticales, presentan desmosomas	V. Medulares, presentan desmosomas
III. Se ubican en la zona corticomedular. Poseen uniones estrechas entre sí y con las otras células medulares	VI. Forman estructuras concéntricas (corpúsculos de Hassall)

Tabla 3. Tipos de CET presentes en el timo

Las CD. Células de origen mieloide (de la médula ósea), son una población heterogénea, parte del linaje de los monocitos, un tipo de fagocitos. Presentan proyecciones citoplásmicas con forma dendrítica, tienen citoplasma carente de tonofilamentos (filamentos protéico citoplasmáticos que forman parte del citoesqueleto), lo que le permite alterar la forma de su citoplasma para migrar entre las células. Tienen la función de detectar la presencia de patógenos e iniciando reacciones de defensa del sistema inmunitario innato, al capturar proteínas pertenecientes al patógeno, la presentan ante los linfocitos para iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa; por lo que se considera como un puente entre los dos tipos de inmunidad.

Dentro del timo se localizan en médula y en la zona corticomedular y son presentadoras de antígenos. Estas también están relacionadas con la selección negativa. Se identifican tres tipos en el timo: CDc de forma dendrítica (CD11c+), CDc (SIRP+) y CD plasmacitoides o CDp de forma redonda.

Linfocitos T reguladores (Treg). Desde los años 60s se tiene conocimiento de la existencia de linfocitos T con acción supresora en el sistema inmunológico, pero no fue hasta 1995 que se definió el fenotipo de dichos linfocitos T con el nombre de linfocitos T reguladores (Treg) (Abbas *et al.*, 2018; Fortoul *et al.*, 2017).

1.7.2. Linfocitos T reguladores

Estos son una subpoblación heterogénea de linfocitos T CD4⁺ que durante la selección negativa pueden reconocer antígenos propios, diferenciándose a Treg, tienen su origen en la zona medular del timo.

Componen un 5 a 10% de los linfocitos T CD4⁺. Estos suprimen o regulan la respuesta inmunitaria de otras células del sistema inmune como CD4 y CD8, se encargan de mantener la tolerancia central. También participan en el control de la respuesta inflamatoria y en infecciones y respuestas alérgicas. (Li *et al.*, 2015)

Existen diferentes fenotipos, pero el más frecuente es CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. A los linfocitos Treg presentes en el timo se les llama también tTreg, Treg vírgenes o Treg naturales mientras que los Treg producidos fuera del timo (en el sistema periférico) se denominan pTreg o Treg adaptativos. Estos se inducen por la estimulación por parte de TcR o por precursores maduros que no expresan el receptor para la cadena alfa de interleucina 2 (IL-2) o pierden la habilidad para expresarlo como un método de mantener su función supresora. Una vez maduros, los Treg se desplazan al sistema inmunológico periférico para llevar a cabo su función reguladora, siendo co-estimulados por CD28 para mantener el correcto funcionamiento de la respuesta inmunitaria.

Los linfocitos Treg poseen diversos mecanismos de acción: por contacto célula-célula, por secreción de citocinas, por competencia, por factores de crecimiento y por producción de Granzyma (GzB) que son proteasas encontradas en NK y en CD8) y perforina (PRF) que es una proteína efectora que media la función de lisis celular.

Llevan a cabo la supresión de células del sistema inmunológico como son: linfocitos NK, Mastocitos, Monocitos, Macrófagos, CD, Neutrófilos, Linfocitos T, Linfocitos B y linfocitos NKT. Por otra parte, los Treg activan basófilos en humanos (Abbas *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2017; Chávez *et al.*, 2017).

Las alteraciones en los Treg se han relacionado con el desarrollo de enfermedades, principalmente autoinmunes como son Lupus eritematoso sistémico (SLE), alergias, artritis y diabetes, así como endocrinopatías, insuficiencia renal, diverticulitis intestinal (inflamación o infección de pequeñas bolsas –divertículos- en el intestino grueso), rechazo de injertos, así como lesiones de tejido entre otras.

Takahama y colaboradores (2006) se resaltó el papel que tienen los corpúsculos de Hassall durante la generación de Treg mediante la producción de Linfopoyetina estromal tímica (TSLP), parte de la familia de las citocinas. La expresión de TSLP por parte del corpúsculo de Hassall activa las CDt las cuales a su vez inducen la generación de Treg (Takahama *et al.*, 2006).

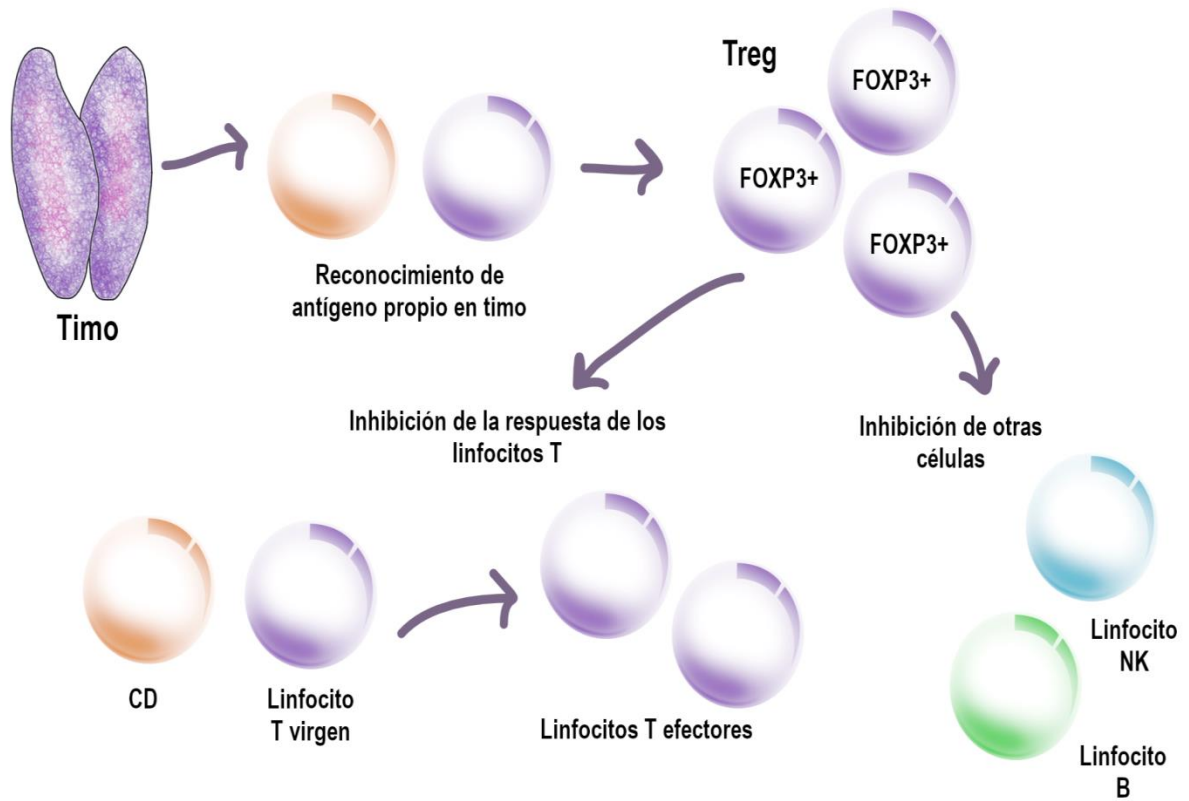


Figura 12. Origen de los linfocitos Treg y sus funciones. Se representan en esquema las tTreg (Linfocitos reguladores originados en timo), sin embargo, las Treg pueden tener su origen también en el sistema inmunológico periférico (pTreg) (basado en Abbas *et al.*, 2018).

1.8. Marcadores de poblaciones celulares FOXP3

La mayoría de los pTreg expresan niveles altos de CD25, otros linfocitos Treg lo expresan en menor cantidad, sin embargo, todos los Treg expresan FOXP3, por tanto, se define como un marcador típico tanto para tTreg como pTreg.

Los linfocitos Treg expresan el factor de transcripción intranuclear FOXP3, integrante de la familia de factores de transcripción forkhead, también llamado Ecurfi por haber sido descrito por primera vez en ratas de la cepa Ecurfi. FOXP3 está involucrado en el desarrollo y funcionamiento de Treg en timo y en el sistema inmunológico periférico.

Es una proteína de 47-kDa compuesta por 431 aminoácidos. Se compone de 11 exones. En humanos se presenta en dos bandas cercanas, la banda inferior corresponde a la isoforma sin el segundo exón codificante, y la banda superior representa la isoforma w (wild).

