



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS EN PULMÓN COMO
CONSECUENCIA DE LA INHALACIÓN DE CLORURO DE
MANGANESO O ACETATO DE MANGANESO.
MODELO RATÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

NAYELY ABIGAIL TREJO FERNÁNDEZ

TUTORA:

DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES



2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Trejo

Fernández

Nayely Abigail

56537552

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

300219528

2. Datos del tutor

Dra.

Teresa Imelda

Fortoul

van der Goes

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Abel

Santamaría

del Ángel

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Julio César

Carrero

Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Laura

Colín

Barenque

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Paul

Carrillo

Mora

7. Datos del trabajo escrito.

Diferencias morfológicas en pulmón como consecuencia de la inhalación de Cloruro de Manganeso o Acetato de Manganeso, en un modelo murino.

55 p

2012.

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales:

Dra. Teresa Fortoul van der Goes.
Dr. Abel Santamaría del Ángel.
Dr. Julio César Carrero Sánchez.
Dra. Laura Colín Barenque.
Dr. Paul Carrillo Mora.

A todos aquellos que con su colaboración permitieron que se realizara este trabajo:

Por su apoyo en la parte técnica:

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata
Técnica Académica Judith Reyes Ruíz

Al personal del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM

Jefe de la Unidad de Bioterio: Dr. Enrique Pinzón Estrada.

Y colaboradores:

Dr. Víctor Manuel Salgado Alfaro.
Dr. Ismael Torres Saldaña.

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por los conocimientos que aprendí en las aulas de la Facultad de Ciencias.

Este proyecto fue parcialmente apoyado por PAPIIT, UNAM IN200606.

Agradecimientos

Son muchas las personas que me han acompañado a lo largo de este camino, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos. Sin importar donde estén sé que llegarán estas palabras.

A Diana Trejo.

Aunque ya no te veo eres el motor de todos mis días, eres el porqué de mis logros y agradezco que me hayas permitido formar parte de tí.

A mis papas que día con día me han enseñado con amor y mucha paciencia lo que implica tener metas, logros y no rendirse jamás, no tengo más que agradecer a la vida por tenerlos.

Alejandra y Xare que me han apoyado, cuidado y han estado al pendiente de mí, son un claro ejemplo de hermandad, no las cambiaría por nada.

A mis abuelitos, tíos y primos que sin importar en donde este siempre están ahí incondicionalmente, no saben lo que ha significado su apoyo en esos días tan difíciles, no se imaginan la alegría que han provocado en mí con una visita, no había encontrado la forma de agradecerse los.

A la Dra. Fortuol por su comprensión, dedicación y apoyo a lo largo de este proyecto, además de ser una excelente tutora es un grandioso ser humano. Gracias.

A mis amigos (Diana, Leonel, Eri, Darí y Hugo) que llevan el legado de en las buenas y en las malas. Siempre bajo las condiciones que sean tienen una palabra de aliento, son los mejores.

A Nelly y Carlos que más que compañeros de laboratorio se convirtieron en un ejemplo de vida no tienen idea de lo mucho que los aprecio como amigos y cuanto les agradezco toda la dedicación que han puesto en mí.

A tí mi pequeña alma gemela que sin tí no hay nada, no existen palabras que describan todo lo que ha significado tu compañía a lo largo de mi vida y de este proceso. Lo hicimos.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Contaminación atmosférica y sus efectos.....	3
2.2. Partículas suspendidas.	4
2.3. Características químicas del Manganeseo.	7
2.4 Usos del Manganeseo	8
2.5 Vías de exposición.	9
2.6 Absorción y transporte del Manganeseo.....	9
2.7 Efectos en la salud provocados por manganeseo	12
2.8 Estados de oxidación del Manganeseo	13
2.9 Trabajos realizados con Manganeseo.....	14
2.10 Efectos respiratorios del manganeseo	15
2.11. Citocinas. IL-6.	16
2.12 Óxido nítrico. Nitrotirosina	17
2.13 Sistema Respiratorio	18
2.13.1 Bronquios	19
2.13.2 Bronquiolos	20
2.13.3 Alvéolos	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1 Objetivos particulares.	23
6. MATERIAL Y MÉTODO	24
6.1 Material biológico	24

6.2 Obtención de la muestra.....	24
6.3 Inmunohistoquímica.	25
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Resultados MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃ tinción HE	27
7.2 Resultados MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃ tinción MASSON	29
7.3 Densidad media de tejido conectivo.....	31
7.4 Resultados MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃ Inmunohistoquímica IL-6.....	33
7.5 Densidad media IL-6.....	35
7.6. Resultados MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃ Inmunohistoquímica Nitrotirosina.....	38
7.7 Densidad media nitrotirosina.....	40
8. DISCUSION.....	43
8.1 Contaminación y daños a la salud.....	43
8.2 El manganeso como contaminante atmosférico.	44
8.3 Manganeso y sistema respiratorio en nuestro modelo.	44
8.4 Los cambios inflamatorios en el modelo.....	46
8.5 El estrés oxidante y nitrosante como causa del daño.....	46
9. CONCLUSIONES.....	49
10. BIBLIOGRAFIA	50

1. RESUMEN

La contaminación atmosférica por partículas que contienen metales como el manganeso representa un riesgo elevado para la salud afectando a millones de personas en todo el mundo. Este problema se ha asociado al aumento de diversas enfermedades respiratorias, entre ellas el asma y cáncer pulmonar. Se considera que la concentración del manganeso se incrementó en el ambiente ya que estudios en el tejido pulmonar de casos de autopsia, realizados en la Ciudad de México, demostraron lo anterior.

En el ambiente el manganeso (Mn) esta adherido a partículas, las cuales son agentes contaminantes del aire que al ser inhaladas pueden ocasionar problemas respiratorios (Conde, 2007) a nivel de bronquiolos y alveolos pulmonares. Los bronquiolos pulmonares están conformados por epitelio cilíndrico simple el cual está compuesto por células bronquiolares no ciliadas o células de Clara y ciliadas. Presentan tejido conectivo fibroelástico y están rodeados por capas de células de músculo liso.

La toxicidad de los distintos compuestos de manganeso parece depender del tipo de ion Mn y de su estado de oxidación. Se ha encontrado que Mn^{3+} (ej. acetato de manganeso) es más potente produciendo estrés oxidante que Mn^{2+} (ej. cloruro de manganeso), y que este último necesita de la presencia de Mn^{3+} para poder oxidarse existiendo una sinergia entre los dos estados de oxidación, el análisis de la inflamación es una de las respuestas comunes debido a la inhalación de partículas, y el estrés oxidante asociado puede ser identificado por la nitrotirosina. En este trabajo se compararan las diferencias histológicas en pulmón, producidas por la exposición vía aérea al Mn en diferentes estados de oxidación, incluyendo dos marcadores inmuohistoquímicos IL-6 y nitrotirosina, el primero como indicador de inflamación y el segundo de estrés nitrosante.

Para este trabajo se utilizaron ratones CD1 expuestos a cloruro de manganeso 0.02 M y acetato de manganeso 0.01 M, 1 hr/2/semana por 2, 4, 6 y 8 semanas. Un grupo de animales tratados por 8 semanas se suspendió la exposición y se observaron los cambios al mes y 2 meses. Se sacrificaron, perfundieron por vía intra-traqueal y se fijaron los pulmones con paraformaldehído al 4% y se extrajeron. Se obtuvieron los cortes histológicos para las tinciones HE y Masson, los cuales se analizaron con microscopía fotónica. Por otra parte se realizó una técnica inmuohistoquímica para identificar los marcadores IL-6 y nitrotirosina utilizando el software Image-Pro V 6.0.

Los resultados muestran que la inhalación de ambos compuestos produjo modificaciones en el epitelio respiratorio especialmente en el bronquiolo terminal, en el que se identificó la presencia de edema bronquiolar.

Además, se observó edema vascular y alveolar así como la aparición de macrófagos, descamación epitelial, infiltrado inflamatorio y aumento del tejido conectivo. Al comparar los compuestos se observó que el daño se presentó con mayor severidad y de forma más temprana en acetato de manganeso al compararlo con cloruro de manganeso. En los animales que se suspendió la exposición y se dejaron 1 mes y 2 meses, el daño fue más severo ya que el infiltrado inflamatorio en bronquiolos terminales se incrementó notablemente (bronquiolitis) en el caso de ambos compuestos.

En caso de los marcadores evaluados por inmunohistoquímica se detectó que la marca de IL-6 y nitrotirosina es notablemente más intensa en animales expuestos a acetato de manganeso. Cabe resaltar que la marca de nitrotirosina se expresa con mayor intensidad, lo que sugiere que además de existir inflamación debido a la inhalación de ambos compuestos, también se está produciendo estrés nitrosante.

Los datos sugieren que la inhalación de estos compuestos produce alteraciones morfológicas, más evidentes en el caso del acetato de manganeso.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Contaminación atmosférica y sus efectos.

La contaminación atmosférica se define como la presencia de agentes en el aire en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afectando estructuras, materiales y ocasionar cambios en las condiciones climáticas. A lo largo de su presencia en el planeta, el ser humano ha propiciado el deterioro del ambiente por la contaminación atmosférica. Las actividades que producen emisión de contaminantes atmosféricos incluyen desde el uso de fogatas y la combustión de madera hasta la industrialización y urbanización de las grandes ciudades (Vallejo, *et al*, 2003).

La contaminación atmosférica se puede clasificar de acuerdo con su origen en natural y antropogénica. Las fuentes naturales pueden provenir de fenómenos de origen natural como volcanes, terremotos, cambios climáticos etc. Las fuentes antropogénicas son aquellas que son producidas o transmitidas por el hombre en su continua actividad como son: industrias que emiten desechos sólidos, emisiones al aire, de óxido de nitrógeno y de azufre, el monóxido de carbón, etc.

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia (química o biológica) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales, por ejemplo el humo, los polvos, los gases, las cenizas, las bacterias, los residuos y los desperdicios. Además de los contaminantes atmosféricos, los del ambiente, incluyen también a todo aquello que altere sus características naturales como el calor, la radiactividad y el ruido. Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios están en la atmósfera tal y como fueron generados por procesos naturales o por actividades del ser humano, son por ejemplo el monóxido de carbono (CO) y el bióxido de azufre. Los contaminantes secundarios son los que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen contaminantes primarios, por ejemplo el ozono (O₃) y los sulfatos (Riveros-Rosas H. *et al.*, 1997).

La contaminación atmosférica representa un riesgo para la salud humana, ésta afecta a millones de personas de todo el mundo, especialmente a aquellas que viven en los grandes núcleos urbanos y en áreas fuertemente industrializadas, por lo que en los últimos años la exposición a contaminantes atmosféricos ha generado una creciente preocupación, ya que estudios desarrollados durante la última década muestran una clara asociación entre la exposición de la población y el aumento en indicadores de morbilidad y mortalidad. Se menciona que en los países industrializados un 20% de la

incidencia total de enfermedades puede atribuirse a factores ambientales (Smith, 1999).

Se sabe que los adultos respiran 20 000 veces al día y que esto equivale a 10 000 litros de aire que circulan a través de los pulmones; sin embargo, gran parte de este aire va acompañado de contaminantes, por lo que es importante recalcar que la contaminación atmosférica es un problema importante de salud pública, tanto en términos del número de personas afectadas, así como en enfermedades asociadas a ella (Annual Report The Lung Association, 2009; Brain, 1977).

A su vez se ha demostrado que la contaminación tiene una asociación con enfermedades respiratorias, entre ellas el asma y otras alergias. Estas patologías han aumentado durante las últimas décadas en aquellas ciudades en las que se han reportado elevados índices de contaminantes atmosféricos. Los agentes implicados son los óxidos de nitrógeno, azufre, partículas de suspensión, ozono, metales e hidrocarburos (Dockery *et al.*, 1993; Pope *et al.*, 1995; Schwartz 1994; Vedal, 1997).

El 2010 fue proclamado como el año internacional de los pulmones para enfatizar la importancia de tener pulmones sanos, sobretodo en zonas con mayor índice de contaminación, como es la Ciudad de México. El énfasis fue la contaminación la cual es causa de morbilidad y mortalidad, ya que afecta al 100% de la población (OMS, Organización Mundial de la Salud, 2005).

2.2. Partículas suspendidas.

La contaminación atmosférica dada por partículas suspendidas, en las últimas décadas ha incrementado en el valle de México. Las partículas suspendidas son un contaminante constituido por material líquido y sólido de muy diversa composición y tamaño, que se encuentran en el aire y resulta de una mezcla de muchas clases de contaminantes producto de una gran cantidad de procesos naturales y antropogénicos. El origen de estos contaminantes incluyen procesos de combustión en vehículos, principalmente aquellos que usan diesel, industrias de fundición, pinturas, cerámica y plantas productoras de energía. La erosión, las tolvaneras y los incendios forestales constituyen también una fuente natural de partículas en el aire (Mujica, *et al.*, 1996; Pérez, *et al.*, 2010).

Las partículas suspendidas en ambientes industrializados, como es la Ciudad de México, suelen contener múltiples metales de transición, incluyendo Fe, Mn, Cu, Ni, Zn, Co, V, Cr y Ti (Prahald, *et al.*, 1999).

Estas partículas suspendidas son capaces de provocar daños a la salud, ya que están compuestas por una gran variedad de compuestos tóxicos, entre los que se incluyen los metales (plomo, hierro, vanadio, níquel, cobre, platino,

manganeso y otros), compuestos orgánicos, material de origen biológico (virus, bacterias, restos de animales y plantas, tales como fragmentos de polen), iones (sulfatos y nitratos) y gases reactivos (ozono, peróxidos y aldehídos), y, su núcleo se forma frecuentemente de carbono elemental puro (EPA 1999). Cada uno de estos componentes teóricamente tiene el potencial de causar daño en las vías aéreas por uno o más mecanismos. La mucosa de las vías aéreas es considerada como la primera línea de defensa en contra de los tóxicos inhalados (Sweeney, *et al.*, 1995).

Las partículas se clasifican con base a su tamaño que se mide en términos del diámetro. De esta forma, las partículas suspendidas totales (PST) tienen un diámetro que va de 0.001 a alrededor de 100 micrómetros (μm) (Romieu, *et al.*, 1997). Las que miden menos de 10 μm (PM10) se conocen como fracción inhalable; una vez dentro del árbol respiratorio, dependiendo de sus propiedades específicas, se depositan en diferentes sitios, como fosas nasales, laringe, tráquea, bronquios, bronquiólos y sacos alveolares del pulmón (Lippmann, 1989). Dentro de la fracción inhalable, se encuentran las de fracción gruesa, que incluye las partículas con diámetros entre 2.5 y 10 μm (PM10-2.5), las cuales se sedimentan o depositan en vías respiratorias superiores; la fracción fina, compuesta por partículas menores a 2.5 μm (PM2.5) es conocida también como fracción respirable, porque pueden penetrar hasta vías respiratorias inferiores. En los últimos años se ha dado mayor atención a partículas con tamaño menor a 1 μm de diámetro, que se conocen como fracción ultrafina y a las que se atribuye un mayor potencial de daño (figura 1) (EPA 2002; Lippmann 1989; Rojas, *et al.*, 2003). Por otra parte las partículas ultrafinas y finas, las cuales son de origen antropogénico predominantemente, se depositan con mayor probabilidad en las partes más bajas del sistema respiratorio humano y, de este modo, tienen un impacto mayor sobre la salud (Politis, *et al.*, 2008) .

Uno de los componentes de estas partículas puede ser el manganeso y los compuestos de manganeso los cuales se presentan naturalmente en el ambiente en forma de sólidos en el suelo y en forma de pequeñas partículas en el agua. El manganeso también puede estar presente en el aire en forma de pequeñas partículas de polvo. Estas partículas que contienen manganeso generalmente se depositan en superficies en unos días dependiendo de su tamaño, peso, densidad, y de las condiciones climáticas (EPA, 1996) y se ha observado en trabajadores expuestos frecuentemente a altas concentraciones de manganeso atmosférico incremento en la incidencia de tos y otros síntomas asociados con la bronquitis (Roels, 1987; Saric, 1992).

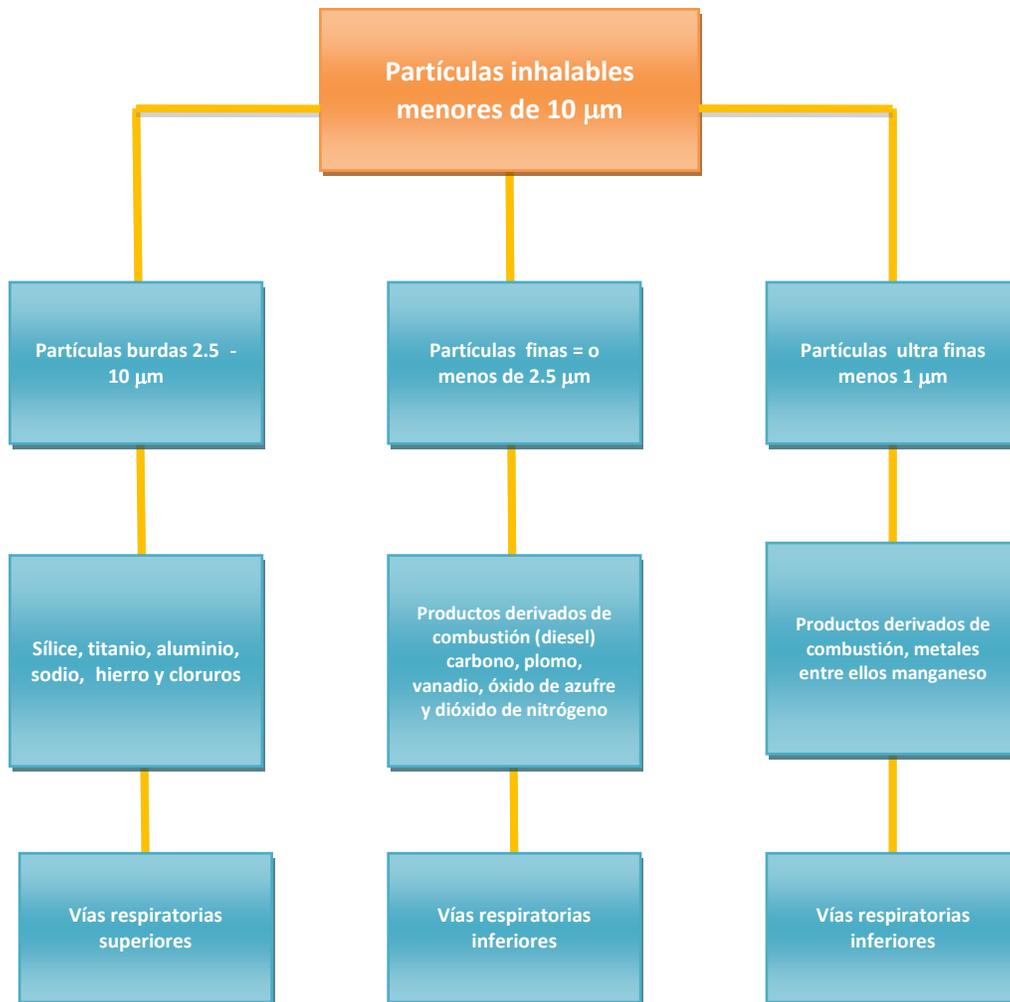


Figura 1. Clasificación de partículas inhalables.

