



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS PULMONARES INDUCIDAS
POR LA INHALACIÓN DE VANADIO. ESTUDIO
COMPARATIVO EN RATA Y RATÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CARLOS IVÁN FALCÓN RODRÍGUEZ

TUTORA:

DRA. TERESEA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

2008



Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Falcón
Rodríguez
Carlos Iván
21 57 55 12
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300106596

2. Datos del tutor

Dra.
Teresa Imelda
Fortoul
van der Goes

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Laura
Colín
Barenque

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Isabel
García
Peláez

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Martha Patricia
Bizarro
Nevares

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Martha Luz
Ustarroz
Cano

7. Datos del trabajo escrito.

Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio. Estudio comparativo en rata y ratón.

71 p
2008

AGRADECIMIENTOS

PAPIIT-DGAPA 2006-06

Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM:

Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

M en C. Gabriela Piñón Zarate

M en C. Adriana González Villalva

Nelly López Valdez

Al Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular:

Téc. Acad. Verónica Rodríguez Mata

Téc. Acad. Judith Reyes Ruiz

A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina:

M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada, Jefe de la Unidad

M.V.Z. Ismael Torres Saldaña

M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro

SU CRÍTICA Y APOYO EN TODOS LOS MOMENTOS DE MI VIDA, BUENO EN LA MAYORIA. MUCHAS GRACIAS.....
POR TODOS LOS DIAS DE RISA Y PACIENCIA QUE ME HAN TENIDO LAS TRES.....

ÍNDICE

TEMA	PÁGINAS
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. LA CONTAMINACIÓN POR PARTICULAS SUSPENDIDAS.....	3
2.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTÍCULAS.....	3
2.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL VANADIO.....	5
2.4. USOS DEL VANADIO.....	6
2.5. ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO (ROS).....	6
2.6. EL SISTEMA RESPIRATORIO.....	8
2.6.1. BRONQUIOLOS.....	9
2.6.2. MÚSCULO LISO.....	11
2.6.2.1. FISIOLÓGÍA DEL MÚSCULO LISO.....	12
2.6.2.2. PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO.....	14
2.6.3. ALVÉOLOS.....	15
2.7. PATOLOGÍA ASOCIADA CON LA CONTAMINACIÓN POR PARTICULAS SUSPENDIDAS.....	16
2.7.1. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC).....	17
2.7.2. BRONQUIOLITIS.....	17
2.7.3. ASMA.....	18
2.7.4. PROLIFERACION DE LA CAPA MUSCULAR EN EL BRONQUIOLO:REMODELACIÓN.....	19
2.8. CITOCINAS QUE INTERVIENEN EN LOS CAMBIOS BRONQUIOLARES POR PARTÍCULAS SUSPENDIDAS.....	20
2.9. MODELO DE LA INHALACIÓN DE VANADIO EN RATA Y RATÓN.....	21
2.10.CITOCROMO P450 (CYP) Y SUS DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPOTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIAL Y MÉTODO	
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
6.2. OBTENCIÓN DE MUESTRA.....	27
6.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
6.4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28

7. RESULTADOS

7.1. INFILTRADO INFLAMATORIO EN EL MODELO EN RATA.....	29
7.2. INFILTRADO INFLAMATORIO EN EL MODELO EN RATÓN.....	29
7.3. DAÑO EPITELIAL EN EL MODELO EN RATA.....	30
7.4. DAÑO EPITELIAL EN EL MODELO EN RATÓN.....	30
7.5. MÚSCULO LISO BRONQUIOLAR Y VASCULAR.....	31
7.5.1. CAMBIOS EN EL MUSCULO LISO BRONQUIOLAR MODELO EN RATA.....	31
7.5.2. CAMBIOS EN EL MUSCULO LISO BRONQUIOLAR MODELO EN RATÓN.....	31
7.5.3. CAMBIOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR MODELO EN RATA.....	32
7.5.4. CAMBIOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR MODELO EN RATÓN.....	32
7.6. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-6 EN EL MODELO EN RATA.....	32
7.7. INMUNOHISTOQUÍMICA IL-6 EN EL MODELO EN RATÓN.....	33
7.8. INMUNOHISTOQUÍMICA TNF- α EN EL MODELO EN RATA.....	33
7.9. INMUNOHISTOQUÍMICA TNF- α EN EL MODELO EN RATÓN.....	34

8. DISCUSION

8.1. METABOLISMO EN LA CÉLULA DE CLARA: DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES.....	52
8.2. ACTIVACION DE CITOCINAS POR EL VANADIO Y ROS.....	55
8.3. CAMBIO EN LA CAPA MUSCULAR DEL BRONQUIOLO.....	57
8.4. CAMBIO EN LA CAPA MUSCULAR DE VASOS SANGUÍNEOS.....	58
8.5. VÍA DE REMODELACION POR LA INHALACION DE VANADIO, EN EL MODELO DE RATA Y RATON.....	60

9. CONCLUSIONES.....	63
-----------------------------	-----------

10. BIBLIOGRAFÍA.....	64
------------------------------	-----------

1. Resumen

La contaminación atmosférica sigue siendo un problema mundial, en especial la ocasionada por partículas suspendidas. En éstas se adhieren metales como el vanadio, que son emitidos a la atmosfera por el proceso de combustión de productos derivados del petróleo. El vanadio (pentóxido de vanadio V_2O_5) entra adherido a las partículas inhaladas y se deposita en el epitelio bronquiolar. Este epitelio está constituido por células ciliadas y por las células de Clara, además de estar rodeado por una capa de músculo liso. Estas estructuras juegan un papel relevante en patologías como la EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), entre las que se encuentran la bronquiolitis, bronquitis y asma. Todas estas patologías tienen como resultado la remodelación de la vía respiratoria baja, con: hiperplasia epitelial y proliferación de músculo liso.

La respuesta a la inhalación de xenobióticos puede modificarse de acuerdo con la especie que se estudie, por lo que es de interés integrar al estudio especies diferentes y comparar los resultados obtenidos. En este trabajo se comparan las diferencias en la respuesta bronquiolar a la inhalación de vanadio, utilizando como modelos a la rata y el ratón. Se compararon los cambios morfológicos y la presencia de algunos marcadores de inflamación (IL-6, TNF) y de proliferación de musculo liso peribronquiolar (α -actina). Se utilizaron ratas Wistar y ratones CD-1 macho, expuestos pentóxido de vanadio 0.02M, dos veces por semana por 4 semanas, 6 semanas y 12 semanas. Paralelamente se contó con un grupo control. Se sacrificaron, se fijaron con paraformaldehído al 4%. Se realizó técnica histológica habitual e inmunohistoquímica para identificar los marcadores mencionados. Para el último caso, utilizando Image-Pro Plus se cuantificó la densidad de la marca y se compararon los resultados. Además se midió (μ m) el grosor de la capa de músculo en los bronquiolos y en los vasos sanguíneos. Nuestros resultados muestran que después de la exposición a vanadio hay cambios epiteliales tales como proliferación en la rata y descamación en los ratones. Incremento en IL-6 y TNF en la rata, en el ratón solo se incrementó IL-6. Por otro lado la α -actina, bronquiolar y vascular, fue más evidente en la rata.

Estos datos sugieren que el vanadio tiene diferente efecto en ambas especies y que además de afectar el epitelio bronquiolar, tiene un efecto importante en el musculo liso, que se asemeja al que ocurre en EPOC y en enfermedades cardiovasculares referidos por la exposición a contaminantes atmosféricos, como es el caso de las partículas suspendidas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS SUSPENDIDAS

La contaminación ambiental es un problema grave en todo el mundo, en particular los metales, tales como el Plomo y el Cadmio (Fortoul et al., 2005). El primero es utilizado para proveer de energía en baterías, también es usado en soldaduras y cubierta de cables. El segundo se emplea como protector de corrosión en otros metales, fuente de alcalinidad de algunos metales y la manufactura de algunos plásticos (Manahan, 2003). Previamente Fortoul et al (2005) reportó, que los metales en el aire son un problema en la ciudad de México, ya que se encontró un incremento en tejido pulmonar de autopsia de los siguientes metales: Pb, Cd, Ni y V (Fortoul et al., 1996, 1999, 2002).

La población se encuentra expuesta por la vía inhalada, principalmente a la combustión de petróleo, carbón y aceites pesados, durante la generación de electricidad y calor. Los depósitos de vapores de gas, humos de aceites o combustibles, particularmente de México, Venezuela, Irán y Kuwait, contienen altas concentraciones de vanadio (Fortoul et al., 2002), que son emitidas durante la extracción del petróleo y la combustión de gasolinas en los automóviles.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTÍCULAS

Las partículas, son una parte importante de la contaminación atmosférica. Todas las partículas entran adsorbidas junto a otro tipo de partículas, las partículas metálicas se unen a partículas, formadas por núcleos de carbono, por ejemplo, metales de transición como el Zinc, Níquel y Vanadio, de esta manera entran a la vía respiratoria. (Figura 1).

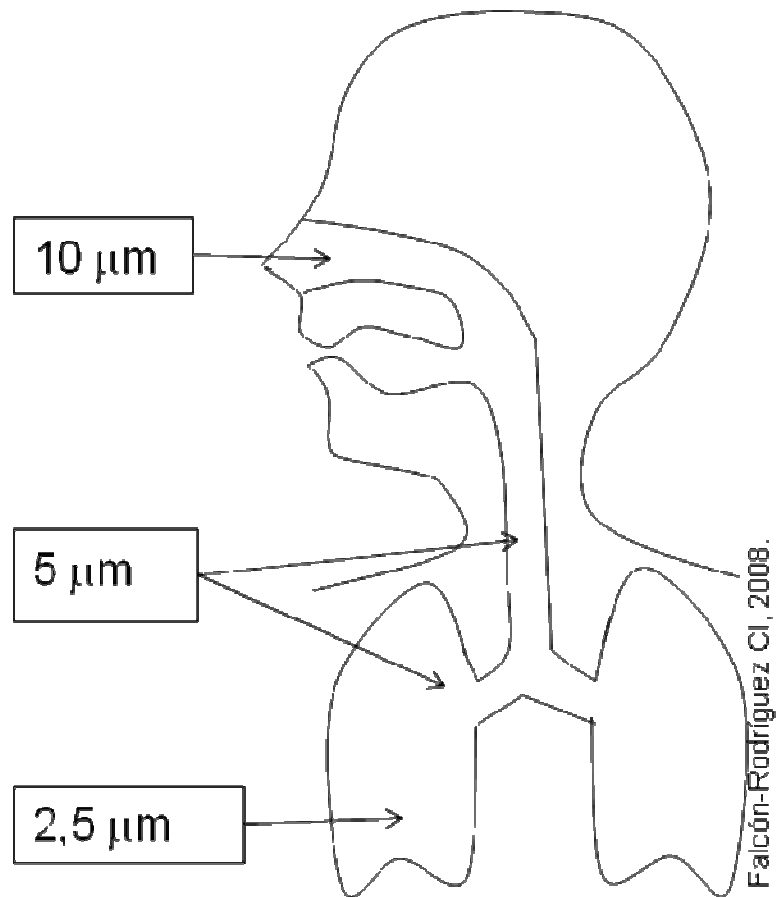


Figura 2. Representación esquemática de la relación tamaño y depósito de las partículas suspendidas, en las diferentes partes del tracto respiratorio.

2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL VANADIO

El vanadio es un elemento de transición, clasificado en la familia VB dentro de la tabla periódica, sus estados naturales de oxidación son: -1 a +5, aunque los estados más comunes son: +3,+4 y +5 (Fortoul et al., 2002). Las partículas con vanadio que miden 2.5 μ m de diámetro se depositan con facilidad en el pulmón. El Vanadio tiene múltiples usos, la mayoría enfocada a la generación de materiales resistentes. El Vanadio es utilizado en muchas industrias, por lo cual existe una exposición laboral importante.

2.4 USOS DEL VANADIO

Existe una fuerte emisión de vapores de calderas y humos, que se generan durante varios procesos en donde se utiliza el vanadio, por ejemplo la eliminación de impurezas del vanadio en los minerales (Plunkett, 1987; Zenz, 1994), es un gran catalizador de reacciones químicas, por ejemplo, en la oxidación de sulfuros a sulfatos y de alcohol a acetaldehído (Dill et al., 2004). También es utilizado en la elaboración de vidrio amarillo que retiene la luz UV y en la industria fotográfica para el desarrollo de algunas sustancias reveladoras. En la industria metalúrgica sirve para la elaboración de muchos productos metálicos y aleaciones que son muy resistentes y de bajo peso, y en la minería se utiliza en la purificación de minerales.

Es utilizado en la fabricación de anilinas que sirven para teñir de color negro y amarillo cerámica y telas (Barceloux, 1999). También se utilizó en el tratamiento de la anemia, diabetes mellitus, tuberculosis y sífilis y en suplementos alimentarios y anabólicos (Fortoul et al., 2002).

El vanadio (Pentóxido de Vanadio, V_2O_5), es la forma más común de encontrarlo en la atmosfera, es un residuo de las partículas suspendidas generado por las emisiones de plantas generadoras de electricidad, por la combustión de acetites y gasolinas derivados del petróleo por los vehículos automotores (Gevett et al., 1997; Bonner et al., 2000) éste ultimo es la principal fuente de emisión de vanadio en las grandes ciudades (Fortoul et al., 2002). Algunos estudios comprueban que el Vanadio genera Especies Reactivas de Oxígenos (ROS), y éstas son la principal causa de daño en exposición laboral (Valko et al., 2006)

2.5 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que contiene uno o más electrones desapareados. La presencia de un electrón desapareado confiere un grado de reactividad química bajo una molécula de radical libre (Valko et al., 2004, 2005). Dentro de las especies de reactivas que dan origen a los

radicales libres, se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS) por sus siglas en inglés (Valko et al., 2004, 2005).

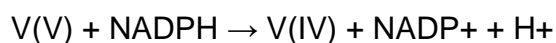
Las ROS pueden producirse por factores endógenos y exógenos. Las principales fuentes endógenas son: procesos inflamatorios mediados por los neutrófilos y los macrófagos, en la catálisis de los productos de la mitocondria y el transporte de electrones (Cadenas, 1989, Valko et al., 2005), vía citocromo P450 y por la degradación de algunos compuestos por las sustancias de los peroxisomas, tal como el Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) (Inoue et al., 2003).

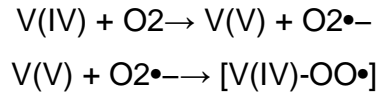
Entre las fuentes exógenas principalmente se encuentran: la irradiación UV, rayos "X" y rayos gama, también, por la catálisis de metales que se encuentran en las partículas que forman parte de la contaminación atmosférica (Valko et al., 2005).

En un estudio realizado por Poli et al (2004), observó que después de la exposición a varios agentes xenobióticos, los niveles de ROS se encontraban aumentados. Las altas concentraciones generadas después de la exposición (estrés oxidante), son importantes mediadores de daño en las estructuras celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Valko et al 2005).

Los metales participan en la formación de radicales libres, los cuales causan varias modificaciones en las bases del DNA, peroxidación de lípidos, cambios en la concentración de calcio, los cuales repercuten de manera significativa en la homeostasis celular (Valko et al., 2005),

El vanadio, es un metal que tiene varios estados de oxidación, los cuales participan en la formación de radicales libres (Hartwig et al., 2004). En el plasma el Vanadio +5 ó V(V) rápidamente se reduce a V +4, por el NADPH y el ácido ascórbico, un antioxidante plasmático; además es transportado y unido a proteínas plasmáticas, como la labumina y la transferrina. La reacción dentro de la célula es la siguiente (Crans et al., 2004):





El V (V), dentro del organismo es reducido hasta el radical peroxivanadil $[\text{V(IV)-OO}^{\bullet}]$ y vanadil hidroperóxido $[\text{V(IV)-OH}^{\bullet}]$ (Ding et al., 1994, Valko et al., 2005). Algunos estudios confirman que la reducción de un electrón de V (V) a V (IV), mediante el ascorbato junto con fosfato, puede representar una vía importante de reducción en los sistemas biológicos (Ding et al., 1994; Valko et al., 2005). Se ha propuesto que el resultado de las especies reactivas, generado por V(IV), H_2O_2 y lípidos hidroxipeoxidados vía reacción de Fenton, pueden jugar un papel significativo en el mecanismo de daño celular en condiciones fisiológicas (Zhang et al., 2001) mostrada de la siguiente manera:



Algunos estudios de transducción de señales muestran que los componentes del vanadio actúan como inhibidores de las fosfatasas de tirosina, y tienen un gran potencial para inducir estrés oxidante (Valko et al., 2005) dentro de los sistemas biológicos y especialmente en el sistema respiratorio, ya que es la vía principal de entrada de estos agentes.

2.6 EL SISTEMA RESPIRATORIO

El sistema respiratorio se puede dividir para su estudio en: vías aéreas superiores, que incluyen: la nariz, las fosas nasales, nasofaringe y laringe; mientras que las vías bajas incluyen a la tráquea, los bronquios, bronquiolos respiratorios, bronquiolos terminales y alvéolos (Tortora y Derrickson, 2007).

La tráquea está formada por una mucosa que esta revestida por el epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes. En la submucosa se

encuentran abundantes fibras elásticas, glándulas y vasos sanguíneos que nutren su epitelio.

La capa muscular se encuentra formada por músculo liso, en su parte posterior. En la parte anterior está formada por cartílago en forma de herradura y haces de músculo liso rodeando el cartílago (Geneser, 2006).

Los bronquios son una derivación de la tráquea. Se encuentran formados por los mismos elementos de la tráquea, a excepción del cartílago que tiene una disposición en placas alrededor del bronquio (Ross et al., 2005).

2.6.1 BRONQUIOLOS

Los bronquiolos representan las últimas 14 ramificaciones del conducto principal, su diámetro es menor a 1mm y su pared carece de cartílago y glándulas (Geneser, 2006). Cada bronquiolo lleva consigo una vena y una arteria (Tortora et al., 2007). Su epitelio muestra una transición desde la tráquea y se encuentra formado por el epitelio cilíndrico a cúbico simple con células ciliadas y no ciliadas o células de Clara, además de presentar núcleos basales y esféricos (Figura 3)

La célula de Clara se encarga del metabolismo de los agentes xenobióticos, es decir, de todas las sustancias que se encuentran en la atmósfera y que entran adsorbidas junto a otras partículas durante la inspiración (Falcón-Rodríguez et al., 2006, 2008). Además contienen gránulos de secreción, como, glicoproteínas elaboradas en el retículo endoplásmico rugoso (Gartner et al., 2007) y se vacían por exocitosis (Geneser, 2006) (Figura 3). Son ricas en retículo endoplásmico liso que ocupa más del 40% del volumen citoplásmico, en el cual se encuentra el sistema de isoenzimas del citocromo P450.

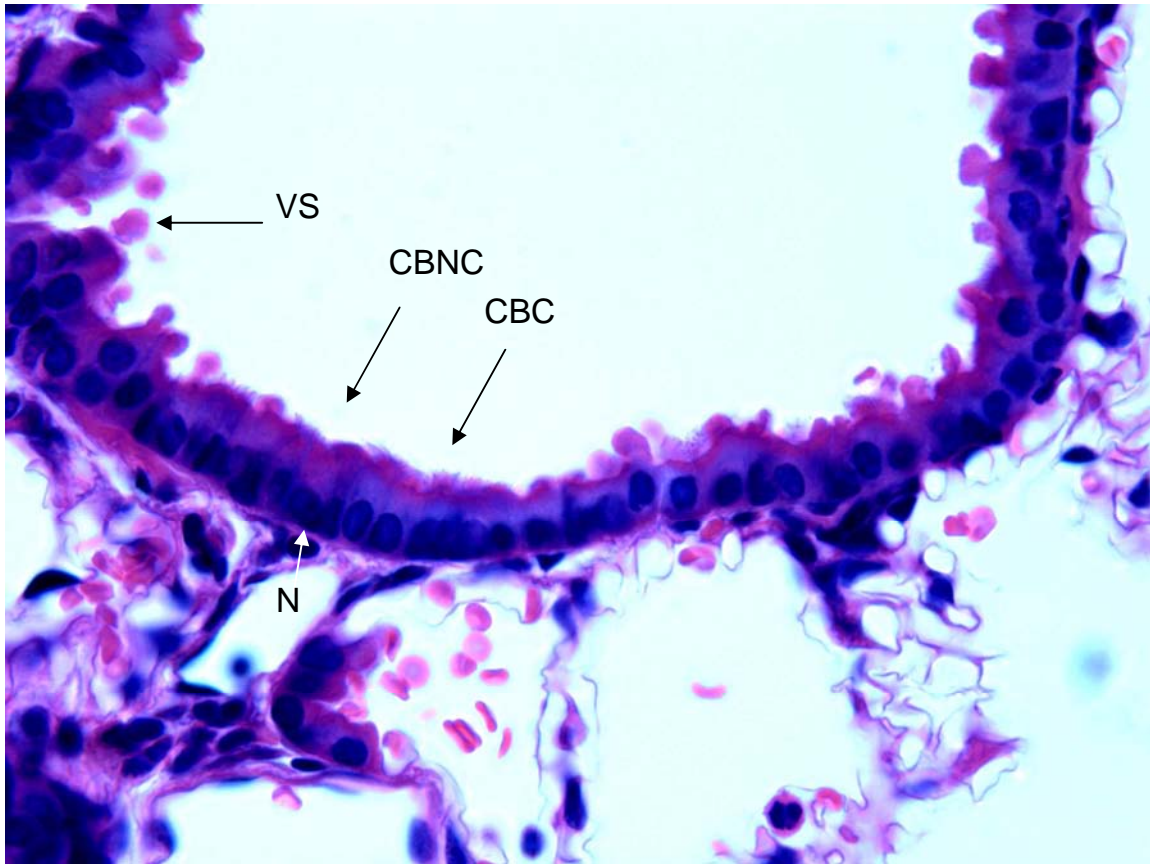


Figura 3. Corte histológico de bronquiolo (1000X). Se observa las características del epitelio bronquiolar. La célula de Clara o célula bronquiolar no ciliada (CBNC) con su núcleo basal (N), además también se aprecia la célula bronquiolar ciliada (CBC) y las vesículas secretas (VS) por exocitosis.