FOXP3 es el factor de transcripción que le permite a Treg llevar a cabo su función supresora, pero también induce la expresión de proteínas proapoptóticas y reprime la expresión de Bcl-2 (proteína que regula la muerte celular, inhibiéndola o induciéndola). Los linfocitos Treg requieren una constante señalización de rescate celular que impida que inicien apoptosis, esta función recae principalmente en FOXP3.

FOXP3 codifica para la proteína escurfina, cuya deficiencia se ha relacionado con trastornos autoinmunes y de proliferación de linfocitos en ratones; por su parte en humanos se presenta un síndrome similar denominado inmunodisregulación poliendocrinopatía y endocrinopatía ligada al X (IPEX). La mutación en la expresión de FOXP3 se ha relacionado también con muerte fetal, fallo en la implantación y preeclampsia (Chávez *et al.*, 2017; González *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2017, Tsuda *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICACIÓN

La concentración de V ha aumentado en las últimas décadas en la atmósfera de la ZMVM. La inhalación de V ocasiona disminución en el número de CD y en la expresión de sus marcadores, así como un aumento en la expresión de K5, marcador de CETm, éstas últimas involucradas en la producción y regulación de Treg. Por lo anterior es importante estudiar el efecto del V en estas células (Treg).

3. HIPÓTESIS

Si el V disminuye el número de CD y aumenta el número de CETm, así como sus marcadores, entonces podrán observarse cambios en el número de linfocitos Treg del timo de ratones expuestos a V.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Identificar el efecto de la inhalación de V sobre los linfocitos Treg en el timo de ratones

4.2. Objetivos particulares

Identificar por inmunohistoquímica y cuantificar mediante densitometría la expresión de FOXP3⁺, en el timo de ratones control y expuestos a V.

5. MÉTODO

El protocolo del manejo de animales durante el experimento se apegó a la NORMA oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Registrado bajo el nombre del proyecto FM/DI/071/2017 de título “Estudio del desarrollo de tolerancia al a inhalación de vanadio en epitelio pulmonar. Diferencias por sexo en un modelo murino”. Aprobado por las Comisiones de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Modelo biológico

Se utilizaron 40 ratones macho (*Mus musculus*) de la cepa CD1, con un peso de 32 a 35 gr. y una edad aproximada de 8 semanas, con condiciones de vida de agua y alimento *ad libitum* (rat chow, purina) y con condiciones de luz-oscuridad de 12:12h, los cuales fueron divididos de la siguiente forma:

- Grupo control - 20 ratones
- Grupo experimental – 20 ratones

Ambos grupos destinados para realizar inmunohistoquímica para FOXP3+ en cortes de timo y evaluar por densitometría.

Protocolo de inhalación

De acuerdo con el protocolo descrito y estandarizado por Fortoul y colaboradores (2011) se administró un protocolo de inhalación continua con sacrificios semanales con una duración de cuatro semanas para una exposición subcrónica de V.

Para el grupo control:

- Los ratones inhalan una solución salina con una concentración de 0.9% durante 1h, dos veces por semana. Para obtener una muestra semanal de 5 ratones sacrificados al final de cada semana

Para el grupo experimental:

- 5 ratones inhalan una solución de pentóxido de vanadio (V_2O_5) con una concentración de 0.02 M (1.4 mg/m^3) durante 1hr, dos veces por semana. Para obtener una muestra semanal de 5 ratones sacrificados al final de cada semana.

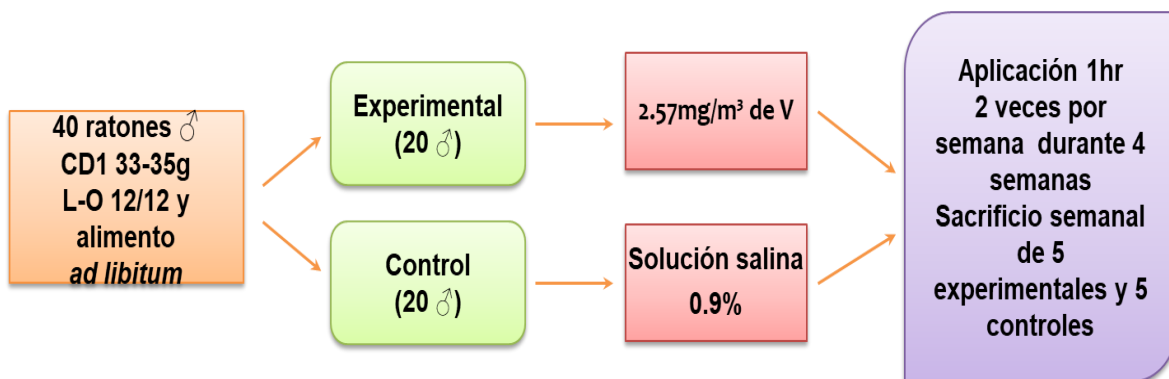


Figura 13. Diagrama de flujo. Protocolo de inhalación.

Para ambos casos se utilizó una caja de acrílico transparente con las dimensiones de 45 cm x 21 cm x 35 cm³ con un volumen de 3.3 L. Conectada a un nebulizador por medio de un orificio en la caja y una manguera de plástico flexible fijada al nebulizador y a la caja de acrílico por medio de cinta adhesiva.

Para los ratones del grupo experimental se utilizó pentóxido de Vanadio (V₂O₅) de la marca Sigma-Aldrich con un grado de pureza del 99.99% en presentación de polvo con el que se realizó una disolución con solución salina (al 0.9% como la utilizada para el grupo control) con una molaridad de 0.02M (2.57mg/m³ V), la cual se mantuvo en agitación constante hasta el momento de su utilización para evitar la precipitación del compuesto.

Nebulizador

Se utilizó un nebulizador ultrasónico Yue Hua, modelo WH-802 para uso hospitalario con un flujo constante de 4 mL/min, con un 80% de partículas nebulizadas con un diámetro aerodinámico de 1 a 5 µm.

La caja fue sellada con cinta adhesiva durante el procedimiento para evitar la fuga accidental del compuesto, así como para evitar la entrada de aire.

Al inicio del procedimiento se marcó con tinta indeleble a cada ratón para identificar la caja de procedencia, se colocaron con cuidado y rapidez en la caja de acrílico cuidando de mantener un flujo de aire suficiente hasta el momento de sellar para la inhalación.

Al cabo de cada semana se seleccionaron al azar cinco ratones del grupo control y cinco ratones del grupo experimental. Los ratones fueron anestesiados con

pentobarbital sódico (Pisabental) por vía intraperitoneal, Después se perfundieron con solución salina al 0.9% por el corazón, para el lavado interno y después con paraformaldehído para su fijación. Realizándose después la extracción del timo, y fue colocado en una solución de formol al 4% y se procesó para técnica histológica.

Los cortes del tejido de los lóbulos del timo, procesados previamente por técnica histológica se incluyeron en bloques de parafina para la realización de la técnica de inmunohistoquímica.

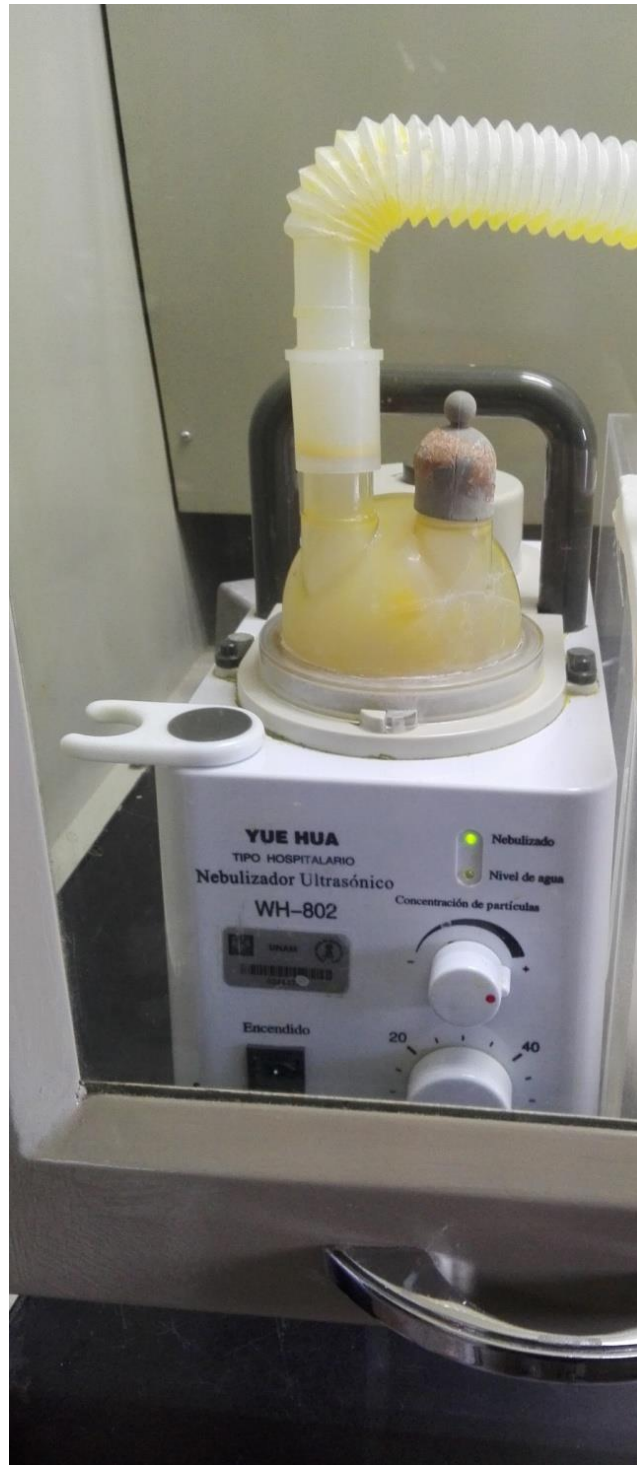


Figura 14. Detalle del nebulizador en funcionamiento.

temperatura ambiente y una vez fríos se hicieron 2 lavados con PBS de 3 minutos cada uno.