2.3. Características químicas del Manganeseo.

El manganeseo es el doceavo elemento más abundante en la biosfera. De número atómico 25 y peso atómico 54.938 es un elemento de transición localizado en el grupo 7 (VIIA) de la tabla periódica, ubicado entre el cromo y el hierro, y comparte propiedades con ambos metales. Existe en 11 estados de oxidación que va de -3 a +7, siendo los más comunes +2, +4 y +7 (Jankovic, 2005); cabe resaltar que la valencia +2 ha sido la más encontrada en los sistemas biológicos (Roth, 2006).

El manganeseo se encuentra naturalmente en rocas, suelos, agua y alimentos (Wilson, 2007). El manganeseo puro es de color plateado, pero no ocurre naturalmente en esta forma. Se combina con otras sustancias tales como el oxígeno, azufre o cloro. El manganeseo también puede combinarse para producir compuestos orgánicos de manganeseo. Aunque poco conocido o usado en su forma pura, reviste gran importancia práctica en la fabricación de acero. El manganeseo también se oxida fácilmente en el aire para formar una capa de color café de óxido. (Lenntech, 2012), puede existir en forma orgánica e inorgánica. Se ha observado que los riesgos de salud provocados con la inhalación de Manganeseo han sido asociados con componentes inorgánicos del manganeseo como el MANEB, plaguicida ya en desuso (Ferraz *et al.*, 1988) e inorgánicos en forma de humos y polvos provenientes de la manufactura de aceros y soldaduras (Roels, *et al.*, 1987, Wang, *et al.*, 1989). La forma inorgánica incluye compuestos como cloruro de manganeseo ($MnCl_2$), sulfato de manganeseo ($MnSO_4$), acetato de manganeseo ($MnOAc$), fosfato de manganeseo ($MnPO_4$), óxido de manganeseo (MnO_2), y tetraóxido de manganeseo (Mn_3O_4).

El manganeseo es un elemento ubicuo, además es uno de los tres elementos traza esenciales, aunque también puede ser tóxico, lo cual significa que no sólo es necesario para la supervivencia de los humanos, sino que es también tóxico cuando está presente en elevadas concentraciones (Lenntech, 2012).

La toma del manganeseo por los humanos tiene lugar mayoritariamente a través de los alimentos, como son las espinacas y los cereales; y los que contienen las más altas concentraciones de manganeseo, son los granos como el arroz, el aceite de oliva, las semillas de soya, huevos, frutos secos, chicharos, ostras, y se encuentra en grandes cantidades en otros productos como el té (ATSDR, 2011; Lenntech, 2012). La OMS recomienda una ingesta para adultos de 2-3 mg/día, mientras que la Food and Nutrition Board de la Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. recomienda de 2.5-5 mg/día (Jiménez e Idal, 2004).

Cabe mencionar que el cuerpo humano contiene entre 200 y 400 micromoles de manganeseo, que están distribuidos uniformemente (Keen, Hurley, *et al.*, 1984). Los tejidos que contienen mayor concentración de manganeseo son aquellos con altos niveles de mitocondria; como es el caso del cabello y estructuras pigmentadas, como la retina, piel oscura y granulos de

melanina. Hueso, hígado, páncreas y riñón contienen altas concentraciones de manganeso (20-50 nmol/g) en comparación con otros tejidos; como cerebro, corazón, pulmones y músculo, que contienen menos de 20 nmol Mn/g (Hurley y Keen, 1987).

Este elemento es traza debido a que juega un papel imprescindible en los procesos catalíticos enzimáticos. Actúa como cofactor de varias enzimas, participando en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Es un activador de enzimas en competencia con el magnesio, al cual puede sustituir sin pérdida de actividad catalítica (Martínez, 2006).

2.4 Usos del Manganeso.

Los compuestos del manganeso tienen muchas aplicaciones en la industria. El dióxido de manganeso se usa como un agente desecante o catalizador en pinturas y barnices y como decolorante en la fábrica de vidrio y en pilas secas. El permanganato de potasio se emplea como blanqueador para decoloración de aceites y como un agente oxidante en química analítica (Lenntech, 2012). Además, se usa en la fabricación de vidrio, cerámicas, soldaduras, baterías y latas de aluminio (Aschner, 2005; WHO 2004). También se utiliza como recubrimiento de electrodos en varillas de soldadura, en los trituradores de rocas y en las agujas y cambios de vía de los ferrocarriles.

Algunas sales de manganeso se utilizan como fertilizantes y como secantes para el aceite de linaza, en la fabricación de vidrio, como decolorantes de textiles y en el curtido de pieles (Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, 2001). Por otra parte, la combustión de gasolina libre de plomo y de algunos aditivos automotrices conteniendo el compuesto antidetonante metil-ciclopentadienil tricarbonil manganeso (MMT), resulta en la liberación de fosfatos, sulfatos y óxidos de Mn. El MMT también se ha utilizado como inhibidor de humos (Aschner, 2005; Bueno-Brito, 2005).

El manganeso es esencial para la producción de hierro y acero por sus propiedades de fijación de azufre, antioxidante y utilidad para las aleaciones. El manganeso es el cuarto metal más utilizado ya que se producen 20 millones de toneladas de mineral extraído anualmente (Wilson, 2007).

2.5 Vías de exposición.

Debido a que el Manganeseo se encuentra en la atmósfera asociado a partículas inhalables, la principal vía de exposición es la inhalada y su vida media es de 39 días (SESMA, 2009).

Otra ruta de exposición a este metal está dada por la ingesta, aunque se sabe que la absorción en el tracto gastrointestinal no es grande. La absorción de manganeseo a través de la piel puede considerarse despreciable ya que no penetra de una forma significativa en el caso de la vía dérmica, y por último, la vía ocular solo provoca una irritación local (Wilson, 2007).

2.6 Absorción y transporte del Manganeseo.

Como ya se menciona el manganeseo se absorbe principalmente por inhalación ya que ofrece una ruta casi directa a la sangre (Santos-Burgoa, 2001; Fortoul, 2001). Para que una partícula sea absorbida por esta vía debe ser soluble y medir menos de 3 μm , de lo contrario será desplazada por transporte mucociliar hacia la faringe, donde se expectora o se deglute (Aschner, 2005; Massod, 2002). Al ser inhalado, el Mn entrara en contacto con las vías respiratorias, por donde viajará, se depositará y causara daño (figura 2). Numerosos estudios confirman que el manganeseo es fácilmente absorbido dentro de la cavidad nasal en las terminaciones nerviosas presinápticas de las proyecciones axonales del olfato (Tjalve, *et al.*, 1999; Vitarella, *et al.*, 2000; Fechter, *et al.*, 2002; Dobson, *et al.*, 2003; Normandin, *et al.*, 2004; Dorman, *et al.*, 2002).

El manganeseo (Mn) también puede llegar al aparato digestivo a través de los alimentos o del agua contaminada. En la velocidad de absorción puede influir el nivel de manganeseo contenido en la dieta, el tipo de compuesto de manganeseo, la edad y las deficiencias de hierro.

Después de su inhalación o administración parenteral u oral, el manganeseo absorbido se elimina rápidamente de la sangre y se distribuye principalmente en el hígado. El manganeseo absorbido por el tracto gastrointestinal entra por la vía portal, donde puede permanecer libre, o unirse a la α_2 -macroglobulina y así llega al hígado rápidamente. Una pequeña fracción del Mn absorbido entra al sistema (menos del 10%) circulatorio donde se puede oxidar en Mn^{3+} y se une a transferrina (figura 3) (Davidsson, *et al.*, 1989; Critchfield, *et al.*, 1992).

Después de ser absorbido, el manganeseo se transporta a través de la sangre al hígado, los riñones, el páncreas y las glándulas endocrinas. La bilis constituye su principal vía de excreción, por lo que se elimina casi completamente en las heces; sólo entre un 0.1 y un 1.3 % de la ingesta diaria se elimina por vía urinaria. La toxicidad de los distintos compuestos de

manganeso parece depender del tipo de ion manganeso y de su estado de oxidación (figura 3) (Nordberg, 2001).

La vida media biológica del manganeso es de 36 a 41 días, pero en el caso del manganeso depositado en el cerebro, se considera mayor. (Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo, 2001).

El dióxido de manganeso y otros compuestos de manganeso utilizados o producidos como subproductos volátiles del proceso de refinado del metal son prácticamente insolubles en agua. Por este motivo, sólo llegan al torrente sanguíneo las partículas suficientemente pequeñas para alcanzar el alvéolo pulmonar. Las partículas inhaladas de mayor tamaño pueden ser depuradas por las vías respiratorias y deglutidas. El manganeso también puede llegar al aparato digestivo a través de los alimentos o del agua contaminada (Nordberg 2001).

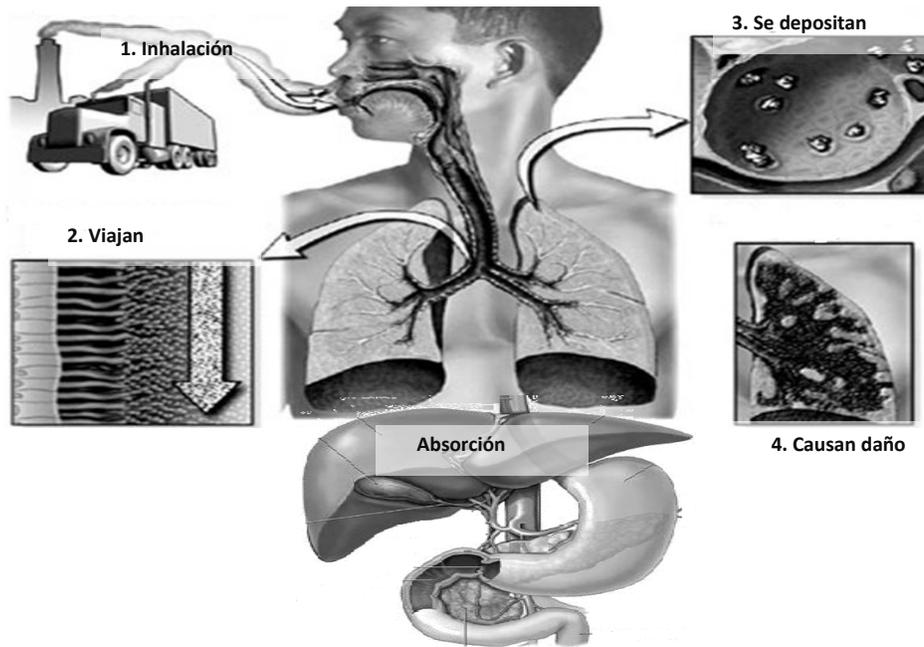


Figura 2. Diagrama de absorción y transporte del Manganeseo.

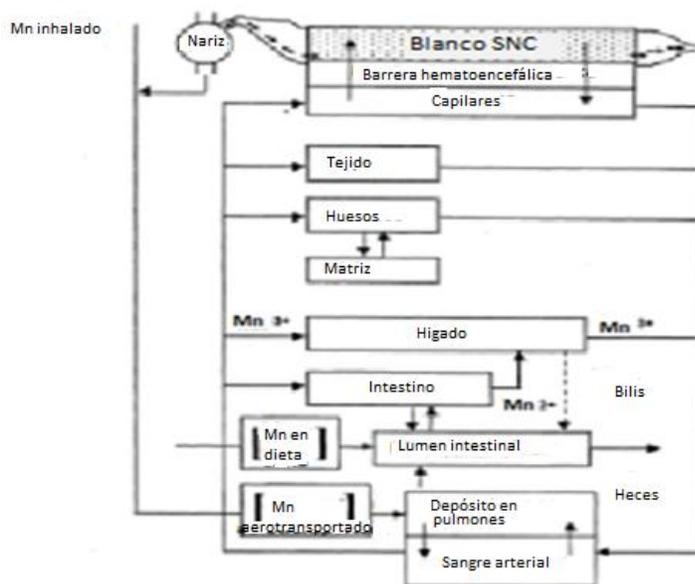


Figura 3. Farmacocinética del modelo de Manganeso (Andersen, 1999).

Los mecanismos implicados en la absorción de este metal por células epiteliales pulmonares y el transporte de metales traza a través de la barrera aire-sangre, no se entiende del todo (Heilig, 2006), sin embargo se ha propuesto que el transportador-1 de metales divalentes (DMT1/) es expresado por las células epiteliales pulmonares y parece jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis del manganeso en los pulmones. Se ha observado en ratas que poseen un punto de mutación natural de DMT1 (G185R) que se traduce en mal plegamiento y la degradación de proteínas (Ghio, *et al.*, 2005), por otra parte también se ha observado que la expresión de DMT1 está aumentada en epitelio bronquiolar de ratas expuestas a citrato amónico férrico, apoyando un papel en la desintoxicación (Gunshin, *et al.*, 1997). DMT1 puede transportar varios otros iones metálicos divalentes, además de hierro, incluyendo manganeso (Heiling, *et al.*, 2006).

2.7 Efectos en la salud provocados por manganeso.

Se ha identificado que el manganeso se encuentra en las partículas suspendidas de la Ciudad de México y además se ha detectado su presencia en tejido pulmonar de casos de autopsia de sujetos que residían en la Ciudad de México apreciando un discreto aumento en el tejido, comparando su evolución durante los años 1960 (20 varones, 19 mujeres) y 1990 (30 varones y 18 mujeres), las concentraciones de manganeso en el pulmón fueron estudiadas con espectrometría de absorción atómica y no se correlacionaron con el sexo, hábito de fumar, edad, o causa de la muerte, sin embargo, si hubo correlación con la ocupación (Fortoul, *et al*, 2002). Por lo anteriormente expuesto, es importante evaluar los efectos que la inhalación de este elemento, que ingresa al organismo adherido a las partículas suspendidas en la atmósfera, puede ocasionar en el sistema respiratorio que es el primer sitio de contacto (ATSDR, 2011).

El manganeso en el ambiente tiende a estar en bajas concentraciones en lugares no poblados, y es más alto en zonas urbanas. El Mn está enlistado como un tóxico ambiental por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos y ha establecido la concentración límite de referencia para el manganeso de 0.00005 mg/m³ (EPA, 2010). Los efectos del manganeso ocurren principalmente en el tracto respiratorio y el sistema nervioso. Los síntomas de intoxicación por manganeso son alucinaciones, olvidos y otros daños en el sistema nervioso. El manganeso puede causar una alteración parecida a la enfermedad de Parkinson (manganismo), embolia pulmonar y bronquitis (Lenntech, 2012; Fortoul, *et al*, 2001). En personas que están expuestas a altas concentraciones de este elemento se han observado efectos adversos sobre la salud entre los cuales se (Lenntech, 2012): incremento en la frecuencia de enfermedades respiratorias (neumonía mangánica, bronquitis,) (Fortoul *et al*, 2001; Brauer M, 2001), desórdenes neurológicos (manganismo) y reproductivos (pérdida de la libido y decremento en la fertilidad) (Vitarella et al, 2000).

El manganismo, cuya manifestación va precedida habitualmente de síntomas inespecíficos como la cefalea, cansancio, trastornos del sueño e irritabilidad, posteriormente deriva en un estado psicótico que lo caracteriza. Es posible observar simultánea o subsecuentemente manifestaciones de disfunción motora extrapiramidal de tipo de la enfermedad de Parkinson, como rigidez muscular, alteraciones de la marcha, inexpresividad facial y temblores finos. La recuperación es infrecuente y la disfunción suele persistir o progresar después de que se interrumpe la exposición (Isselbacher, *et al*, 1994; Ladou, 1996).

Los desórdenes neurodegenerativos van en aumento como es el caso de Alzheimer y Parkinson. Muchos metales esenciales de transición, como el zinc, el manganeso, el cobre y el hierro están implicados en algunas enfermedades neurodegenerativas. Estos metales presentan propiedades bimodales (hormesis): en bajos niveles, son esenciales para el adecuado funcionamiento

de muchas enzimas tales como las proteínas, cofactores e incluso propiedades antioxidantes, mientras que en altos niveles son tóxicos (Kéller, *et al*, 2004).

Los trabajadores en la industria para la producción de manganeso tienen mayor riesgo de exposición a dicho metal por inhalación a través del polvo tóxico suspendido. Poblaciones vecinas, expuestas al ferromanganeso, hierro, manufacturas de acero, plantas de carbón y residuos peligrosos, pueden propiciar altos niveles de manganeso, particularmente en el aire y en el agua. Otros grupos dentro de la población, en general cercanas a áreas con intenso tránsito vehicular, obreros automotrices y choferes de taxi, están expuestos a elevadas concentraciones de manganeso provenientes de la combustión del MMT. Al igual que ellos, granjeros y empleados agrícolas expuestos al empleo de plaguicidas, están en mayor riesgo de exposición a esta clase de tóxicos que un individuo común (Vallejo, *et al.*, 2003).

Por las consecuencias que la exposición a Mn puede tener, es importante identificar los cambios que la inhalación de este elemento puede inducir localmente, en el órgano al que llega primero a través de las partículas suspendidas, es decir pulmón.

2.8 Estados de oxidación del Manganeso.

Los efectos a la salud han sido relacionados con compuestos que contienen manganeso en el estado de oxidación Mn (II), Mn (III), o Mn (IV), ya que estas formas son las que se encuentran de forma frecuente en el ambiente. Se han llevado a cabo diferentes estudios con varios estados del Mn, sin embargo el más utilizado ha sido MnCl₂. Se ha encontrado que los componentes provenientes del estado de oxidación +2 juegan un papel relevante en efectos a la salud, y que éste es el estado que se encuentra de forma predominante en gran proporción en el ambiente y en mineras (Aschner, *et al*, 2005). Su actividad pro-oxidativa es dependiente de la cantidad de Mn⁺³ existente, lo cual facilita que Mn⁺² se oxide a Mn⁺³.

El cloruro de manganeso presenta un peso molecular de 125.84 g/moles se puede encontrar en alimentos y en pilas secas, además es un precursor de otros compuestos de manganeso.

Por otra parte el acetato de manganeso con un peso molecular de 228.82 g/moles se puede generar en situaciones en que otros óxidos de manganeso se calienten en el aire (NIOSH Pocket Guía, 1995).

Se ha postulado que la inhalación de Mn³⁺ es más potente como productor de estrés oxidante que Mn⁺², por lo tanto causa más daño celular (Archibald y Tyree, 1987; Ali, *et al.*, 1995; Chen, *et al.*, 2001) mientras que Mn⁺² necesita la presencia de Mn⁺³ para llevar a cabo la oxidación (Ordoñez, 2006). Ordoñez y colaboradores observaron que la inhalación de la mezcla de

ambos compuestos produce alteraciones morfológicas similares y de comportamiento en desórdenes neurodegenerativos (Ordoñez, *et al.*, 2008).