Las isoenzimas CYP450 se encuentran en una concentración de 5 a 10 veces más elevadas en la célula de Clara, que en otro tipo celular y en más concentración que otras sustancias que conjuguen xenobióticos, tales como: la glutatión peroxidasa o glutatión transferasa (Gram, 1997). Otra función importante y de reciente hallazgo, es originar a la misma célula y posiblemente a la célula bronquiolar ciliada (Garnet et al., 2007).

El epitelio bronquiolar descansa sobre su lámina propia, formada por tejido conjuntivo denso, que nutre a las células. Por debajo de la lamina basal se encuentra la capa de músculo liso, cuya función es modelar el diámetro de la vía

aérea (figura 3) y en condiciones patológicas participa produciendo algunas citocinas que modulan el microambiente bronquiolar.

2.6.2 MÚSCULO LISO

Las fibras musculares lisas son células largas, ahusadas, tiene extremos afilados y suelen estar agrupadas en capas, aunque es difícil determinar los límites de las células individuales con microscopía óptica. Cada fibra muscular posee un único núcleo localizado en la parte central y más ancha de la fibra. El núcleo es alargado en sentido longitudinal de la fibra. El conjunto de fibras musculares se unen por tejido conectivo que penetran entre ellas (Geneser, 2006) (Figura 4).

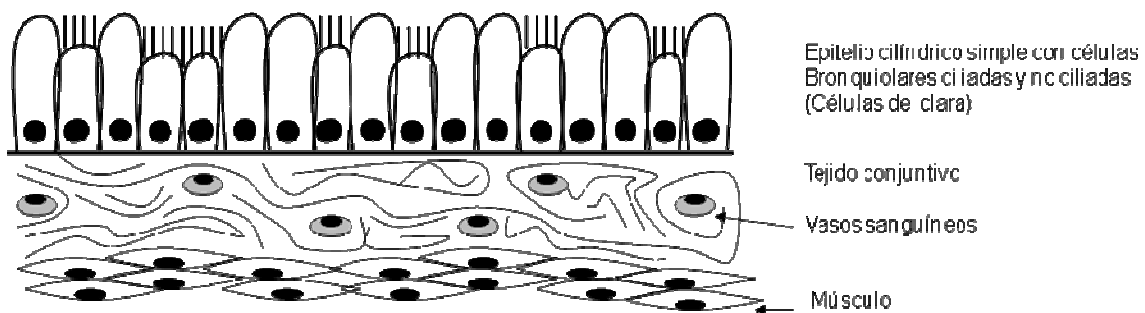


Figura 4. Esquema representativo de la disposición de las diferentes capas que conforman el bronquiolo no respiratorio.

2.6.2.1 FISIOLOGÍA DEL MÚSCULO LISO

Muchos órganos como los viscerales, usan al músculo liso para inducir contracción lenta y regular, o mantener el grado de contracción durante largos periodos. Por ejemplo, el músculo liso de las paredes de los vasos sanguíneos controla el flujo sanguíneo, regulando el diámetro de los vasos sanguíneos (Moyes y Schulte, 2007).

El músculo liso es un conjunto de células individuales y se organizan en una red funcional. Tienen uniones de tipo GAP entre ellas, esto les permite mantener una comunicación y regular respuestas locales (Moyes y Schulte, 2007). Cada fibra está formada en su interior por grupos dispersos de filamentos finos y gruesos, pero no están organizados en sarcómeros, como en el caso del músculo estriado. Todos los filamentos se interconectan, formando una red dentro del citoplasma, también pueden unirse a sitios llamados placas de adhesión. Esta conformación tridimensional les permite a las células contraerse en cualquier dirección (Moyes y Schulte, 2007) (Figura 5).

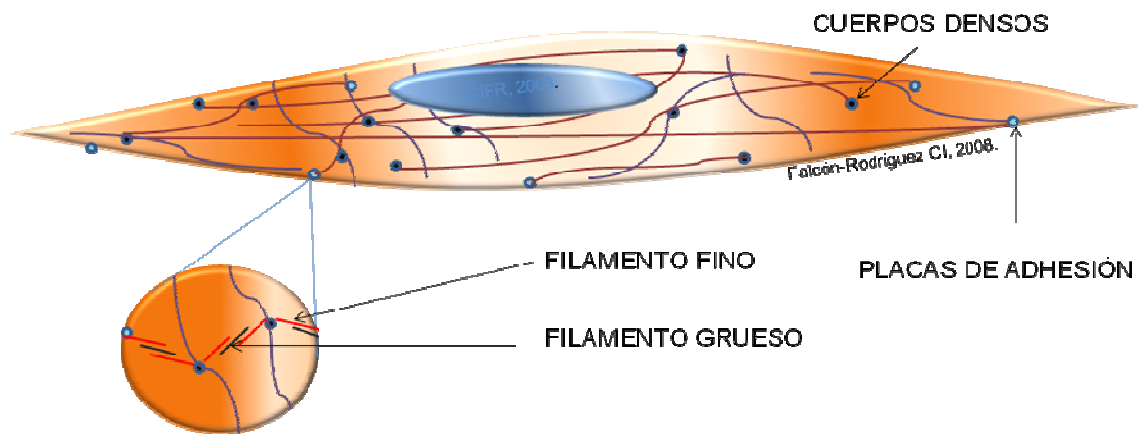
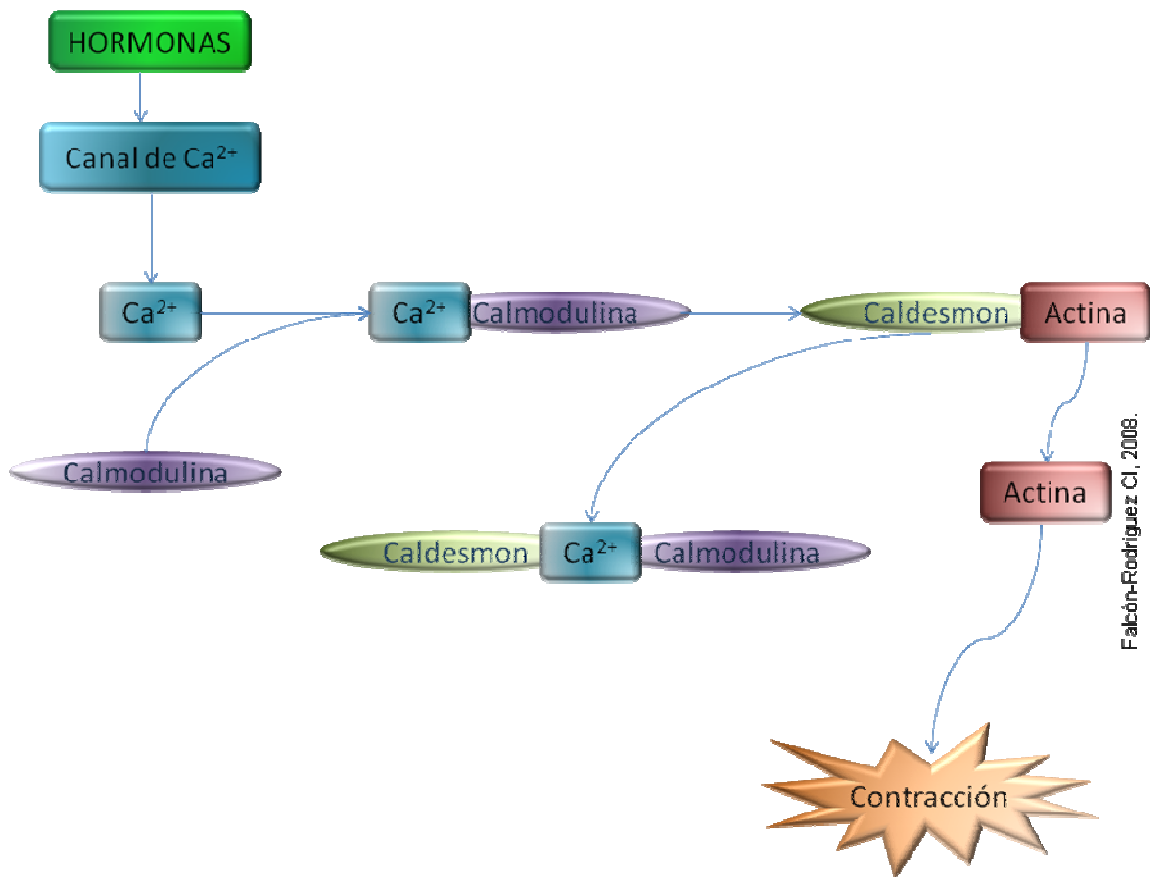


Figura 5. Representación esquemática de la estructura funcional de una fibra muscular lisa.

El músculo liso tiene una proteína llamada caldesmon, que es una proteína de unión a la actina y se une al filamento fino, evitando la unión de la miosina a la actina. Esta proteína se activa en respuesta a los niveles de Ca^{2+} , pero no se une a ellos. Cuando suben los niveles de Ca^{2+} , la proteína calmodulina soluble se une a Calcio y después se une al caldesmon. Formando el complejo calmodulina-caldesmon-Calcio, lo que permite la disociación de la actina, y el resultado, es la formación de un puente cruzado entre la miosina y la actina. Cuando los niveles descienden, el complejo Ca^{2+} -calmodulina-caldesmon se disocia y el caldesmon vuelve al sitio de inhibición en la actina (Moyes y Schulte, 2007; Tortora y Derrickson, 2007) (Figura 6).



Falcón-Rodríguez CI, 2008.

Figura 6. Control de la contracción del músculo liso.

La contracción del músculo liso está regulada por el sistema nervioso parasimpático, o por hormonas, tal como la noradrenalina, que favorece la relajación del músculo liso bronquiolar, aumentando el diámetro de la vía aérea (Tortora y Derrickson, 2007). Otras hormonas actúan modificando los niveles de calcio intracelular. El calcio juega un papel importante en la contracción del músculo, altera las cascadas de señalización que estimulan a las proteínas-cinasas y las proteínas fosfatasas. Por ejemplo, cuando el caldesmon es fosforilado por una MAPcinasa, es incapaz de unirse a la actina, incluso cuando los niveles de Ca²⁺ descienden. La fosforilación del caldesmon mantiene una contracción de forma independiente del Ca²⁺ (Moyes y Schulte., 2007; Tortora y Derrickson., 2007).

2.6.2.2 PROLIFERACIÓN DEL MÚSCULO LISO

Las células del músculo liso responden a una gran variedad de estímulos de proliferación, dentro de estos estímulos se encuentran: el factor de crecimiento ligado a el receptor de Tirosina-cinasa y sustancias broncoconstrictoras asociadas a proteínas G, acopladas a receptores de siete dominios transmembranales. La respuesta de las células a la activación es diferente en especies distintas. Por ejemplo la histamina induce proliferación de músculo liso de las vías aéreas en humano (HASM), pero esto no ocurre en células de bovinos. Aunque la vía de señalización y de transcripción “corriente abajo”, son factores clave en la estimulación de los factores de crecimiento, pueden ser sorprendentemente estables en algunas especies (Hershenson et al., 2008). Además la actividad mitogénica de las células esta mediada por proteínas de las MAP cinasas, que consiste en la participación de tres familias de cinasas serina/treonina citoplasmáticas (ERK, JUN-c y P38), éstas participan en la promoción del crecimiento y diferenciación en el núcleo celular. Todos estos cambios se encuentran comúnmente activados por mecanismos de fosforilación de residuos de tirosina y treonina, y se observan en la mayoría de los pacientes con alguna enfermedad pulmonar obstructiva (Hershenson et al., 2008).

2.6.2.3 HIPERTROFIA

La hipertrofia es el aumento de volumen de un órgano o tejido por un aumento en la masa de las células. Uno de los resultados de la hipertrofia de las células del músculo liso es el incremento en la síntesis de proteínas y la expresión de la proteína contráctil (α -actina). Esta proteína se encuentra en el tejido muscular y está constitutivamente en el aparato contráctil del músculo liso. Su ubicación esta restringida a células del músculo liso de vasos sanguíneos y algunos órganos viscerales. La agresión a este tejido, aumenta la inmunorreactividad, por lo que aumenta aproximadamente entre el 50-83% el cambio en el RNAm de la proteína contráctil; este mecanismo aumenta la masa

del musculo liso, lo que implica el crecimiento de las fibras (Hershenson et al., 2008). La expresión de la α -actina es regulada por hormonas, proliferación celular y alteraciones patológicas, que incluyen transformación oncogénica y aterosclerosis (Tortora y Derrickson, 2007).

2.6.3 ALVÉOLOS

Los alveolos son un conjunto de sacos que se encuentran formados por dos tipos celulares: los neumocitos tipo I que, son células planas simples (Torotora y Derrickson, 2007) y revisten el 95% de la superficie de los alvéolos, su función es el intercambio de gases hacia los vasos sanguíneos. Los neumocitos tipo II, se encuentran dispersos entre las células de tipo I, son casi cuboides y representan el 5% de la superficie de los alvéolos (Ross et al., 2005). En su ápice contienen microvellosidades y secretan un material que mantiene distendidos a los pulmones, (Torotora y Derrickson, 2007), son las progenitoras de los neumocitos de tipo I y los neumocitos de tipo II (Ross et al., 2005). Estas células forman un epitelio simple que se encuentra descansando sobre una membrana basal elástica y fina (Torotora y Derrickson, 2007) (Figura 7).

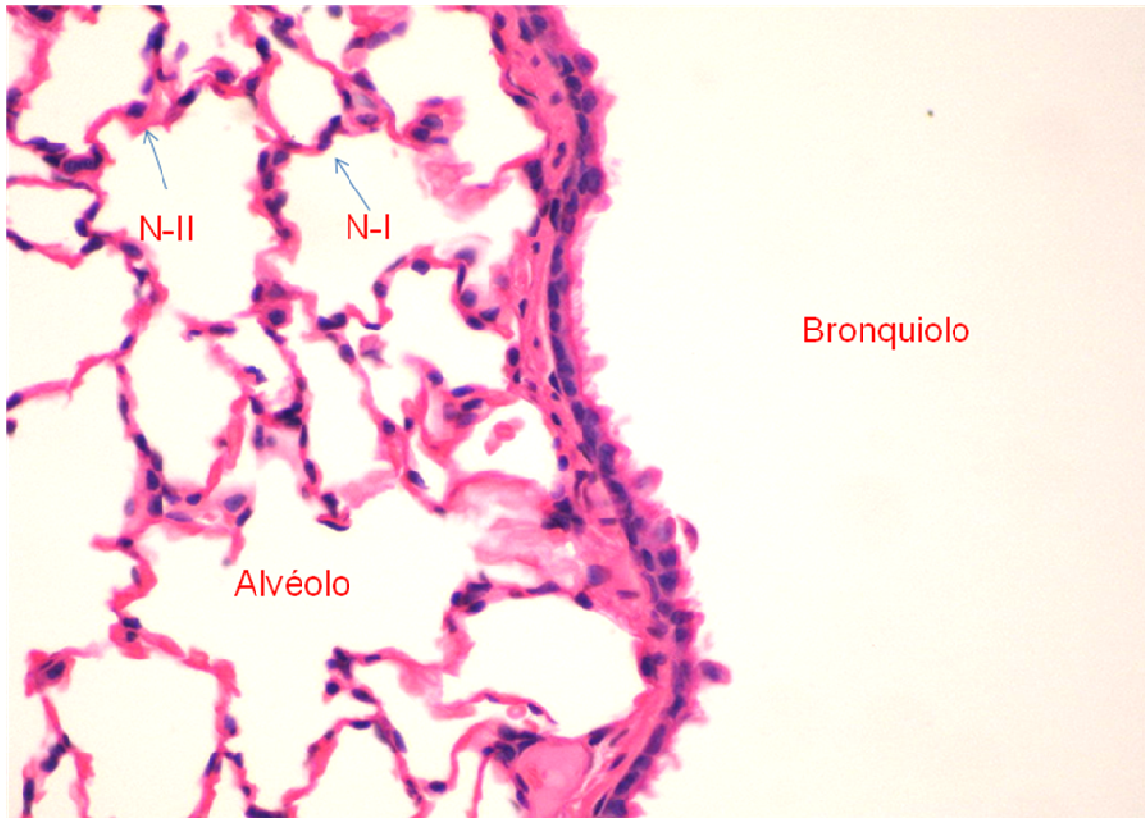


Figura 7. Corte histológico de pulmón (400X), en la cual se observan los diferentes tipos celulares que conforman los alveolos y el bronquiolo aumento o escala

2.7 PATOLOGÍA ASOCIADA CON LA CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS SUSPENDIDAS.

La exposición a las partículas suspendidas y adosadas los metales, tal como el vanadio en los seres humanos, induce respuestas inflamatorias tales como: traqueobronquitis, asma, neumonitis química, alveolitis y fibrosis (Samet et al., 1998), y la exposición crónica está asociada con el desarrollo de la obstrucción crónica de las vías aéreas (Churg et al., 2003).

En un estudio realizado por Churg et al (2003), comparando muestras de pulmón obtenidas de casos de autopsias de sujetos residentes en Vancouver, Canadá y en la Ciudad de México. Los resultados mostraron cambios bronquiolares tales como: aumento en la cantidad de músculo liso y tejido fibroso,

en las muestras de la Ciudad de México, contrastados con las muestras de los casos de Vancouver, lo que sugiere que las partículas son fibrogénicas en individuos expuestos a altos niveles y a largos periodos, resultando en una remodelación de la pared muscular del bronquiolo, además estos cambios están fuertemente asociados con la obstrucción crónica de la vía aérea (Churg et al., 2003).

De esta manera al estar expuestos a: partículas con diámetro de 2.5µm (Kun-Il et al., 2001), vapores, polvos y gases en lugares de trabajo, se podría desarrollar una enfermedad pulmonar obstructiva crónica u otro tipo de patología como: asma o bronquiolitis (Churg et al., 2003; Tortora y Derrickson, 2007).

2.7.1 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), es un trastorno respiratorio caracterizado por la obstrucción crónica y recurrente del flujo aéreo (Tortora y Derrickson, 2007) y se ha asociado con el hábito tabáquico, inhalación de humos y a la exposición a partículas suspendidas en las grandes ciudades, tales como: óxidos nitrosos o sulfurosos. Algunas características de esta patología son: activación de TNF- α e infiltrado de neutrófilos (Barnes, 2000).

2.7.2 BRONQUIOLITIS

La bronquiolitis se refiere a eventos inflamatorios que se centran en los bronquiolos. Dentro de las causas de la inflamación se encuentran: el humo del cigarro, infecciones virales, inflamación idiopática, enfermedades intersticiales, toxinas o medicamentos, en muchos casos es idiopático. Histológicamente, todos los casos de bronquiolitis suelen estar asociados a inflamación aguda y usualmente corresponden a infecciones virales. La bronquiolitis obliterante, está caracterizada por la gran actividad de células inflamatorias, además de la proliferación de fibroblastos en la vía aérea (Visscher et al., 2006).

La bronquiolitis crónica está acompañada de fibrosis peribronquiolar, proliferación de fibroblastos o miofibroblastos en la capa de músculo liso, infiltrado intenso de células inflamatorias como neutrófilos y mononucleares, además de presentar hiperplasia de las células de Clara en la capa epitelial (Kindt et al., 1989; Visscher et al., 2006).

2.7.3 ASMA

Es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas, caracterizada por la presencia activa de células inflamatorias, tales como eosinófilos, macrófagos y linfocitos T dentro de la mucosa bronquial (Bousquest et al., 1990; Eynott et al., 2003).

Su descripción se centra en la disminución reversible de la luz de la vía aérea, resultando la obstrucción del flujo aéreo, además de estar asociado a tos y disnea (Charles et al., 2000). Mientras que la reversibilidad de la obstrucción de la vía aérea es una diferencia en comparación con otras enfermedades crónico obstructivas pulmonares como la bronquiolitis (Charles et al., 2000). Además presenta un aumento en el número de células del músculo liso (hiperplasia) (Charles et al., 2000).