Se inhibió la peroxidasa endógena por 10 minutos, se retiró nuevamente el exceso de líquido y se enjuagaron las preparaciones en agua destilada 2 veces. Se colocaron posteriormente en PBS.

Se colocó una gota de Background Sniper de la marca Biocare Medical (reactivo de bloqueo universal) por un periodo de 10 minutos para reducir la tinción inespecífica de fondo, para evitar la tinción de proteínas diferentes a al marcador de interés (FOXP3+).

Se hicieron dos lavados con PBS y se colocó directamente una gota del anticuerpo primario para FOXP3 de la marca Biocare Medical (FOXP3 prediluted monoclonal antibody) en cada corte de timo. Se mantuvo en refrigeración por 24 horas en una cámara húmeda construida con un refractario de vidrio donde se colocó una base de papel absorbente humedecido con agua destilada y se cubrió con parafilm para mantener la humedad.

Pasado el periodo de 24 horas se retiró del refrigerador y se llevó a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados con PBS, incubando después el anticuerpo secundario (4plus Biotinylated goat anti-mouse IgG de la marca Biocare medical) por 30 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS de 2 minutos cada uno. Se secaron cuidadosamente con gasa y se procedió a incubar el complejo de estreptavidina por 30 minutos, para después realizarse 2 lavados con PBS de 2 minutos.

Se procedió a revelar las preparaciones con 1 gota de diaminobencidina (DAB) con 1 mL de PBS por 5 minutos, que tiñe las células que presentan positividad con una coloración ocre. Las preparaciones se enjuagaron con agua destilada, para después ser contrateñidas con hematoxilina y enjuagadas con agua corriente para observar un viraje en la coloración.

Se realizaron lavados de 1 minuto con PBS, agua y agua destilada cada uno.

Los cortes se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente, xilol y fueron montados con resina y cubreobjetos para permitir su observación en microscopio.

Fotomicrografía

Se realizó la toma de fotografías digitales con cámara digital OLYMPUS C-7070 Wide Zoom (C7070wz) y microscopio óptico, con un aumento de 40X, a color. Capturando 5 campos al azar de la zona cortical, corticomedular y medular de las preparaciones de los cortes histológicos de timo.

La toma de fotografías se realizó en una sola sesión para evitar diferencias en la iluminación del microscopio.

Se seleccionaron 4 fotografías representativas tanto del grupo control como experimental para señalar la presencia del marcador en el tejido del timo.

Las fotomicrografías obtenidas originalmente a color fueron organizadas y procesadas en una sola sesión, con el software de Adobe Photoshop 2015 con un perfil de blanco y negro previamente estandarizado para su análisis por densitometría. Este cambio de esquema de color facilita la lectura de la marca de FOXP3+ en el software especializado para densitometría DensiFe.

Densitometría

Las imágenes del grupo control y de grupo experimental de cada semana fueron analizadas con el software DensiFe, se estableció una exposición de 0.3 para la totalidad de las fotografías como valor para identificar positividad. Se utilizó el número de píxeles como parámetro para la intensidad del marcador FOXP3.

Dichos datos fueron condensados en una hoja de cálculo (Excel 2016) para realizar el análisis estadístico correspondiente.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de los datos obtenidos por la técnica de densitometría con la utilización del software estadístico Prism (ver.6.0), Se realizó una prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov, para contrastar si el conjunto de datos se ajusta a una distribución normal, así como un se seleccionó un análisis de varianza ANOVA de una vía para comparar la presencia del marcador FOXP3 en las muestras control contra las experimentales de cada semana (cuatro semanas en total). Estableciéndose una prueba *post hoc* de Tukey en caso de encontrarse diferencias significativas en el grupo experimental y el control. Se estableció una significancia de $p \leq 0.05$.

Se realizó una gráfica para representar los datos obtenidos de manera visual, estableciendo una barra de error estándar, que mide la variabilidad entre las diferencias muestrales.

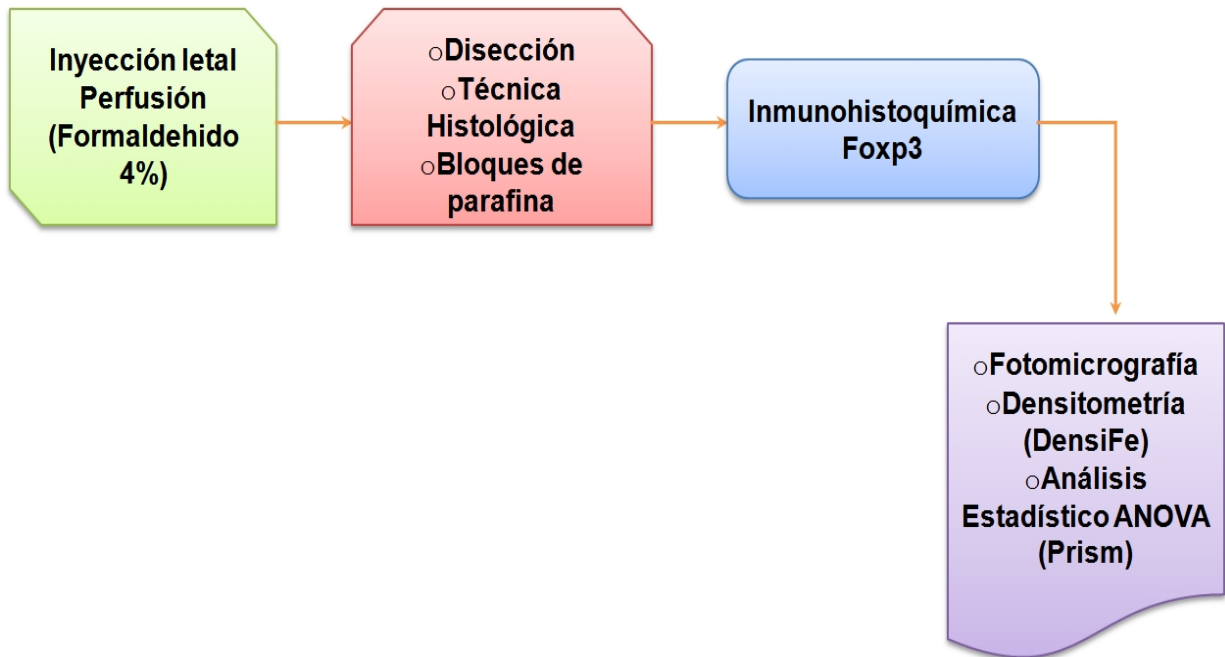


Figura 15. Protocolo simplificado para la realización de técnica de inmunohistoquímica y densitometría

6. RESULTADOS

Se utilizó el marcador para FOXP3+ para la técnica de inmunohistoquímica ya que, aunque los linfocitos T reguladores tienen varios marcadores, estos son compartidos por otras células, solo la proteína FOXP3 es un marcador característico de Treg (González *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015).

Se observó positividad, marcada por una tonalidad ocre, tanto en el timo de los ratones control como en el de los experimentales desde primera semana hasta el final del experimento. La marca se puede identificar tanto en la zona medular y corticomedular, así como en la zona cortical.

Durante la semana uno se observa positividad principalmente en la zona medular, tanto en las preparaciones de los ratones control como en los experimentales, concordante con el proceso de producción y maduración de los linfocitos T reguladores. Durante las semanas subsecuentes, 2 a 4 se observa positividad tanto en controles como experimentales. En las preparaciones experimentales, a mayor tiempo de exposición, se observan alteraciones en la citoarquitectura del timo en la forma de desorganización celular entre corteza y médula.