2.9 Trabajos realizados con Manganeso.

Los efectos tóxicos se han descrito en los animales expuestos a compuestos de manganeso por inhalación (Shiotsuka, 1984; Suzuki, *et al.*, 1978, Moore, *et al.*, 1975). Shiotsuka y colaboradores (1984) demostraron una mayor incidencia de neumonía entre las ratas expuestas durante 2 semanas a concentraciones de dióxido de manganeso que van de 68 a 219 mg/m³.

A monos expuestos a concentraciones de dióxido de manganeso que van de 0.7 a 3.0 mg/m³ durante 10 meses mostraron una mayor incidencia de enfisema pulmonar (Suzuki, *et al.*, 1978). Hámsters y ratas expuestas durante 56 días a 0.117 mg Mn₃O₄/m³ mostraron lesiones bronquiales (Moore, *et al.*, 1975). Se ha observado absorción específica del manganeso a través de la mucosa olfatoria hacia el bulbo olfatorio seguido de la distribución generalizada al cerebro (Tjalve, *et al.*, 1996). Dorman *et al.* mostraron que la exposición subcrónica de ratas a sulfato de manganeso (MnSO₄) se asocia a rinitis en la parte anterior de la nariz. En este mismo artículo se reportó que la inhalación subcrónica de primates no humanos a MnSO₄ dio como resultado bronquitis subaguda, inflamación del conducto alveolar y proliferación de tejido linfoide asociado a los bronquios en ausencia de rinitis y otras enfermedades nasales.

Dorman *et al.*, 2001 mostraron que en animales expuestos a sulfato de manganeso (3 mg Mn/m³), se observaba menor concentración en pulmón y mayor en el bulbo olfatorio en comparación con los niveles de exposición observados con tetraóxido de manganeso. Por otra parte, Rhoads y Sanders en 1985 compararon una serie de compuestos metálicos y observaron que el sulfato de manganeso se eliminó de forma más rápida en los pulmones, mientras que fosfato y tetraóxido de manganeso fueron retenidos por períodos más largos.

También se ha demostrado que existe un incremento en las concentraciones de manganeso en el cerebro, testículos e hígado de ratas adultas después de la inhalación de sulfato de manganeso, que es más soluble (MnSO₄) que la forma de fosfato o tetraóxido de manganeso (Dorman, *et al.*, 2001; Vitarella, *et al.*, 2000).

En la bronquitis ocasionada en ratas se ha demostrado que se retienen más partículas en los pulmones al ser inhaladas y tienen un patrón multifocal de depósito que es diferente al de ratas sanas (Sweeney, *et al.*, 1995).

2.10 Efectos respiratorios del manganeso.

En humanos, la inhalación de partículas que contienen compuestos de manganeso como dióxido de manganeso (MnO_2) o tetraóxido de manganeso (Mn_3O_4) dan una respuesta inflamatoria en el pulmón. Ésta se caracteriza por infiltración de macrófagos y leucocitos los cuales fagocitan las partículas de manganeso que se han depositado. El daño del tejido pulmonar, sin embargo no suele ser muy extenso pero puede incluir áreas locales de edema (WHO, 2000; Lloyd Davies, 1946). Los síntomas y signos de irritación y lesiones de los pulmones incluyen tos, bronquitis, neumonitis, y mínimas reducciones en la función pulmonar (Abdel Hamid, *et al.*, 1990; Akbar-Khazadeh 1993, y Lloyd Davies, 1946; Roels, *et al.*, 1987). Estos efectos se han observado principalmente en personas expuestas a polvo de manganeso debido a condiciones laborales; sin embargo, existe evidencia que apoya que los efectos respiratorios también pueden ocurrir en zonas residenciales, cerca de fábricas de ferromanganeso (Kagamimori, *et al.* 1973; Nogawa, *et al.*, 1973; OMS, 1987).

No se ha establecido un umbral para determinar los efectos, pero es probable que la respuesta inflamatoria comience poco después de una exposición continua. Cabe señalar que una respuesta inflamatoria de este tipo no es exclusiva de partículas que contiene manganeso, ya que es característico de casi todas las partículas inhalables (EPA, 1985).

En algunos estudios realizados a trabajadores expuestos a polvo de manganeso (Lloyd Davies, 1946) y a residentes cercanos a fábricas de ferromanganeso (OMS, 1987) se observó que existía un aumento en la prevalencia de las enfermedades pulmonares infecciosas, especialmente neumonía. Parece probable que este aumento en la susceptibilidad a infecciones respiratorias se debe principalmente a irritación de los pulmones e inflamación causada por la inhalación de partículas, como se indicó anteriormente. La inhalación de partículas que contienen compuestos de manganeso tales como MnO_2 o Mn_3O_4 también conduce a una respuesta inflamatoria en los pulmones, aunque la inhalación de $MnCl_2$ no causa inflamación pulmonar en conejos (Camner, *et al.*, 1985).

Se ha propuesto que en el momento que las partículas logran llegar a las vías aéreas el epitelio de estas, responden sintetizando o liberando mediadores secundarios de la inflamación, los cuales contribuyen a la respuesta de inflamación local. Entre estos mediadores se encuentran las citocinas, como es el caso de IL-6, la cual se ha demostrado juega un papel crítico en la repuesta inflamatoria y daño pulmonar de ratones expuestos a contaminantes ambientales (Yu, *et al.*, 2002), o bien el óxido nítrico en una de sus isomorfos, como la nitrotirosina, que indicará daño celular así como inflamación (Sheffield, *et al.*, 2006).

2.11. Citocinas. IL-6.

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular que tras ser liberadas por diversas células entre ellas macrófagos alveolares, linfocitos, células epiteliales y células endoteliales (Yu, *et al.*, 2002; Arcangeli, *et al.*, 2001; Frampton, *et al.*, 1999; Koyama, *et al.*, 1998; Mils, *et al.*, 1999; Mosmann, *et al.*, 1996; Bankey, *et al.*, 1995), actúan modificando la función de otras células diana bien de un modo autocrino, paracrino o endocrino. Las citocinas también intervienen en la comunicación que se produce entre las células del sistema inmune y entre éstas células y otras de carácter no inflamatorio. Todas estas citocinas están relacionadas con la inflamación alérgica de las vías aéreas. El proceso de inflamación en los pulmones está caracterizado por la producción de leucotrienos, histamina, bradiquinina, y una variedad de citocinas y quimocinas. Entre las citocinas pro-inflamatorias podemos encontrar a la IL-6, una citoquina que regula la respuesta al estrés inducida por la infección y la lesión tisular (Romero, 1990) y que se considera que contribuye a la iniciación y extensión del proceso inflamatorio. IL-6 es una citocina multifuncional que es producida por una gran variedad de células (Baumann, *et al.*, 1984; Jirik, *et al.*, 1989; Nijsten, *et al.*, 1987), usualmente en sitios donde hay inflamación del tejido. IL-6 actúa en una gran variedad de células, sin embargo su rol patofisiológico en la inflamación es controversial. Activa los linfocitos B y T, y estimula a los hepatocitos para producir proteínas de fase aguda.

En estudios se ha demostrado que IL-6 tiene propiedades antiinflamatorias y protectoras, incluyendo: la capacidad de inhibir la producción de factor de necrosis tumoral(TNF), IL-1, y la proteína inflamatoria de macrófagos-2, disminuir la retención de los neutrófilos, aumentar los niveles del receptor antagonista de IL-1 y el receptor soluble de TNF, estimular la producción de inhibidores de metaloproteinasas, reducir la producción de superóxido intracelular, reducir la degradación de la matriz, e inhibir la apoptosis celular (Jordan, *et al.*, 1995; Mizuhara, *et al.*, 1994; Rollwagen, *et al.*, 1998; Shingu, *et al.*, 1994, 1995; Tilg, *et al.*, 1994; Ulich, *et al.*, 1991; Xing, *et al.*, 1998).

Se ha demostrado en pulmones de ratones expuestos a contaminantes ambientales que IL-6 tiene un rol fundamental en inflamación y daño pulmonar inducido por la exposición partículas ambientales como; cobalto, cromo, silica, asbestos, entre otros (Yu, *et al.*, 2002; Goldini, *et al.*, 2004; Caglieri, *et al.*, 2006; Pelclová, *et al.*, 2007; Lehtonen, *et al.*, 2007). En el pulmón existe una gran variedad de células, como macrófagos alveolares, linfocitos, células epiteliales alveolares y células endoteliales que son capaces de producir IL-6 (Arcangeli, *et al.*, 2001; Bankey, *et al.*, 1995; Frampton, *et al.*, 1999; Koyama, *et al.*, 1998; Mosmann y Sad, 1996; Yu, *et al.*, 2002).

2.12 Óxido nítrico. Nitrotirosina.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre diatómico que recientemente se ha encontrado que tiene un papel clave tanto en procesos fisiológicos normales, como en estados patológicos. La producción de óxido nítrico en pulmón se ha descrito principalmente en células endoteliales y células de las vías respiratorias (Guo, *et al.*, 1992; Halbower, *et al.*, 1994; Kobzik, *et al.*, 1993; Sherman, *et al.*, 1999). La presencia del NO en los sistemas biológicos lleva a la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS), tales como el peroxinitrito, que reacciona rápidamente con residuos de tirosina en las proteínas para formar nitrotirosina (figura 4). El peroxinitrito tiene una vida media muy corta en pH neutro. La presencia de la nitrotirosina se ha utilizado como un marcador de la producción de especies reactivas de nitrógeno en tejidos dañados, por lo tanto la nitrotirosina ha sido propuesta como marcador para identificar el daño tisular inducido por el moléculas derivadas por el óxido nítrico (Ohshima, 1990).

La nitrotirosina es un producto estable de la reacción del peroxinitrito con proteínas. La formación de peroxinitrito se favorece cuando el óxido nítrico supera a la superóxido dismutasa (SOD) en la competencia por el superóxido (Myatt, 1996). Estudios previos han demostrado que la nitrotirosina ha detectada por inmunohistología en varios procesos de inflamación incluyendo placas ateroscleróticas y la artritis reumatoide, entre otras (Millipore, 2012).

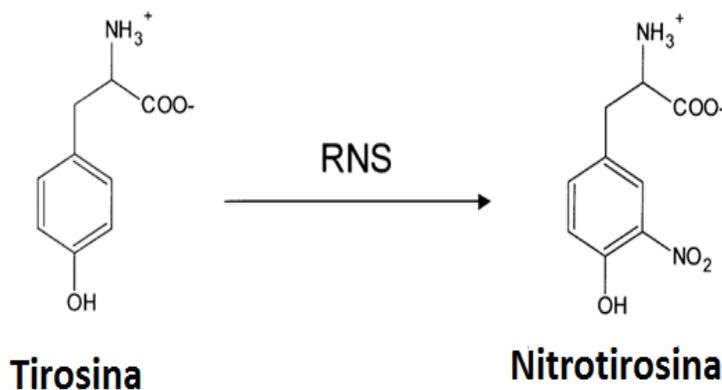


Figura 4: Mecanismo de reacción para forma nitrotirosina (Mani, *et al.*, 2003).

Por otra parte, se conoce por medio de estudios inmunohistoquímicos que la nitrotirosina se encuentra presente a lo largo del epitelio respiratorio, sin diferencias entre las partes proximal y distal del árbol respiratorio y en macrófagos alveolares, exudado alveolar, membranas hialinas en pulmones de los recién nacidos con insuficiencia respiratoria (Aiko, *et al.*, 2000). No se observó en el endotelio, y en el caso de las capas de músculo liso de las vías respiratorias y vasos sanguíneos, la presencia de esta es poca o casi inexistente (Outi, *et al.*, 2002).

En numerosos estudios se ha observado la interacción entre especies reactivas de nitrógeno e iones de metales de transición contribuyen al aumento en la tasa de nitración (Pryor, 1995; Crow, 1996; Van der Vliet, 1996).

2.13 Sistema Respiratorio.

El tracto respiratorio es el portal de entrada para diversos contaminantes que se encuentran en el aire, por lo que los pulmones son los primeros órganos afectados. La gama de enfermedades respiratorias debido a la contaminación es muy amplia (Pérez, *et al.*, 2010).

El sistema respiratorio está compuesto por dos pulmones y una serie de vías aéreas que los comunican con el exterior. Dentro de los pulmones, las vías aéreas se ramifican en conductos cada vez menores hasta alcanzar espacios aéreos más pequeños llamados alvéolos. Este aparato cumple tres funciones principales: conducción del aire, filtración del aire e intercambio de gases (respiración) (figura 5).

Las vías aéreas del aparato respiratorio están divididas en una porción conductora y una respiratoria. La porción conductora está formada por las vías aéreas que conducen a los sitios de respiración dentro de los pulmones, donde ocurre el intercambio gaseoso. Las vías de conducción comprenden: cavidades nasales, rinofaringe y orofaringe, laringe, tráquea y bronquios principales (primarios) (figura 5).

Dentro de los pulmones, los bronquios principales sufren una ramificación extensa para finalmente dar origen a los bronquios respiratorios. Los bronquiolos constituyen la parte final de la porción conductora. En conjunto, los bronquios intrapulmonares y los bronquiolos forman el árbol bronquial.

La porción respiratoria es la parte de la vía en la cual se lleva a cabo el intercambio gaseoso (figura 5). Comprende las siguientes estructuras: bronquiolos respiratorios, conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos.

2.13.1 Bronquios.

La tráquea se divide en dos ramas que forman los bronquios principales que se ramifican en: bronquio derecho e izquierdo. Los bronquios al introducirse en el hilio pulmonar se dividen y se le denomina a cada uno bronquio lobar –bronquio secundario- y estos a su vez, se subdividen para formar los segmentos –bronquio terciario- conocido también como bronco-pulmonar (Ham y Cormak, 2000).

Los bronquios al principio tienen la misma estructura histológica general que la tráquea. En el sitio en donde los bronquios entran en los pulmones para convertirse en bronquios intrapulmonares los anillos de cartílago son reemplazados por placas cartilaginosas de forma irregular. Estas placas desaparecen en el momento en que la vía aérea alcanza un diámetro de 1mm y a partir de aquí el bronquio comienza a llamarse bronquiolos (Diagnóstico Histológico, 2000; Fawcett, 2005).

Los bronquios pueden identificarse por sus placas de cartílago y una capa de músculo liso. La segunda modificación que ocurre en la pared del bronquio intrapulmonar es la adición del músculo liso para formar una capa circunferencial completa. El músculo liso se torna en una capa cada vez más evidente conforme disminuye la cantidad de cartílago. Al principio este músculo se organiza en haces entrelazados que forman una capa continua pero en los bronquios más pequeños, esta capa puede aparecer discontinua (Ross, *et al.*, 2005).

Como el músculo liso forma un estrato separado –una capa muscular verdadera- se considera que la pared del bronquio tiene cinco capas: mucosa, muscular, submucosa, cartilaginosa y la capa adventicia. Sus características son: En la capa mucosa se encuentra presente un epitelio pseudo-estratificado cilíndrico, que cuenta con el mismo tipo celular que tiene el epitelio traqueal y su altura va disminuyendo a medida que los bronquios reducen su calibre. En el caso de la capa muscular – capa que se observa continua en el bronquio mayor- esta se adelgaza adquiriendo una apariencia “menos organizada” y discontinua cuando llega a conformar al bronquio menor. Para la capa de la submucosa, el tejido conjuntivo permanece bastante laxo (Ross, *et al.*, 2005).

La capa cartilaginosa está constituida por placas –cartilaginosas-discontinuas, que se tornan cada vez más pequeñas conforme se va reduciendo el diámetro bronquial. Por último, la capa adventicia está constituida por tejido conjuntivo que se continúa con el de las estructuras cercanas, como las ramas de la arteria pulmonar y el parénquima pulmonar (Ross, *et al.*, 2005; Ham y Cormak, 2000).

2.13.2 Bronquiolos.

Los bronquiolos son vías áreas de conducción que miden 1 mm de diámetro o menos. Los bronquiolos más grandes son ramas de los bronquios segmentarios. Estos conductos sufren ramificaciones consecutivas para dar origen a los bronquiolos terminales, que son más pequeños y también se ramifican. Por último, los bronquiolos terminales dan origen a los bronquiolos respiratorios.

Los bronquiolos de mayor diámetro al principio tienen un epitelio pseudoestratificado cilíndrico ciliado que gradualmente se transforma en un epitelio simple cilíndrico ciliado conforme el conducto se estrecha. Las células caliciformes todavía están presentes en los bronquiolos más grandes, pero faltan por completo en los bronquiolos terminales. En los bronquiolos no hay glándulas subepiteliales ni tampoco placas cartilaginosas características de los bronquios. En la pared de todos los bronquios hay una capa de músculo liso.

Los bronquiolos terminales están revestidos por un epitelio simple cúbico en el cual hay células de Clara dispersas entre las células ciliadas. Las células de Clara son células no ciliadas que exhiben una prominencia característica redonda o con forma de cúpula de la superficie apical, secretan un agente tensoactivo, una lipoproteína, que impide la adhesión luminal si la pared de la vía aérea se colapsa, en particular durante la espiración. Además, las células de Clara producen una proteína de 16 kDa conocida como proteína de célula de Clara (CC16), que es un componente abundante de la secreción de la vía aérea.

Función de los Bronquiolos.

Los bronquiolos respiratorios forman una zona de transición en el aparato respiratorio y participan tanto en la conducción del aire como en el intercambio gaseoso.

La pared del bronquiolo respiratorio tiene evaginaciones de paredes delgadas que están diseminadas en toda su longitud. En los alveolos ocurre el intercambio de gases entre el aire y la sangre.

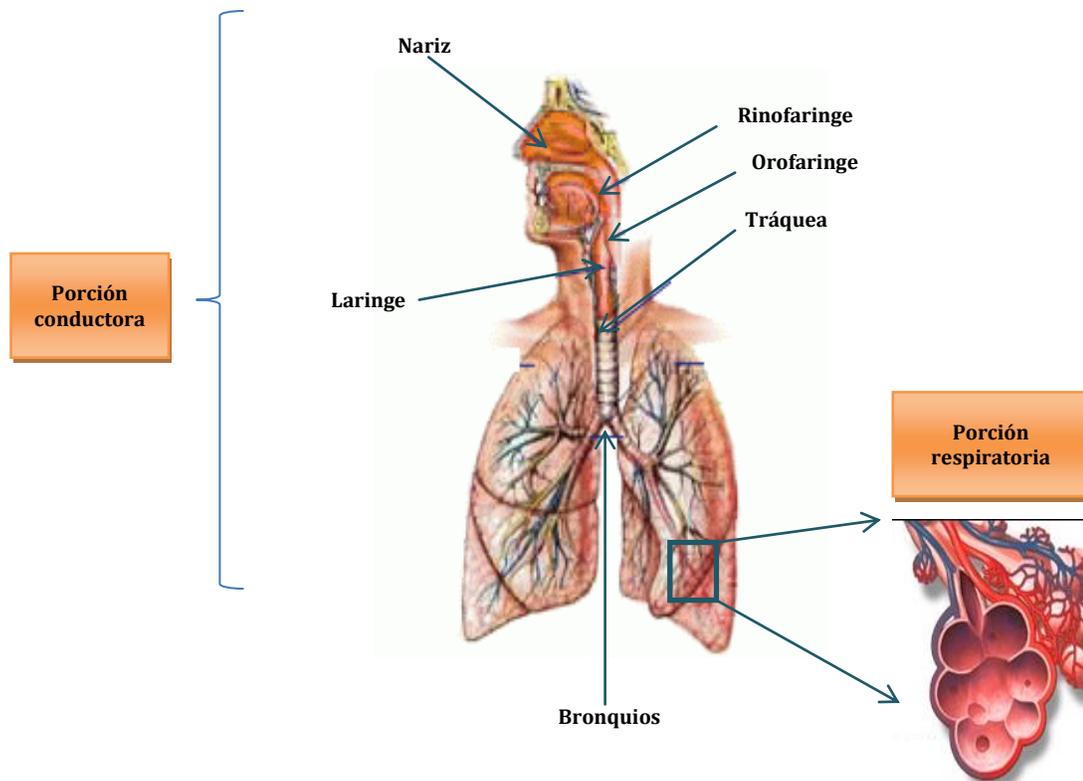


Figura 5. Componentes del aparato respiratorio.