Algunos estudios realizados sobre la estimulación del músculo liso de la vía aérea en respuesta a agentes mitogénicos, tales como: factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y citocinas, muestran la interacción para inducir la proliferación de los miocitos y promover la remodelación de la vía aérea, mismo evento patológico observado en pacientes con asma (Hamid et al., 1991), bronquiolitis obliterante o bronquitis crónica (Panettieri, 1998).

El asma es una patología que podría estar activada por las partículas aéreas, o por vapores y humos en sitios de trabajo. El vanadio induce irritación del

tracto respiratorio, alteraciones en la funcionalidad pulmonar, y se relaciona con alteraciones respiratorias tales como el asma.

Las dos patologías anteriormente mencionadas (El asma y bronquiolitis) tienen como resultado, la proliferación del musculo liso en la capa muscular de los bronquios o bronquiolos (Bonner et al., 2000).

2.7.4 PROLIFERACIÓN DE LA CAPA MUSCULAR EN EL BRONQUIOLO: REMODELACIÓN

La proliferación de la capa epitelial y la capa muscular en el bronquiolo, dirigen a la remodelación de la vía aérea lo que provoca la reducción de esta vía. En este evento es posible que exista la diferenciación de miofibroblastos a células de músculo liso en la capa muscular (Bonner et al., 2000).

Bonner et al (2000), utilizó el modelo la cepa de rata Sprague-Dawley y por instilación intratraqueal de pentóxido de vanadio, reportó el desarrollo de una patología obstructiva. Además la presencia del músculo liso peribronquiolar aumentó y tuvo como consecuencia la obstrucción de la luz de la vía área, También provocó fibrosis y metaplasia del epitelio bronquiolar.

Esta obstrucción de la vía aérea es consistente con la patología presentada en pacientes con asma crónico (Bonner, 2000).

Como ya se mencionó previamente las partículas o vapores que contengan metales, tal como el vanadio, activan una respuesta inflamatoria pulmonar (Dreher et al., 1997), a través de citocinas que median dicha respuesta u otras como la proliferación.

2.8 CITOCINAS QUE INTERVIENEN EN LOS CAMBIOS BRONQUIOLARES POR PARTÍCULAS SUSPENDIDAS

Las citocinas son proteínas encargadas de estimular o inhibir varios procesos celulares normales, como: el crecimiento, diferenciación celular e inflamación. En los mamíferos, la IL-6 es producida por varios tipos celulares del sistema inmune como: los macrófagos (Aarden et al., 1987), neutrófilos, eosinófilos, células T y células B (Hirano et al., 1986). Pero también por otros tipos celulares tales como: fibroblastos (Weissenbach et al., 1980), queratinocitos (Baumann et al., 1984), osteoblastos, células del músculo liso, músculo esquelético (Akira et al., 1993), adipocitos (Arner, 2005), hepatocitos (Tortora y Derrickson, 2007) y algunos epitelios (Quay et al., 1998), como las células endoteliales (Corbel y Melchers, 1984). Además algunas citocinas son utilizadas como marcadores de daño en algunas enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Existen algunos estudios que evidencian el aumento de citocinas por la exposición a metales. Por ejemplo, la exposición laboral a vapores de mercurio, aumenta de manera significativa la expresión de genes que codifican para citocinas que participan en la respuesta inflamatoria, tales citocinas son: TNF- α , IL-2 e IL-7 (Liu et al., 2003). Los metales de transición como el Vanadio, Cromo y Zinc inducen la expresión de citocinas en células inflamatorias (Samet et al., 1998). Se ha reportado que el pentóxido de vanadio estimula la secreción de IL-6, IL-8 y TNF- α (Carter et al., 1997). La IL-8 es un quimioatrayente y activador de neutrófilos en diferentes tejidos y órganos de organismos expuestos a partículas. El aumento en los niveles de IL-8 está documentado en lavados bronquioalveolares en pacientes con daño pulmonar agudo (Samet et al., 1998)

TNF- α es la primer citocina que actúa en el daño pulmonar, entre sus funciones se encuentran: iniciar y mantener la respuesta inflamatoria (Yoshida y Tuder, 2007), además de activar a otras citocinas como: TGF- β , IL-1B, IL-6

(Guharoy et al., 2001). Además es capaz de activar a NF- κ B, y así sintetizar otras citocinas como IL-8 (Shanley et al., 2001). Además, TNF- α es capaz de inducir la expresión de una miríada de mediadores que afectan el crecimiento de fibroblastos y su diferenciación. Por otro lado induce la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂), que es un potente inhibidor de la síntesis de colágeno, y altos niveles de ésta citocina inhiben la proliferación de fibroblastos (Guharoy et al., 2001).

La IL-6, es una citocina muy conocida, porque regula muchos procesos inflamatorios en los órganos del cuerpo humano. El aumento en esta citocina, esta implicada en una gran variedad de desordenes pulmonares (Saito et al., 2008), como: la inflamación, permeabilidad vascular y la proliferación celular (Yoshida y Tudor, 2007). La consecuencia de la inflamación crónica es el desarrollo de fibrosis pulmonar (Bonner, 2000).

Por otra parte, se ha reportado que los diversos compuestos del vanadio no causan el mismo daño en diferentes especies (Dill et al., 2004). La mayoría de los estudios toxicológicos, usan diferentes modelos en los que incluyen varias especies, para que los resultados puedan con más seguridad, ser extrapolados a los humanos.

2.9 MODELO DE LA INHALACIÓN DE VANADIO EN RATA Y RATÓN

Los estudios toxicológicos son realizados en diferentes especies que se seleccionan de acuerdo con el órgano de interés o la susceptibilidad especie-específica que interesa al investigador. Las más utilizadas son rata y ratón. Estas dos especies responden a químicos y carcinógenos de diferente manera (Klaassen, 2001).

El resultado experimental en los animales de diferentes especies que son expuestos a las mismas sustancias tóxicas debe ser objeto de estudio para comprender la mayoría de las interacciones entre las sustancias, células y/o

proteínas que regulan algunos pasos fundamentales en el metabolismo de los compuestos evaluados y tratar de explicar su fisiopatología (Klaassen, 2001).

Entre estas diferencias de especie hay varios estudios. Klaassen (2001), reporta que, los ratones, son altamente resistentes a desarrollar hepatocarcinomas por acción de las aflatoxinas. Una dieta elevada en concentración de aflatoxinas, alrededor de 10,000 partes por billón (ppb) no es suficiente para producir cáncer de hígado en ratón, mientras que en la rata, una dosis baja aproximadamente de 15 ppb produce el aumento de tumores en hígado. Probablemente éstas alteraciones pueden deberse a las diferencias que existen en los sistemas enzimáticos que se encuentran en las diferentes especies (Klaassen, 2001).

En Otro estudio realizado por el Programa Nacional de Toxicología en E.U.A, utilizaron ratas Fisher 344 y ratones de la cepa B6C3F₁, los cuales se expusieron a pentóxido de vanadio (V₂O₅) por la vía inhalada. Los ratones se sometieron a dosis de: 1, 2 y 4 mg/m³, durante 104 semanas, los análisis se realizaron en: 5, 12, 26, 54, 171, 362 y 535 días, después de comenzar el tratamiento. Los resultados mostraron que el grupo expuesto a 4 mg/m³, la tasa de depósito disminuyó de 0.62 a 0.27 µg/día, para el grupo expuesto a 2 mg/m³, disminuyó de 0.41 a 0.22 µg/día. Por último, el grupo expuesto a 1 mg/m³, mostró una pequeña disminución de 0.31 a 0.26 µg/día. Por lo que se concluyó que el vanadio es retenido aproximadamente del 2-3% en los pulmones de los ratones expuestos a cualquiera de las tres dosis (IARC, 2002). En el caso de las ratas la dosis fue la siguiente: 0, 1 y 2 mg/m³, y la evaluación duro 16 días. Los animales expuestos por 16 días mostraron un peso pulmonar significativamente mayor en comparación con los organismos expuestos a los días 0, 1, 4, pero similar en el día 8, manteniendo el peso y probablemente estabilizando el daño después de la inhalación (IARC, 2002).

Otro estudio realizado por el Programa Nacional de Toxicología, en el cual usaron ratas de la misma cepa, expuestas a 0.5, 1 y 2 mg/m³ de pentóxido de

vanadio. Durante 1, 5, 12, 26, 54, 173, 360 y 540 días. (IARC, 2006). La concentración de vanadio en el pulmón del grupo expuesto a 1 mg/m^3 , disminuyó de 0.41 a $0.25 \text{ } \mu\text{g/m}^3$. Para el grupo 2 cuya dosis fue de 2 mg/m^3 , bajó de 0.68 a $0.48 \text{ } \mu\text{g/m}^3$, para ambos grupos la disminución fue entre el día 1 y el 542. Por lo que se concluyó que las ratas retienen del 10-15% del vanadio inhalado hasta el día 540. En comparación con los ratones que retiene del 2-3%. Lo anterior sugiere que existen diferencias en cuanto a la retención del vanadio, lo que podría llevar a cambios pulmonares diferentes entre estos dos organismos.

Dill et al., (2004), realizaron otro estudio. Repitiendo el modelo de inhalación en rata y ratón que usó El Programa Nacional de Toxicología, mencionado anteriormente, encontraron lo siguiente: aumento en la inflamación crónica, fibrosis intersticial y metaplasia e hiperplasia alveolar y bronquiolar. Además se observó una relación entre el daño y la concentración (Tabla 1). Además estas diferencias se encuentran en el tipo de enzimas que metabolizan las sustancias químicas en el pulmón, una de ellas es el citocromo p450.

2.10 CITOCROMO P450 (CYP) Y SUS DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES

Cada una de las especies presenta diferencias entre sus enzimas que metabolizan xenobióticos las cuales pueden encontrarse o no en algunas especies, tales como: los roedores y conejos.

Existen tres formas para los CYP y son: CYP1A2, CYP3A3 y CYP3A4 y son capaces de catalizar la producción de metabolitos de unión a DNA en 20, 8 y 5 veces más en los organismos no expuestos a xenobióticos. Estas enzimas se expresan en pulmones de humanos y de roedores. Interesantemente, el conejo expresa el CYP4B1 que es una enzima mucho más activa, cerca de 180 veces más efectiva que otras enzimas CYPs (Voit et al., 1997). Las características enzimáticas de la CYP, son las que confieren ciertas cualidades en el metabolismo de algunas sustancias y que puede explicar algunas de las diferencias entre especies.

	RATÓN		DAÑO	RATA		DAÑO
IARC, 2002	1mg/m ³	0.31-0.26 µg/día		0.5mg/m ³	0.22 µg/día	
	2mg/m ³	0.41-0.22 µg/día		1mg/m ³	0.41-0.25 µg/día	
	4mg/m ³	0.62-0.27 µg/día		2mg/m ³	0.68-0.48 µg/día	
DILL et al., 2004	1mg/m ³		inflamación	0.5mg/m ³		inflamación
	2mg/m ³		fibrosis metaplasia, hiperplasia	1mg/m ³		fibrosis metaplasia, hiperplasia
	4mg/m ³		(alveolar y bronquiolar)	2mg/m ³		(alveolar y bronquiolar)
	ACUMULACION EN PULMON (2-3%)			ACUMULACION EN PULMON (10-15%)		

Tabla 1. Resumen de los resultados en los dos modelos rata y ratón. IARC en (2002), reporta, que a diferentes concentraciones de V₂O₅, la tasa de depósito de este metal es diferente para las ratas y ratones. Dill et al (2004), reporta diferentes patologías que están relacionadas con la dosis de exposición, pero encontró similitud en el daño en las dos especies.

3. JUSTIFICACION

En los párrafos anteriores se ha expuesto la importancia que tiene la contaminación por partículas suspendidas en la fisiopatogenia de diversas patologías pulmonares, como las que integran a las EPOCs y dentro de ellas el Asma. Sabemos que un componente de estas partículas es el vanadio, elemento que ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo de trabajo. Otros estudios han centrado sus esfuerzos en los efectos de este elemento en pulmón, pero los experimentos los realizan en rata y no en ratón. El conocer que existen diferencias inter-especie, nos llevó a evaluar, utilizando nuestro modelo de exposición por inhalación de V_2O_5 . Uno de los sitios en los que se centra la diferencia en el modelo en rata es en el bronquiolo y dado que este es el sitio en el que las partículas se depositan y en el que se lleva a cabo el proceso inflamatorio, decidimos evaluar los cambios que ocurren en este sitio, centrándonos en el músculo liso bronquiolar y en algunas citocinas indicadoras de inflamación y fibrosis, en rata y ratón.

4. HIPOTESIS

La inhalación de vanadio inducirá cambios en la estructura bronquiolar que se manifestará por cambios morfológicos, tanto epiteliales, como de la pared del músculo liso bronquiolar que lo llevarán a la proliferación y que además variarán de acuerdo con la especie evaluada. Además, estos cambios se relacionarán con diferencias en la presencia de las citocinas IL-6 y TNF- α , y se relacionarán con la especie evaluada.

5. OBJETIVOS

PRINCIPAL

- Comparar en rata y ratón los cambios morfológicos en el bronquiolo como respuesta a la inhalación de pentóxido de vanadio (V_2O_5)

PARTICULARES

- Evaluar por inmunohistoquímica, las diferencias entre rata y ratón en IL-6 y $TNF\alpha$ como marcadores de inflamación, además de relacionarlo con el tiempo de exposición
- Identificar la participación de la proliferación del músculo liso bronquiolar mediante inmunohistoquímica, utilizando α -actina y relacionar los cambios observados con los marcadores de las citocinas, como consecuencia de la inhalación de V_2O_5 a diferentes tiempos

6. MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron en este estudio ratas y ratones macho, con las siguientes características:

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Ratas

Se utilizaron 20 ratas Wistar macho de 200 g de peso aproximadamente, distribuidas en cuatro grupos (cada grupo con cinco ratas) de la siguiente manera:

- Grupo 1 control (solo inhalaron solución salina al 0.9%)
- Grupo 2 (8 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 4 semanas.
- Grupo 3 (12 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 6 semanas.
- Grupo 4 (24 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 12 semanas.

Ratones

Se utilizaron 40 ratones CD1 machos con un peso aproximado de 35 g cada uno, que fueron distribuidos en 4 grupos (cada grupo con 10 ratones) de la siguiente manera:

- Grupo 1 control (solo inhalaron solución salina al 0.9%)
- Grupo 2 (8 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 4 semanas.
- Grupo 3 (12 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 6 semanas.
- Grupo 4 (24 inhalaciones): Inhalaron pentóxido de vanadio (V_2O_5) 0.02M. 1 hora/dos veces por semana, durante 12 semanas.

6.2 OBTENCIÓN DE MUESTRA

En ambos casos los animales se anestesiaron, vía intraperitoneal con pentobarbital sódico, 20 mg/Kg por ratón y 50 mg/Kg para ratas. Ya anestesiados se expuso el tórax y se lavaron, por vía intracardiaca, con solución salina al 0.9%. Los pulmones se fijaron vía intratraqueal con formol al 10% insuflándolos a capacidad pulmonar total; se extrajeron para el procesamiento habitual de la técnica histológica, se llevaron a cabo cortes de las muestras ya incluidas y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson, para después observarlos al microscopio fotónico de campo claro y evaluar los cambios morfológicos en el bronquiolo respiratorio.

6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes en blanco para evaluar los siguientes marcadores: TNF- α , IL-6, y α -actina (proliferación de musculo liso). Los cortes se desparafinaron en xilol y se deshidrataron en alcoholes graduales.

Se llevó a cabo la recuperación antigénica con Declere, en una olla a 15 Psi, durante 3 minutos. Se realizaron los lavados de PBS (3 de 5 min) y uno de PBS-albumina (1 de 10 min). Se incubó el anticuerpo primario (concentración 1:100) 1 hora en una estufa a 37°C. Se lavaron nuevamente con PBS (3 de 5 min) y PBS-albumina (1 de 10 min). Se incubó el anticuerpo secundario (concentración 1:100) 30 min en la estufa a 37°C. Se lavaron nuevamente las muestras con PBS (3 de 5 min) y PBS-albumina (1 de 10 min). Se incubó con el complejo HRP-estreptavidina 30 min en la estufa a 37°C, se reveló con diaminobenzidina (DAB) y se contratiñó con hematoxilina,

6.4 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se tomaron las fotos y fueron analizadas (50 campos para cada exposición y para cada marcador) con el programa "Motic Images Plus 2.0", en donde se midió el grosor de la marca de α -actina. En el caso de: TNF- α , IL-6, se realizó densitometría. Para ambos casos se utilizó el programa Sigma Stat para realizar una ANOVA, y determinar las diferencias significativas entre grupos y especie (Figura 8).

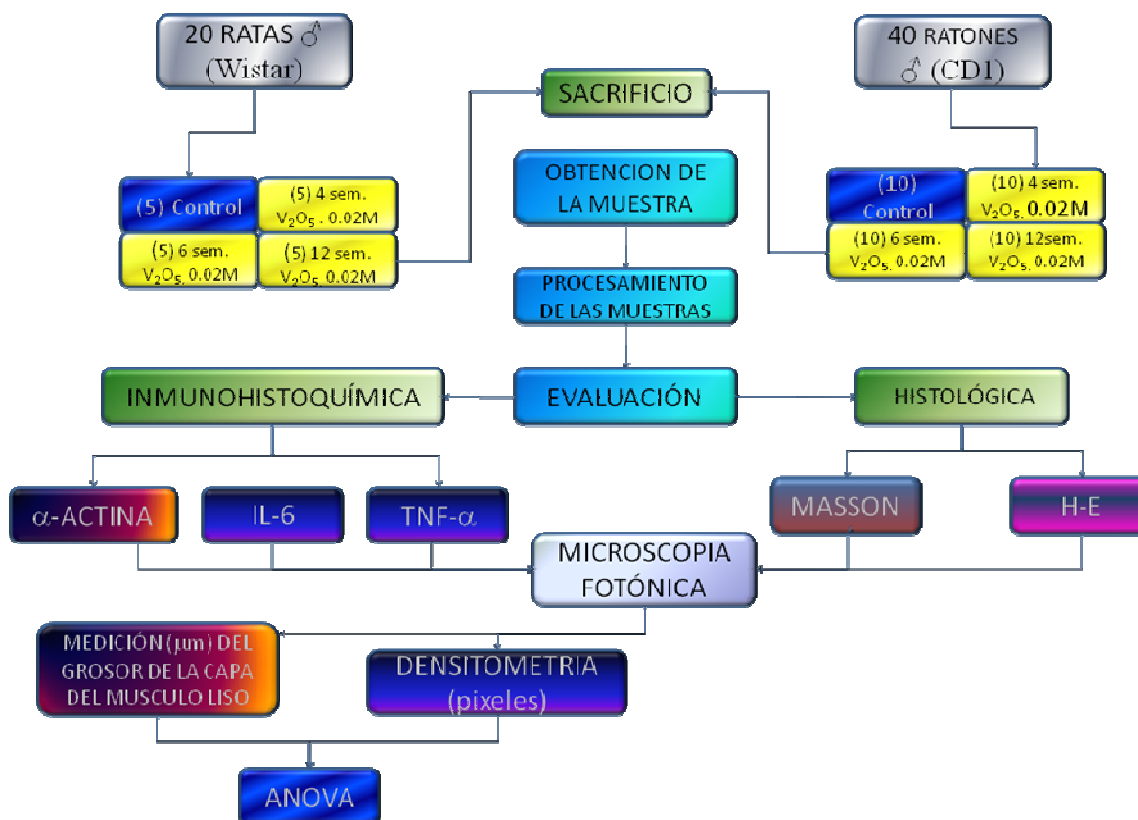


Figura 8. Resumen del método en el que se describen las etapas metodológicas del proyecto.

7. RESULTADOS

Los cambios pulmonares encontrados se centran específicamente en las estructuras que conforman el bronquiolo, en especial su epitelio constituido por: la célula bronquiolar no ciliada o célula de Clara, la célula bronquiolar ciliada, además de las modificaciones en la capa de músculo liso. Los cambios posteriores a la inhalación de vanadio fueron los siguientes:

7.1 INFILTRADO INFLAMATORIO EN EL MODELO EN RATA:

La exposición a vanadio en los organismos, causó la infiltración de células inflamatorias, cuya localización se encontró alrededor del bronquiolo, en los organismos expuestos a V_2O_5 durante 4 semanas (Figura 9-B), en comparación con el grupo control (Figura 9-A), en el cual no se aprecia infiltrado inflamatorio alrededor del bronquiolo (b) y/o el parénquima alveolar (p). En los organismos expuestos a V durante 6 y 12 semanas (Figuras 9-C y 9-D respectivamente), se apreció el mismo patrón que en los expuestos a 4 semanas, infiltrado inflamatorio peribronquiolar con una diferencia mayor, también se encontró infiltrado inflamatorio en el parénquima alveolar (p)

7.2 INFILTRADO INFLAMATORIO EN EL MODELO EN RATÓN:

Los ratones expuestos a 4, 6 y 12 semanas (figuras 10-B,C y D respectivamente), no presentaron infiltrado inflamatorio a diferencia de las ratas. Los bronquiolos (b) y el parénquima alveolar (p), se observaron igual que en los controles (figura 10-A).