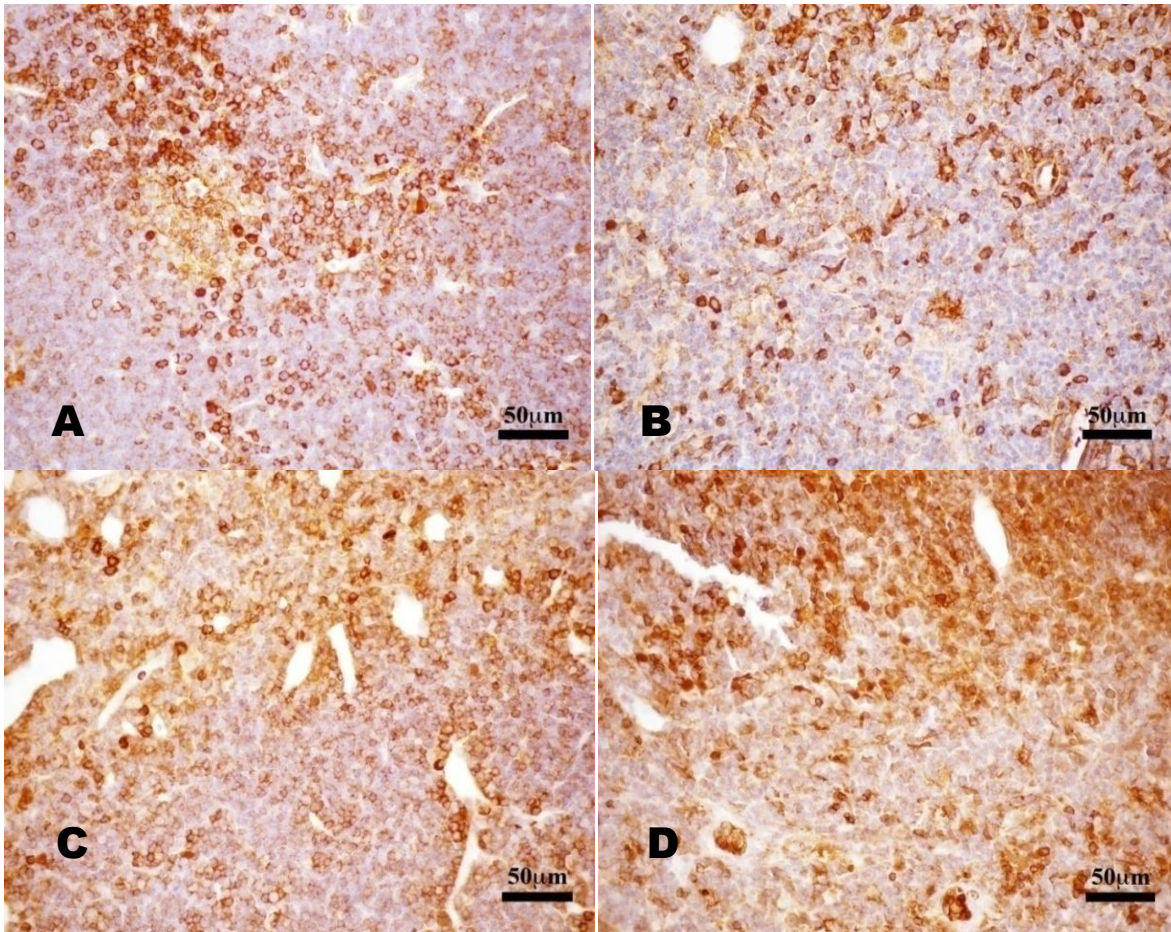


Figura 16. Fotomicrográficas del timo de ratón de la inmunohistoquímica contra FOXP3+ A) 2ª semana control B) 2ª semana experimental C) 4ª semana control D) 4ª semana experimental.

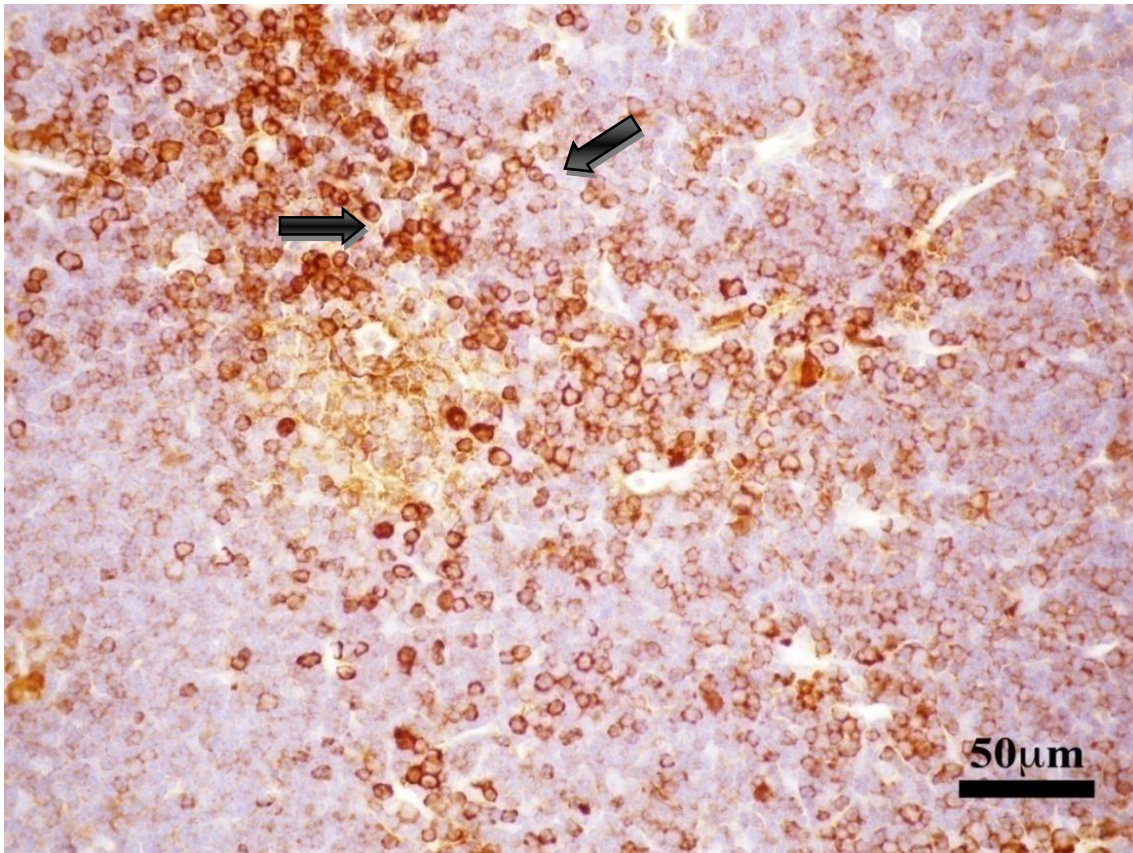


Figura 18. Fotomicrografía a 40x. Técnica de inmunohistoquímica contra marcador FOXP3 de la segunda semana del grupo control. En la fotomicrografía se observa una alta densidad de marca en el tejido señalada con las flechas negras.