2.13.3 Alvéolos.

Los alvéolos son el sitio donde ocurre el intercambio gaseoso. La extensión de la superficie disponible para el intercambio gaseoso se incrementa por la presencia de éstos. Los alvéolos son espacios aéreos terminales del aparato respiratorio y en estas estructuras ocurren el intercambio gaseoso entre el aire y la sangre. Cada alveolo está rodeado por una red de capilares que ponen la sangre en proximidad estrecha al aire inspirado que está en la luz alveolar (Ham y Cormak, 2000).

En cada pulmón adulto hay entre 150 y 250 millones de alvéolos y su superficie interna es de alrededor de 75 metros cuadrados. Cada alveolo es una cavidad poliédrica de paredes delgadas que mide unos 0.2 mm de diámetro y confluye en un saco alveolar. Estos sacos suelen estar al final de un conducto alveolar pero pueden aparecer en cualquier punto de su longitud y están rodeados y separados unos de otros por una finísima capa de tejido conjuntivo que contiene capilares sanguíneos. El tejido entre los espacios aéreos alveolares contiguos recibe el nombre de tabique alveolar o pared septal (Fawcett, 2005).

El epitelio alveolar está compuesto por varias células especializadas y sus productos, los cuales tienen funciones defensivas y protectoras. Existen las células alveolares tipo I, también conocidas como neumocitos de tipo I, que son células planas muy delgadas que revisten la mayor parte de la superficie de los alvéolos. Las células alveolares de tipo I no son capaces de dividirse. Las células alveolares de tipo II también llamadas neumocitos de tipo II o células de los tabiques son células secretoras. Estas células cúbicas están dispersas entre las células de tipo I pero tienden a congregarse en las uniones septales. Estas células son tan abundantes como las células de tipo I, pero debido a su forma, cubren tan solo alrededor del 5% de la superficie alveolar. Al igual que las células de Clara, las células de tipo II hacen protusión hacia el espacio aéreo. Las células alveolares de tipo II son las progenitoras de las células alveolares de tipo I. Luego de lesiones pulmonares éstas proliferan y restauran ambos de tipos de células alveolares dentro del alveolo (Diagnóstico Histológico, 2000; Ross, *et al.*, 2005).

Los macrófagos alveolares eliminan partículas inhaladas de los espacios aéreos y eritrocitos del tabique. Estos derivan de los monocitos de la sangre y pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Algunos macrófagos repletos de material fagocitado ascienden por el árbol bronquial en el moco y son deglutidos o expectorados al llegar a la faringe. Otros macrófagos, retornan al tejido conjuntivo del tabique o se quedan en éste, donde repleto de material de fagocitosis acumulado pueden permanecer durante una gran parte de la vida de una persona. Así en la autopsia, los pulmones de los habitantes de las ciudades como los de los fumadores, suelen exhibir muchos macrófagos alveolares y septales repletos de partículas de carbón (Ross, *et al.*, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

Se considera que el manganeso ha incrementado en el ambiente, ya que estudios en el tejido pulmonar de casos de autopsia realizados en la Ciudad de México, demostraron lo anterior y dado que este elemento es altamente reactivo, de acuerdo con su estado de oxidación, es importante evaluar sus efectos.

Debido a que el cerebro es el órgano blanco para este metal, la mayoría de los estudios realizados se han enfocan en sistema nervioso central, por lo que es de importancia conocer sus efectos en el sistema respiratorio e identificar algunos marcadores que nos indiquen la severidad de la respuesta de acuerdo con el compuesto al que se esté expuesto y el tiempo de la exposición.

4. HIPÓTESIS

La inhalación de cloruro de manganeso y acetato de manganeso ocasionarán cambios morfológicos en la porción terminal de la vía aérea, que se podrán identificar y comparar en estudios histológicos utilizando la microscopía óptica.

Además, estos cambios se relacionarán con diferencias en la severidad de respuesta inflamatoria (IL-6) y el estrés nitrosante (nitrotirosina) que se relacionarán con el compuesto y el tiempo de exposición.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar los cambios histológicos e inmunohistoquímicos en el bronquiolo terminal por la inhalación de cloruro o acetato de manganeso, en un modelo murino.

Relacionar los cambios morfológicos con el tipo de compuesto, el tiempo de exposición, el cese de la misma y la presencia de inflamación y estrés nitrosante.

5.1 Objetivos particulares.

Evaluar por histológica las diferencias morfológicas de acuerdo con el compuesto empleado y el tiempo de exposición utilizando las tinciones de Hematoxilina y Eosina y tricrómica de Masson.

Evaluar por inmunohistoquímica las diferencias en la inducción de inflamación de acuerdo con el compuesto empleado y el tiempo de exposición utilizando IL-6 como marcador.

Evaluar por inmunohistoquímica las diferencias en la inducción de estrés nitrosante de acuerdo con el compuesto empleado y el tiempo de exposición, utilizando nitrotirosina como marcador.

6. MATERIAL Y MÉTODO.

6.1 Material biológico.

Se emplearon 70 ratones machos de la cepa CD1 de 35 ± 5 g de peso que se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad (12:12 h) con agua y alimentación *ad libitum*.

Los 70 animales se dividieron en 5 grupos: (1) control que inhaló el vehículo (solución salina), (2) expuesto a $MnCl_2$, (3) expuesto a $Mn(AO)_3$, (4) exposición a cloruro de manganeso y posteriormente suspensión del tratamiento y (5) exposición a acetato de manganeso y posteriormente suspensión del tratamiento.

Los grupos con tratamiento inhalaron una solución 0.02M de cloruro de manganeso y solución 0.01M de acetato de manganeso por ocho semanas, una hora dos veces por semana. Los grupos en suspensión inhalaron de igual forma solución de acetato de manganeso (0.01M) o solución de cloruro de manganeso (0.02M) por ocho semanas, y al término de éstas, se dejaron sin tratamiento por 1 y 2 meses después de la última inhalación, para posteriormente sacrificarlos.

Para la inhalación los animales fueron colocados en una caja de acrílico (45 x 21 x 35 cm), inhalaron el vehículo (solución salina), el acetato de manganeso o el cloruro de manganeso, según el caso. La solución se dispersó en la cámara con un Ultranebulizador UltraNeb 99 (DeVilbiss) con flujo de 10 L/min.

6.2 Obtención de la muestra.

Los animales se sacrificaron a las dos, cuatro, seis y ochos semanas de exposición, por la aplicación de una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Posteriormente, se perfundieron por vía intratraqueal a capacidad pulmonar total (CPT) con paraformaldehído al 4%, se extrajo el bloque pulmonar que fueron incluidos en bloques de parafina para realizar cortes con el micrótopo de 3 a 5 micras de espesor y así llevar a cabo su análisis por microscopía de luz con las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HE) y tricrómica de Masson. En cada caso se analizó el bronquiolo con base en los siguientes parámetros: alteración epitelial, descamación de células, aumento de tejido conectivo y edema. Posteriormente, se llevó a cabo el análisis morfométrico con ayuda del programa IMAGE PRO V 6.0 para evaluar los cambios morfológicos en el tejido conectivo de pulmones expuestos a cada compuesto, para este análisis las laminillas teñidas con tricrómica de Masson

fueron observadas a 400 aumentos, se evaluó toda laminilla y se fotografiaron las áreas más representativas; de cada 5 campos se tomaron 3. Para examinar la alteración epitelial y la descamación de células se utilizaron laminillas teñidas con Hematoxilina y Eosina, fueron observadas a 1000 aumentos, se analizó toda la laminilla, se fotografiaron las áreas más representativas (5/3), como se indica en la tabla 1.

Se analizaron 10 animales control, 40 expuestos durante 2, 4, 6 y 8 semanas tanto de cloruro de manganeso como de acetato de manganeso (5 ratones por grupo/cada compuesto), y 20 animales (5 por grupo) que fueron tratados por 8 semanas, y posteriormente se les suspendió la exposición de cloruro de manganeso o acetato de manganeso se evaluaron a 1 y otros a 2 meses después (Figura 6).

6.3 Inmunohistoquímica.

Se realizaron cortes en blanco para evaluar los siguientes marcadores: IL-6, y nitrotirosina. Los cortes se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en alcoholes graduales.

Con la finalidad de desenmascarar epítomos, se llevó a cabo la recuperación antigénica con Declere, en una olla de presión a 15 Psi, durante 3 minutos. Se realizaron los lavados de PBS (3 de 5 min) y uno de PBS albúmina (1 de 10 min). Se incubó el anticuerpo primario de los distintos marcadores: en el caso de IL-6 se utilizó una concentración 1:100 (anticuerpo monoclonal IL-6 Santa Cruz Biotechnology), mientras que la concentración de nitrotirosina fue 1:50 (anticuerpo monoclonal anti-nitrotirosina Chemicon International) La incubación del anticuerpo fue de 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 Dako universal LSAB + System HRP (concentración nuevamente 1:100 y 1:50 respectivamente) 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. Utilizando el software Image-Pro V 6., se cuantificó la densidad media de la marca en pixeles en microfotografía y se compararon los resultados.

Esta cuantificación se realizó a 1000 aumentos, debido a que es un análisis más específico, ya que en este caso principalmente se basa en la observación del epitelio bronquiolar. Se revisaron todos los cortes pertenecientes a los diferentes tratamientos y semanas de exposición, así como de post-exposición; nuevamente la evaluación se realizó en todas las lamillas, tomando las áreas más representativas, de cada 5 campos 3 fueron cuantificados con el software (Figura 6).

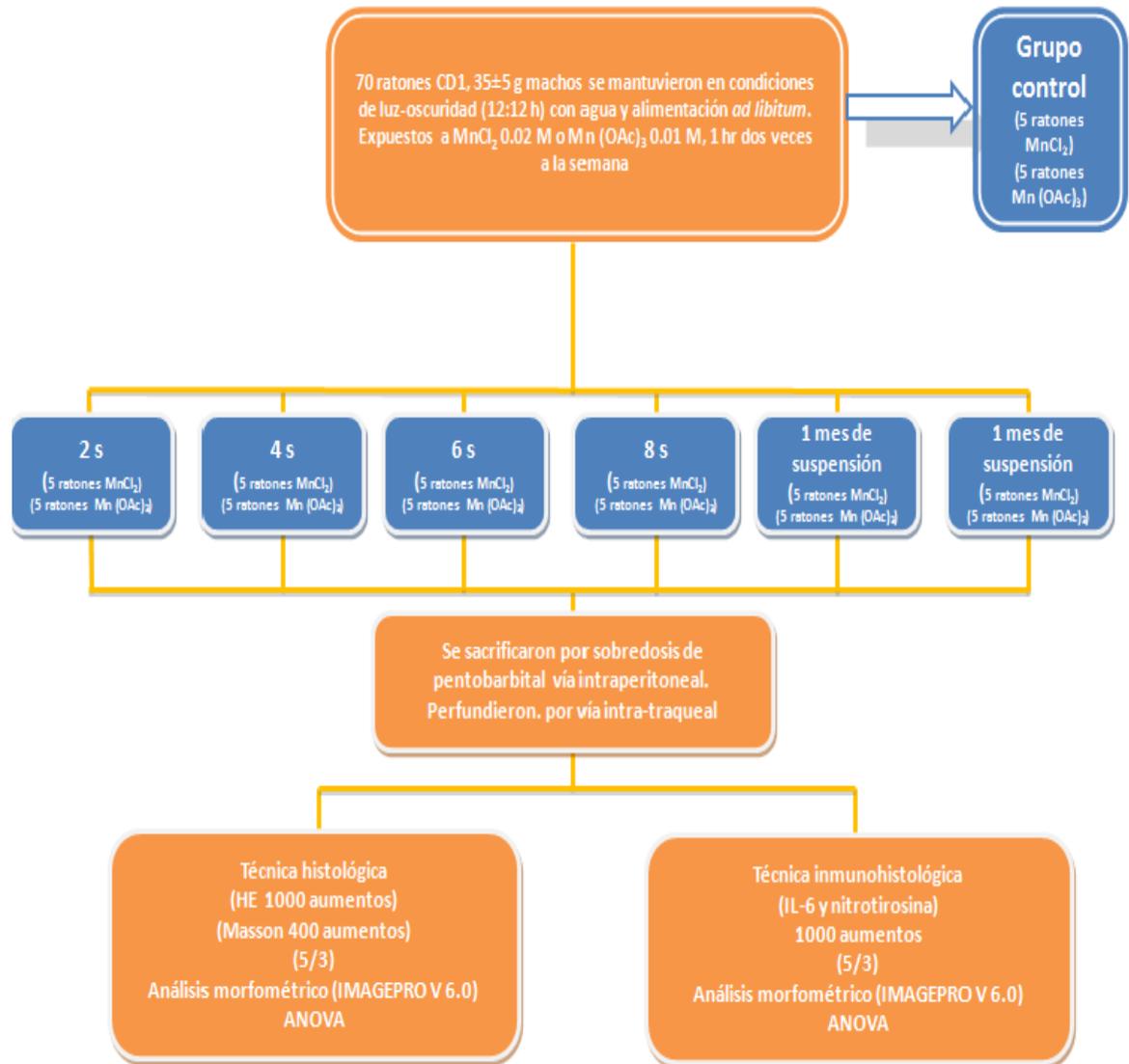


Figura 6. Método experimental utilizado.

	Tinción HE (MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃)	Tinción Masson (MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃)	Densidad media tejido conectivo Masson (MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃)	Densidad media IL-6 (MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃)	Densidad media nitrotirosina (MnCl ₂ y Mn (OAc) ₃)
Laminillas observadas	42 laminillas por cada grupo expuesto y por cada tratamiento administrado.	42 laminillas por cada grupo expuesto y por cada tratamiento administrado.	42 laminillas por cada grupo expuesto y por cada tratamiento administrado.	56 laminillas por cada grupo expuesto y por cada tratamiento administrado.	56 laminillas por cada grupo expuesto y por cada tratamiento administrado.
Aumentos	1000 aumentos	400 aumentos	400 aumentos	1000 aumentos	1000 aumentos
# campos	5 de cada 3	5 de cada 3	5 de cada 3	5 de cada 3	5 de cada 3

Tabla 1. Esta tabla muestra el número de lamillas, aumentos y número de campos analizados en las diferentes pruebas realizadas a lo largo de este estudio.

7. RESULTADOS.

7.1 Resultados MnCl₂ y Mn (OAc)₃ tinción HE.

En los cortes de pulmón, teñidos con HE se observó de forma detallada el epitelio bronquiolar. En el caso de los grupos controles de ambos compuestos no se observó ningún tipo de cambio significativo. Los grupos de 2, 4 y 6 semanas tratados con MnCl₂ y Mn (OAc)₃ no mostraron cambios relevantes en la integridad de su epitelio bronquiolar. Sin embargo los grupos pertenecientes a 8 semanas expuestos a MnCl₂ y Mn (OAc)₃ se observó descamación de células epiteliales a lo largo del epitelio bronquiolar, este cambio es más severo en el grupo expuesto a acetato de manganeso. Los cambios más drásticos fueron observados en los grupos expuestos durante 8 semanas y que posteriormente se les suspendió el tratamiento por 1 y 2 meses. Los cambios identificados fueron la aparición de infiltrado inflamatorio en la periferia de los bronquiolos, al comparar ambos compuestos se muestra que el grosor de la capa muscular es mayor en los expuestos a Mn (OAc)₃. Figura 7.

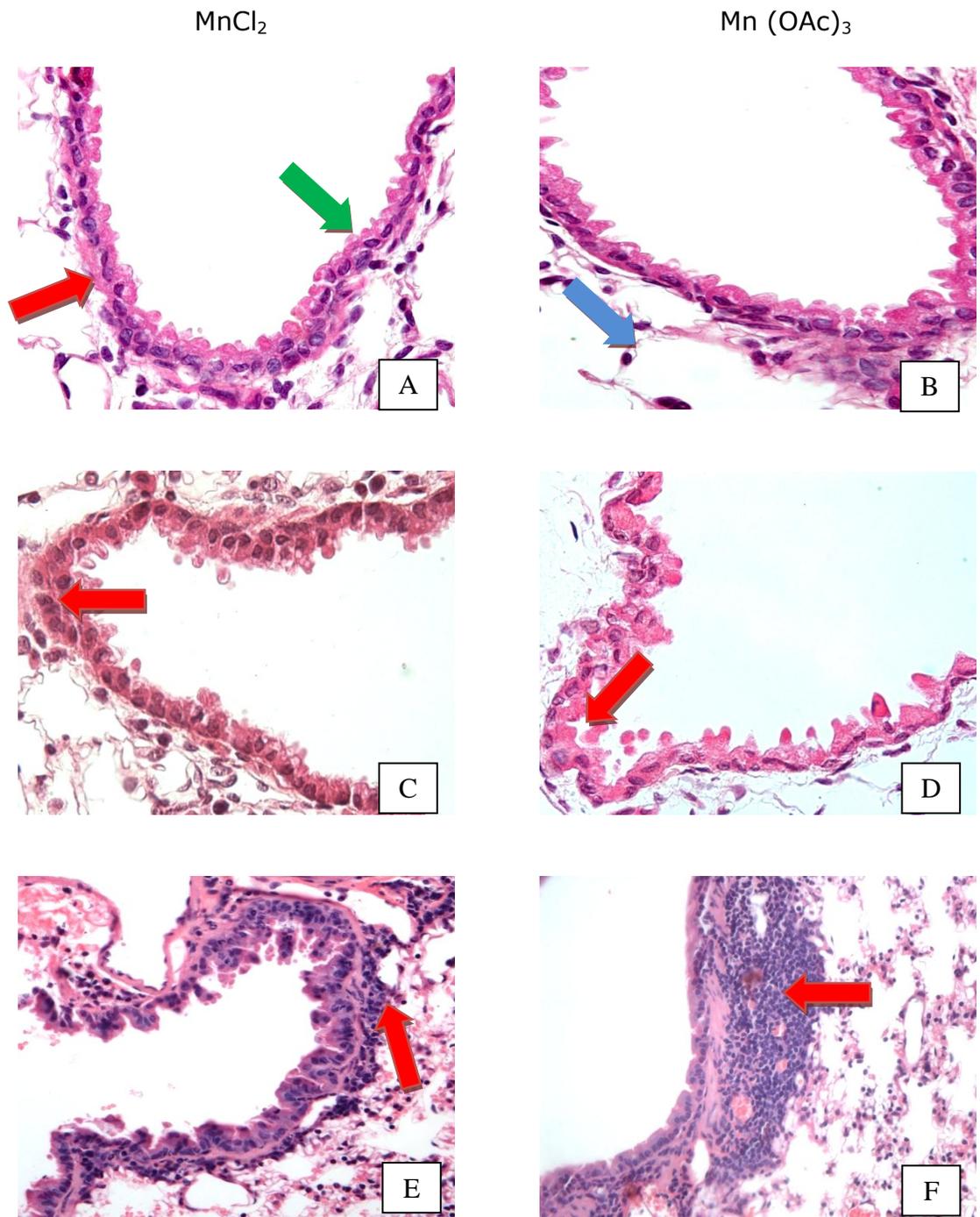


Figura 7. En la imagen 7A se observa la membrana basal (flecha roja) y células epiteliales bronquiolares (flecha verde) de un corte de pulmón de un animal del grupo control de $MnCl_2$ (100X), mientras que en 6B se observan los alveolos (flecha azul) del control de $Mn(OAc)_3$ (100X). En ambos paneles la integridad del epitelio bronquiolares se encuentra intacta y no se observa ningún tipo de cambio. En la imagen 7C y 7D se observan los cambios en el epitelio bronquiolares después de 8 semanas de inhalación de $MnCl_2$, o $Mn(OAc)_3$, en los que se hace evidente la descamación de células epiteliales (flecha roja). (100x). El panel 7E muestra un bronquiolo de un ratón expuesto a $MnCl_2$ y con un mes después de haber suspendido la exposición. Se observa la presencia de infiltrado inflamatorio en toda la periferia de la estructura

mencionada (flecha roja). En el caso de $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ (7F) el infiltrado es mucho más evidente y se aprecia aumento en el grosor de la capa muscular (flecha roja) (40X).