7.3 DAÑO EPITELIAL EN EL MODELO EN RATA:

El epitelio bronquiolar normal (figura 11-A) está constituido por epitelio que va de cilíndrico a cubico simple, con células ciliadas y no ciliadas, núcleos basales y esféricos y con presencia de vesículas secretoras. Después de la inhalación de V los cambios se hicieron evidentes desde las 4 semanas (figura 11-B); lo que se observó fue hiperplasia de algunas células epiteliales bronquiolares, en especial de la célula de Clara, desarreglo en la estructura cilíndrica y con cambios nucleares, ya que pierden su forma esférica. A las 6 semanas de exposición a V_2O_5 (figura 11-C) las células de Clara perdieron su estructura cilíndrica y los núcleos de las células se apreciaron de manera irregular. Después de 12 semanas de exposición a V_2O_5 (figura 11-D), se observó que los cambios en la morfología de la célula de Clara se mantienen lo mismo que los cambios en la morfología de los núcleos de estas células.

7.4 DAÑO EPITELIAL EN EL MODELO EN RATÓN:

Para el caso de los ratones, en los controles (figura 12-A), se apreció un epitelio cilíndrico simple, formado por las células de Clara, cilíndricas, las cuales presentan núcleos basales y esféricos y sus vesículas que secretaban a la luz del bronquiolo. Después de 4 semanas de exposición (figura 12-B), el epitelio del bronquiolo se observó sin cambios, comparado con los ratones control, observando a las células de Clara con protrusión hacia la luz del bronquiolo, sus núcleos basales y la presencia de vesículas secretoras en el citoplasma de la célula.

Cuando comparamos los resultados en ambas especies observamos que en las ratas el cambio epitelial fue más evidente, se hizo más notable cuando transcurrieron 6 semanas de estar inhalando el elemento (figura 12-C). La célula bronquiolar no ciliada perdió su forma cilíndrica observándose un poco amorfos, sus núcleos cambiaron su estructura esférica, sin cambios en sus vesículas

secretoras. A diferencia. en los ratones expuestos por 12 semanas (figura 12-D), se apreció pérdida notable de la capa epitelial, ya que solo son evidentes fragmentos citoplásmicos de la célula bronquiolar y disminución en su altura, cambios que no se apreciaron en la rata.

7.5 MÚSCULO LISO BRONQUIOLAR Y VASCULAR:

Para evaluar este efecto utilizamos al marcador α -actina, que indica proliferación de músculo liso

7.5.1 CAMBIOS EN EL MUSCULO LISO BRONQUIOLAR MODELO EN RATA:

En los controles, la marca estaba muy bien definida en la zona peribronquiolar que corresponde al músculo liso que se encuentran de manera normal (figura 13-A). Conforme el tiempo de exposición progresó, la presencia de la marca fue más evidente, y la zona ocupada por la misma, fue más gruesa. Mientras a las 4 semanas de exposición, los cambios no eran muy evidentes y semejantes al control (figura 13-B), para las 6 semanas (Figura 13-C), esta capa se apreció más gruesa. Estos cambios persistieron hasta las 12 semanas de exposición (figura 13-D).

7.5.2 CAMBIOS EN EL MUSCULO LISO BRONQUIOLAR MODELO EN RATÓN:

Se observaron diferencias significativas entre especies y en los controles, la capa de músculo liso bronquiolar es más delgada en ratón que el de rata (Figura 14-A). A las 4, 6 y 12 semanas, (figuras 14-B, C y D respectivamente). Los cambios se mantuvieron semejantes a los de la rata, con un aumento en la marca, pero nunca fue tan gruesa como en el caso de la rata.

7.5.3 CAMBIOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR MODELO EN RATA:

Utilizando la misma marca (α -actina) en el caso de los controles se apreció una marca delgada que limitaba la pared de los vasos, como se esperaba. (Figura 15-A). A las 4 semanas (figura 15-B) de exposición, no hay cambios con relación al control. Al igual que en el caso del bronquiolo, a las 6 y 12 semanas (figura 15-C y 15-D respectivamente), la marca de α -actina se observó más gruesa que en el grupo control.

7.5.4 CAMBIOS EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR MODELO EN RATÓN:

La marca de la α -actina fue semejante en los controles en ambas especies (figura 16-A). Lo mismo ocurrió a las 4 semanas (figura 16-B). A partir de las 6 y hasta las 12 semanas (figuras 16-C y 16-D respectivamente) se observó aumento en el grosor de la capa de musculo liso.

Se aplicó una prueba de ANOVA para identificar las diferencias en los bronquiolos y los vasos sanguíneos. La grafica muestra que en el caso de las ratas (figura 17) no hubo diferencias significativas entre el grupo control y el grupo expuesto por 4 semanas. Las diferencias se observaron a las 6 y 12 semanas, en ambas estructuras. En el caso de los ratones (figura 118), el comportamiento fue muy parecido al de las ratas (figura 17) sólo que en éstas últimas el cambio fue más evidente.

7.6 INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-6 EN EL MODELO EN RATA:

La marca de IL-6, se incremento conforme aumentaron las exposiciones a V_2O_5 . El organismo control de (figura 19-A) se observó negativo. En el grupo expuesto a 4 semanas (figura 19-B), en la cual se apreció una marca muy localizada en las células epiteliales del bronquiolo y parte en el musculo liso. En el grupo expuesto a 6 semanas (figura 19-C), apareció la marca en las mismas

estructuras que en el grupo de exposición a 4 semanas. Para el grupo expuesto a 12 semanas (figura 19-D), se observó la expresión de IL-6, en algunas células de Clara y en el infiltrado inflamatorio, además fue evidente en la capa de músculo liso.

7.7 INMUNOHISTOQUÍMICA IL-6 EN EL MODELO EN RATÓN:

En el grupo control (figura 20-A), la marca para la citocina se observó en la periferia de las células de Clara, en especial en la parte apical del epitelio, sin cambios significativos en la presencia de la marca a las 4 semanas (figura 20-B). Para las 6 y 12 semanas (figura 20-C y 20-D respectivamente), se localizó en todo el epitelio del bronquiolo, especialmente en la célula de Clara. Además fue evidente la marca en el parénquima (figura 20-B,C, y D respectivamente).

Se realizó una prueba de ANOVA para identificar las diferencias en la marca de IL-6 en los pulmones. En las ratas la grafica mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos expuestos a las 4, 6 y 12 semanas respectivamente (figura 21). Para el caso de los ratones no se observó diferencia significativa, la marca de IL-6 se mantuvo a lo largo del tiempo de tratamiento, similar al grupo control (figura 21).

7.8 INMUNOHISTOQUÍMICA TNF- α EN EL MODELO EN RATA:

En el control (figura 22-A), la marca fue negativa, hasta la cuarta semana (figura 22-B), en la que se apreció una marca muy localizada en las células del epitelio, y en el parénquima. Para el grupo expuesto a 6 semanas (figura 22-C), la marca se mantuvo en el epitelio, y en escaso infiltrado inflamatorio). De la misma manera se notó que el grupo expuesto por 12 semanas (figura 22-D), la marca se mantuvo en el epitelio y, en el infiltrado inflamatorio.

7.9 INMUNOHISTOQUÍMICA TNF- α EN EL MODELO EN RATÓN:

Para los ratones, la historia fue diferente, ya que en el grupo control (figura 23-A) la marca fue muy evidente y específica en el epitelio (flecha negra). Para los grupos expuestos a 4 semanas (figura 23-B) y 6 semanas (figura 23-C), las muestras fueron negativas para TNF- α ., pero el grupo expuesto a 12 semanas (figura 23-D), mostro marca en el epitelio (flecha negra) y en el musculo liso (flecha verde).

Se realizó una prueba de ANOVA para identificar las diferencias en la marca de TNF- α en los pulmones. En las ratas la grafica mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos expuestos a las 4, 6 y 12 semanas respectivamente (figura 21). Para el caso de los ratones, el grupo control muestra su marca basal, pero conforme pasa e tiempo de exposición, la marca no es evidente para los tratamientos de 4 y 6 semanas. Por último, se observó marca en el grupo expuesto a las 12 semanas (figura 21).

INFILTRADO INFLAMATORIO RATA

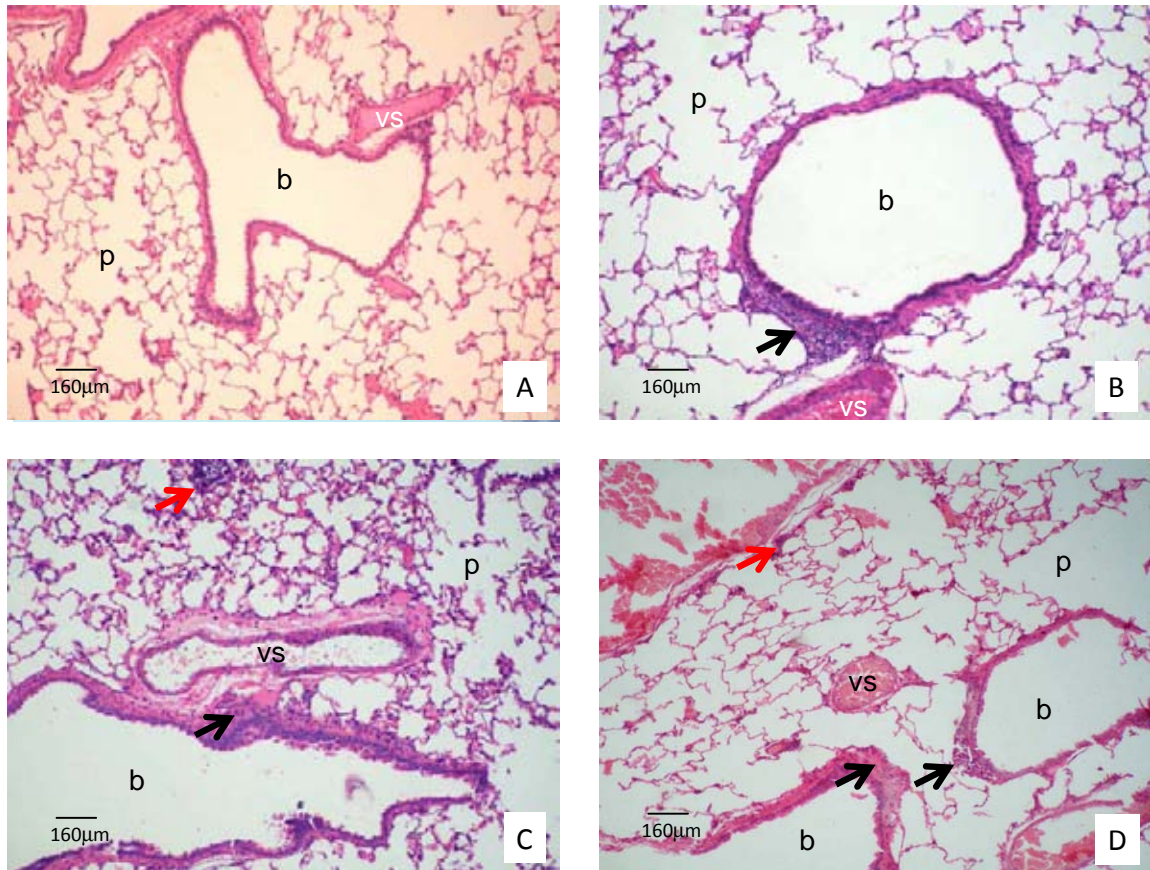


Figura 9. (A) Pulmón de rata control, en el que se observan el parénquima (p), bronquiolo (b) y un vaso sanguíneo (vs), no hay ningún tipo de daño. (B) Pulmón de rata expuesto a V_2O_5 durante 4 semanas, se observan infiltrado inflamatorio peribronquiolar (flecha negra), bronquiolo (b) y un vaso sanguíneo. (C) Pulmón de rata expuesto V_2O_5 durante 6 semanas, se observan Infiltrado inflamatorio peribronquiolar (flecha negra) y alveolar (flecha roja), además se observa su bronquiolo (b), vaso sanguíneo (vs). (D) Pulmón de un organismo expuesto durante 12 semanas, se observa infiltrado inflamatorio peribronquiolar (flechas negras) y alveolar (flecha roja).

INFILTRADO INFLAMATORIO RATON

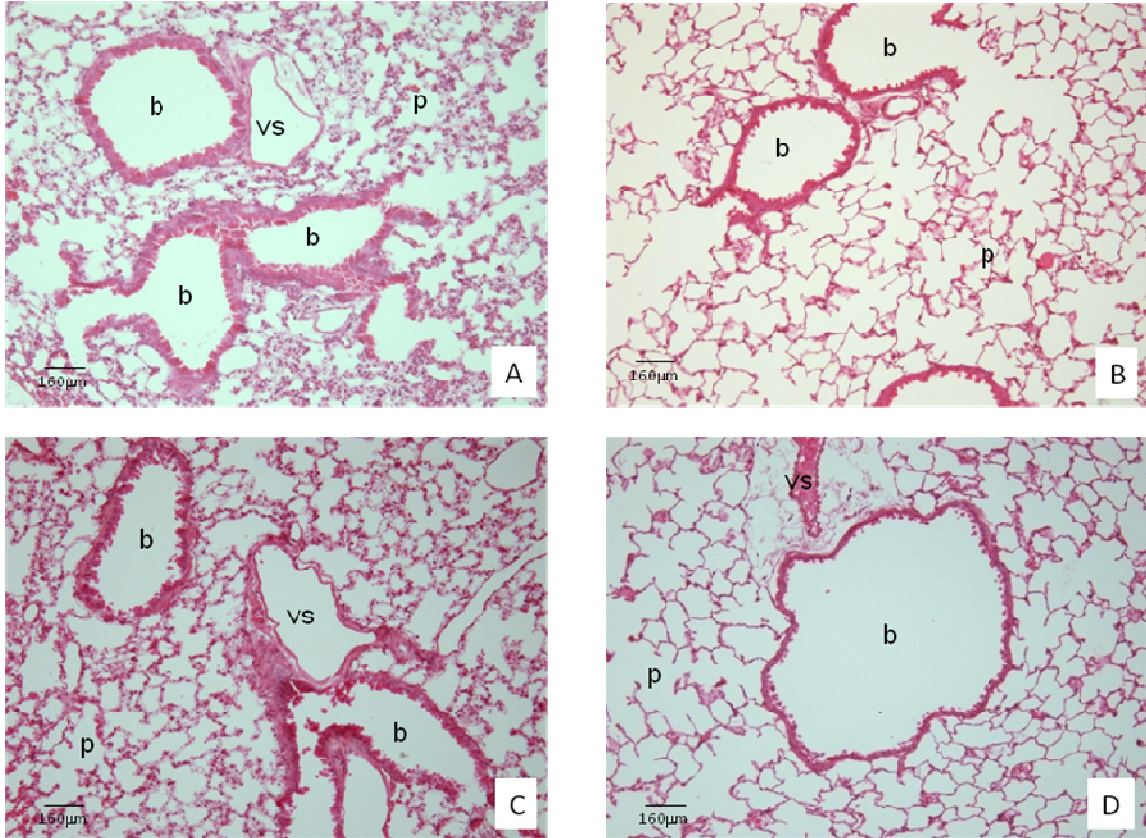


Figura 10. (A) Pulmón de un ratón control, se observan el parénquima (p), bronquiolo (b) y un vaso sanguíneo (vs), no hay ningún tipo de daño. (B) Pulmón de un organismo expuesto a V₂O₅ durante 4 semanas, bronquiolo (b) y un vaso sanguíneo, no se aprecia infiltrado inflamatorio. (C) Pulmón de un organismo expuesto V₂O₅ durante 6 semanas, se observan el bronquiolo (b) y el parénquima (p) y un vaso sanguíneo (vs). (D) Pulmón de un organismo expuesto durante 12 semanas, se aprecia su bronquiolo (b) y un vaso sanguíneo (vs). En todas las exposiciones de los ratones, no se aprecian daños, en comparación con las ratas.

DAÑO EN EL EPITELIO BRONQUIOLAR RATAS

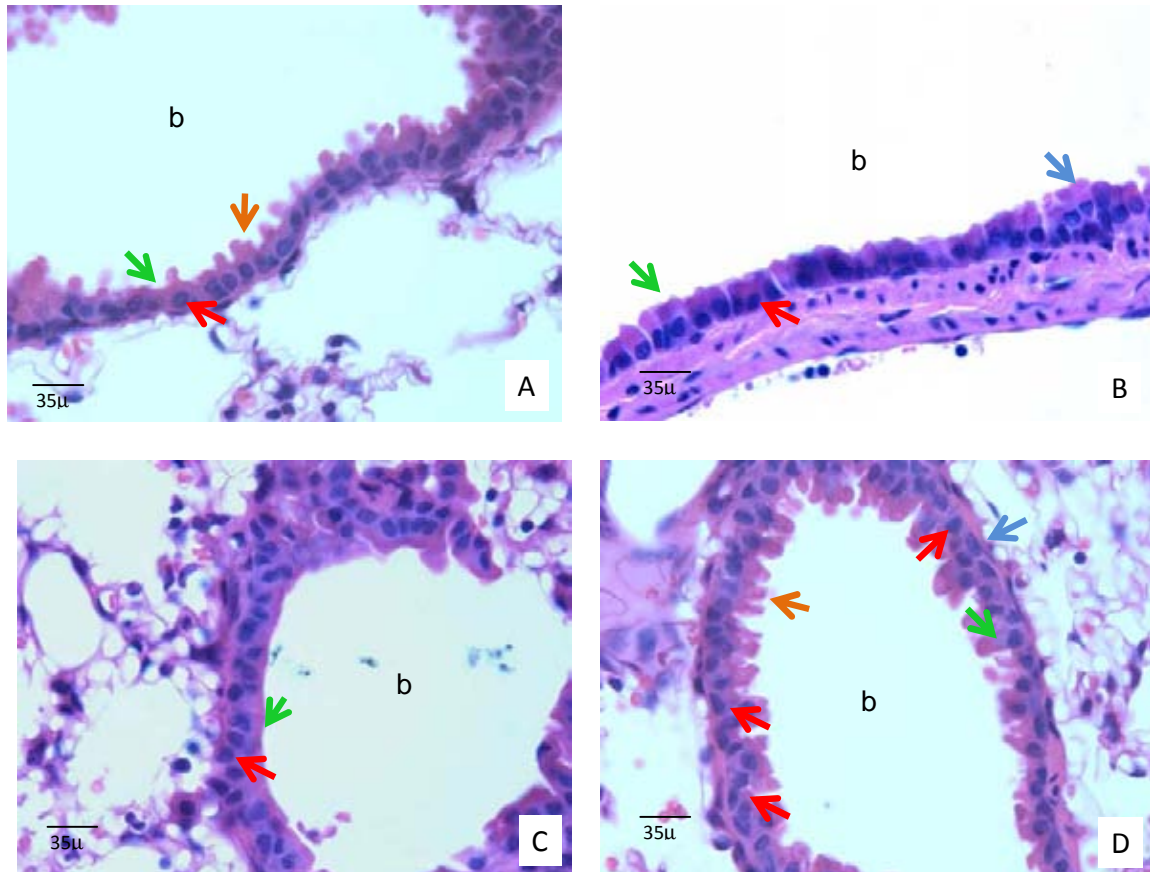


Figura 11. (A) Bronquiolo (b) de un organismo control. Se observa el epitelio cilíndrico a cubico simple. En donde se encuentra la Célula de Clara (flecha verde), con sus vesículas secretoras (flecha naranja), sus núcleos basales y esféricos (flecha roja). (B) Bronquiolo (b) de un ratón expuesto a V₂O₅ durante 4 semanas, se aprecia el epitelio, sus células de Clara han perdido su morfología característica (flecha verde) al igual que sus núcleos (flecha roja). Pareciera que existe una proliferación de células de Clara (flecha azul). No se aprecian vesículas de secreción. (C) Bronquiolo (b) de un ratón expuesto a vanadio durante 6 semanas, el epitelio pierde su morfología cilíndrica (flecha verde) y los núcleos se observan irregulares (flecha roja), además no se aprecian vesículas secretoras. (D) Bronquiolo (b) de un organismo expuesto a 12 semanas, se aprecia gran cantidad de vesículas secretoras (flechas naranja) en comparación con el control, la forma celular (flecha verde) y nuclear (flecha roja) se pierde, además parece que hay proliferación del epitelio (flecha azul).