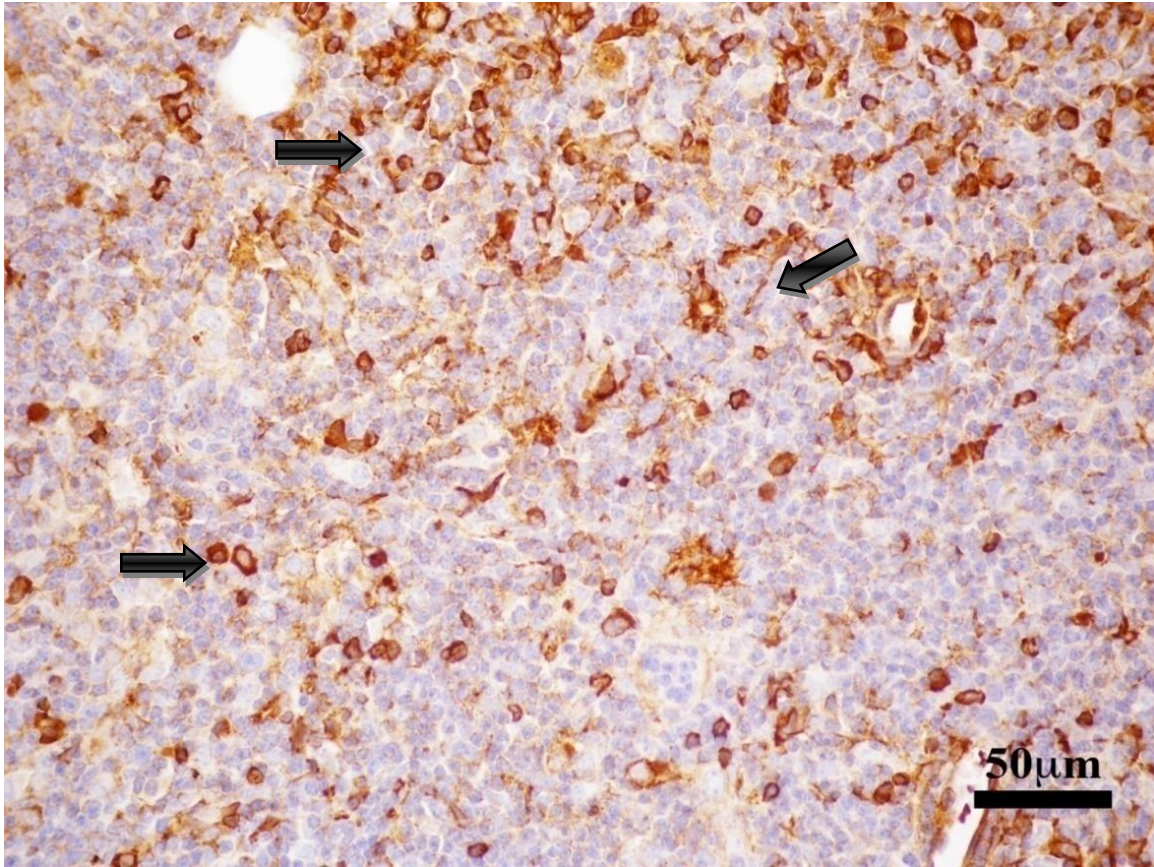


Figura 18. Fotomicrografía a 40x. Técnica de inmunohistoquímica contra marcador FOXP3 de la segunda semana del grupo experimental. En la fotomicrografía se observa una alta densidad de marca en el tejido señalado con las flechas negras.

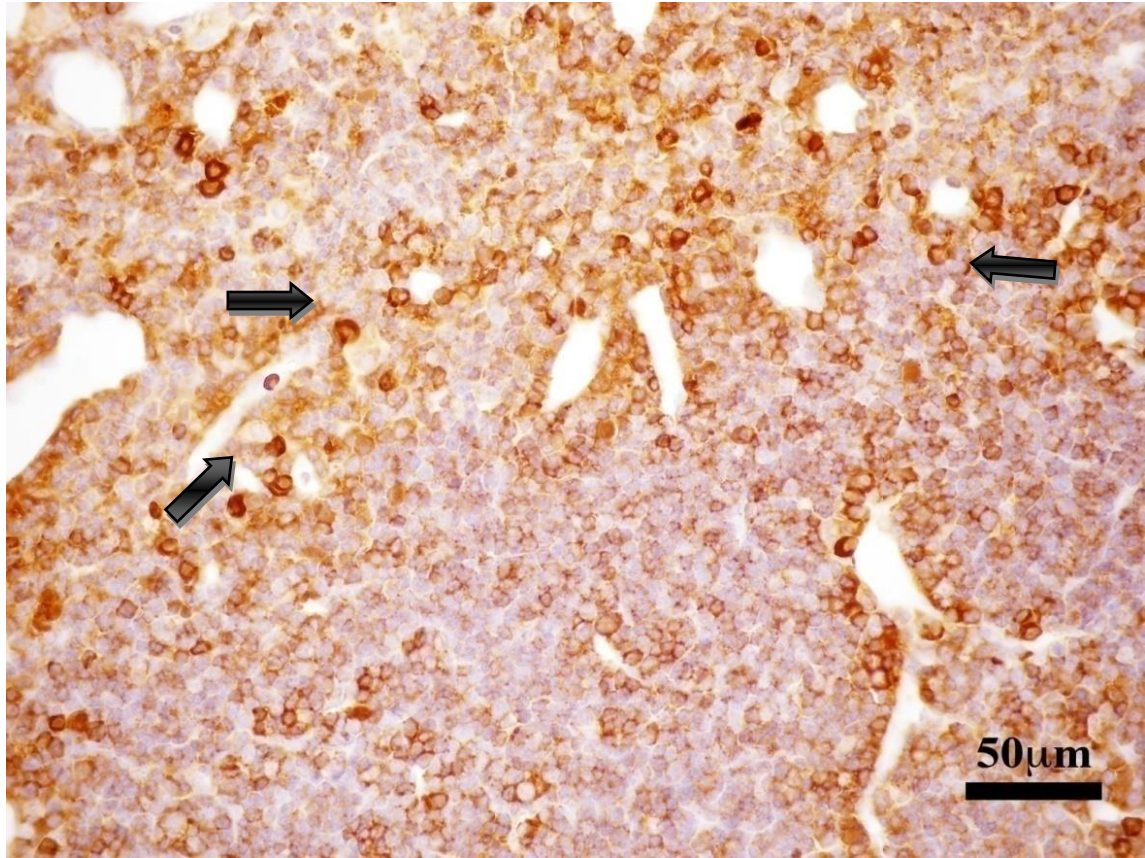


Figura 19. Fotomicrografía a 40x. Técnica de inmunohistoquímica contra marcador FOXP3 de la cuarta semana del grupo control. Positividad marcada con coloración ocre en toda la superficie del tejido. Algunos ejemplos marcados con flechas negras.

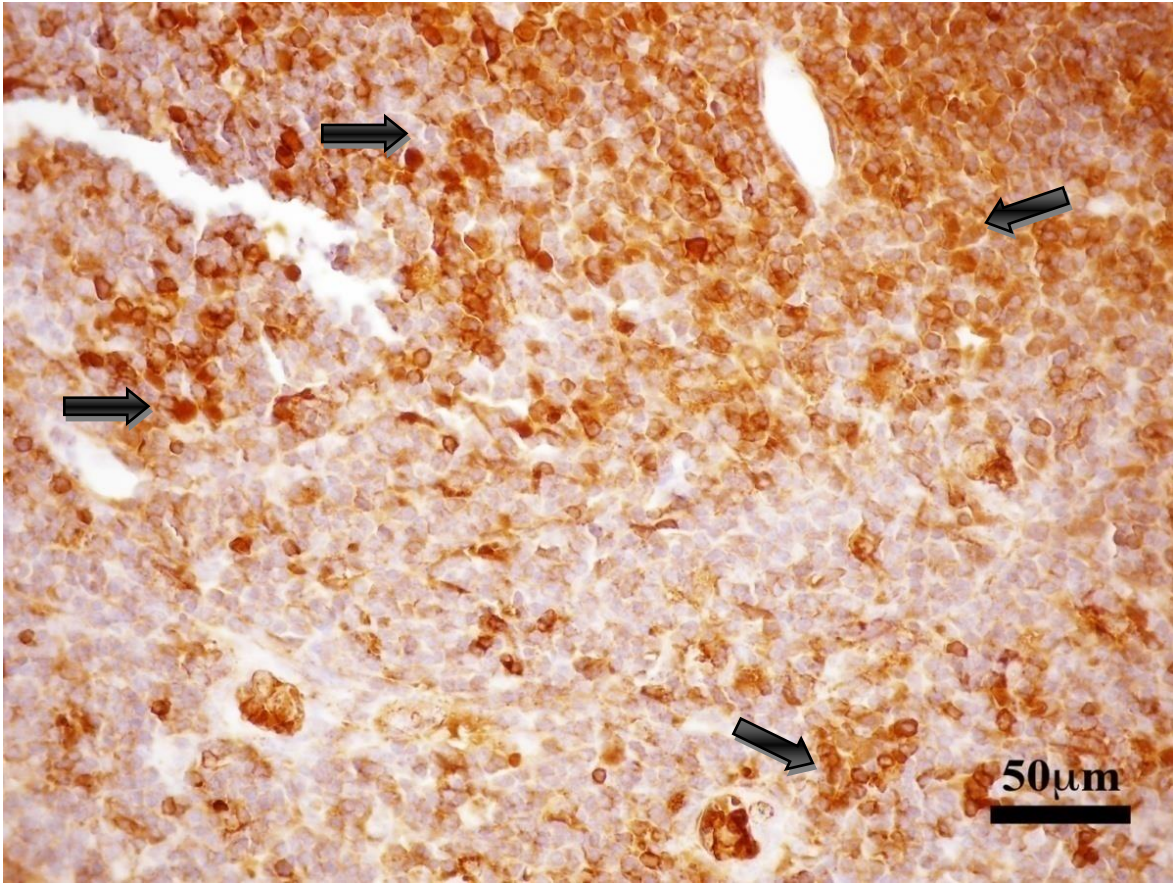


Figura 20. Corte Histológico de la cuarta semana del grupo experimental. Con un aumento del 40x. Técnica de inmunohistoquímica contra marcador FOXP3. En la fotomicrografía se observa una alta densidad de marca en el tejido señalado con las flechas negras.