7.2 Resultados MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ tinción MASSON.

Al analizar los controles teñidos con Masson de ambos compuestos (MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$) se observó nuevamente que la integridad del bronquiolo permanece intacta, no hay presencia de fibrosis ni inflamación.

Por otra parte al examinar los grupos de 2, 4 y 6 semanas expuestos a cloruro de manganeso y acetato de manganeso, no se evidenciaron cambios morfológicos. Las diferencias morfológicas comienzan a ser observables en 8 semanas de exposición, en donde se muestra aumento de tejido conectivo y aparición de infiltrado inflamatorio peribronquiolar. Estas modificaciones se dan en ambos compuestos, sin embargo la severidad es más contundente en los expuestos a $\text{Mn}(\text{OAc})_3$; además este compuesto induce la presencia de edema peribronquilar.

En los periodos sin exposición a 1 y 2 meses los resultados son similares en ambos compuestos; el pulmón se caracteriza por la presencia de edema, tejido conectivo y células inflamatorias, nuevamente la severidad es mayor en los grupos tratados con acetato de manganeso.

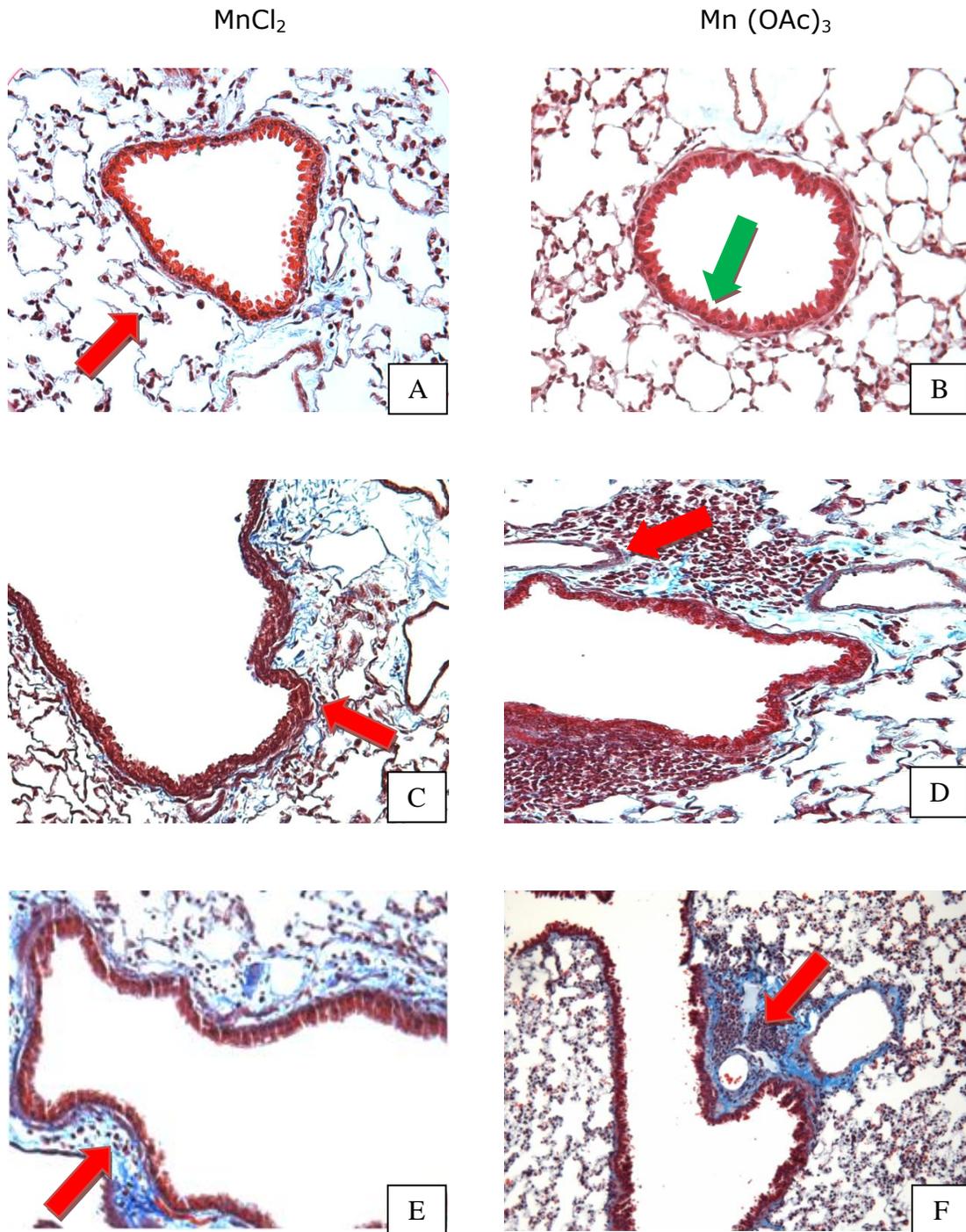


Figura 8. En 8A se aprecia los alveolos (flecha roja) control de $MnCl_2$ y en la imagen 8B el control de $Mn(OAc)_3$, en estas imágenes el epitelio bronquiolar conserva su integridad (flecha verde) y no hay cambios sugerentes de fibrosis o inflamación (40x).

Los cambios resaltan en los grupos expuestos a 8 semanas, por una parte en los tratados con $MnCl_2$ (8C) se nota aumento de tejido conectivo (flecha verde) y la aparición de infiltrado inflamatorio peribronquiolar (flecha roja), al comparar estos cambios histológicos con

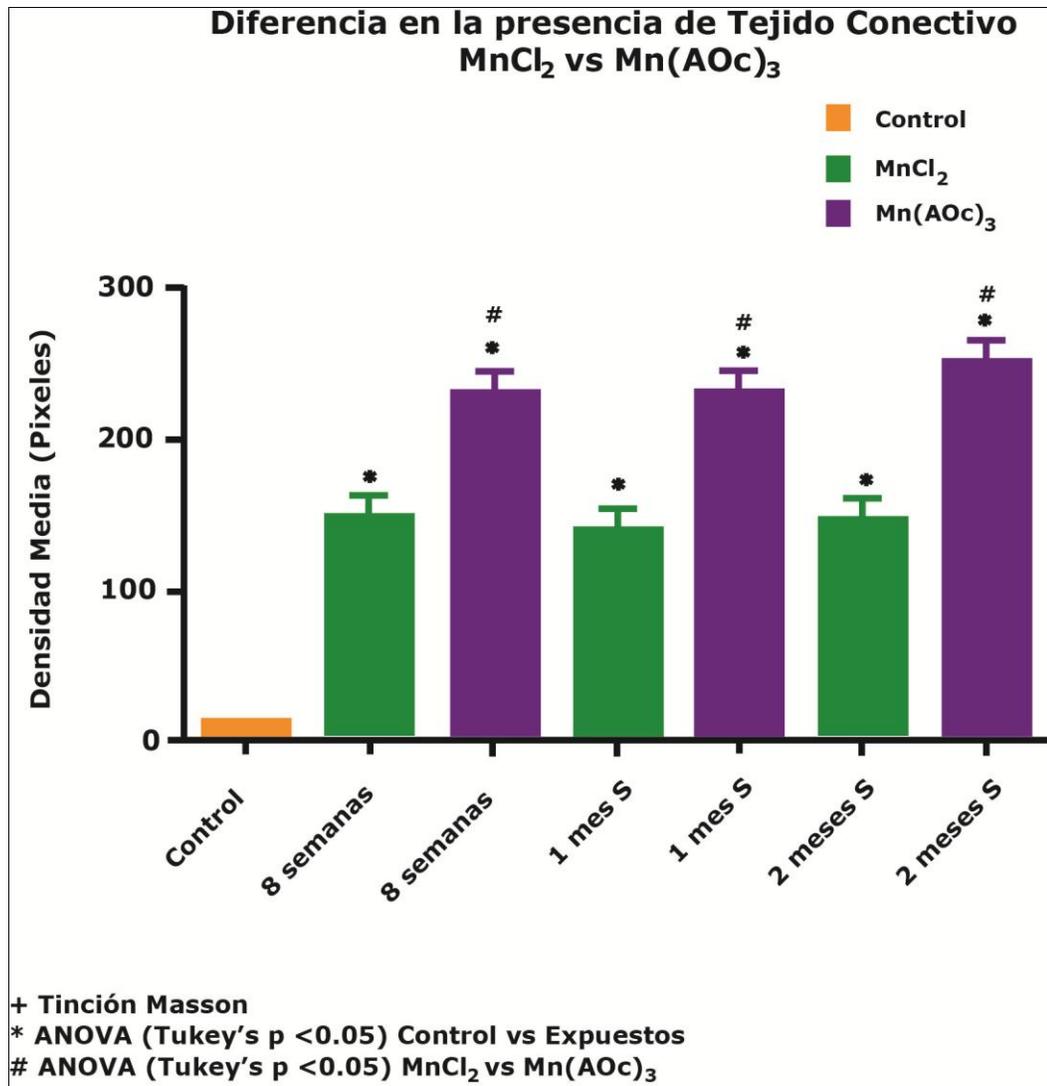
el grupo tratado con $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ (8D) se distinguen estos mismos pero con mayor severidad, así como la presencia de edema peribronquiolar (flecha roja) (40x).

La imagen 8E (MnCl_2), durante el periodo de 1 mes sin exposición, persiste ligero edema y la presencia de escaso tejido conectivo, así como escasas células inflamatorias (flecha roja). Para el grupo expuesto a $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ y con un mes sin exposición (panel 8F), los cambios inflamatorios son más severos (flecha roja) (40x).

7.3 Densidad media de tejido conectivo.

Al cuantificar la densidad media de tejido conectivo de los diferentes grupos tratados con cloruro de manganeso o acetato de manganeso se encontró que los controles de ninguno de los compuestos mostraron cambios significativos en el incremento de este tejido.

Al medir la densidad media de los grupos tratados con MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{AOC})_3$ por 2, 4 y 6 semanas se observó que el aumento de tejido conectivo no fue significativo; estas diferencias lograron ser significativas hasta las 8 semanas de exposición, 1 y 2 meses de suspensión de los tratamientos. Sin embargo al comparar entre compuestos el aumento de tejido conectivo fue mayor en los grupos tratados con acetato de manganeso (Gráfica 1). En la misma gráfica se muestra que al comparar el grupo control contra los grupos expuestos tanto a MnCl_2 como a $\text{Mn}(\text{AOC})_3$ existen diferencias significativas respecto al aumento de tejido conectivo en los grupos de 8 semanas, 1 mes de suspensión y 2 meses de recuperación (gráfica 1).



Gráfica 1. Densidad media de tejido conectivo en los distintos grupos de tratamiento.

7.4 Resultados MnCl₂ y Mn (OAc)₃. Inmunohistoquímica IL-6.

El análisis inmunohistoquímico realizado con IL-6 nos indicó cuales son los grupos y que compuestos son capaces de iniciar procesos inflamatorios. En los grupos controles tanto de MnCl₂ como de Mn (OAc)₃ no se observa marca de IL-6 en las regiones de los bronquiolos.

La expresión de IL-6 fue evidente en todos los grupos expuestos a MnCl₂, desde las 2 semanas la marca apareció, aumentando a las 4 semanas de exposición, para disminuir a las 6 y 8 semanas, así como a 1 mes de suspensión; finalmente el marcaje de IL-6 volvió aumentar en el grupo de 2 meses de suspensión. La marca de IL-6 en todos los grupos se observó en la zona apical de las células epiteliales, la membrana basal y el tejido peribronquiolar.

En el caso de los grupos expuestos a Mn (OAc)₃, la marca de IL-6 fue observable a las 2 semanas de exposición. A las 4 semanas la marca de IL-6 aumento notablemente, sin embargo en los grupos expuestos a 6 y 8 semanas, así como 1 mes de suspensión no se observaron cambios de marcaje en las regiones de los bronquiolos. En contraparte la expresión de IL-6 volvió a aumentar notablemente a los 2 meses de suspensión y, la marca aparece en zonas apicales de células epiteliales, membrana basal y tejido peribronquiolar.

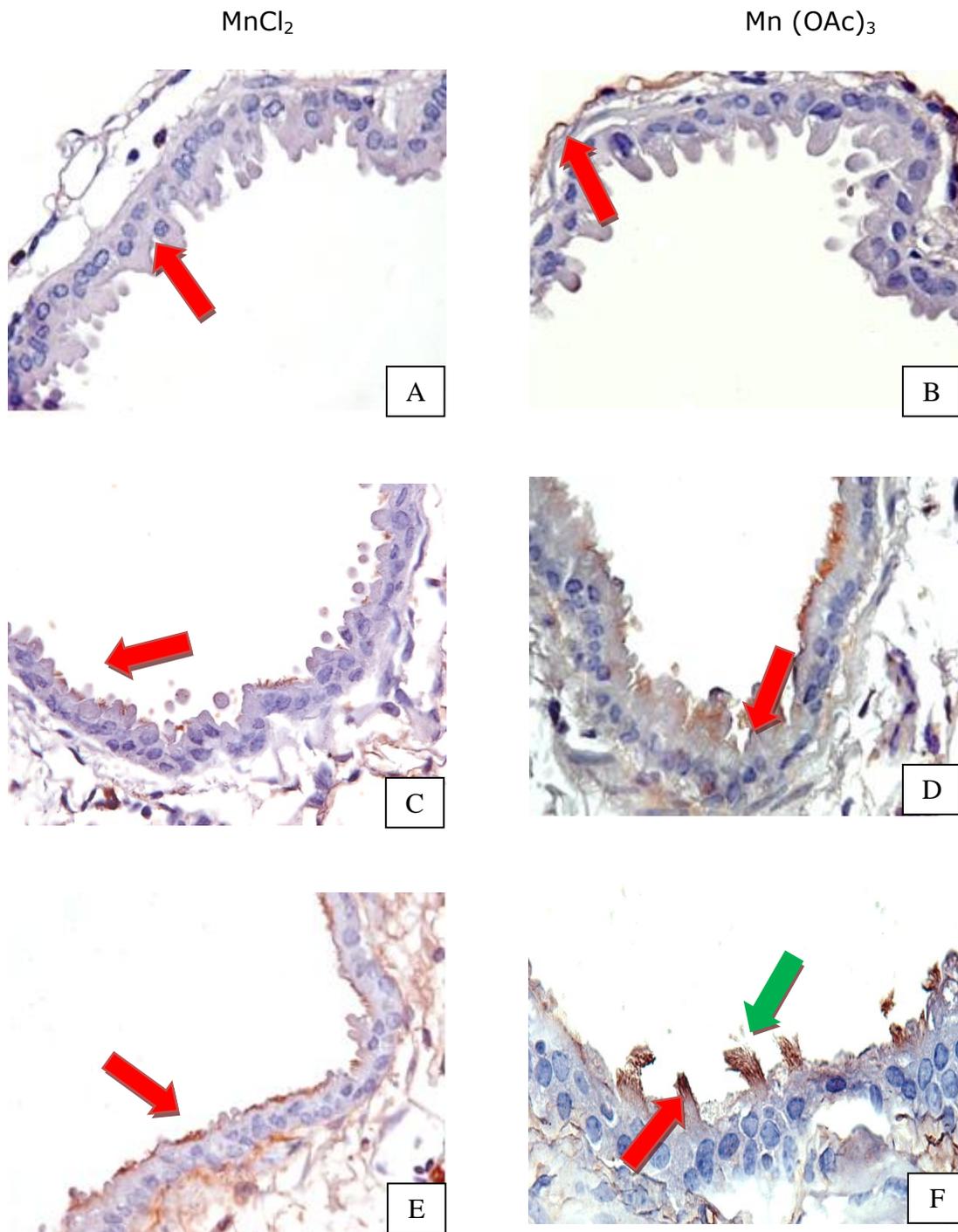


Figura 9. Marca de IL-6 en los diferentes grupos expuestos a MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$, (100X).