DAÑO EN EL EPITELIO BRONQUIOLAR RATON

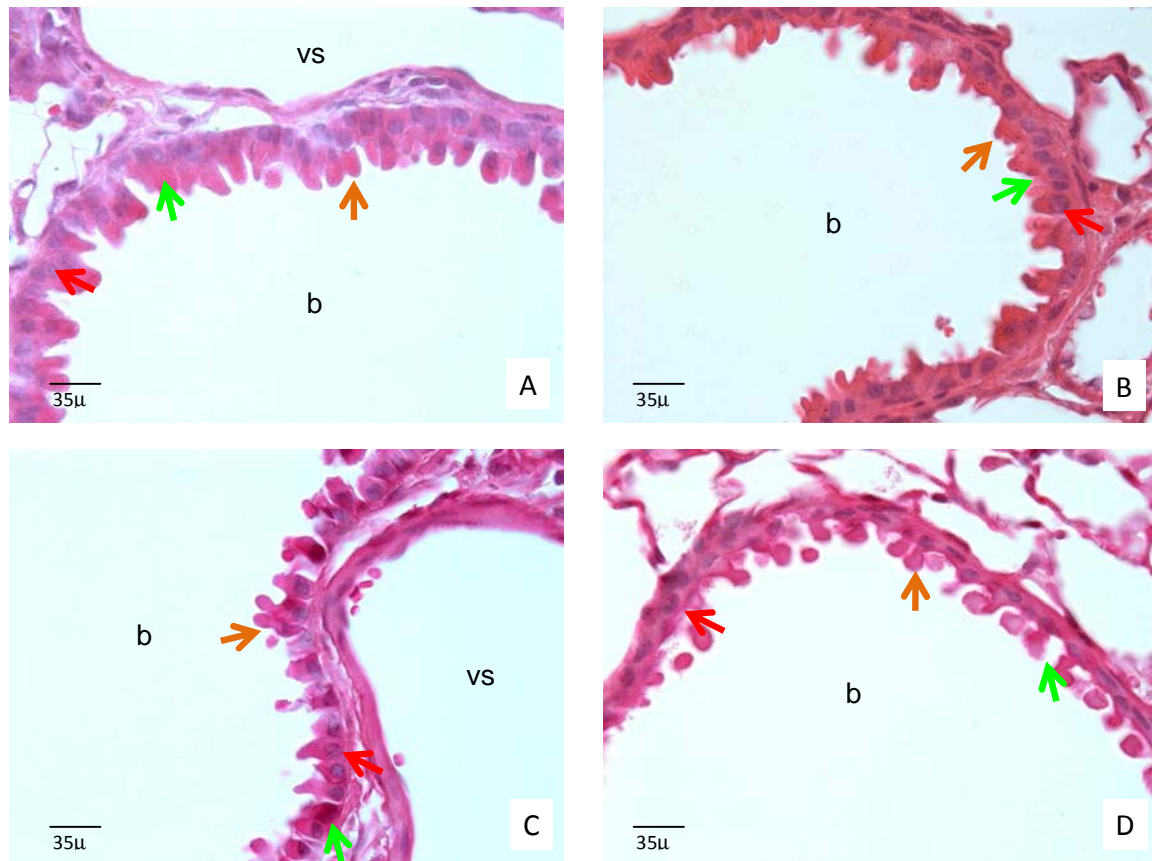


Figura 12. (A) Bronquiolo (b) de un organismo control. Se observa el epitelio cilíndrico simple. En donde se encuentra la célula de Clara (flecha verde), con sus vesículas secretoras (flecha naranja), sus núcleos basales y esféricos (flecha roja). (B) Bronquiolo (b) de un ratón expuesto a vanadio durante 4 semanas, se aprecia el epitelio, sus células de Clara han perdido su morfología característica (flecha verde) al igual que sus núcleos (flecha roja). (C) Bronquiolo (b) de un ratón expuesto a vanadio durante 6 semanas, el epitelio pierde su morfología cilíndrica (flecha verde) y los núcleos se observan irregulares (flecha roja), se observan aperturas entre el epitelio. (D) Bronquiolo (b) de un organismo expuesto a 12 semanas, se aprecia gran cantidad de vesículas secretoras (flechas naranja) en comparación con el control, la forma celular (flecha verde) y nuclear (flecha roja) se pierden, también es muy evidente la descamación de las células epiteliales.

REMODELACION DE LA CAPA DE MUSCULO LISO PERIBRONQUIOLAR EN RATA

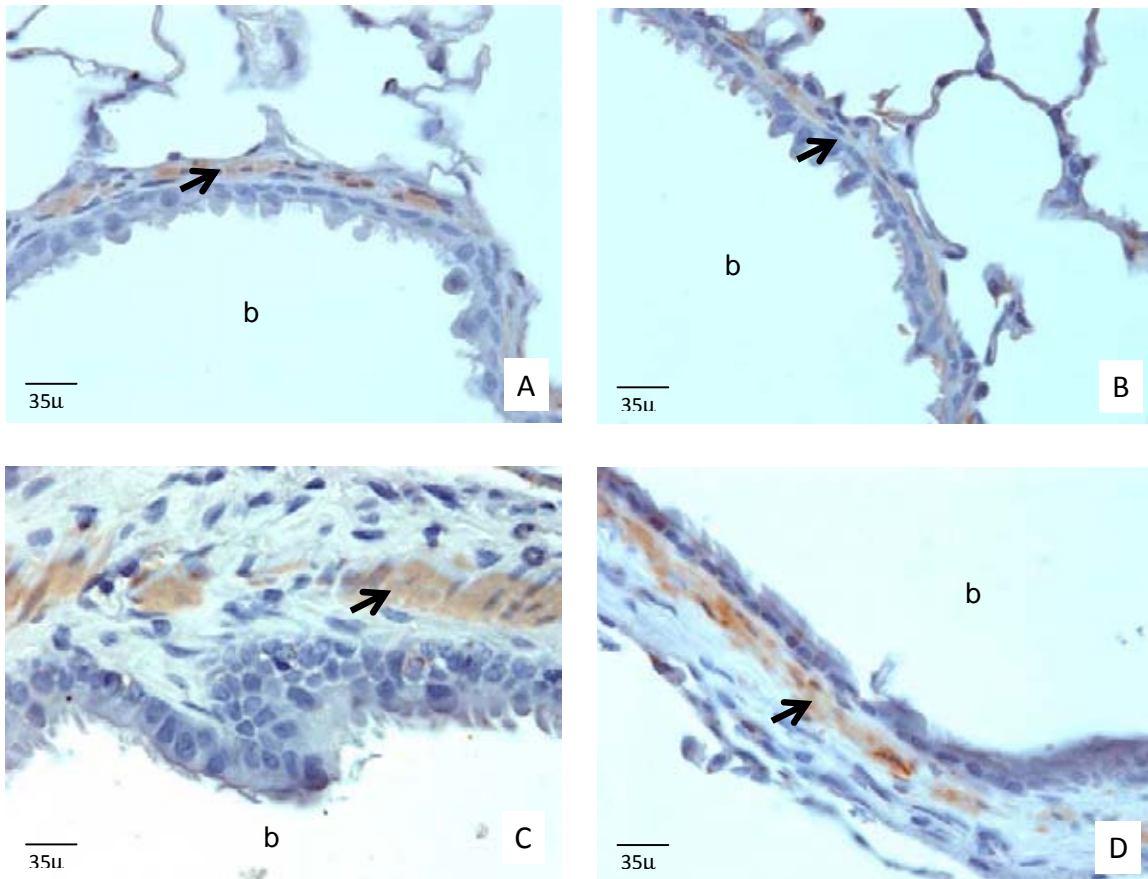


Figura 13. (A) Bronquiolo (b) de un organismo control, se aprecia la marca de la proteína α -actina (flecha negra) en el músculo liso, marcado por inmunohistoquímica (flecha negra). (B) Bronquiolo (b) de un organismo expuesto a 4 semanas, se observa la pared del músculo liso (flecha negra), el grosor de la marca es similar al organismo control. (C) Bronquiolo de un organismo expuesto a 6 semanas, se observa el aumento de la pared del músculo liso (flecha negra). (D) Bronquiolo (b), se observa el aumento de la pared del músculo liso (flecha negra) en un organismo expuesto a 12 semanas. El aumento en la pared del músculo liso es proporcional al aumento en las exposiciones.

REMODELACION DE LA CAPA DE MUSCULO LISO PERIBRONQUIOLAR EN RATÓN

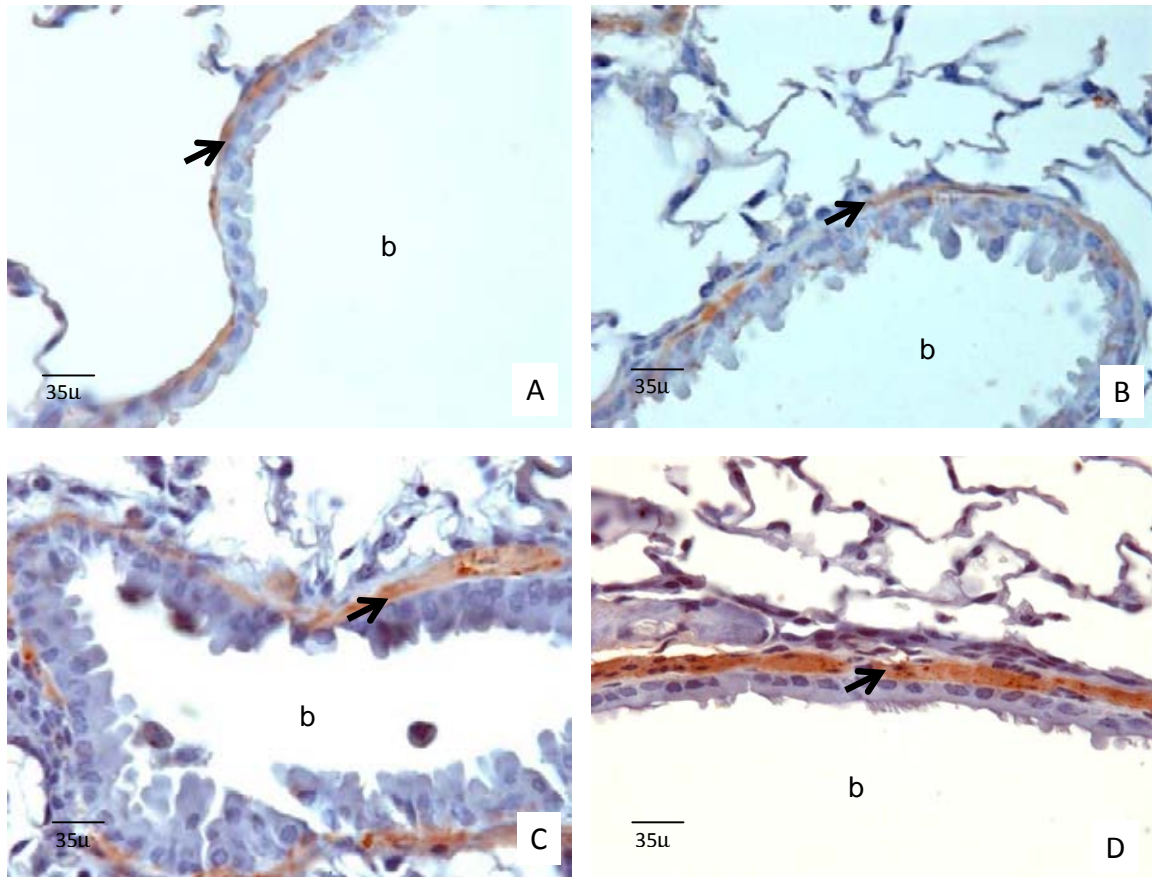


Figura 14. (A) Bronquiolo (b) de un organismo control, se aprecia la marca de la proteína α -actina (flecha negra) en el músculo liso, identificado por inmunohistoquímica (flecha negra). (B) Bronquiolo (b) de un organismo expuesto a 4 semanas, se observa la pared del músculo liso (flecha negra), el grosor de la marca es similar al organismo control. (C) Bronquiolo de un organismo expuesto a 6 semanas, se observa el aumento de la pared del músculo liso (flecha negra). (D) Bronquiolo (b), se observa el aumento de la pared del músculo liso (flecha negra) en un organismo expuesto a 12 semanas. El aumento en la pared del músculo liso es proporcional al aumento en las exposiciones.

REMODELACION DE LA CAPA DE MUSCULO LISO PERIVASCULAR EN RATA

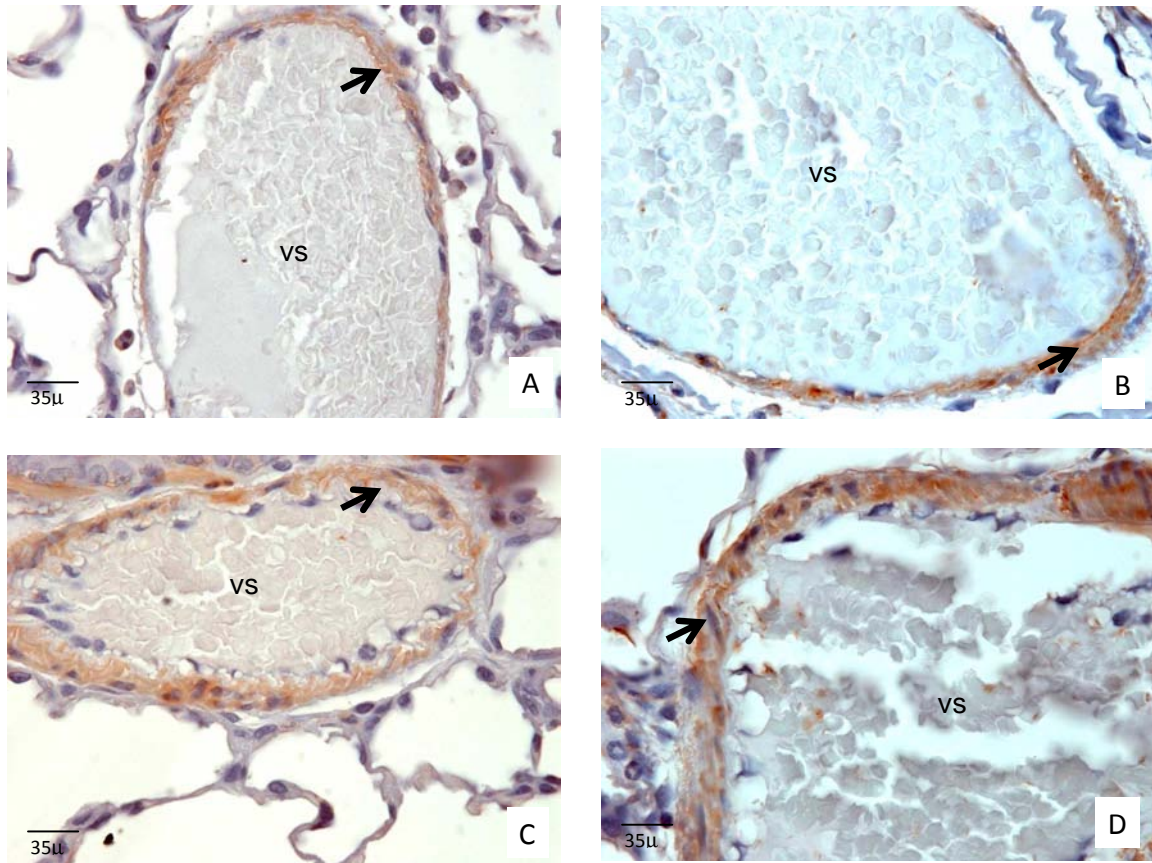


Figura 15. (A) Marca de la α -actina en músculo liso en rata de un organismo control (flecha negra), el grosor de la pared es normal. (B) Pared de músculo liso de un organismo expuesto a 4 semanas, el grosor es muy similar al de un organismo control. (C) Pared del músculo liso de un organismo expuesto a 6 semanas. Es más evidente la marca en cuanto al grosor. (D) Músculo liso de un vaso sanguíneo de un organismo expuesto a 12 semanas. El aumento de la pared del músculo liso aumenta conforme aumentan las exposiciones.

REMDELACION DE LA CAPA DE MUSCULO LISO PERIVASCULAR EN RATÓN

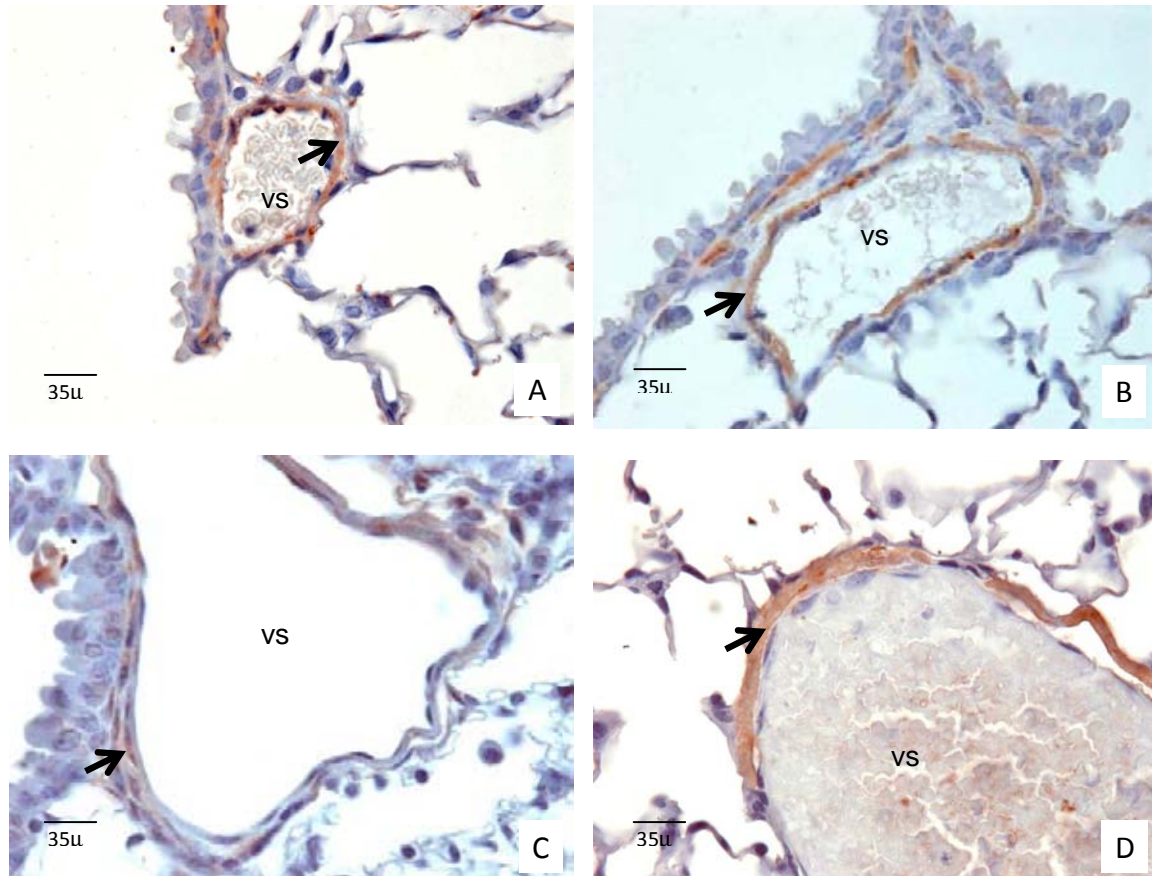


Figura 16. (A) Marca de la α -actina en músculo liso en rata de un organismo control (flecha negra), el grosor de la pared es normal. (B) Pared de musculo liso de un organismo expuesto a 4 semanas, el grosor es muy similar al de un organismo control. (C) Pared del músculo liso de un organismo expuesto a 6 semanas. Es más evidente la marca en cuanto al grosor. (D) Músculo liso de un vaso sanguíneo de un organismo expuesto a 12 semanas. El aumento de la pared del músculo liso aumenta conforme aumentan las exposiciones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

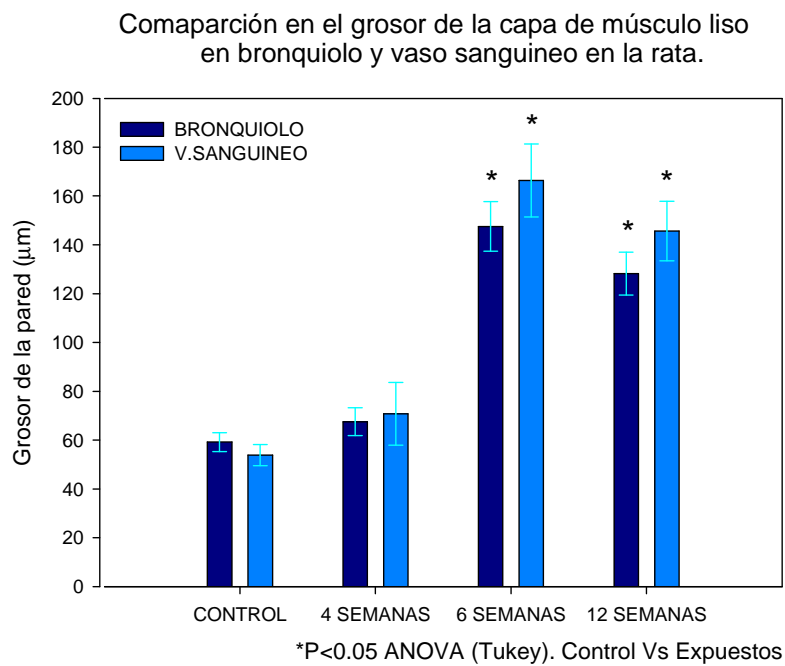


Figura 17. Cambios en el grosor de la capa de músculo liso peribronquiolar y vascular de rata. Se observa el aumento significativo en el grosor de la capa de músculo liso después de la sexta semana de exposición a pentóxido de vanadio. En la corta semana de exposición, no hay diferencias comparando con el control.