Análisis estadístico

Con las fotomicrográficas capturadas en cinco campos al azar por cada preparación (25 preparaciones del grupo control y 25 experimentales) se realizó la técnica de densitometría con el software DensiFe, con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico por medio del software Prism, realizando un análisis de ANOVA para comparar la expresión del marcador FOXP3+ en el timo de ratones control y en ratones con una exposición subcrónica al pentóxido de V.

Expresión de FOXP3 en ratones control y experimentales

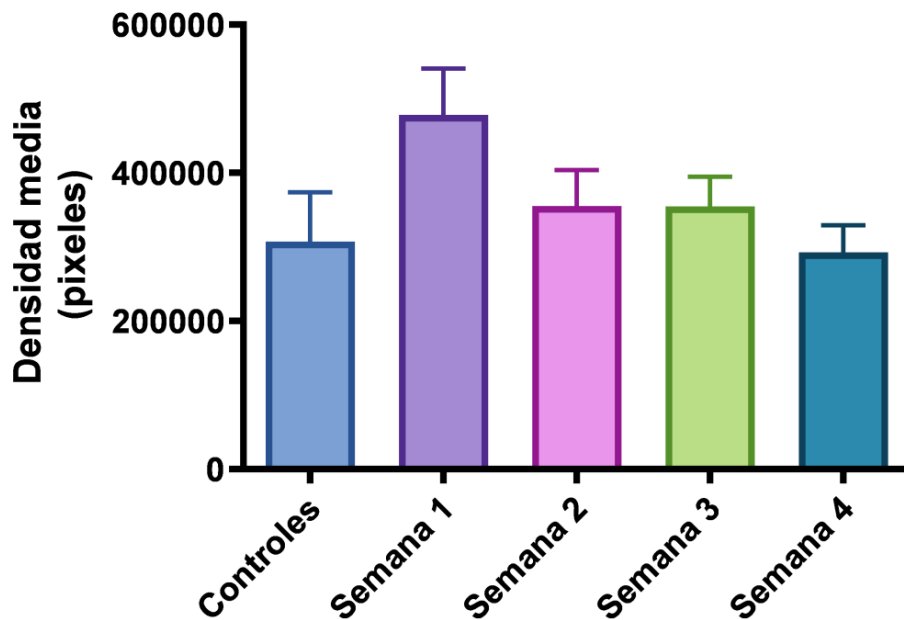


Figura 21. Densitometría de la expresión de FOXP3 en ratones control y experimentales expuestos a la inhalación de V durante un periodo de 4 semanas. Análisis de ANOVA de una vía con barra de error estándar con un valor de significancia de $p \leq 0.05$.

Se definió analizar la densidad media de la expresión de FOXP3 (eje Y) contra el grupo control de las 4 semanas, y un grupo semanal de exposición durante un periodo de 4 semanas (eje X), con el fin de definir si se presentan cambios significativos en la expresión del marcador de Treg por efecto de la inhalación dependiente del tiempo de exposición.

Se estableció utilizar una barra de error estándar para representar la variabilidad de los datos.

Al no obtener diferencias significativas no se procedió a hacer un análisis post-hoc.

7. DISCUSIÓN

Con el desarrollo urbano en las últimas décadas, así como las condiciones topológicas y climatológicas propias de la ZMVM mencionadas anteriormente, se ha observado un incremento exacerbado de la contaminación atmosférica como consecuencia, entre otros factores, de la quema de combustibles. A partir de los años ochenta hasta los años noventa se fue retirando del mercado aquella gasolina mexicana que contenía plomo. Sin embargo, el combustible utilizado actualmente libera diversas PM como el V mencionado con anterioridad, lo que, a su vez, de acuerdo con estudios anteriores representa efectos negativos en la salud.

De acuerdo con los antecedentes, la exposición a V se puede relacionar con el desarrollo de alteraciones en el correcto funcionamiento del organismo.

En el caso específico del sistema inmunológico las alteraciones en su correcto funcionamiento pueden derivar en el desarrollo de diversos padecimientos, entre ellos enfermedades autoinmunes. Que son padecimientos causados por la pérdida de tolerancia del SI, propiciando una respuesta del SI adaptativo ante antígenos propios, así como la activación de los linfocitos autorreactivos (linfocitos cuyos receptores tienen alta afinidad por los antígenos propios, los cuales escapan los mecanismos de eliminación del SI). Estas pueden presentarse por ataques inmunitarios tisulares o en órganos o por acción de antígenos a nivel sistémico o localizado como Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Lupus Eritematoso cutáneo (CLE), Asma, Alergias o Diabetes tipo II (T2D) (Abbas *et al.*, 2018)

De acuerdo con los hallazgos encontrados por Fortoul (2008) y colaboradores, así como Ustarroz (2012, 2017) y colaboradores se presentan alteraciones en las poblaciones celulares, involucradas en la respuesta inmunitaria periférica y central, y en sus marcadores por la acción de la inhalación de V. La disminución en el número de CD CD11c, la alteración en las CETm, con un incremento en la primera semana y una disminución en las semanas subsecuentes en un modelo de 4

semanas de exposición, así como un desarreglo de la distribución celular de la corteza y la médula tímica utilizando el mismo modelo de exposición; considerando que ambos tipos celulares son indispensables para la eliminación de clonas autorreactivas, alteraciones por efecto de la exposición de V podrían derivar en un incremento en enfermedades autoinmunes. (Fortoul)

Herbin y colaboradores en 2016 demostraron que tanto CETm como CD tímicas (CDt) tienen un papel redundante, esto es que llevan a cabo la misma función, en el mantenimiento y regulación de la tolerancia central al eliminar clonas autorreactivas durante la selección negativa en la corteza tímica (se denomina clona o clon a un grupo de células derivadas de un precursor común que mantienen características similares). Utilizando un modelo murino (ratones *knockout*, que son ratones a los que se les ha inactivado algún gen por medio de modificación genética), establecieron que al depletar a los ratones de CD, las CETm mantenían la integridad de la tolerancia central y se mantenía la producción de Treg, por el contrario, al depletar CETm, aunque se mantiene la tolerancia central, se observó una disminución en la producción de Treg, por último, al depletar tanto de CD como CETm se observaba un aumento en la presencia de clonas autorreactivas, sin embargo no se observaban cambios en la producción de Treg, esto con la finalidad de mantener la inmunidad periférica (Abbas *et al.*, 2018; Herbin *et al.*, 2016; Takaba *et al.*, 2017).

El papel de CETm en la producción de Treg es no redundante con las CD, y por tanto, la importancia de CD en la producción de Treg es dispensable, mientras que CETm son esenciales para la producción de Treg.

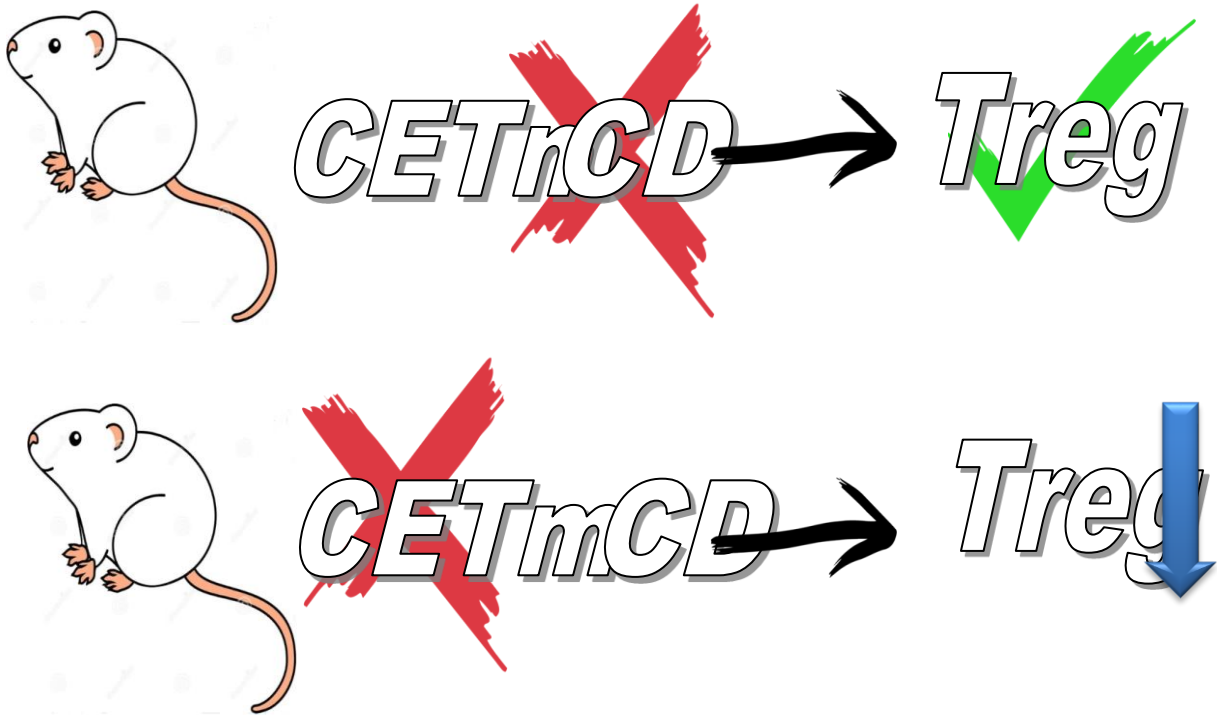


Figura 22. De acuerdo con Herbin y colaboradores, tanto CETm y CD tienen una labor redundante en la eliminación de clonas autorreactivas pero la presencia de CETm es vital para la producción de Treg (Basado en Herbin *et al.*, 2016).