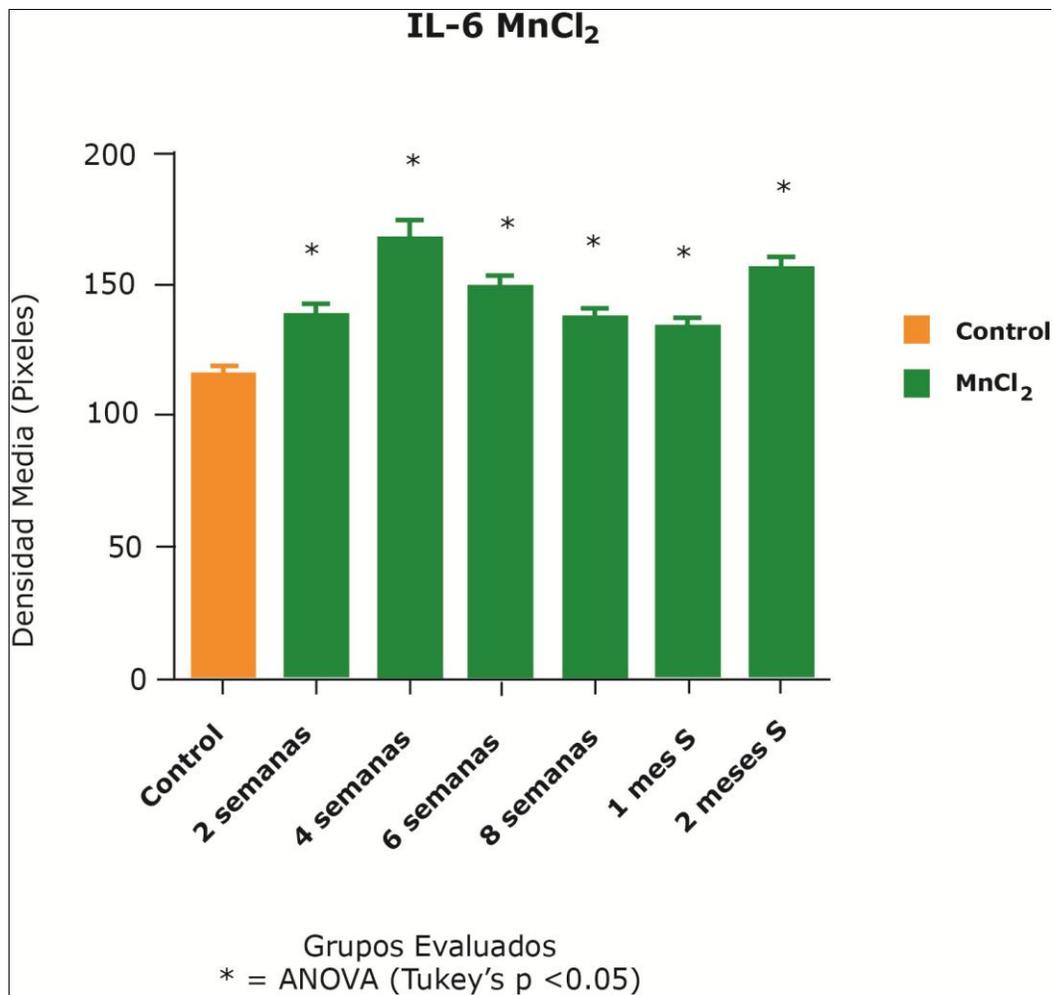
En las imágenes 9A (MnCl_2 control) se observan las células epiteliales bronquiolares intactas (flecha roja) y 9B ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$ control) muestra la membrana basal (flecha roja), en ninguno de los controles existe marca de IL-6, mientras que en 9C (MnCl_2) y 9D ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$) ambos expuestos a 4 semanas, se reconoce la marca de IL-6 en la zona apical de las células epiteliales (flecha roja, 9C y 9D) y membrana basal y el tejido peribronquiolar.

Finalmente en la imagen 9E MnCl_2 (2 meses de recuperación) el marcaje comienza a aumentar en la zona apical de las células epiteliales (flecha roja) y membrana basal al compararlo con 8C, mientras que en la imagen 9F, tratados con $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ y de grupo 2 mes de suspensión. La marca de IL-6 se localiza nuevamente en la zona apical de las células epiteliales (flecha roja) y membrana basal. Da la impresión de salida del material celular hacia la luz del bronquiolo (flecha verde).

7.5 Densidad media IL-6.

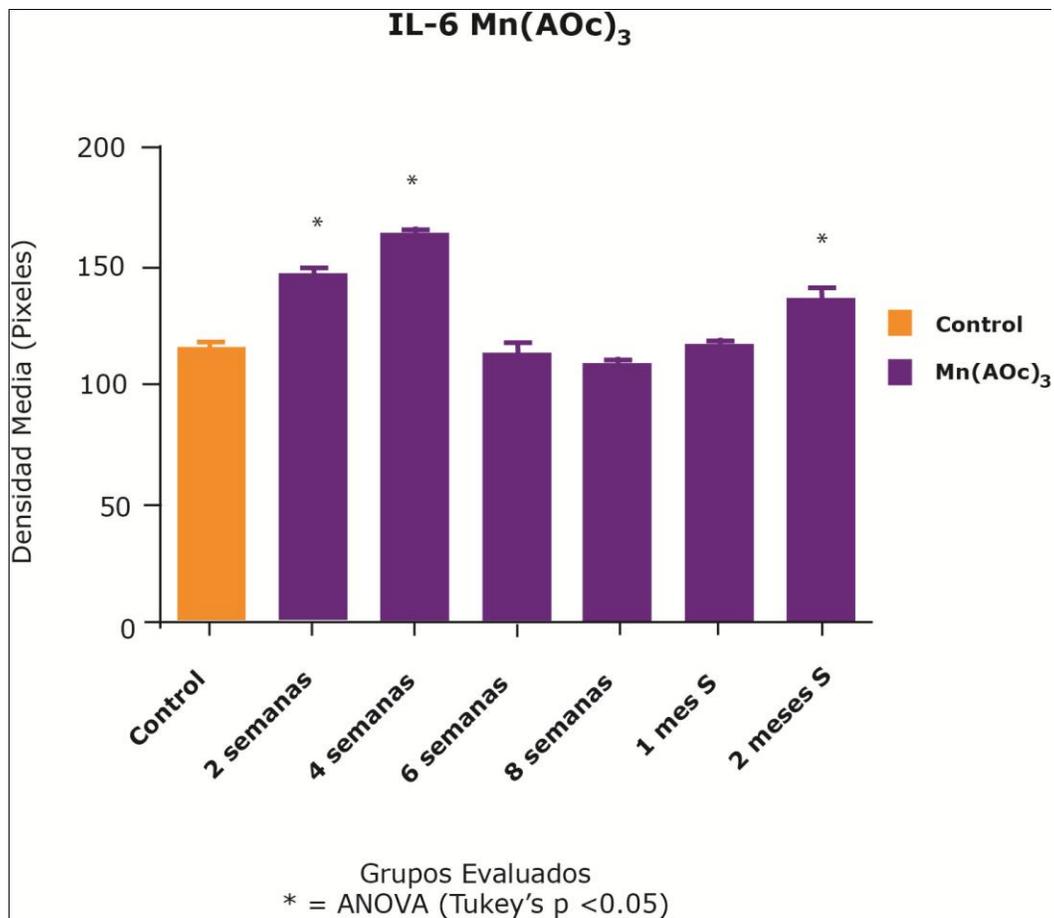
En los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico para IL-6 en animales expuestos a MnCl_2 se observa que todos los grupos expuestos son diferentes al control.

La marca de IL-6 se observa desde las 2 semanas de exposición hasta los 2 meses de sin exposición, sin embargo la intensidad de la marca aumenta a las 4 semanas, posteriormente disminuye en 6, 8 semanas y 1 mes de suspensión para finalmente aumentar a los 2 meses sin exposición. Las diferencias estadísticamente significativas se observaron en todos los grupos tratados con MnCl_2 al comprarlos con el control siendo más evidentes en 4 semanas y 2 meses de suspensión de los tratamientos (gráfica 2).



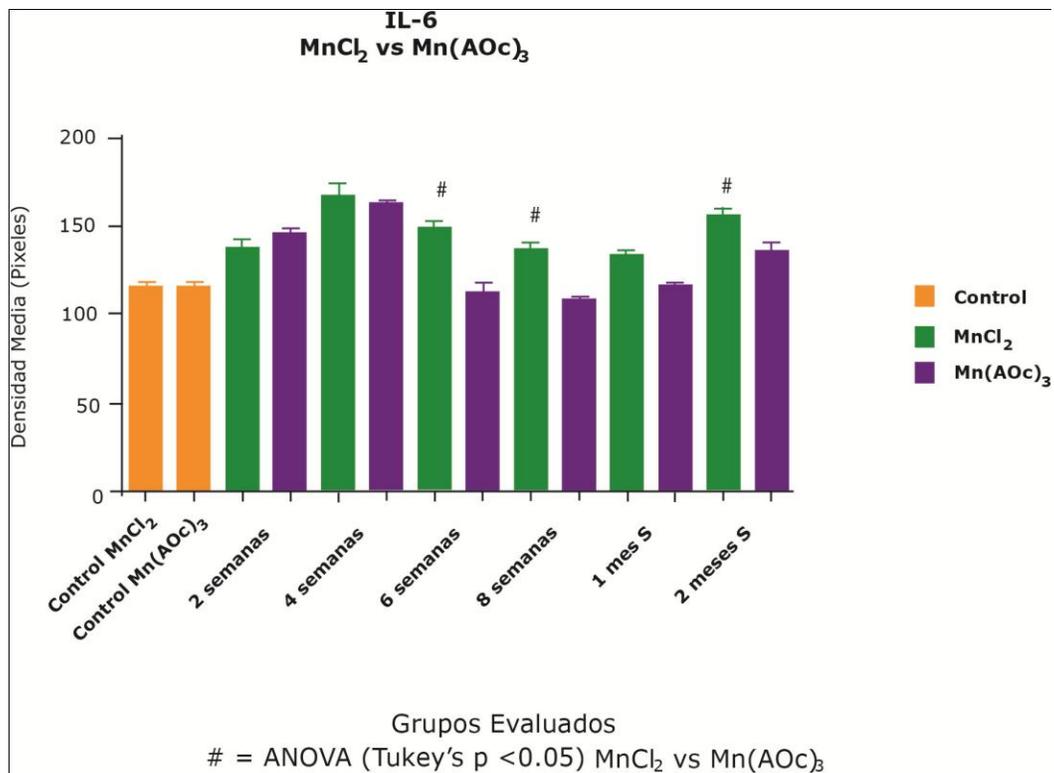
Grafica 2. Densidad media de IL-6 de los grupos expuestos a $MnCl_2$ comparados con el grupo control.

Por otro lado, los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico para IL-6 en animales expuestos a $Mn(AOC)_3$ mostraron que la marca para IL-6 es notable a las 2 semanas de exposición y aumentó en 4 semanas. Sin embargo en 6 y 8 semanas y 1 mes sin exposición no existen cambios significativos. Finalmente a los 2 meses de suspensión del tratamiento se observó, nuevamente incremento en la intensidad de la marca. Al comparar los grupos expuestos vs. control se aprecian cambios significativos en 2 y 4 semanas, así como a los 2 meses de suspensión (gráfica 3).



Gráfica 3. Densidad media de IL-6 en animales tratados con Mn (AOc)₃. Comparación de grupos expuestos vs. control.

Para concluir el análisis inmunohistoquímico realizado con IL-6 se compararon los grupos expuestos al mismo número de semanas, pero con los diferentes compuestos (MnCl₂ vs. Mn (AOc)₃). No se observaron cambios significativos a las 2 semanas, 4 semanas y 1 mes de suspensión, pero los cambios son notables en los grupos que fueron expuestos por 6 y 8 semanas, así como en el grupo de 2 meses de suspensión (gráfica 4).



Gráfica 4. Densidad media de IL-6 en los pulmones de animales expuestos a MnCl₂ y Mn(AOAc)₃. Comparación entre los compuestos utilizados.

7.6. Resultados MnCl₂ y Mn (OAc)₃ Inmunohistoquímica Nitrotirosina.

En los controles de ambos compuestos (MnCl₂ y Mn (OAc)₃) la marca de nitrotirosina es tenue a lo largo del epitelio alveolar que rodea el bronquiolo. En los grupos expuestos a cloruro de manganeso se observó que la marca de nitrotirosina se conservó tenue a las 2, 4 y 6 semanas de exposición, en cuanto a las 8 semanas la expresión de nitrotirosina aumento de forma notable. Este mismo aumento se observó a 1 y 2 meses de suspensión de los tratamientos; en estos grupos la nitrotirosina se observó en células del epitelio bronquiolar, células inflamatorias y células alveolares.

En lo que concierne a la exposición de Mn (OAc)₃ la nitrotirosina se hizo presente desde las 2 semanas de exposición, aumentando a las 4 semanas, disminuyendo en 6 y 8 semanas, para nuevamente incrementar su expresión a 1 y 2 meses de suspensión de los tratamientos. La marca en estos grupos es más acentuada en el parénquima alveolar y se limita a la superficie bronquiolar, sin embargo en todos grupos donde se expresó la nitrotirosina, se localizó en áreas de citoplasma de células epiteliales, células inflamatorias y células alveolares.

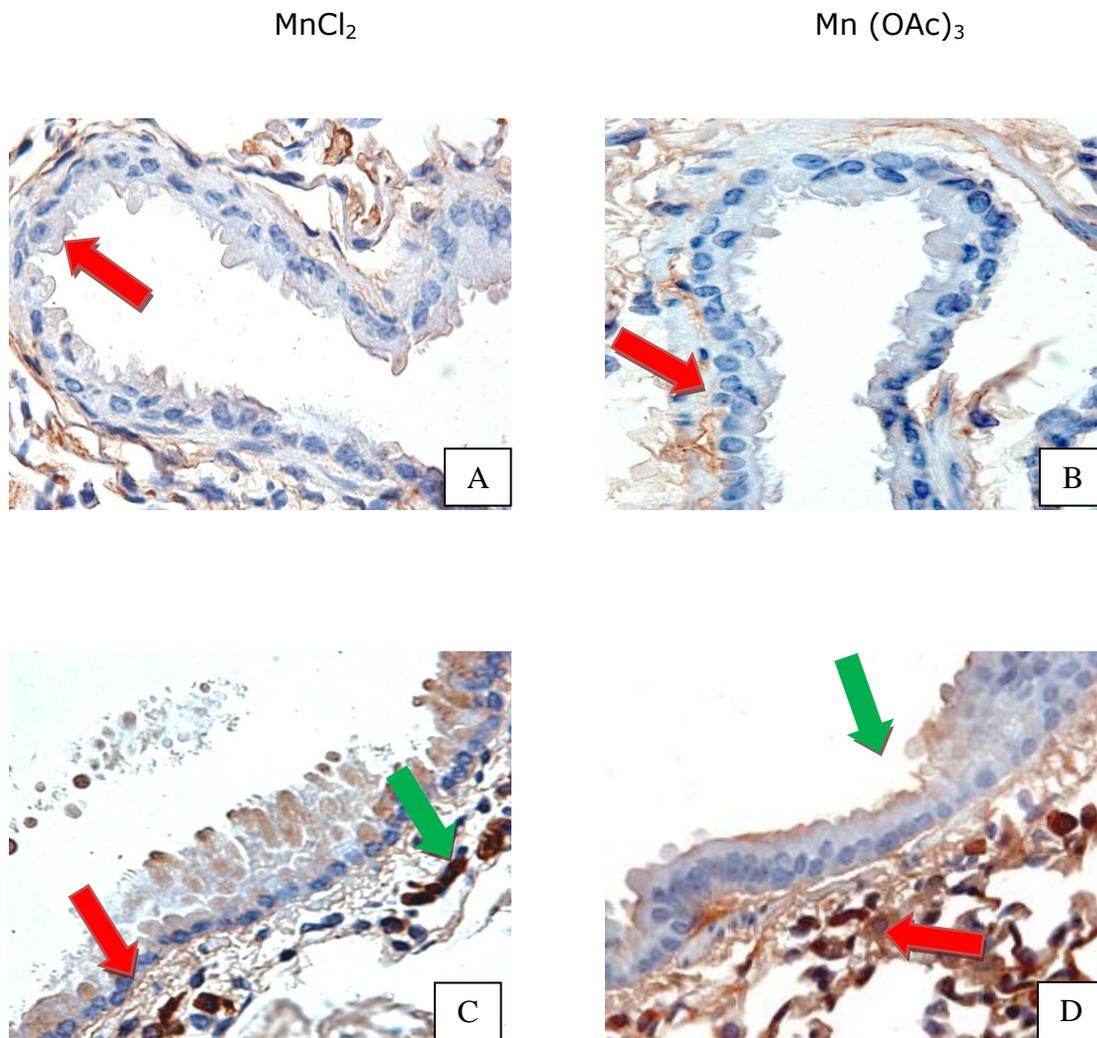
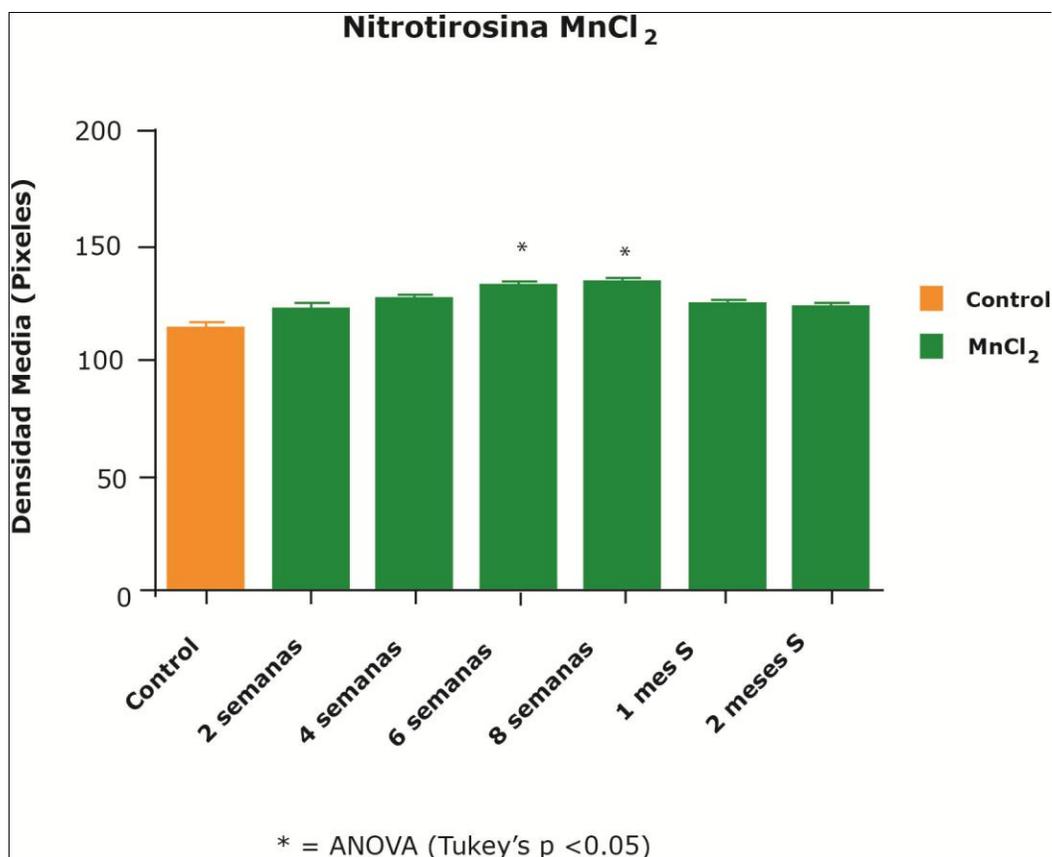


Figura 11. Marca de nitrotirosina en los diferentes grupos expuestos a $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ (100X). En la figura se observan los controles de los diferentes compuestos 11A ($MnCl_2$) indica células epiteliales bronquiolares (flecha roja) y la 11B muestra membrana basal (flecha roja) ($Mn(OAc)_3$), se observa muy tenue la marca en la en epitelio alveolar que rodea al bronquiolo (100 x).