Comparación en el grosor de la capa de músculo liso en bronquiolo y vaso sanguíneo en el ratón.

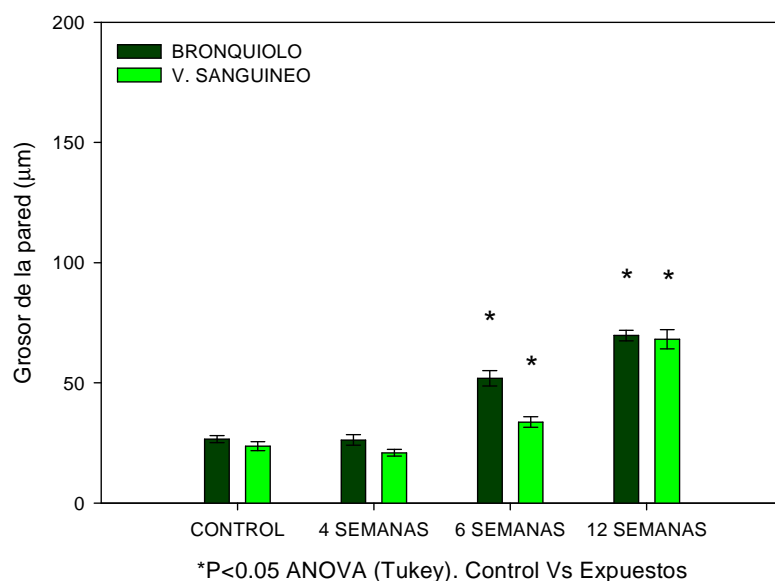


Figura 18. Se observa un incremento significativo en el grosor del musculo liso peribronquiolar y perivascular en los grupos de exposición de 6 y 12 semanas. El aumento observado en los ratones no es tan evidente como el de las ratas (figura 17). Además se aprecia otra diferencia entre la rata y el ratón, y es en el grosor de su músculo liso, en las dos estructuras evaluadas. La capa muscular es más delgada en los ratones que en las ratas.

PRESENCIA DE CITOCINAS (IL-6)

RATA

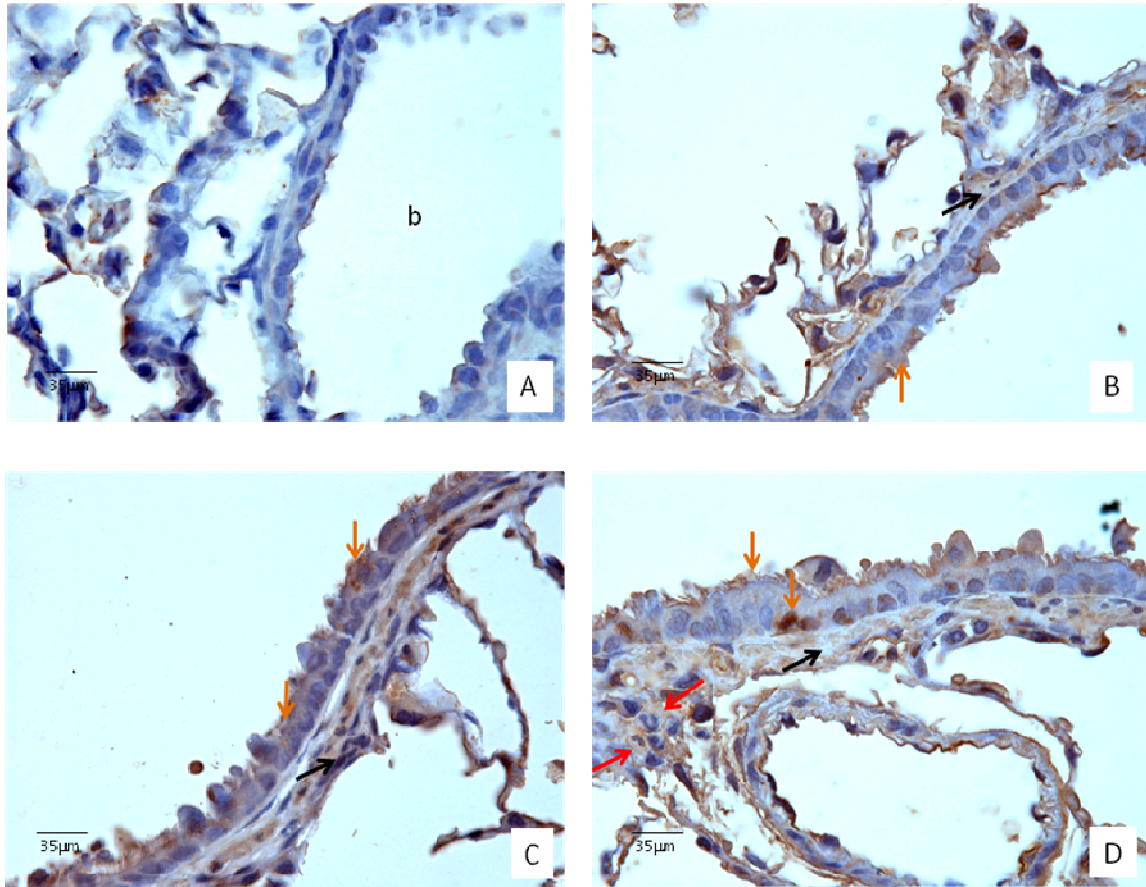


Figura 19: Inmunohistoquímica para IL-6. (A) organismo control, no se observa marca para esta citocina en este organismo. (B) organismo expuesto durante 4 semanas vanadio. La marca se aprecia en el ápice de las células bronquiolares no ciliadas (flecha naranja) y al parecer en la capa de musculo liso (flecha negra). (C) organismo expuesto a 6 semanas, la marca para IL-6 se encuentra localizada en las mismas estructuras que en el grupo anterior, musculo liso (flecha negra) y célula de Clara (flecha naranja). (D) organismo expuesto a 12 semanas de vanadio, se observa infiltrado inflamatorio, dentro de este, se aprecian linfocitos (flechas rojas), que son positivos para la marca de IL-6.

PRESENCIA DE CITOCINAS (IL-6) RATÓN

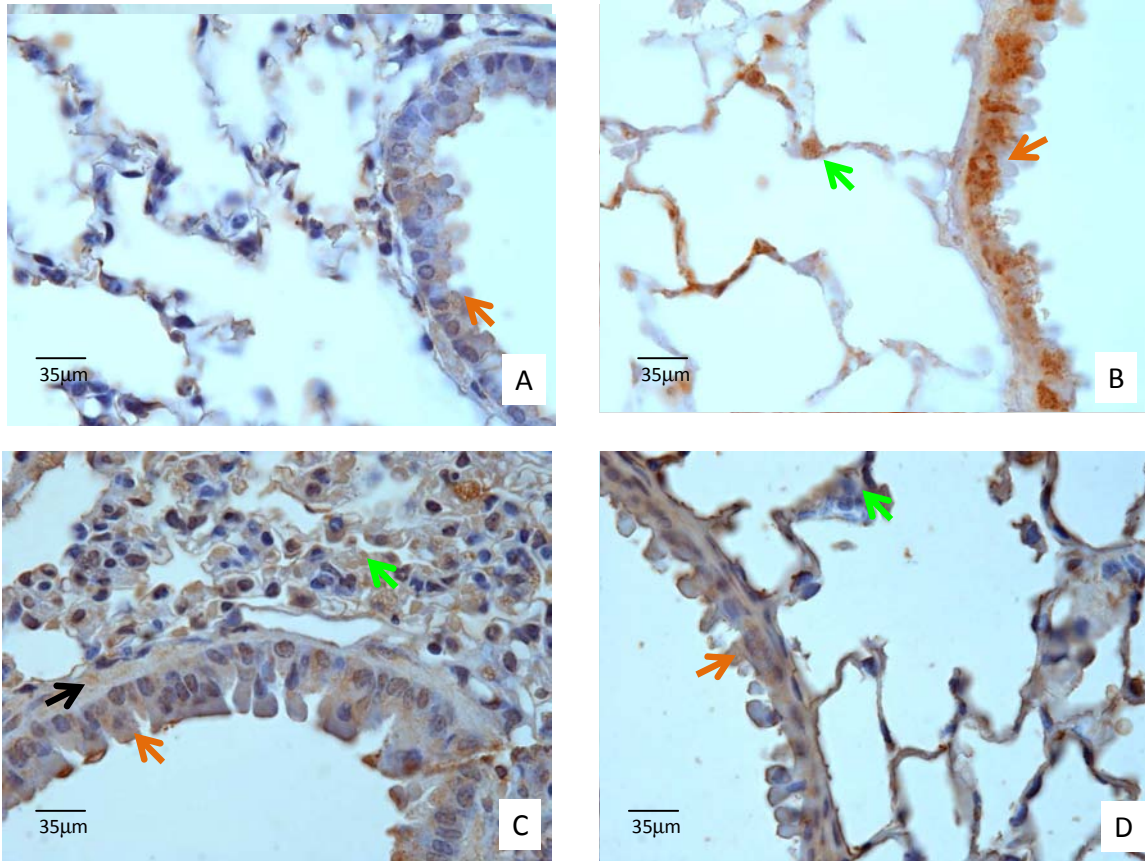


Figura 20: Inmunohistoquímica para IL-6 en ratón. (A) organismo control, la marca de la interleucina no es muy localizada en la periferia celular. (B) organismo expuesto durante 4 semanas a vanadio. La marca se aprecia en todas las células epiteliales (flecha naranja) y al parecer en algunos neumocitos (flecha verde). (C) organismo expuesto a 6 semanas, la marca para IL-6 se encuentra localizada en algunos neumocitos en los alveolos pulmonares (flecha verde), el músculo liso peri-bronquiolar (flecha negra). (D) organismo expuesto a 12 semanas de vanadio, se observa marca de IL-6 igual que en el control, en las células epiteliales (flecha naranja) y el parénquima alveolar (flecha verde).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

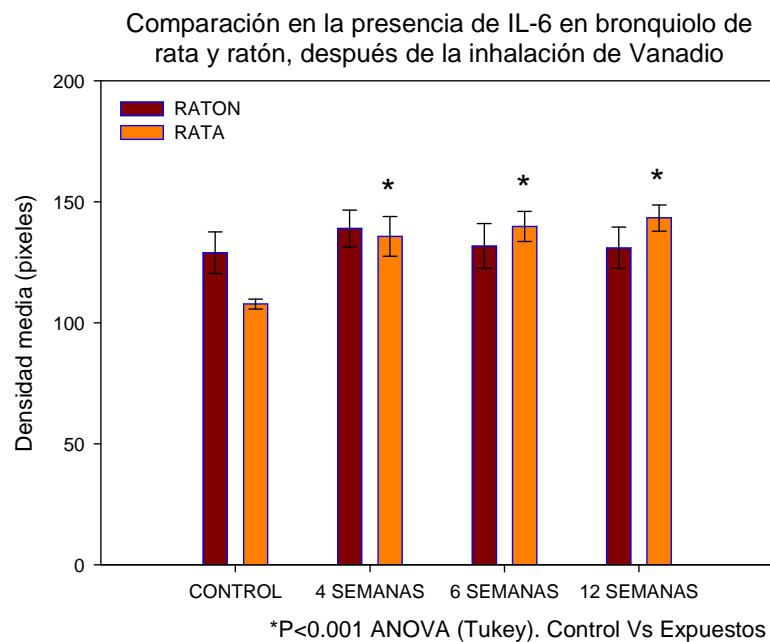


Figura 21. Se observa la diferente densidad de IL-6, en los diferentes grupos de exposición y por especie. En el ratón la presencia de la citocina sube a las 4 semanas de exposición, y baja en la semana 6 y la semana 12, este aumento no es significativo. En el caso de rata, el control muestra una densidad baja de IL-6, su nivel basal, pero a partir de la semana 4 de exposición y hasta la semana 12 aumenta considerablemente.

PRESENCIA DE CITOCINAS (TNF- α) RATA

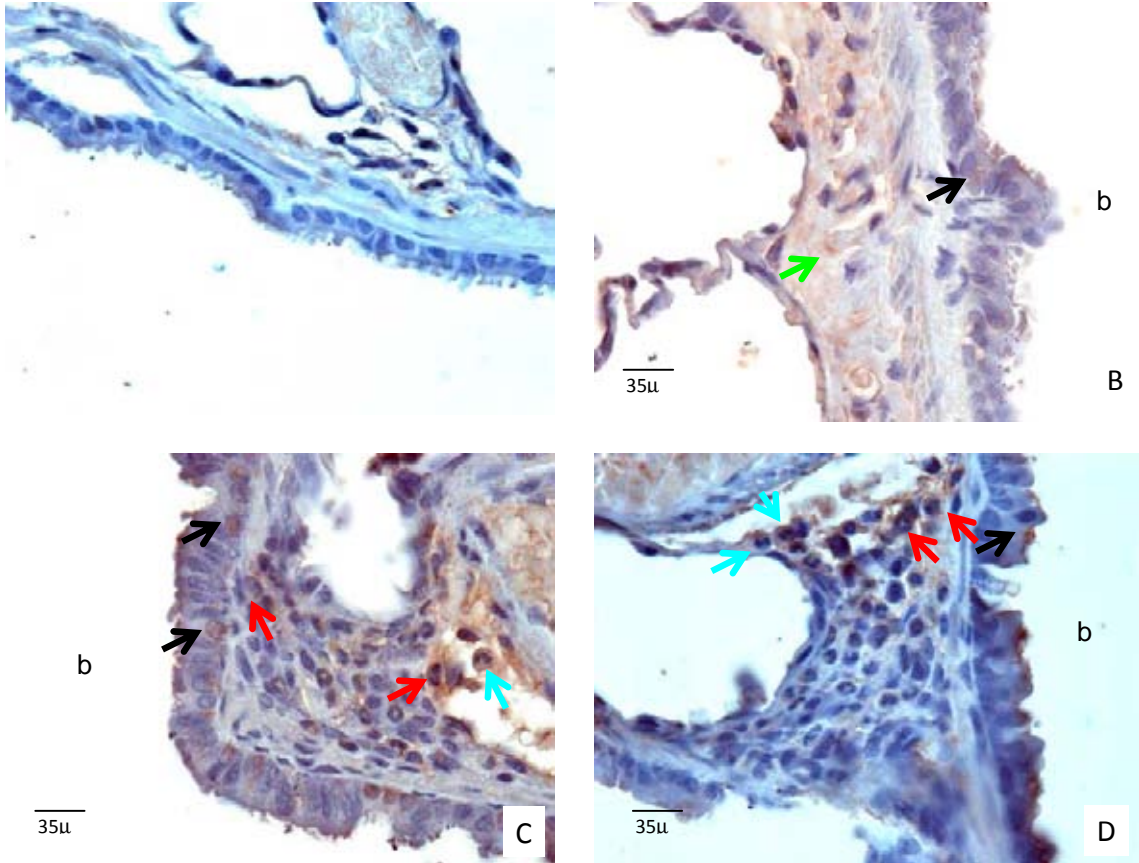


Figura 22. Inmunohistoquímica para TNF- α en rata. (A) organismo control, la marca de la citocina no es evidente. (B) organismo expuesto durante 4 semanas vanadio. La marca se aprecia en las células del epitelio bronquiolar (flecha negra) y al parecer en la capa de musculo liso y el estroma (flecha verde). (C) organismo expuesto a 6 semanas, la marca para TNF- α se localiza en neutrófilos (flecha azul) y algunos linfocitos (flecha roja). (D) organismo expuesto a 12 semanas de vanadio, se observa marca de TNF- α en el epitelio bronquiolar y en el infiltrado inflamatorio, neutrófilo y linfocitos.

**PRESENCIA DE CITOCINAS (TNF- α)
RATÓN**

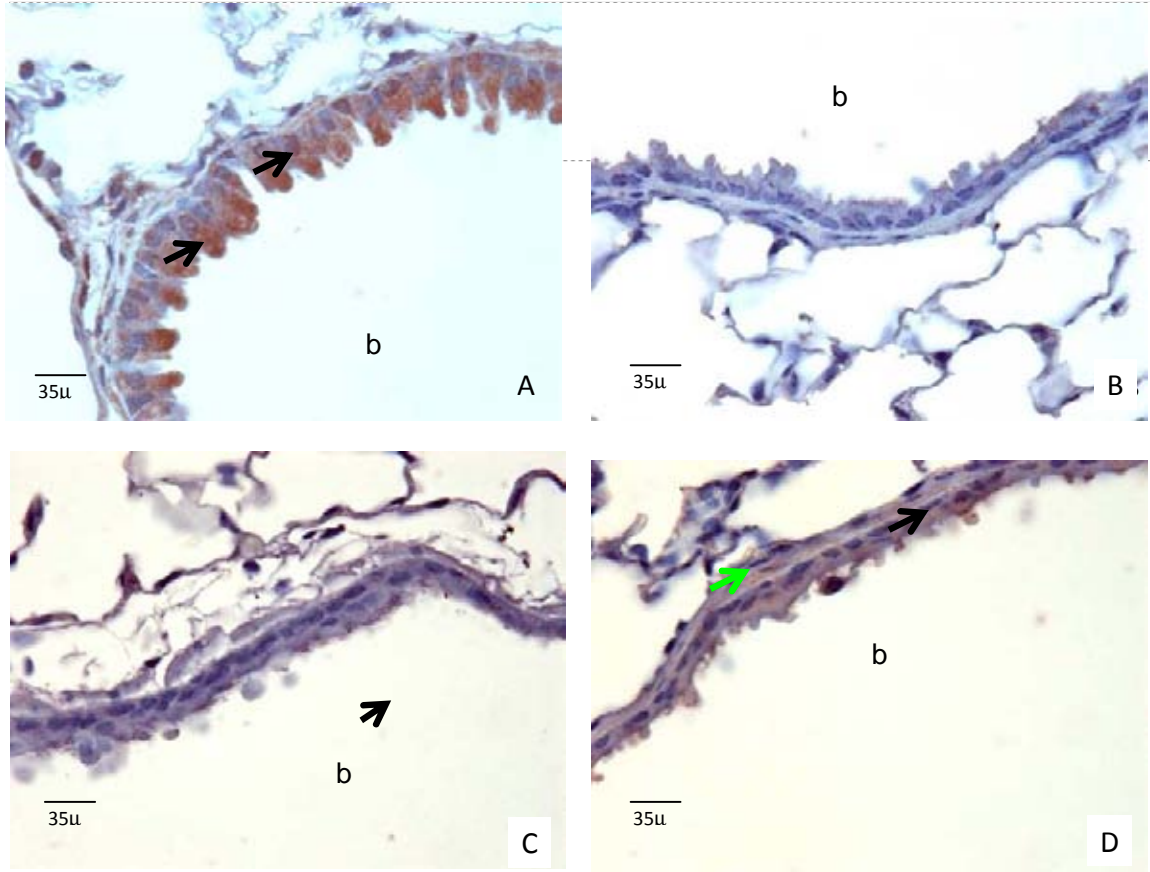


Figura 23. Inmunohistoquímica para TNF- α en ratón. (A) organismo control, la marca de la citocina es muy evidente en las células del epitelio bronquiolar. (B) organismo expuesto durante 4 semanas vanadio. No hay marca. (C) organismo expuesto a 6 semanas, No hay marca. (D) organismo expuesto a 12 semanas de vanadio, se observa marca muy tenue en el epitelio bronquiolar y en la capa de musculo liso.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

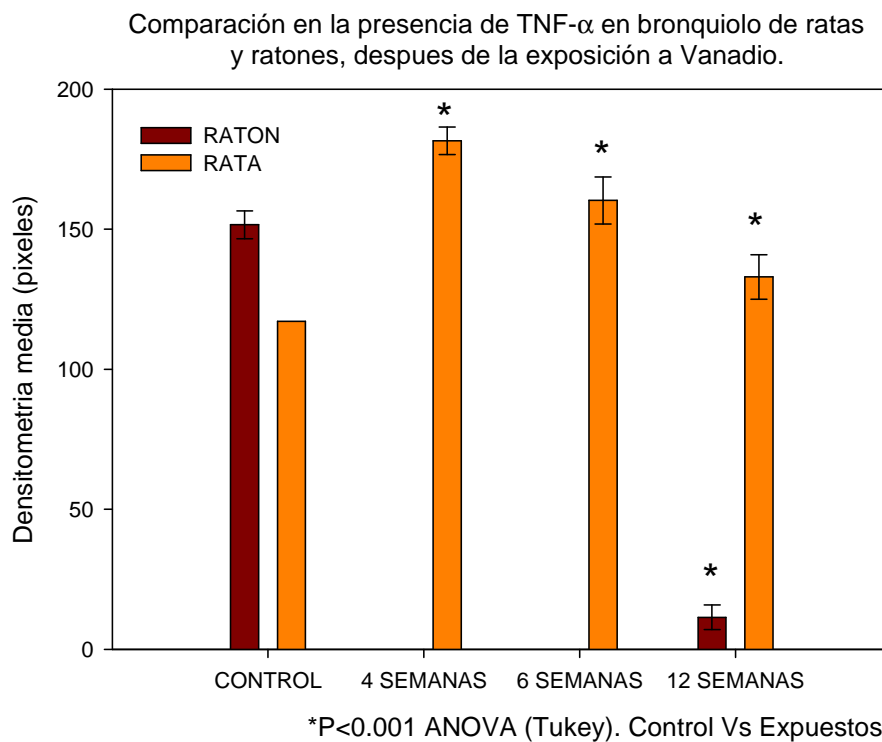


Figura 24. Se observa la diferente densidad de la marca de TNF- α , en los diferentes grupos de exposición y por especie. En el ratón la presencia de la citocina en el grupo control se encuentra muy elevada y en las 4 y 6 semanas no se observó, y aumenta un poco a las 12 semanas. En el caso de la rata, el control muestra un nivel basal, que aumenta a las 4 semanas y disminuye gradualmente a las 6 y 12 semanas de exposición. Pero es significativamente diferente los grupos tratados en comparación con el grupo control.