Conforme a lo reportado por Ustarroz y colaboradores, se registra aumento en el número de CETm junto con su marcador K5 en el timo, a lo largo de las 4 semanas de exposición a V, en comparación con un grupo control. Este aumento en el número de CETm podría reflejarse en un aumento también en la producción de Treg pero con una disminución de CD, como resultado de la exposición a V, se puede inferir que con la disminución de CD el trabajo de eliminación de clonas autorreactivas recae con mayor preferencia en las CETm. Las cuales a su vez darían menos prioridad a la producción de Treg en favor de mantener la tolerancia central, por lo que no se observaría una mayor producción de linfocitos Treg. Lo cual es concordante con el resultado de la densitometría, donde no hay cambios significativos en la expresión de FOXP3 ni en el número de linfocitos Treg (Ustarroz *et al.*, 2012, Ustarroz *et al.*, 2017)

De acuerdo con el análisis estadístico no hubo cambios significativos en la expresión de FOXP3 en los linfocitos Treg, entre los grupos control y experimentales dependiente de tiempo de exposición. Aunque visualmente en la gráfica parezca haber diferencias entre el grupo control y la semana 1, el análisis de ANOVA de una vía arroja un valor de significancia mayor a la p establecida a ≤ 0.05 . El valor obtenido fue de $p = 0.11$. Para la semana 2,3 y 4 visualmente se observa más homogeneidad entre los datos.

Aunque hay alteraciones en el número de CETm como consecuencia de la exposición de V, hasta el momento no se ha registrado en la literatura alteraciones en genes involucrados en su diferenciación de precursores de células epiteliales a CET como la familia de TNF (receptor del factor de necrosis tumoral). Dado que la pérdida de estos receptores está relacionada con una selección anormal de células T en el timo, con la activación de autoinmunidad así como la producción de anticuerpos. (Ustarroz *et al.*, 2017, Takaba *et al.*, 2017).

Por último, otro factor a considerar debido al papel crítico de los Treg en el mantenimiento y regulación de la tolerancia central es que los propios linfocitos Treg cuentan con mecanismos para mantener su correcto funcionamiento, por acción de su marcador FOXP3, así como mecanismos epigenéticos que regulan la transcripción de FOXP3 y modificaciones post-transcripcionales que controlan la estabilidad de FOXP3, las cuales permiten regular la actividad de Treg (Li *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017). De acuerdo a Li y colaboradores (2015) la región genómica de FOXP3 cuenta con diversas secuencias no codificantes conservadas con funciones específicas en la transcripción de FOXP3 (CNS1, CNS2, CNS3). CNS1 está más relacionada con los Treg periféricos, también llamados naturales (no considerados en este trabajo), CNS2 tiene un papel en mantener estable la alta expresión de FOXP3 en Treg, mientras CNS3 es requerida para promover la expresión de FOXP3.

La modificación de proteínas post-traslacionales es esencial para la regulación de la localización de las proteínas, así como su estabilidad y su capacidad de función (Li *et al.*, 2015; Parias *et al.*, 2010). La literatura disponible hasta el momento no muestra alteraciones en estas por efecto de la exposición a V.

El presente trabajo se enfocó en registrar cambios en Treg, por medio de una densitometría cuantificando presencia del marcador FOXP3, se requieren estudios complementarios para determinar si la exposición subcrónica de V representa alguna alteración en el estado de maduración de los Treg tímicos, la función de los mismos o en los procesos llevados a cabo por su marcador, podríamos utilizar en un estudio futuro, marcadores de activación de Treg para observar si están activos o funcionan adecuadamente.

Como perspectivas de trabajo se presenta la posibilidad de estudiar también el efecto de la inhalación de V en corpúsculos de Hassal, CETm tipo VI involucradas en la producción de Treg, que pudieran ofrecer un panorama más completo del efecto que tiene el V en timo y las implicaciones que pueden tener para otras células del sistema inmunológico.

8. CONCLUSIONES

Se observó positividad para FOXP3 en los timos de ratón, tanto en grupo experimental como control, en zona cortical, medular y corticomedular.

No se observaron diferencias significativas en la expresión del marcador FOXP3 en el timo de ratones expuestos a V en un modelo de inhalación de 4 semanas en corteza, médula ni zona corticomedular comparadas con los controles.

Sin embargo, aunque no se observaron cambios en el número de Treg FOXP3+ como acción directa de la exposición subcrónica de V, no podemos afirmar que estos linfocitos estén activos o que funcionen adecuadamente.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier. 8va edición.

Anderson, J., Thundiyil, J., Stolbach, A. (2012). Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*, 8(2), 166–175.

Anticiclónico. (2000). In *Diccionarios Oxford Complutense de Ciencias de la tierra* (2a. ed., p. 39). Editorial Complutense.

Avila-Costa, M. R., Colín-Barenque, L., Zepeda-Rodríguez, A., Antuna, S. B., Saldivar O, L., Espejel-Maya, G., Mussali-Galante, P., del Carmen Avila-Casado, M., Reyes-Olivera, A., Anaya-Martinez, V., & Fortoul, T. I. (2005). Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. *Neuroscience Letters*, 381(1–2), 21–25.

Avila-Costa, M. R., Fortoul, T. I., Niño-Cabrera, G., Colín-Barenque, L., Bizarro-Neves, P., Gutiérrez-Valdez, A. L., Ordóñez-Librado, J. L., Rodríguez-Lara, V., Mussali-Galante, P., Díaz-Bech, P., & Anaya-Martínez, V. (2006). Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) promote memory deterioration. *Neurotoxicology*, 27(6), 1007–1012.

Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Vanadium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 265–278. <https://doi.org/10.1081/clt-100102425>

Burriel, F., Lucena F., Rivas, S., Hernández J. (2002). *Química analítica cualitativa*. Thomson editores.

Chang, R., Goldsby, K. (2013). *Química*. Mc Graw Hill. 11a edición.

Chávez, F., Rojas-Lemus, M., Fortoul, T., Tenorio, E. (2017). Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad.

Revista de la Facultad de medicina de la UNAM. Vol. 60, No. 5, Septiembre – octubre

Chen, L., Liu, C., Zhang, L., Zou, R., & Zhang, Z. (2017). Variation in Tree Species Ability to Capture and Retain Airborne Fine Particulate Matter (PM_{2.5}). *Scientific reports*, 7(1), 3206.

Cicolella, A. (2008). Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés. *Revue Des Maladies Respiratoires*, 25(2)

Curtis, H., Schnek, A., Massarini, A. (2008). *Biología*. Editorial Médica Panamericana 7a edición.

Fortoul, T. I., Bizarro-Nevarés, P., Acevedo-Nava, S., Piñón-Zárate, G., Rodríguez-Lara, V., Colín-Barenque, L., Mussali-Galante, P., Avila-Casado, M., Avila-Costa, M. R., & Saldivar-Osorio, L. (2007). Ultrastructural findings in murine seminiferous tubules as a consequence of subchronic vanadium pentoxide inhalation. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 23(4), 588–592.

Fortoul, T. I., Piñón-Zarate, G., Diaz-Bech, M. E., González-Villalva, A., Mussali-Galante, P., Rodriguez-Lara, V., Colin-Barenque, L., Martinez-Pedraza, M., & Montaña, L. F. (2008). Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histology and histopathology*, 23(11), 1321–1326.

Fortoul, T. I., Gonzalez-Villalva, A., Pinon-Zarate, G., Rodriguez-Lara, V., Montano, L. F., & Saldivar-Osorio, L. (2009). Ultrastructural megakaryocyte modifications after vanadium inhalation in spleen and bone marrow. *Journal of Electron Microscopy*, 58(6), 375–380.