En la figura 11C, la marca se distingue en el citoplasma de las células epiteliales (flecha roja), en las células inflamatorias y en los alveolos (flecha verde); estos cambios corresponden al grupo tratado con $MnCl_2$ de 1 mes sin exposición. En contraparte, en la imagen 11D tratada con $Mn(OAc)_3$ y 1 mes sin exposición, la marca es mucho más acentuada en el parénquima alveolar (flecha roja), y se limita a la superficie epitelial bronquiolar (flecha verde) (100x).

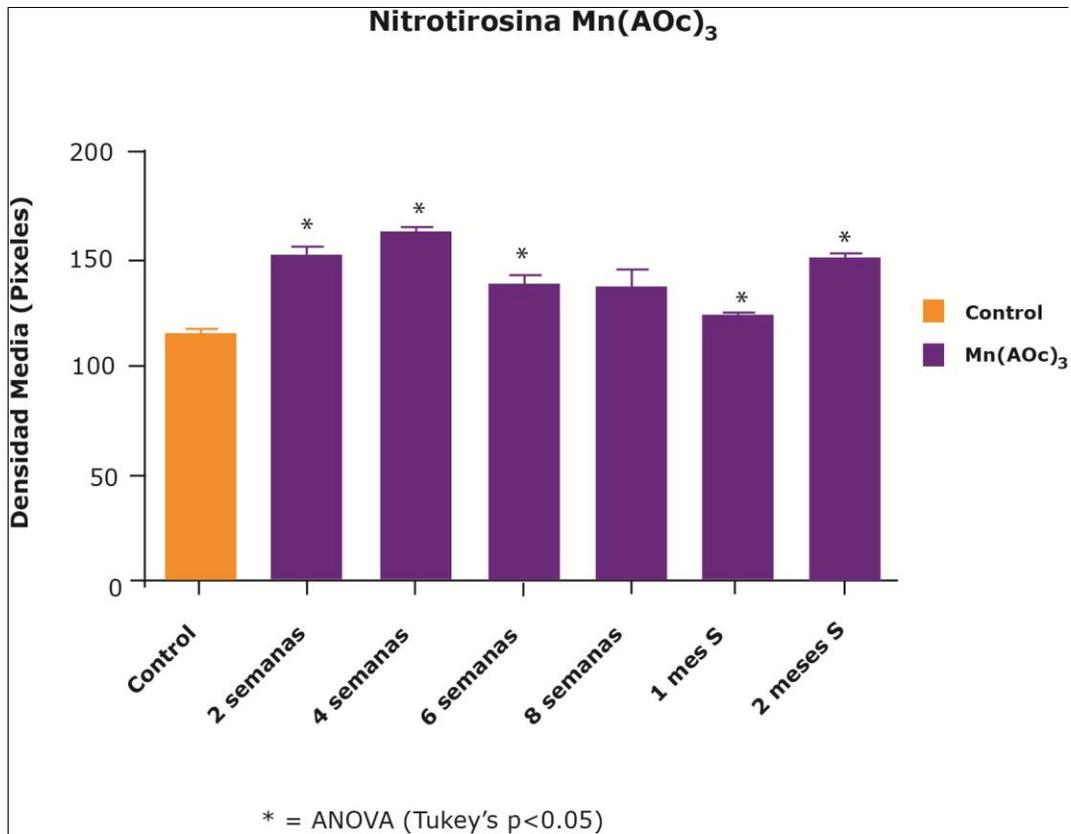
7.7 Densidad media nitrotirosina.

La comparación de los grupos expuestos a cloruro de manganeso contra el control evidencian que no existen cambios significativos a las 2 y 4 semanas de exposición; la marca de nitrotirosina aumenta su intensidad significativamente a 6 y 8 semanas de exposición, para finalmente disminuir en 1 y 2 meses de suspensión de los tratamientos (gráfica 5).



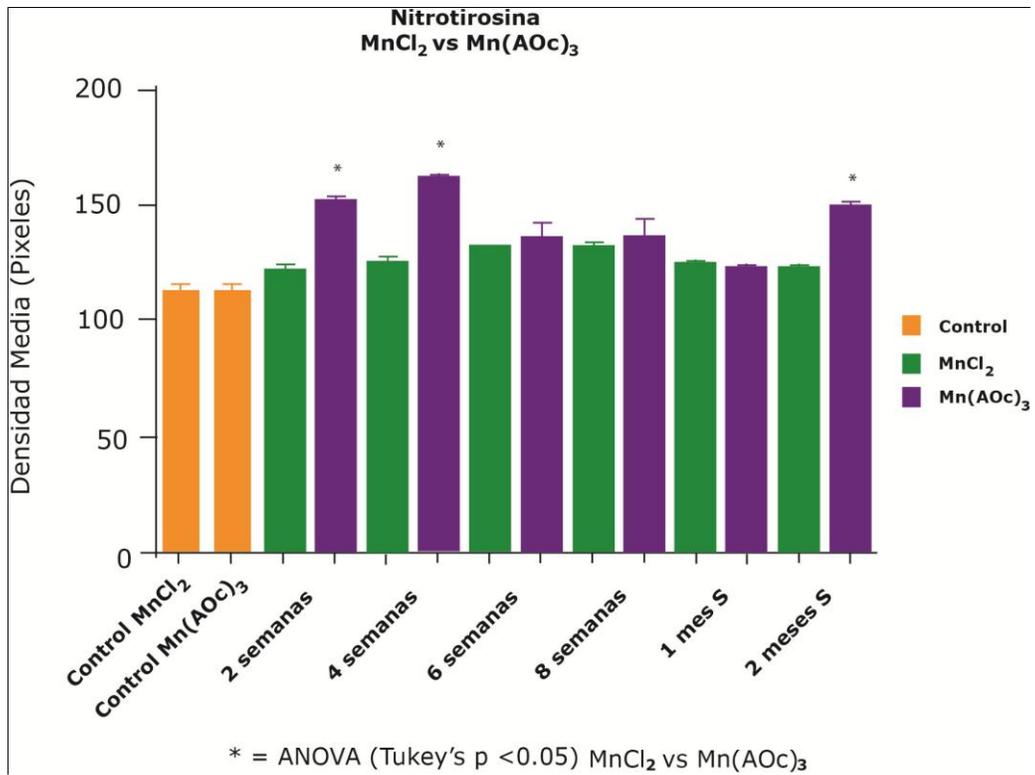
Gráfica 5. Densidad media de nitrotirosina de los grupos expuestos a $MnCl_2$ comparación entre los grupos expuestos vs. control.

En los resultados obtenidos del análisis inmunohistológico para nitrotirosina en animales expuestos a $Mn(OAc)_3$, al comprar estos grupos contra el control se encontró que la marca de nitrotirosina se hace notoria de forma más temprana iniciando desde las 2 semanas de exposición, en 4 semanas la intensidad de nitrotirosina aumenta notablemente, a las 6 disminuye pero es mayor que el control, para finalmente a las 8 semanas disminuir de forma tal que no hay diferencias significativas con el control. Sin embargo al mes de suspensión vuelve a aumentar para finalmente tener la mayor expresión a los 2 meses de recuperación (gráfica 6).



Gráfica 6. Densidad media de nitrotirosina en los tejidos pulmonares de animales tratados con Mn (OAc)₃. Comparación de grupos expuestos vs. control.

Para finalizar el análisis inmunohistoquímico realizado con nitrotirosina se compararon los grupos expuestos al mismo número de semanas, pero a diferentes compuestos (MnCl₂ vs. Mn (AOc)₃). Al realizar la comparación se observó que los todos los cambios significativos ocurren en acetato de manganeso, la primeras diferencias son en 2 y 4 semanas, posteriormente no hay cambios significativos hasta 2 meses de suspensión (gráfica 7).



Gráfica 7. Densidad media de nitrotirosina en el tejido pulmonar de animales expuestos a MnCl₂ y Mn (AOc)₃. Comparación entre compuestos de grupos expuestos al mismo número de semanas.

8. DISCUSION

8.1 Contaminación y daños a la salud

A lo largo de este trabajo se ha destacado que la contaminación atmosférica es un riesgo para la salud humana, ya que afecta a millones de personas de todo el mundo, especialmente aquellas que viven en grandes urbes y en áreas altamente industrializadas. Como consecuencia de esto, en los últimos años la exposición a contaminantes atmosféricos ha generado una creciente preocupación. En estudios desarrollados durante la última década se muestra una clara asociación entre la exposición de la población y el aumento en indicadores de morbilidad y mortalidad. Se menciona que en los países industrializados, como es México, un 20% de la incidencia total de enfermedades puede atribuirse a factores ambientales (OMS, 2006; Smith, 1999). El sistema respiratorio es susceptible al daño causado por materiales tóxicos inhalados e irritantes debido a que una fracción importante de estas partículas se puede depositar en las vías aéreas; por lo tanto la gama de enfermedades debido a la contaminación es muy amplia (Pérez, *et al.*, 2010), entre las que se encuentran cardiopulmonares, cardiovasculares y pulmonares, mortalidad por cáncer, así como infecciones de las vías respiratorias inferiores (Abbey, *et al.*, 1999; Beelen, *et al.*, 2008b; Beeson, *et al.*, 1998; Cao, *et al.*, 2011; Dockery, *et al.*, 1993; Eftim, *et al.*, 2008; Filleul, *et al.*, 2005; Gehring, *et al.*, 2006; Katanoda, *et al.*, 2011; Laden, *et al.*, 2006; Miller, *et al.*, 2007; Nafstad, *et al.*, 2004; Ostro, *et al.*, 2010; Pope, *et al.*, 2002; Puett, *et al.*, 2009; Yorifuji, *et al.*, 2011).

Otro tipo de asociación se da entre contaminación y enfermedades respiratorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma y la fibrosis. Estas patologías han aumentado durante las últimas décadas en aquellas ciudades en las que se han reportado elevados índices de contaminantes atmosféricos. Los agentes implicados son los óxidos de nitrógeno, azufre, partículas suspendidas, ozono, metales e hidrocarburos. (Dockery, *et al.*, 1993; Pope, *et al.*, 1995; Schwartz, 1994; Vedal, 1997). Estas partículas suspendidas suelen contener diversos metales de transición, entre ellos el manganeso (Prahalad AK, *et al.*, 1999), el cual ingresa principalmente por inhalación. (Santos-Burgoa, 2001; Fortoul, 2001). Dado que los pulmones son uno de los órganos expuestos a los agentes ambientales (Brunekreef, *et al.*, 2002), la capacidad para protegerse a sí mismos consiste en mecanismos inmunológicos y no inmunológicos (Olivieri, *et al.*, 1966) que abordaremos a lo largo de esta discusión.

8.2 El manganeso como contaminante atmosférico.

El manganeso es uno de los elementos que podemos encontrar adosado a partículas ambientales y el pulmón es el primer órgano expuesto a este, por lo que este estudio se basó en comparar los cambios en el tejido respiratorio como consecuencia de la exposición a dos compuestos de manganeso. Los compuestos utilizados poseen, distinto estado de oxidación: el cloruro de manganeso (+2) y el acetato de manganeso (+3), se relacionaron los efectos con el tiempo de exposición, ya que dependiendo de la magnitud de ésta, de la eficiencia de los mecanismos de defensa y de los factores de susceptibilidad individual, los efectos serán de menor o mayor severidad (Universidad de Chile, 2012). Los cambios que observamos fueron la descamación de las células epiteliales, aparición de infiltrado inflamatorio, edema vascular y alveolar, así como ligero aumento de tejido conectivo. Estos mismos cambios han sido observados en repuesta a lesiones pulmonares agudas causadas por la inhalación de otras partículas suspendidas (Saxxon, 2005; Schaumann, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2001); así como de diferentes compuestos del manganeso (MnO_2 , MnO , Mn_3O_4) (WHO, 2000).

Mediante este mismo análisis se comprobó de manera general, que los efectos en todas las pruebas fueron más severos en los grupos tratados con acetato de manganeso; esto se atribuye a su estado de oxidación, dado que se ha propuesto que la inhalación de Mn^{+3} es más potente como productor de estrés oxidante y causa más daño celular, dato que ya mencionamos con anterioridad (Archibald y Tyree, 1987; Ali, *et al.*, 1995; Chen, *et al.*, 2001), sin embargo se profundizará en estas ideas más adelante.

8.3 Manganeso y sistema respiratorio en nuestro modelo.

Al comparar los componentes del sistema respiratorio que mencionamos a lo largo de este estudio del grupo control es posible identificar los cambios encontrados tanto en bronquiolos, como en los alveolos. Además, como previamente se mencionó debido al tamaño de las partículas que contienen manganeso son los sitios donde se pueden depositar y causar daños (WHO, 2000).

Uno de los primeros cambios observados fue en el epitelio bronquiolar. Este epitelio posee excelente capacidad de reparación siempre y cuando su membrana basal permanezca intacta. Sin embargo al inhalar ambos compuestos de Mn se observó descamación de células epiteliales, por lo que se sugiere que una de las causas que provocó estos cambios puede ser que los compuestos al ser agentes extraños en los bronquiolos, lesionaron las células bronquiolares y a las proteínas de unión que se encargan de mantenerlas adheridas a la membrana basal y por lo tanto perdieron su anclaje desprendiéndose hacia la luz bronquiolar dejando algunas zonas expuestas. En condiciones óptimas la lesión bronquiolar es seguida por la eliminación del

tejido dañado, proliferación, hiperplasia epitelial y finalmente reparación (López, *et al.*, 2011). Es importante reiterar que en la reparación celular se utiliza a la membrana basal como andamio para el movimiento y proliferación de nuevas células bronquiales (López, *et al.*, 2011).

En cuanto a la densidad media del tejido conectivo, determinamos que se encontró aumento significativo sobre todo en los pulmones de ratones expuestos a acetato de manganeso. Erikson y Aschner en 2003 plantearon que el Mn juega un papel importante en el crecimiento de tejido conectivo. En otros estudios se han observado estos mismos cambios debido de la inhalación de otros metales como el plomo (Onarlioglu, 1998). Por lo anterior sugerimos que este aumento es consecuencia de la inhalación de cloruro y acetato de manganeso debido a que ambos compuestos son capaces de activar el proceso de reparación con el fin de remodelar el tejido dañado, restaurar el epitelio y por lo tanto añadir matriz de tejido conectivo en un intento por hacer que el tejido vuelva a su estado anterior. También creemos que otro factor importante que pudo contribuir a este aumento de tejido conectivo fue ocasionado por el desprendimiento de las células epiteliales, ya que en lo que comienza este proceso de reparación la membrana basal quedó expuesta a estos componentes permitiendo su paso a la zona donde se realiza el intercambio gaseoso y a su vez afectando el tejido conectivo que conforma a los alveolos (Norberg, *et al.*, 2001; Man, *et al.*, 1988; Gordon, *et al.*, 1986; Stephens, *et al.*, 1974). El tejido conectivo es muy importante en los alveolos, ya que les brinda soporte debido a que está conformado principalmente por una gran cantidad de fibras elásticas (Hance, *et al.*, 1975), colágena, proteoglicanos y otras proteínas (Hance, *et al.*, 1975; White, *et al.*, 1979). Sugerimos que cuando se encuentra expuesto tanto a cloruro como a acetato de manganeso, la producción del tejido conectivo aumentará con el fin de reparar el sitio lesionado. Los fibroblastos juegan un papel sumamente importante, ya que son los encargados de producir matriz extracelular, si existe sobreproducción de ésta pueden originarse componentes del tejido conectivo y provocar cambios en su arquitectura, este mecanismo es de defensa, el cual se inicia como respuesta a la presencia de agentes extraños, en este caso de manganeso (Antonini, *et al.*, 2004). En algunos estudios realizados con componentes derivados del manganeso (MMT) se ha observado que la deficiencia de CC16 (proteína producida por las células de Clara) puede contribuir a la activación de fibroblastos y el crecimiento excesivo de tejido conectivo (Lesur, *et al.*, 1995), estos hallazgos indican que el MMT induce inflamación asociada con cambios en la producción/degradación de componentes de la matriz extracelular (TEDER y Heldin, 1997).

El proceso de reparación incluye la destrucción de los "agentes extraños" y la reparación de los tejidos dañados. Si la destrucción específica y reparación no están correctamente programados aparecerán trastornos inflamatorios, como es el caso de nuestro modelo, por lo que mediante nuestros resultados demostramos que el manganeso, cuando es inhalado, provoca inflamación pulmonar (Antonini, *et al.*, 2004).

8.4 Los cambios inflamatorios en el modelo.

Se ha observado que el proceso de inflamación en los pulmones está caracterizado por la producción de leucotrienos, histamina, bradiquinina y una amplia variedad de citocinas y quimiocinas. Se sabe que IL-6 es una citocina proinflamatoria que contribuye a la iniciación y extensión de este proceso y es producida por un amplia gama de células (Baumann, *et al.*, 1984; Jirik, *et al.*, 1989; Nijsten, *et al.*, 1987) entre ellas macrófagos alveolares, linfocitos, células epiteliales y células endoteliales (Yu, *et al.*, 2002; Arcangeli, *et al.*, 2001; Frampton, *et al.*, 1999; Koyama, *et al.*, 1998; Mils, *et al.*, 1999; Mosmann, *et al.*, 1996; Bankey, *et al.*, 1995). Nuestros resultados demuestran la presencia de IL-6 en los bronquiolos de los ratones expuestos tanto a cloruro como a acetato de manganeso. Existen diversos estudios que vinculan la producción de IL-6 a la presencia de contaminantes ambientales (Fortoul, *et al.*, 2011; Fuji, *et al.*, 2001; Kodavanti, *et al.*, 1999; Yu, *et al.*, 2002) por lo que sugerimos que esta remodelación aérea es similar a la observada en asma, ya que estos efectos han sido asociados a la inhalación de vanadio (Fortoul, *et al.*, 2011; Bonner, *et al.*, 2000). Dorman y colaboradores en 2008 asociaron la inflamación pulmonar con la exposición industrial de manganeso, por otra parte la OEHHA en 2008 mediante dos estudios en animales demostró que la inhalación aguda de manganeso provoca inflamación pulmonar.

Mediante este mismo estudio inmunohistoquímico se encontró presencia de IL-6 en la porción apical de las células de Clara del epitelio bronquiolar con ambos compuestos, sin embargo la presencia fue mayor en los animales tratados con acetato de manganeso. Se ha determinado que la célula de Clara posee gran actividad metabólica, con función detoxificadora de sustancias extrañas (Gaxiola, *et al.*, 1997). Halatek y colaboradores demostraron que al administrar MMT en ratones se inducen lesiones en la célula de Clara, por lo que inferimos mediante este modelo que el manganeso en estado de oxidación +2 y +3 es capaz de lesionar a estas células (Halatek, *et al.*, 1998).