8. DISCUSION

Estudios epidemiológicos han demostrado la relación entre las concentraciones de las partículas aéreas, la morbimortalidad (Saldiva et al., 2002) asociadas al aparato respiratorio (Bonner, 2007).

Aparentemente, las partículas estimulan a las células del epitelio pulmonar, para incrementar la liberación de mediadores inflamatorios, que se activan por señales intracelulares, y esta activación dirige el futuro de la respuesta, con un incremento o disminución en la expresión de algunos genes que codifican para la síntesis de citocinas (Bonner, 2007).

Algunos componentes de las partículas, como el caso de los metales, están implicados en la patogénesis de la inflamación pulmonar (Soukup et al., 2000). En especial, las partículas llamadas ROFA, que son los residuos de combustibles que se liberan hacia la atmósfera, y además son la principal fuente de emisión de partículas metálicas, Entre los componentes metálicos de las partículas se encuentran el plomo y el vanadio (Koutrakis y Spengler., 1987). Dentro del daño pulmonar, la inflamación puede considerarse un mecanismo de defensa del organismo en contra de las partículas inhaladas (Saldiva et al., 2002). El daño se manifiesta una vez que éstas han interactuado con las células epiteliales (Quay et al., 1998). En nuestro modelo, se encontró infiltrado inflamatorio después del tratamiento con V_2O_5 inhalado, y que fue evidente en el grupo de las ratas. Este infiltrado produce citocinas y que se evaluaron en este experimento. Además la presencia de IL-6 y TNF- α favorece otros cambios, como la producción de otras citocinas como IL-8, con propiedades quimiotácticas (no evaluada en éste estudio) que da como resultado el aumento en la cantidad de células inflamatorias, rodeando a los bronquiolos y activando algunos mecanismos celulares como la proliferación celular.

8.1 METABOLISMO EN LA CÉLULA DE CLARA: DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES

Los cambios encontrados en la morfología del bronquiolo, la presencia de infiltrado inflamatorio y de α -actina en rata y ratón, nos sugieren que hay diferencias en la manera de responder al V_2O_5 por la vía inhalada. Estos cambios pueden relacionarse con las diferencias en la activación de las enzimas del sistema de monoxidasas en las que se encuentra el sistema de oxidasas de función mixta (CYPs) (Vasallo et al., 2004). Estudios previos, han probado que las células bronquiales tienen respuestas diferentes ligadas a las especies utilizadas. Por mencionar algunos ejemplos, estudios de Vasallo y cols. (2004) con cumarina y naftaleno, identificaron diferente efecto en la célula bronquial, dependiendo de la especie. En el caso del ratón, éstos compuestos indujeron la necrosis del epitelio, mientras que en la rata indujo proliferación. Por otro lado, las diferencias observadas en nuestros resultados entre especies se sustentan con el trabajo mencionado anteriormente, en cuanto a la aplicación de un mismo compuesto, y la capacidad de responder de diferente manera; ya que los ratones expuestos a V_2O_5 durante 12 semanas, presentaron una descamación del epitelio, semejante a la que se encontró en el trabajo de Vasallo et al (2004). Mientras que en las ratas presentaron hiperplasia del epitelio bronquial, después de la exposición a V_2O_5 , este cambio no se observó en el ratón.

Uno de los mecanismos propuestos para explicar las diferencias entre especies se le atribuye a las vías metabólicas empleadas, y mediadas por la acción de las oxidasas de función mixta, que se expresan de manera diferente de acuerdo con la especie y con el sitio anatómico estudiado. Este sistema enzimático se encarga del metabolismo de los agentes xenobióticos, y como ya se mencionó, se encuentra en gran cantidad en la célula bronquial no ciliada (Gartner, 2007).

El pulmón de los mamíferos es un lugar metabólicamente muy importante, ya que llegan a él muchos contaminantes suspendidos en las partículas y que

ingresan al sistema respiratorio. Varios de estos compuestos son bioactivados a través del citocromo P450 (CYP). Para realizar esta bioactivación necesita de la oxidación (hidroxilación) y requiere del citocromo P450, adenina-nicotinamida dinucleótido fosfatasa (NADPH) y NADPH citocromo reductasa, que es la vía más común en el mecanismo de detoxificación, y que es utilizado por muchos fármacos y xenobióticos (Castell et al., 2005; Poh-Gek et al., 2006).

La mayoría de los CYPs producen enantiómeros (isómeros especulares), tal es el caso de el naftaleno, compuesto usado como aromatizante. Específicamente las isoenzimas CYP2B y CYP2F2, los cuales metabolizan el nafteleno y producen el enantiómero naftaleno epóxido. Por ejemplo la CYP2F2 produce el 1R, 2S-oxido, mientras que el CYP2B produce el 1R, 2R-oxido (Voit et al., 1997), Otro estudio revela que el p-xileno, es un inhibidor de la CYP2F2.

En contraste, ninguno de estos dos enantiómeros causa alteraciones en los pulmones de la rata, esto sugiere un único mecanismo de acción en el ratón y el cual esta afectando la estructura pulmonar de estos animales, (Vasallo et al., 2004).

Este resultado evidencia que no todas las especies contienen el mismo sistema de isoenzimas en la célula de Clara.

Otro estudio, en el cual utilizaron ratones hembras, muestra que algunos compuestos son mas tóxicos cuando son bioactivos que cuando entran al organismo. Se adicionó el compuesto 4-ipomenol, simultáneamente se agrego otro compuesto llamado p-xileno, el cual tiene como resultado la inhibición de la enzima CYP4B1. La inhibición tiene como consecuencia la prevención del daño pulmonar producido por este compuesto, aumentando la dosis letal del 4-ipomenol de 18mg/Kg a 160mg/Kg, en los ratones expuestos a este tratamiento (Voit et al., 1997). Esto sugiere que las especies tienen diferencias en sus CYP, lo

cual puede bioactivar o no las diferentes sustancias y mostrar diferentes daños de acuerdo a la especie.

Además la CYP2F2 se expresa en humanos y en su placenta (Gamer et al., 2004). La rata y el hámster presentan poca expresión de este citocromo, y no muestran signos de toxicidad con altas dosis de xenobióticos (Voit et al., 1997; Gamer et al., 2004) En las células de Clara de ratón se encuentran las siguientes proteínas: CC10, CYP2B, CYP2F2, las cuales son responsables del metabolismo de algunos fármacos y xenobióticos.

Por otro lado Poh-Gek et al., (2006) realizaron un experimento, en el cual expuso a ratas, ratones y monos por vía parenteral a naftaleno. En la prueba realizada para Northern Blot se notó mayor intensidad en la expresión del RNAm para la CYP2F en el pulmón de ratón comparado con la rata. Esta última, expresa de 4 a 8 veces menos esta CYP.

Un estudio realizado por inmunohistoquímica localizó la CYP2A3 en el epitelio respiratorio y nasal de la rata (Thornton-Manning et al., 1997). En comparación, CYP2G1, que se encuentra exclusivamente en el epitelio olfatorio de ratón (Hua et al., 1997) y de rata (Zupko et al., 1991; Poh-Gek et al., 2006).

Poh-Gek et al (2006) realizaron el siguiente experimento. Utilizando la técnica “*Peptide mass fingerprinting*”, hecho en cornetes superiores e inferiores, descubrieron las diferencias entre las isoenzimas que se encuentran en el epitelio de la cavidad nasal, en tres modelos de animales usados anteriormente y los resultados se muestran en la tabla siguiente (Tabla 2).

ESPECIE	Cornete	CYP (isoenzima)
RATA	SUPERIOR	CYP2A3

		CYP2G1
	INFERIOR	CYP2F4
		CYP2A3
RATON	SUPERIOR	CYP2A5
		CYP2G1
	INFERIOR	CYP2A5
		CYP2F2
MACACO	SUPERIOR	CYP2A13
		CYP2A6
		CYP2J2
		CYP2F1
	INFERIOR	CYP2A13

Tabla 2. Diferencias en la localización de las isoenzimas CYP por estructura y especie. Esto sugiere diferencias entre la localización de las diferentes CYP, el cual puede bioactivar a diferentes xenobióticos.

8.2 ACTIVACION DE CITOCINAS POR EL VANADIO Y ROS

Se ha observado que las células epiteliales de la vía aérea humana expuestas a partículas producen IL-6, IL-8 y TNF- α . Estas citocinas están implicadas en patologías respiratorias tales como: neumoconiosis y silicosis (Vanhee et al., 1995; Carter et al., 1997; Quay et al., 1998). En el caso de la exposición a partículas suspendidas hay reportes que mencionan que la expresión de IL-6 en células epiteliales expuestas a estas partículas ricas en vanadio, está incrementada, esto debido a la activación de NF-kB, la cual se encuentra mediada por la generación de ROS, derivado de los metales de transición (Samet et al., 1999). IL-6 es multifuncional, pero principalmente se encarga de participar en la inflamación, en el aumento de la permeabilidad vascular y en la proliferación celular (Yoshida y Tuder, 2007).

Estas partículas tienen adheridos a su superficie diversos metales, tales como: Hierro, Níquel, Vanadio y Cobre, que producen radicales libres en el interior de la célula, a través de la vía del citocromo p450. Esta producción podría provocar daño pulmonar (Pritchard et al., 1996; Dreher et al., 1997) que se manifiesta como inflamación aguda, necrosis del epitelio nasal, cambios morfológicos del epitelio como hiperplasia, y carcinomas (Calderón-Garcidueñas et al., 1998). En nuestro caso, la exposición a V_2O_5 mostró cambios significativos en el epitelio bronquiolar, tanto en la rata como en el ratón y que se acompañaron de aumento en la presencia de IL-6, solo en la rata. Es posible suponer, que los cambios que encontramos se relacionen con la producción de especies reactivas de oxígeno generadas por la exposición a V_2O_5 , y la capacidad para activar a las citocinas, como IL-6 y TNF- α .

Por otro lado se sabe que las especies reactivas activan a receptores de tirosina cinasa (RTK) (Bonner, 2007), además el vanadio es capaz de generar peróxido de hidrogeno y formar peroxovanadato, este ultimo es estructuralmente similar a la molécula de fosfato y actúa como un potente inhibidor irreversible (Ingram et al., 2003) de la proteína tirosina de fosfatasa (PTP) (Samet et al., 1997; Samet et al., 1999) y el resultado lleva a una prolongada actividad de las MAP cinasas, lo que lleva a estrés celular (Ingram et al., 2003).

En nuestro estudio notamos que la marca para IL-6 y, se incrementaban de acuerdo con el tiempo de exposición, solo en las ratas. Además de encontrarse de manera específica en el epitelio bronquiolar y músculo liso, en ambas especies, además en el infiltrado inflamatorio, que solo mostró la rata. Para TNF- α , que de igual manera que la IL-6, solo la mostró la rata. Suponemos que este incremento se dio como consecuencia de NF- κ B o Ras, ambos por la fosforilación de los receptores de Tirosina cinasa (RTK) mediante los radicales formados por el vanadio. Esto dirige a un cambio en la expresión de los genes, promoviendo la producción de las citocinas necesarias para que ocurra inflamación. La activación de diferentes MAPK, ERK, JNK y P38 en el epitelio bronquial humano expuesto a

metales tiene como resultado el crecimiento, la proliferación, la apoptosis y la modulación en la expresión de proteínas (Kiakis y Avruch, 1996).

8.3 CAMBIO EN LA CAPA MUSCULAR DEL BRONQUIOLO

El daño epitelial, resultado de la exposición a vanadio, dirige a un aumento en los factores de crecimiento; proliferativos y fibrogénicos, tales como la secreción de algunas citocinas como IL-6 y TNF- α , además de factores de transcripción. Este daño puede aumentar la permeabilidad del epitelio y favorecer el paso de los factores que activan a miofibroblastos en la capa subepitelial, lo que puede llevar a la proliferación de las células en esta capa (Hershenson et al., 2008).

Una manera de identificar este aumento en la cantidad de células es a través de la proteína contráctil α -actina, la cual está regulada de manera postranscripcional (Hershenson et al., 2008). Este dato sugiere que los mecanismos de aumento de células del músculo liso, observado en nuestro modelo, se encuentran relacionados con la proliferación de los miocitos en la capa muscular. Esto es congruente con patologías obstructivas, como es el caso de pacientes con asma. (Hershenson et al., 2008).

Woodruff's et al (2004), demostró que el aumento del músculo liso lleva a una broncoconstricción, que tiene como resultado la obstrucción de la vía aérea como consecuencia de la exposición de ésta a partículas suspendidas, tales como: aerosoles, metales, vapores y humos (Hershenson et al., 2008). Otro mecanismo que favorece la obstrucción de la vía aérea, es la inhibición de la apoptosis, de esta manera persisten la gran cantidad de células del músculo liso, lo que provoca el engrosamiento de esta capa y como resultado el cierre de la vía (Guharoy et al., 2001).

La identificación de la proteína contráctil (α -actina), indica la proliferación de músculo liso en la capa muscular de los bronquiolos y vasos sanguíneos. Aunque este cambio no es tan evidente en el ratón, en la rata, la marca para esta proteína es más notoria, y se manifiesta con un mayor grosor de la capa muscular comparada con el ratón. Esto confirma las diferencias entre especies y en especial en la respuesta del miocito, que al parecer, podría estar siendo activado de diferente manera, dependiendo de la especie estudiada.

Los cambios que observamos, son compatibles con lo que se ha identificado como remodelación. La remodelación es el cambio en la morfología del epitelio, como hiperplasia, además, está acompañada de un cambio en la capa de músculo liso, como proliferación de miocitos, este último evento incrementa la proteína contráctil α -actina (Hershenson et al., 2008). Esta remodelación es consistente con los cambios encontrados en la rata después del tratamiento con V_2O_5 . Esto sugiere que la rata es más sensible a este compuesto, más que el ratón.

8.4 CAMBIO EN LA CAPA MUSCULAR DE VASOS SANGUÍNEOS

Dentro de los cambios observados, fue notable la modificación en el grosor de las paredes de las venas pulmonares, tanto en el ratón como en la rata, siendo más evidente en la rata. Este cambio se asocia a lo que observamos en el músculo liso del bronquiolo y nos sugiere un efecto específico del vanadio en la capa muscular, como se reportó en las arteriolas aferentes del ratón en riñón, como consecuencia de la exposición a vanadio inhalado utilizando este mismo modelo (Ávila-Casado, et al., 2007).

El músculo liso juega un papel importante en la regulación de la luz de los bronquiolos y vasos sanguíneos en los pulmones. Un aumento gradual en músculo liso, jugaría un papel importante en el desarrollo de hipertensión arterial pulmonar, que puede ser independiente de la patología respiratoria adyacente.

Las MAP cinasas (Ras, Raf-1 y MEK), son necesarias para la activación de ERK, este último dirige la proliferación de miocitos en el tracto respiratorio. Las MAP cinasas constan de tres familias de serina-treonina cinasas citoplasmáticas, que participan en la transferencia de factores de crecimiento dentro del núcleo. ERK, es un activador corriente arriba de la transcripción del promotor de la ciclina D1, y su función es activar la proliferación celular. La proteína ERK se encuentra elevada en lavados de pacientes con asma, (Hershenson MB et al., 2008), y Samet et al., (1998), reportan que el V_2O_5 activa a ERK $\frac{1}{2}$, lo que soporta nuestra hipótesis.

La respuesta de constricción de la vía aérea, aumenta proporcionalmente con el aumento en la respuesta a calcio, TNF- α e IL- β , estas proteínas incrementan la expresión de CD38 en músculo liso (Deshpande et al., 2004), esta proteína de superficie celular cataliza la síntesis de ADP-ribosa, la cual incrementa los niveles de calcio intracelular, a través de la activación de los receptores, los cuales estimulan a las proteínas G. Otro probable mecanismo podría ser a través de Rho cinasa, que es un potente contractor de músculo liso, esto bajo la respuesta de fosforilación y la inhibición de la unión de las subunidades de miosina fosfatasa, las cuales están hidrolizadas (Hershenson et al., 2008).

En el caso de los miofibroblastos y de las células del músculo liso, podrían estar activados o inducidos a través de TGF- α y ocasionar la remodelación de la capa del músculo liso peribronquiolar (Bonner et al., 2000). También los linfocitos Th2, pueden inducir la remodelación en la pared de la vía aérea (Zhu et al., 1999; Zheng et al., 2001), mediante la secreción de citocinas. Además podrían estar implicadas algunas citocinas tal como, IL-6, la cual permite que persista la inflamación y subsecuentemente llevar a cambios fibróticos en el pulmón (Saito et al., 2008). En la rata, las células que observamos en el infiltrado pulmonar, como neutrófilos y macrófagos (Visscher et al., 2006), liberan citocinas como IL-6 y TNF- α . Además el factor NF-kB, el cual activa a las subunidades p50 y p65, estos a su

vez interactúan con la estructura de DNA para aumentar la transcripción de genes para la síntesis de citocinas proinflamatorias tales como IL-8, IL-6 y TNF- α (Berry M et al., 2007), que es parte de lo que observamos en nuestro modelo.

Quizás este mecanismo esta siendo activado en la rata, ya que en ésta persiste la gran cantidad de infiltrado inflamatorio. Este hecho no se aprecia en el ratón, ya que sus niveles de TNF- α no son tan elevados como en los resultados observados en la rata.

8.5 VÍA DE REMODELACION POR LA INHALCION DE VANADIO, EN EL MODELO DE RATA Y RATON.

A continuación resumimos en dos figuras, las posibles vías por las que tanto el epitelio bronquiolar y el músculo liso se transforman, después de la exposición a vanadio. Estos cambios indican que el vanadio, puede actuar directamente en estas estructuras ocasionando patologías semejantes al EPOC y a la hipertensión arterial pulmonar,

RATAS

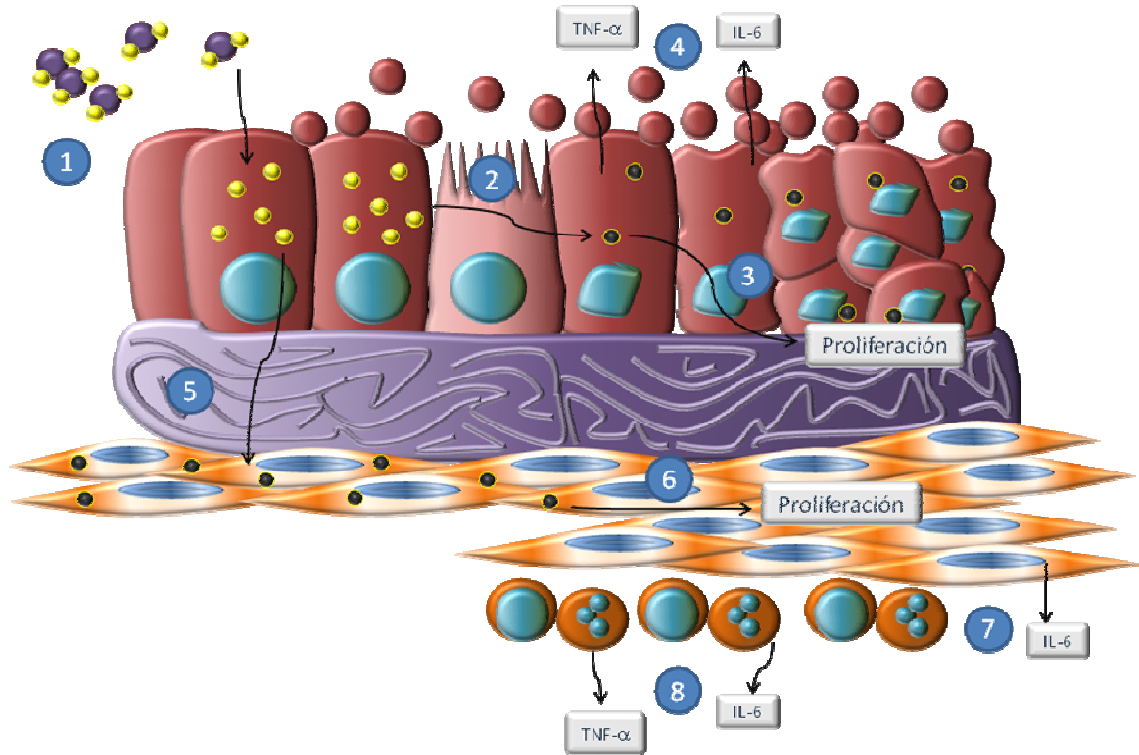


Figura 24. Probable mecanismo que explica la inducción de la proliferación en músculo liso y daño bronquiolar en rata como consecuencia de la inhalación a V_2O_5 . Al principio llega el vanadio hasta los bronquiolos, entra en la célula de Clara, mediante canales. Dentro de la célula de Clara se metaboliza mediante el sistema de enzimas del citocromo p450. Este paso genera la formación de radicales libres en el interior que podrían activar a factores de transcripción vía receptores (RTK), que a su vez podrían fosforilar a Ras o NF-kB. Por otro lado, también podría activar la síntesis o liberación de $TNF-\alpha$, además puede activar a este último factor. Ambas vías, tanto Ras o NF-kB activan a otras proteínas como las MAP cinasas y el resultado es la proliferación de las células. En el caso del epitelio, el resultado es la hiperplasia en esta capa del bronquiolo y en el músculo lleva a proliferación. Además la gran cantidad de infiltrado inflamatorio aumenta las citocinas en la rata, las cuales estarían siendo secretadas por las células epiteliales, el músculo liso y el infiltrado inflamatorio. Los altos niveles de $TNF-\alpha$, mantienen el infiltrado inflamatorio, además de algunas citocinas como el caso de la IL-6.