Fortoul, T. I., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutierrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colin-Barenque, L., Montaña, L. F., García-Pelez, I., Bizarro-Nevarés, P., Lopez-Valdez, N., Falcon-Rodriguez, C. I., Jimenez-Martínez, R. S., Ruiz-Guerrero, M. L., López-Zepeda, L. S., Morales-Rivero, A., & Muñoz-Rivera-Cambas, A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the

understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 951043.

Fortoul, T. I., Rojas-Lemus, M., Rodriguez-Lara, V., Gonzalez-Villalva, A., Ustarroz-Cano, M., Cano-Gutierrez, G., Gonzalez-Rendon, S. E., Montaña, L. F., & Altamirano-Lozano, M. (2014). *Overview of environmental and occupational vanadium exposure and associated health outcomes: an article based on a presentation at the 8th International Symposium on Vanadium Chemistry, Biological Chemistry, and Toxicology, Washington DC, August 15-18, 2012. Journal of immunotoxicology*, 11(1), 13–18.

Fortoul, T. I., Rodriguez-Lara, V., González-Villalva, A., Rojas-Lemus, M., Cano-Gutiérrez, G., Ustarroz-Cano, M., Colín-Barenque, L., Bizarro-Nevarés, P., García-Pealez, I., Montaña, L. F., Jimenez-Martinez, R. S., Lopez-Valdez, N., Ruiz-Guerrero, M. L., Meléndez-García, N. A., García-Ibarra, F. A., Martínez-Baez, V., Alfaro, D. Z., Muñiz-Rivera-Cambas, A., López-Zepeda, L. S., ... Cervantes-Yépez, S. (2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chimica Acta*, 420, 8–15.

Fortoul, T (2017). *HISTOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR (Spanish Edition)* (3rd ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

Fortoul, T., Arteaga, M., Bizarro, M., Cano, G., Carrillo, P., García, I., López, N., Quintero, S., Rojas, M., Ustarroz, M. (2019). *Biología en la salud* (First ed.). Training Distribution and Integrated Services (TD&IS).

Gallego, F. C., Segura, A. P. M., & Isern, T. I. M. (2006). *Elaboración y presentación de un proyecto de investigación y una tesina (TEXTOS DOCENTS)* (Spanish Edition). Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.

González Parias, J. L., Duque Giraldo, V. E., & Velásquez-Lopera, M. M. (2010). FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*, 29(2), 74–84.

González-Villalva, A., Rodríguez-Lara, V., Montaña, F., Lima-Melo, A., Ramirez, G., Fortoul, T. I. (2009). Blood changes generated after vanadium inhalation. *Current Topics in Toxicology*, 6, 31.

Herbin, O., Bonito, A. J., Jeong, S., Weinstein, E. G., Rahman, A. H., Xiong, H., Merad, M., & 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.

Khaniabadi, Y. O., Goudarzi, G., Daryanoosh, S. M., Borgini, A., Tittarelli, A., & De Marco, A. (2017). Exposure to PM₁₀, NO₂, and O₃ and impacts on human health. *Environmental science and pollution research international*, 24(3), 2781–2789.

Li, Z., Li, D., Tsun, A., & Li, B. (2015). FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & molecular immunology*, 12(5), 558–565.

López, M. (2020). *Efecto nitrosante en el timo de ratón por la inhalación de V* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Repositorio institucional de la UNAM.

Moraleda, B., Llanos L. (2018). FBP - Ciencias aplicadas I - Ciencias 1. Editorial Editex. 183 páginas.

Moreno, M.C. (2010). *Climatología urbana (TEXTOS DOCENTS) (Spanish Edition)* (2nd ed.). Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona.

Oke, T. R., Mills, G., Christen, A., Voogt, J. A. (2017). *Urban Climates* (1st ed.). Cambridge University Press.

Orea, G. D. (2002). *Evaluación de Impacto Ambiental (Medio Ambiente) (Spanish Edition)* (2nd ed.). Ediciones Mundi-Prensa.

Pereira, L., Gomes, S., Ishak, R., & Vallinoto, A. (2017). Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 8, 605.

Piñon-Zarate, G., Rodriguez-Lara, V., Rojas-Lemus, M., Martinez-Pedraza, M., Gonzalez-Villalva, A., Mussali-Galante, P., Fortoul, T. I., Barquet, A., Masso, F., & Montaña, L. F. (2008). Vanadium Pentoxide Inhalation Provokes Germinal Center Hyperplasia and Suppressed Humoral Immune Responses. *Journal of Immunotoxicology*, 5(2), 115–122.

Rai, A., Kulshreshtha, K., Srivastava, P. K., & Mohanty, C. S. (2009). Leaf surface structure alterations due to particulate pollution in some common plants. *The Environmentalist*, 30(1), 18–23.

Spellman, F. R. (2019). *The Science of Air: Concepts and Applications, Second Edition* (2nd ed.). CRC Press.

Rivas, S. Introducción a la historia de la química analítica en España: conferencia pronunciada en I VI reunión nacional de química analítica. (1985). Universidad de Oviedo

Takaba, H., Takayanagi, H. (2017). The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends in immunology*, 38(11), 805–816.

Takahama, Y. (2006a). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*, 6(2), 127–135.
<https://doi.org/10.1038/nri1781>

Tesson, S., Skjøth, C. A., Šantl-Temkiv, T., & Löndahl, J. (2016). Airborne Microalgae: Insights, Opportunities, and Challenges. *Applied and environmental microbiology*, 82(7), 1978–1991.

Tomasi, C., Fuzzi, S., & Kokhanovsky, A. (2017). *Atmospheric Aerosols: Life Cycles and Effects on Air Quality and Climate (Wiley Series in Atmospheric Physics and Remote Sensing)* (1st ed.). Wiley-VCH.

Tsuda, S., Nakashima, A., Shima, T., & Saito, S. (2019). New Paradigm in the Role of Regulatory T Cells During Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 10.

Ustarroz, M. (2012). *Efecto de la inhalación del pentóxido de vanadio (V₂O₅) en la morfofisiología de las células dendríticas (CD) del timo de ratón* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Repositorio institucional de la UNAM

Ustarroz-Cano, M., Garcia-Pelaez, I., Cervantes-Yepey, S., Lopez-Valdez, N., & Fortoul, T. I. (2017). *Thymic cytoarchitecture changes in mice exposed to vanadium*. *Journal of Immunotoxicology*, 14(1), 9–14.

Villaseñor, J. (2001). *Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas* (Tesis Doctoral). Universidad de Castilla. <https://books.google.com.mx/books?id=8Vlu05kqFEgC&pg>

Zhao, T., Markevych, I., Romanos, M., Nowak, D., & Heinrich, J. (2018). Ambient ozone exposure and mental health: A systematic review of epidemiological studies. *Environmental research*, 165, 459–472.

Recursos electrónicos

Delimitación de las zonas metropolitanas de México 2010. CONAPO (2012). Retrieved November 10, 2019 from http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Zonas_metropolitanas_2010

EPA United States Environmental Protection Agency, Indoor Air Quality – Volatile Organic Compounds’ impact on indoor air quality. (2021). Retrieved November 26, 2021 from <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/volatile-organic-compounds-impact-indoor-air-quality>.

Escenarios demográficos y urbanos de la zona metropolitana del valle de México CONAPO (2013). Retrieved January 10, 2019 from http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Escenarios_demograficos_y_urbanos_de_la_Zona_Metropolitana_de_la_Ciudad_de_Mexico_1990-2010_Sintesis

Estudio de políticas urbanas de la OCDE - México. (2010). México OCDE. <https://www.oecd.org/gov/sintesis-del-estudio-mexico.pdf>

Hoja de Seguridad Metano. (2009). Metano HDS. <https://www.linde.mx/-/media/corporate/praxair-mexico/documents/safety-data-sheets/metano-hds-p4618f-2009.pdf>

Hoja de seguridad Óxido nítrico. (2014). Óxido Nítrico Linde México. <https://www.linde.mx/-/media/corporate/praxair-mexico/documents/safety-data-sheets/oxido-nitroso-medipure-hds-p4636-2014.pdf>

Inventario de emisiones de la Zona Metropolitana el Valle de México. (2021). Secretaría Del Medio Ambiente de La Ciudad de México. Retrieved October 1, 2021, from <http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/inventario-emisiones-cdmx-2018/Inventario-de-emisiones-cdmx-2018.pdf>

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 948, Nitrous oxide. Retrieved November 26, 2019 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrous-oxide>.

Inventario de emisiones de la Zona Metropolitana el Valle de México. (2021). Secretaría Del Medio Ambiente de La Ciudad de México. Retrieved October 1, 2021, from <http://www.aire.cdmx.gob.mx/descargas/publicaciones/flippingbook/inventario-emisiones-cdmx-2018/Inventario-de-emisiones-cdmx-2018.pdf>