8.5 El estrés oxidante y nitrosante como causa del daño.

Uno de los mecanismos por los que el manganeso puede producir inflamación es el estrés oxidante/nitrosante. La mayor parte de los metales, a través de este mecanismo inducen daño (Tao, *et al.*, 2003; Li, *et al.*, 2008). Una de las moléculas que se genera es el peroxinitrito (ONOO₂), que es capaz de reaccionar con residuos de tirosina en las proteínas para formar nitrotirosina. La presencia de la nitrotirosina se ha utilizado como un marcador de la producción de especies reactivas de nitrógeno en daño tisular inducido por el óxido nítrico (Ohshima, 1990). La nitración puede alterar la conformación y estructura de las proteínas, su actividad catalítica y/o su susceptibilidad para degradarse (Castro, *et al.*, 1996; Berlett, *et al.*, 1996; Grow, *et al.*, 1996).

Al marcar a la nitrotirosina pudimos constatar que la exposición a los dos compuestos de manganeso indujeron estrés y el compuesto que indujo mayor alteración fue el acetato de manganeso. La presencia de estrés se fundamenta con el trabajo realizado por Eiserich y colaboradores en 1998 en el cual aseveran que el incremento de nitrotirosina es un indicador en el aumento de estrés nitrosante más que marcador en la formación de peroxinitrito. Se ha observado que existe incremento significativo de nitrotirosina en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (Sheffield, 2006), por lo cual podemos atribuir que la marca de nitrotirosina es productor de los cambios inducidos por cloruro y acetato de manganeso.

Retomando algunas ideas sabemos que la exposición a las partículas suspendidas que acarrean metales son eliminadas por los macrófagos pulmonares. Estos son las principales células encargadas de defender el pulmón de sustancias inhaladas, como es el caso de metales provenientes de partículas suspendidas (Manganeso); son esenciales para la activación correcta del sistema inmune pulmonar y juegan un papel clave en respuesta a los tóxicos (Driscoll, *et al.*, 1997; Imrich, *et al.*, 1999), ya que en el intento por eliminar a estas partículas pueden morir por apoptosis o necrosis incrementando el proceso inflamatorio.

Por lo anterior podemos inferir que la inhalación de ambos compuestos de manganeso ocasionaron producción y liberación de citocinas, pero también una reducción de la viabilidad celular y un aumento de la apoptosis en los macrófagos pulmonares, por lo que consideramos que la respuesta de los macrófagos pudo contribuir al resultado final de esta exposición tóxica, así como se ha observado para el desarrollo de enfermedades, sin embargo estos procesos están lejos de ser aclarados (Refsnes, *et al.*, 2006; Hiura, *et al.*, 1999; Obot, *et al.*, 2002).

En el desarrollo de este trabajo se ha indicado que al realizar la comparación entre ambos compuestos, se notó que aquellos grupos que se expusieron al acetato de manganeso (+3) presentaron daño de forma más temprana y severa; estas características son atribuibles a su estado de oxidación, ya que se han realizado diversos estudios con varios estados de oxidación del Mn que indican al acetato como más reactivo y tóxico en comparación con el cloruro de manganeso (+2) (Chen, *et al.*, 2001); por esta razón los cambios fueron más notorios en este grupo. En los tejidos, la forma predominante del manganeso es +2, sin embargo su actividad pro-oxidante es dependiente de la cantidad de Mn^{+3} existente, lo cual facilita que Mn^{+2} se oxide a Mn^{+3} . Atribuimos también esta severidad a que se ha observado que las células tratadas con Mn^{+3} acumulan más manganeso y por lo tanto presenta un mayor índice de muerte celular al comprarlas con Mn^{+2} (Chen, *et al.*, 2001; Reaney, *et al.*, 2002). Chen y colaboradores (2001) refieren que el estado de oxidación del Manganeso va a determinar el grado de citotoxicidad del compuesto, lo que provoca que el acetato sea más potente, que el cloruro. Otro factor relevante que se ha sugerido es que también dependiendo del estado de oxidación la retención de manganeso será de mayor o menor grado.

Las razones por las cuales el daño en los pulmones incrementó una vez que se suspendió la exposición a cloruro y acetato de manganeso son desconocidas, sin embargo una posibilidad es que, tal como lo reportaron Maigetter y cols., et al. 1976 la inhalación de MnO_2 incrementó la susceptibilidad a infecciones pulmonares causadas por patógenos bacterianos, por lo que suponemos que como consecuencia del daño causado por Mn, se incremento la susceptibilidad de los animales a patógenos llevando a un incremento gradual del daño post-exposición (Maigatter, et al., 1976). Otro factor al que le podemos atribuir estos cambios esta dado por Olivieri y colaboradores en 2005 ellos concluyen que debido a la destrucción del epitelio bronquiolar y ciliar a causa de la inhalación de contaminantes ambientales los alérgenos permanecen en la superficie epitelial durante un tiempo prolongado, por lo tanto, la susceptibilidad aumenta.

En este trabajo se demostró que el manganeso es capaz de inducir inflamación y estrés nitrosante, sin embargo creemos que es importante resaltar que el manganeso puede ejercer toxicidad celular por otros mecanismos, incluyendo como ya se ha mencionado formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (Ali, et al., 1995; Brouillet, et al., 1993), oxidando directamente a moléculas biológicas para formar las especies reactivas (Archibald y Tyree, 1987) y alteración de la homeostasis del hierro (Kwik-Urbe, et al., 2003; Zheng y Zhao, 2001; Zheng, et al., 1999). Estudios *in vitro* han demostrado que elevadas concentraciones de manganeso inducen la inhibición dentro de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Brown y Taylor, 1999; Galvani, et al., 1995; Zheng y Zhao, 2001), así como que Mn (III) es capaz de oxidar directamente a catecolaminas y dopamina (Archibald y Tyree, 1987; Lloyd, 1995); también se ha demostrado que la exposición *in vitro* a manganeso puede perturbar la regulación celular del hierro alterando directamente a la proteína reguladora de hierro (IRP) de la actividad de unión (Kwik-Urbe, et al., 2003; Zheng y Zhao, 2001; Zheng, et al., 1999).

Por otra parte, los resultados de nuestro estudio demuestran que existen fluctuaciones en cuanto a la presencia de los distintos marcadores analizados para ambos compuestos a lo largo de todo el estudio. Sin embargo, no se analizaron las fluctuaciones encontradas en los marcadores de IL-6 y nitrotirosina, ya que el objetivo central fue determinar cambios histológicos e inmunohistoquímicos entre cloruro y acetato de manganeso, por lo que queda en un futuro analizar el porqué de estas fluctuaciones.

9. CONCLUSIONES

La inhalación de cloruro y acetato de manganeso en ratones es capaz de causar cambios morfológicos en el epitelio pulmonar especialmente en el bronquiolo terminal. Ambos compuestos inducen descamación de células del epitelio bronquiolar, aumento significativo de tejido conectivo, infiltrado inflamatorio (bronquiolitis), edema vascular y alveolar. Estas alteraciones morfológicas son más evidentes en el caso del acetato de manganeso.

Cuando el manganeso es inhalado en forma de cloruro y acetato induce inflamación pulmonar, aumento de células inflamatorias y afecta las células de Clara del epitelio bronquiolar. Por otra parte, se pudo constatar que la exposición de ambos compuestos del manganeso induce estrés nitrosante.

Concluimos que el compuesto que indujo alteraciones histológicas e inmunohistoquímicas de forma más temprana y severa en los pulmones de ratones expuestos fue el acetato de manganeso por lo que se reiteró que los efectos de este metal están asociados directamente a su estado de oxidación. Este modelo puede ser útil para la comprensión de enfermedades respiratorias causadas por la inhalación de partículas que contienen diversos compuestos de metales como el que estudiamos.

10. BIBLIOGRAFIA

- Antonini JM, et al. Systemic immune cell response in rats after pulmonary exposure to manganese-containing particles collected from welding aerosols. *Journal of Immunotoxicology*. **9(2)**, 184-192 (2012).
- Air Quality Guidelines for Europe. Second Edition. WHO (2000).
- Aschner M, Erikson KM, Dorman DC. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **35**, 1-32 (2005).
- Bagga, et al. Manganese Health Research Program: Overview of Research into the Health Effects of Manganese (2002-2007). *Institute of Environment and Health*. **(2007)**.
- Brain, et al. Effects of Iron Status on Transpulmonary Transport and Tissue Distribution of Mn and Fe. Department of Environmental Health, and Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, 2005.
- Brain. The respiratory tract and the Environment. *Environmental Health Perspectives*. **20**, 113-126 (1977).
- Borja, et al. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. **43(6)**, 544-555 (2001).
- Bredow, et al. Subchronic Inhalation of Soluble Manganese Induces Expression of Hypoxi-associated Angiogenic Genes in Adult Mouse Lungs. *Toxicol In Vitro*. **221(2)**, 148-157 (2007).
- Bueno-Brito, et al. Contenido de plomo y manganeso en despachadores de gasolina. *Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica*. **30(2)**, 41-46 (2005)
- Cervantes, et al. Las partículas suspendidas en tres grandes ciudades mexicanas. *Gaceta Ecológica*, enero-marzo, 15-28 (2005).
- Chang, et al. The Role Of Manganese Superoxide Dismutase in Inflammation Defense. *Enzyme Research*. 1-6 (2011).

- Chen, et al. Differential Cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): Special Reference to Mitochondrial [Fe-S] Containing Enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **175**, 160–168 (2001)
- Conde, et al. Enfermedades Respiratorias Agudas. *Secretaría Distrital de la Salud, Boletín ERA*. **22**; (2007).
- Crossgrove, et al. Manganese toxicity upon overexposure. Review Article. *NMR Biomed*. **17**, 544–553 (2004).
- Donaldson, et al. Ultrafine Particles. *Occupational Environmental Medicine*. **58**, 211-216 (2011).
- Dorman, et al. Influence Manganese on the Pharmacokinetics of Inhaled Manganese Sulfate in Male CD Rats. *Toxicological Sciences* **60**, 242-251 (2001).
- Dorman, et al. Sub-chronic inhalation of high concentrations of manganese sulfate induces lower airway pathology in rhesus monkey. *Respiratory Research*. **6(121)**, 1-10 (2005).
- Dorman, et al. Tissue Manganese Concentrations in Lactating Rats and Their Offspring Following Combined in Utero and Lactation Exposure to Inhaled Manganese Sulfate. *Toxicological Sciences* **84**, 12-21 (2005).
- Fawcet. Tratado de Histología. *Mc. Graw Hill, México*. 744-746 (2005).
- Fortoul et al, Manganese in Lung Tissue: Study of México City Residents' Autopsy Records from the 1960s and 1990s. *Archives of Environmental Health*. **56**,187-190 (2001).
- Fujii, et al. Particulate Matter Induces Cytokine Expression in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol*. **25**, 265-271 (2001).
- Gadek, et al. Role of Connective Tissue Proteases in the Pathogenesis of Chronic Inflammatory Lung Disease. *Environmental Health Perspectives*. **5**, 297-306 (1984).
- Halatek, et al. Quantification of Clara cell protein in rat and mouse biological fluids using a sensitive immunoassay. *Eur Respir J*. **11**, 726-733 (1998).
- Ham A. W. y D.H. Cormak. "Tratado de Histología" Interamericana, México. 826-831 (2000).

- Harce- Pagliai. Analytical Methods for 3-Nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*. **2(5)**, 324-336 (1998).
- Heiling, Manganese and iron transport across pulmonary epithelium. *Am J Lung Cell Mol Biol*. **290**, L1247- L1259 (2006).
- Hermans, et al. Clara cell protein as a marker of Clara cell damage and bronchoalveolar blood barrier permeability. *Eur Respir*. **13**, 1014-1021 (1999).
- Hogg, et al. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*. **350(26)**, 2645-2653 (2004).
- Huang, et al. Differential toxicity of Mn²⁺ and Mn³⁺ to rat liver tissues: Oxidative damage, membrane fluidity and histopathological changes. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **64**, 197- 203 (2012).
- Ikegami, et al. Efectos de la IL-6 e IL-8 intrauterinas sobre la expresión del ARNm de apoproteínas del surfactante en pulmón fetal de rata. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology (Ed. Española)*. **1**, 202-208 (2001).
- Jeongoh Han, et al. Manganese (II) induces chemical hypoxia by inhibiting HIF-prolyl hydroxylase: Implication in manganese-induced pulmonary inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **235**, 261-267 (2009).
- Kobayashi, et al. Antiinflammatory Porperties of Inducible Nitric Oxide Synthase in Acute Hyperoxic Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. **24**, 390-397 (2001).
- Kodavanti, et al. Variable pulmonary responses from exposure to concentrated ambient air particles in rat model of bronchitis. *Toxicological Sciences* **54**, 441-451 (2000).
- Lenntech Water- & Air treatment Holding B.V. "Chemical properties of manganese", [en línea]. julio 2012. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mn.htm>
- Li C, Zhou HM. The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. *Enzyme Research*. 1-6 (2011).

- Liu, et al. Acute Effects of Air Pollution on Pulmonary Function, Airway Inflammation, and Oxidative Stress in Asthmatic Children. *Environ Health Perspect.* **117(4)**, 668–674. 2009.
- Lloyd Davies. Manganese Pneumonitis. *British Journal of Industrial Medicine.* **3(3)**, 111–135 (1946).
- Nadadur, et al. Endothelial effects of emission source particles: Acute toxic response gene expression profiles. *Toxicol In Vitro.* 2009; **23(1)**, 67-77 (2008).
- Nicklas Raun J, et al. Lung inflammation and genotoxicity following pulmonary exposure to nanoparticles in ApoE^{-/-} mice. *Particle and Fibre Toxicology.* **6 (2)**, 1186-1743 (2009).
- Nordberg. Enciclopedia de Salud y Trabajo. Organización Internacional del Trabajo, O.I.T. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. **2(9)**, 2001.
- Nurkiewicz et al, Pulmonary Nanoparticle Exposure Disrupts Systemic Microvascular Nitric Oxide Signaling. *Toxicological Sciences.* **110(1)**, 191-203 (2009).
- Olivieri, et al, 2005. Impact of environmental factor on lung defences. *Eur. Resp. Rev* **14 (95)** 51-56 (2005).
- Onarlioglu, et al. The effect of lead inhalation on rat lung morphology. *Tr. J of Medical sciences.* **29(9)** 617-622 (1999).
- Ordoñez-Librado et al. Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a parkinson's disease model: Immunocytochemical and Behavioral evidences. *Neurosciencie* **155**, 7-16 (2008).
- Oszlanczi, et al. Functional neurotoxicity of Mn-containing nanoparticles in rats *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **73**, 2004–2009 (2010).
- Outi. Pulmonary Nitric Oxide in Preterm and Term Infants with Respiratory Failure. Oulu 2002.
- Pérez, et al. The Year of the Lung: outdoor air pollution and lung health. *The European Journal of Medical Sciences.* **140**, 1-6, (2010).

- Politis, et al. Ultrafine Particles (UFP) and health effects. *Global NEST Journal* **10 (3)**, 439-452 (2008).
- Prüss-Üstün and Corvalán. Preventing disease through healthy environments. Towards an estimate of the environmental burden of disease. World Health Organization. 20-33 (2004).
- Ramos-Barbón, et al. Inflamación y remodelación de la vía aérea pequeña: estudios en humanos y modelos experimentales. *Archivment of Bronconeumology*. **47(2)**:2-9 (2011).
- Reaney, et al. Manganese oxidation state mediates toxicity in PC12 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **205**, 271– 281 (2005).
- Rice, et al. Differential Ability of Transition Metals to Induce Pulmonary Inflammation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **177**, 46-53(2001).
- Riveros-Rosas, et al. Personal exposure to elements in México City air. *Science of the Total Enviroment*. **198**, 79-96 (1997).
- Rojas-Martínez, et al. Lung Function Growth in Children with Long-Term Exposure to Air Pollutants in Mexico City. *Am J Respir Crit Care Med*. **176**, 377-384 (2007).
- Romieu, et al. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *European Respiratory Journal*. **31**, 179-196 (2008).
- Rosales- Castillo, et al. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. **43**,544-555 (2001).
- Ross, M.H., Kaye G.I., Wojciech P. Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. *México, Panamericana*. 570-592 (2005).
- Rosales- Castillo, et al. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública de México*. **43**, 544-555 (2001).
- Roth. Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination. *Biolo Res* **39**, 45-57 (2006).
- Rouse. Soot Nanoparticles Promote Biotransformation, Oxidative Stress, and Inflammation In Murine Lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **39**,198-207 (2008).

- Rydell- Törmänen, et al. Extracellular matrix alterations and acute inflammation; developing in parallel during early induction of pulmonary fibrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **92(6)**, 917-925 (2012).
 - Sangani, et al. Lung injury after cigarette smoking is particle related *International Journal of COPD*. 1-8 (2011).
 - Schaumann, et al. Metal-rich Ambient Particles (Particulate Matter _{2.5}) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. *Am. J. Respir Crit Care Med*. **170**, 898-903 (2004).
 - Shrilatha Balakrishna, et al. Environmentally persistent free radicals induce airway hyperresponsiveness in neonatal rat lungs. *Particle and Fibre Toxicology*. 8-11 (2011).
 - Sheffield, et al. Human Pulmonary nitric oxide synthases (NOS) and nitrotyrosine: Findings during neonatal development and in chronic disease (CLD). *Pediatrics*. **118 (3)**, 1056-1064 (2006).
- Spiegel, J y Maystre Y. L. Control de la Contaminación Ambiental. *Enciclopedia de la salud y seguridad en el trabajo*. **55(1)** 55-59.
- Sun, et al. Oxidative interacts of synthetic lung epithelial lining fluid with metal- containing particulate matter. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **281**, L807-L815 (2001).
 - Tapin, et al. Bioaccumulation and locomotor effects of manganese sulfate in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **211**, 166-174 (2006).
 - Tatsushi Suwa, et al. Particulate Air Pollution Induces Progression of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. **39 (6)**, 935-942 (2002).
 - Teerguarden , et al. Pharmacokinetic modeling of manganese. I. Dose dependencies of uptake and elimination. *Journal of toxicology and environmental Health, part A*. **70**, 1493-1504 (2007).
 - Vallejo, M., Jáuregui-Renaud K., Hermosillo A.G., Márquez M.F., Cardenas M. Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la ciudad de México. *Gaceta Médica de México*. **139(1)**, 57-63 (2003).

- Welty-Wolf. Aerosolized manganese SOD decrease hyperoxic pulmonary injury in primates.II. Morphometric analysis. *J Immunol.* **167(12)**, 1600-1619 (2003).
- Wilson, et al. Pulmonary fibrosis: pathogenesis, etiology and regulation. *Mucosal Immunology.* **2(2)**, 103-121 (2009).
- Yu, et al. The role of Interleukin-6 in Pulmonary Inflammation and Injury Induced by Exposure to Environmental Air Pollutants. *Toxicological Sciences.* **68**, 488-497 (2002).
- Zheng, et al. Comparative Toxicokinetics of Manganese Chloride and Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl (MMT) in Sprague-Dawley Rats. *Toxicological Sciences.* **54(2)**, 295-301 (2000).

Referencias electrónicas

- <http://www.atsdr.cdc.gov>. (2012)
- www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151-c3.pdf
- www.epa.gov (2012)
- <http://www.lenntech.com> (2012)
- <http://www.lung.org/press-room/press-releases/state-of-the-air-2012>.
- www.millipore.com.mx (2012)
- <http://www.particleandfibretoxicology.com> (2012).
- <http://www.springerlink.com> (2012).