RATONES

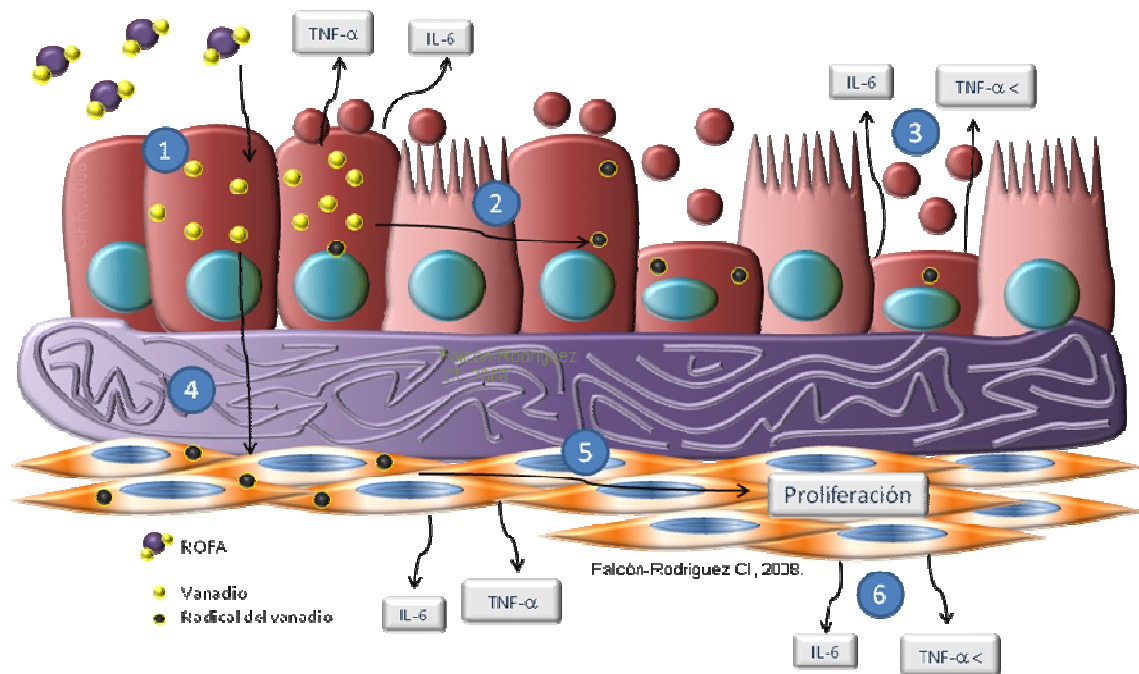


Figura 25. En el caso del ratón, el V_2O_5 entra de la misma manera que en la rata, solo que sugerimos que existe una gran diferencia en la capacidad de responder al mismo compuesto, lo que podría generar diferentes metabolitos. La cantidad de radicales quizás no es tan grande, por lo que no es capaz de activar algunas vías que podrían presentarse en la rata. Lo similar entre estas dos especies, es el aumento en la marca de α -actina, que indica proliferación en la capa muscular peribronquiolar y perivascular. El cambio mencionado anteriormente es fue más evidente en la rata (figura 24). Además de no observarse infiltrado inflamatorio. Por otro lado las citocinas marcadas en este trabajo, sólo fueron evidentes en músculo liso, después del tratamiento con V_2O_5 .

9. CONCLUSIONES

- El vanadio tiene efectos diferentes de acuerdo con la especie estudiada.
- La presencia IL-6 y TNF- α , por el contacto con el V₂O₅, es similar a la observada, en otros procesos inflamatorios pulmonares.
- La exposición a V₂O₅ causa la remodelación de los bronquiolos, misma alteración que se observa en pacientes con asma crónica y bronquitis.
- El vanadio induce proliferación del musculo liso dado que incrementó la presencia de α -actina.
- Esta proliferación en el musculo liso es de gran importancia ya que es parte de la fisiopatología en la EPOC y en la hipertensión pulmonar secundaria a los problemas relacionados con contaminación atmosférica por metales y partículas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aarden LA., De Groot ER., Schaap OL and Lansdorp PM. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol.* 17:1411-6. 1987.
- Akira S., Taga T and Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 54:1-78. 1993.
- Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr MolMed.* 5:333-9. 2005.
- Avila-Casado MC., Soto-Abraham V., Lopez-Krauletz S and Fortoul TI. The kidney and vanadium effects. Chap 7. In: *Vanadium its impact on health.* Eds. Fortoul TI and Avila-Costa MR. Nova Science Publishers. 2007.
- Barceloux DG. Vanadium. *Clinical toxicology* 37:265-278. 1999.
- Barnes Peter J., Mechanisms in COPD. differences from asthma. *Chest* 117:10s-14s. 2000.
- Baumann H., Jahreis GP., Sauder DN and Koj A. Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute 142 phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. *J Biol Chem.* 259:7331-42. 1984.
- Berry M., Brightling C., Pavordl and Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Epub.* 3:279-82. 2007.
- Bonner James., Annette B Rice., Cindy R Moomaw and Daniel L Morgan. Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am J Physiol lung cell mol physiol.* 278:209-226. 2000.
- Bonner James. Lung fibrotic response to particles exposure. *Toxicologic pathology.* 35:148-153. 2007.
- Bousquest J., Chanez P., Lacoste JY., Barneon G., Ghavanian N., Enander I., Venge P., Ahlsted S., Simony-Lafontaine J., Godard P. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med.* 323:1033-1039.1990.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann Rev Biochem.* 58:79-110. 1989.
- Calderón-Garciadueñas L., Rodríguez-Alcaraz A., Villareal-Calderón A., Lyght O., Janszen D and Morgans T Kevin. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicological science.* 46:352-364. 1998.

- Castell JV., Teresa Donato M., Gomez-Lechon María José. Metabolism and biactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and toxicologic pathology*. 57:189-204. 2005.
- Carter JD., Ghio JM., Samet JM., Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to air pollution particles is metal-dependent. *Toxicol appl pharmacol*. 46:180-188. 1997.
- Charles F., Thomas Jr., Andrew H. Limper. Phosphatidylinositol kinase regulation of airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir. Cell Mol Biol*. 23:429-430. 2000.
- Churg Andrew., Brauer M., Ávila-Casado Maria del Carmen., Fortoul Teresa I and Wrigth Joanne. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ health perspect*. 111:714-718. 2003.
- Corbel C and Melchers F. The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. *Immunol Rev*. 78:51-74. 1984.
- Crans DC., Smee JJ and Gaidamauskas E and Yang LQ. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev*. 104:849-902. 2004.
- Deshpande DA., Dogan S., Walseth TF., Miller SM and Amrani Y. Modulation of calcium signaling by interleukin-13 in human airway smooth muscle: role of CD38/cyclic adenosine diphosphate ribose pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 31:36-42. 2004.
- Dill JA., Kyeonghee ML., Mellinger KH., Bates DJ., Burka LT and Roycroft JH. Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicological science*. 77:6-18. 2004.
- Ding M., Gannett PM., Rojanasakul Y., Liu KJ and Shi XL., One-electron reduction of vanadate by ascorbate and related free radical generation at physiological pH. *J Inorg Biochem*. 55:101-112. 1994.
- Dreher KL., Jaskot RH., Lehman JR., Richards JH. And McGee JK. Soluble transition metal mediated residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health*. 50:285-305. 1997.
- Eynott R Paul., Niko paavolainen., Groneberg D., Alistair N., Salmon M., Puneeta N., Sum-Yee L and Chung Fan K. Role of nitric oxide in chronic allergen-induced airway cell proliferation and inflammation. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, JPET 304:22-29. 2003.

Falcón-Rodríguez CI., Piñón-Zarate G., Ordóñez-Librado JL., Rodríguez-Mata V., Reyes-Ruiz J., Fortoul TI. Cambios bronquiolares como consecuencia de la inhalación de vanadio modelo en rata. VI Congreso Nacional de toxicología. Facultad de Química. UNAM. 2006.

Falcón-Rodríguez CI., López-Valdez N., Fortoul TI. Cambios intra-pulmonares inducidos por la inhalación de vanadio. III Congreso mesoamericano de Ecotoxicología y química ambiental. Facultad de ciencias. UNAM. 2008.

Fortoul TI., Saldivar Liliana O., Espejel-Maya G., Bizarro Patricia., Mussali-Galante P., Ávila-Casado MC., Colin-Barenque L and Ávila-Costa MR. Inhalation of cadmium, lead or its mixture effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. *Environ toxicol and pharmacology*. 19:329-334. 2005.

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

Fortoul TI., Salgado CR., Moncada SG., Sánchez IG., López IE., Espejel MG., Calderon NL., Saldivar L. Ultrastructural Findings in the murine nonciliated bronchiolar cell (NCBC) after subacute inhalation of lead acetate. *Acta vet. Brno*. 68:51-55. 1999.

Fortoul TI., Mendoza ML., Ávila MC., Quan TA., Saldivar OL., Espejel MG., Navarro-Villanueva., Ávila-Costa MR., Colin-Barenque P., Bizarro P., Olaiz FG. Vanadium in ambient air. Concentration in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960 and 1990. Autopsies from the sixties and the nineties. *Arch environ health* 57:446-449. 2002.

Gamer AO., Leibold K., Deckardt., Kittel B., Kaufmann W, Tennekes HA and van Ravenzwaay B. The effects of styrene on lung cells in female mice and rats. *Food and chemical toxicological*. 42:1655-1667. 2004.

Garnert P, Leslie y Hiatt L James. *Texto atlas de histología*. ed 3. Ed. Mc Graw Hill. México. 2007.

Gavett J., Madison SL., Dreher KL., Winsett DW., McGee and Costa DL. Metal and sulfate composition of residual oil fly ash determines airway hyperreactivity and lung injury in rats. *Environ Res*. 72:162-172. 1997.

Geneser Finn., *Histología, sobre bases moleculares*. ed 3. Ed. Medica panamericana. Buenos Aires, Argentina 2006.

- Gram E Theodore. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *The American Society for Pharma and Experimental Therap.* 49:297-342. 1997.
- Guharoy Sujata and Sem H Phan. Lung repair, remodeling and fibrosis. Chapter 14. In: *Molecular biology of acute lung injury*. Edited by Wong Hector R., Shanley Thomas P. Kluwer academic publishers. 2001.
- Hamid Q., Springall DR., Riveros-Moreno V., Chanez P., Howarth P., Redington A., Bousquest J., Gordard P., Holgate S and Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet.* 342:1510-1514. 1992.
- Hamid Q., Azzawi M., Ying s., Moqbel R., Wardlaw AJ., Corrigan CJ., Bradley B., Durham SR., Collins JV., Jeffery PK., Quint DJ., Kay AB. Expression of RNAm for interleukin-5 in mucosal bronchial bioopsies from asthma. *J clin invest.* 87:1541-1546. 1991.
- Hartwig A and Schwerdtle A. Interactions by carcinogenic metalcompounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett.* 127:47-54. 2002.
- Hershenson MB., Brown M., Camoretti-Mercado B. and Solway Julian. Airway smooth muscle in asthma. *Annu. Rev Pathol Mech Dis.* 8:523-555. 2008.
- Hirano T., Yasukawa K., Harada H., Taga T., Watanabe Y., Matsuda T., Kashiwamura S., Nakajima K., Koyama K and A. Iwamatsu. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 324:73-6. 1986.
- Hua Z, Zhang QY, Su T, Lipinkas TW, and Ding X.cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of mouse CYP2G1, an olfactory-specific steroid hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 340:208-214. 1997.
- IARC., *Monographics on evaluation of carcinogenic risk to human.* Vol. 86. Cobalt inhard metal and cobalts sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. Lyon france. 2006.
- Ingram JL., Rice AB., Santos J., Van Houten B and Bonner JC. Vanadium-induced HB-EGF expression in human lung fibroblasts is oxidant dependent and requires MAP kinases. *Am J Physiol.* 284:774-82. 2003.
- Inoue M., Sato EF., Nishikawa M., Park AM., Kira Y., Imada I and Utsumi K., Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.* 10:2495-2505. 2003.
- Kindt GC., Weiland JE., Davis WB., Gadek JE. And Dorinsky PM. Bronchiolitis in adults: A reversible cause of airway obstruction associated with airway neutrophilis and neutrophil products. *Am rev respir dis.* 140:483-492. 1989.

Klaassen D Curtis., Casarett and Doull's Toxicology the basic science of poison. Ciudad, McGraw Hill international. 2001.

Koutrakis P and Spengler JD. Source apportionment of ambient particles in Steubenville, Ohio, using specific rotation factor analysis. Atmos Environ 21:1511-1519. 1987.

Kun-Il Kim., Chang Won Kim., Min Ki Lee., Kyung Soo Lee., Choong-Ki Park., Seok Jim., Jong Gi Kim. Imaging of occupational lung disease. Radiographics. 21:1371-1391. 2001.

Kyriakis J and Avruch J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. Bioessays 18:567-577. 1996.

Leonard SS., Harris GK and Shi XL. Metal-induced oxidative stress and signal transduction, Free Rad Biol Med. 37:1921-1942. 2004.

Lewis

Liu J., Lei D., Waalkes MP., Beliles RP., Morgan DL. Genomics analysis of the rat lung following elemental mercury vapor exposure. Toxicol sci. 74:174-181. 2003.

Manahan Stanley E. Toxicological chemistry and biochemistry. ed 3., Ed. CRC press LLC. United State of America. 2003.

Mussali-Galante P and Fotoul TI. Atmospheric Pollution. Chapter 5. In: Environmental research progress. Edited by Florian P. Maes. Nova science publishers Inc. 2008.

Moyes DC y Schulte PM., Principios de fisiología animal. ed.1., Ed., Pearson education. Madrid, España 2007.

Panettieri Reynold A. Cellular and molecular mechanism regulating airway smooth muscle proliferation and cell adhesion molecule expression. Am respir crit care med 158:133-140. 1998.

Plunkett ER. Handbook of industrial toxicology. New York: Chemical publishing Co. 1987.

Poh-Gek Forkert, Brandie Millen, Lawrence H. Lash, David A. Putt, and Burhan I. Ghanayem. Pulmonary bronchiolar cytotoxicity and formation of dichloroacetyl lysine protein adducts in mice treated with trichloroethylene. JPET 316:520-529, 2006.

- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F and Chiarpotto E., Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem.* 11:1163–1182. 2004.
- Pritchard RJ., Ghio AJ., Lehmann JR., Winsett, DW., Tepper JS., Park P., Gilmour MI., Dreher KL and Costa DL. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentration of associated metals. *Inhal. Toxicol.* 8:457–477. 1996.
- Quay Jacqueline L., Reed William,, Samet James and Devlin Robert B. Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kB Activation. *Am. J Respir Cell Mol Biol.* 19:98–106, 1998.
- Ross M., Kaye G., Paulina W. *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular.* ed. 4., Ed. Medica panamericana. Buenos Aires, Argentina 2005.
- Saito Fumitake, Tasaka Sadatomo, Ken-ichiro Inoue, Miyamoto Keisuke, Nakano Yasushi, Ogawa Yuko, Yamada Wakako, Shiraishi Yoshiki, Hasegawa Naoki., Fujishima Seitaro, Takano Hirohisa and Ishizaka Akitoshi. Role of Interleukin-6 in Bleomycin-Induced Lung Inflammatory Changes in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38:566–571. 2008.
- Saldiva Paulo NH., Robert W Clarke., Brent A Coull., Rebecca C Stearns., Joy Lawrence., G G Krishna Murthy., Edgar Diaz., Petros Koutrakis., Helen Suh., Akira Tsuda and John J. Godleski. Lung inflammation Induced by concentrated ambient air particles related to particle composition. *Am J Respir Crit Care* 165:1610–1617. 2002.
- Samet JM., Graves LM., Quay J., Dailey LA., Devlin RB., Ghio AJ., Wu Weidong., Bromberg PA., Reed W. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cell exposed to metal. *Am J Physiol.* 275:551-558. 1998.
- Samet James M., Robert Silbajoris., Weidong Wu and Lee M Graves. Tyrosine phosphatases as targets in metal-induced signaling in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:357–364. 1999.
- Shanley P Thomas., Wong R., Signal transduction pathways in acute lung injury NF-k β and AP-1. Chapter 1 in: *Molecular biology of acute lung injury.* Edited by Wong Hector R., Shanley Thomas P. Kluwer academic publishers. 2001.
- Soukup JM., Ghio AJ and Becker S. Soluble components of Utah valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro. *Inhal Toxicol* 12:401–414. 2000.
- Spengler J And Wilson R. Emissions, dispersion and concentration of particles. Chap 3. In: *Particles in our air: Concentration and health effects.* Eds Wilson R and Spengler J. Boston, Harvard university press. 1996.

- Thornton-Manning JR, Nikula KJ, Hotchkiss JA, Avila KJ, Rohrbacher KD, Ding X, and Dahl AR. Nasal cytochrome P450 2A: identification, regional localization and metabolic activity toward hexamethylphosphoramide, a known nasal carcinogen. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142:22–30. 1997.
- Tortora G. y Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología*, ed 11., Ed. Medica panamericana. México. 2007.
- Vanhee DP., Gosset A., Boitelle B., Wallaert and Tonnel AB. Cytokines and cytokine network in silicosis and coal worker's pneumoconiosis. *Eur. Respir. J.* 8:834–842. 1995.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ and Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266:37–56. 2004.
- Valko M., Morris H and Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12:1161–1208. 2005.
- Vassallo Jeffrey D., Sarah M Hicks., Stephanie L Born., George P Daston. Roles for epoxidation and detoxification of coumarin in determining species differences in Clara cell toxicity. *Toxicological sciences.* 82:26–33. 2004.
- Visscher Daniel W and Myers Jeffrey. Bronchiolitis. *The proceedings of the american thoracic society.* 3:41-47. 2006.
- Voit Fanucchi Michelle., Murphy E Mary., Buckpitt R Alan., Philpot M Richard and Plopper G Charles. Pulmonary cytochrome P450 monooxygenase and Clara cell differentiation in mice. *Am. J Respir Cell Mol Biol.* 17:302–314, 1997.
- Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M., Shulman L., Soreq H., Nir U., Wallach D and Perricaudet M., Tiollais P and Revel M. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7152-6. 1980.
- Woodruff PG., Dolganov GM., Ferrando RE., Donnelly S and Hays SR. Hyperplasia of smooth muscle in mild to moderate asthma without changes in cell size or gene expression. *Am J Respir Crit Care Med.* 169:1001–6. 2004.
- Yoshida Toshinori and Tuder Rubin M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol rev.* 87:1047-1082. 2007.
- Zenz C. *Occupational medicine.* Mosby St Louis, MO. 1994

Zhang Z., Huang CS., Li JX., Leonard SS., Lanciotti R, Butterworth L and Shi XL., Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 392:311–320. 2001.

Zheng T., Zhu Z., Wang J., Homer RJ and Elias JA. IL-11 insights in asthma from overexpression transgenic modeling. *J Allergy Clin Immunol.* 108:489-496. 2001.

Zhu Z., Homer RJ., Wang Z.,Chen Q., Geba GP., Wang J.,Zhang Y and Elias JA. Pulmonary expression of the interleukina-13 cause inflammation., mucus hypersecretion, subepitelial fibrosis, physiologic abnormalities and exotoxin production. *J Clin Invest.* 103:779-788. 1999.

Zupko K, Poria Y, and Lancet D. Immunolocalization of cytochromes P 450olf1 and P-450olf2 in rat olfactory mucosa. *Eur J Biochem* 196:51–58. 1991.