



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA TOLERANCIA AL DAÑO POR LA INHALACIÓN DE VANADIO EN EL EPITELIO  
PULMONAR; DIFERENCIAS POR SEXO EN UN MODELO MURINO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. LÓPEZ VALDEZ NELLY**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM  
**DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**CD. MX., ENERO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1281/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **LÓPEZ VALDEZ NELLY** con número de cuenta **301728979** con la tesis titulada "**LA TOLERANCIA AL DAÑO POR LA INHALACIÓN DE VANADIO EN EL EPITELIO PULMONAR; DIFERENCIAS POR SEXO EN UN MODELO MURINO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO  
Secretario: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE  
Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ  
Suplente: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de noviembre de 2019

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



c. c. p. Expediente del alumno(a)

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 346684)

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT UNAM IN200418).

A la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes

Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

# Gracias...

*A mi familia, a mis amigos y compañeros, por ser parte de mi*

*Porque han formado parte de los momentos más importantes de mi vida, de mi formación personal y profesional, y con su presencia me han enriquecido.*

*Una nueva conciencia...  
un hombre nuevo,  
tiene conciencia de la dignidad,  
del valor de la dignidad  
para vivir, para trabajar,  
para devolver la dignidad  
a todos los géneros de vida,  
que al igual que tú , que yo,  
existen, sienten...  
aun con su inefable inteligencia;  
sienten el maltrato, el hambre,  
la sed, la angustia, el dolor,  
las manos del experimentador.*

*Gracias a esos seres, que  
sacrificados por la experimentación  
dieron nuevos horizontes a la vida, viejas y nuevas generaciones  
han visto alejar la muerte y el dolor.*

*Gracias reiteradamente a esas ratas,  
perros, gatos, simios  
y demás "conejillos de indias"  
que en aras de la ciencia,  
la enseñanza o la investigación,  
mitigan la angustia, el dolor...  
la agonía del eterno sueño.*

*Una nueva conciencia...  
Un hombre nuevo  
Antonio Duvalier*

*Gracias a todos*

## Índice

Tabla de Abreviaturas .....	1
1 Resumen .....	1
2 Abstract .....	3
3 Introducción.....	4
3.1 La Contaminación.....	4
3.1.1 Aspectos generales de la contaminación.....	4
3.1.2 Clasificación de los contaminantes atmosféricos.....	4
3.1.3 Vías de exposición a los contaminantes atmosféricos. ....	5
3.1.4 Efectos adversos de los contaminantes aéreos en el sistema respiratorio. ....	6
3.2 El Sistema Respiratorio .....	7
3.2.1 Generalidades del sistema respiratorio.....	7
3.3 La mucosa del Sistema Respiratorio.....	8
3.3.1 Descripción general de la mucosa.....	8
3.3.2 El Epitelio Respiratorio .....	9
3.3.3 El Epitelio Bronquiolar.....	10
3.3.4 La Célula Bronquiolar No Ciliada.....	10
3.3.5 La CBNC como defensora ante la exposición a distintos xenobióticos. ....	11
3.3.6 El Epitelio Alveolar. ....	12
3.3.7 Las Células Alveolares Tipo II. ....	13
3.3.8 El neumocito tipo II como defensor ante la exposición a distintos xenobióticos. ....	14
3.4 La tolerancia como respuesta de las células epiteliales ante la exposición a xenobióticos ....	15
3.5 Dimorfismo pulmonar.....	18
3.6 El vanadio como representante de los agentes xenobióticos inhalados.....	19
3.6.1 Características generales del vanadio.....	19
3.6.2 Toxicocinética y Toxicodinamia del V.....	20
3.6.3 Toxicidad del V en el sistema respiratorio.....	21
3.6.4 Estrés oxidante como mecanismo de daño inducido por el vanadio.....	22
3.7 Antecedentes directos .....	23
4 Preguntas de Investigación.....	24
5 Justificación .....	24
6 Objetivos.....	24
6.1 Objetivo General.....	24
6.2 Objetivos Particulares.....	24

7	Hipótesis.....	25
8	Metodología.....	26
	8.1 Selección de grupos experimentales.....	26
	8.2 Determinación de la concentración de V en caja.....	26
	8.3 Protocolo de inhalación .....	27
	8.4 Eutanasia y extracción de órganos.....	27
	8.5 Determinación de la concentración de vanadio en muestras biológicas .....	28
	8.6 Evaluación histopatológica del tejido pulmonar y análisis morfométrico .....	28
	8.7 Inmunohistoquímica.....	29
	8.8 Obtención de las fracciones citosólica y microsomal en tejido fresco.....	30
	8.9 Cuantificación de la proteína en las fracciones citosólica y microsomal.....	30
	8.10 Western Blot .....	31
	8.11 Ensayo de actividad enzimática de CYP450 (CYP1A1 y CYP1A2).....	32
	8.12 Análisis Densitométrico.....	35
	8.13 Análisis Estadístico .....	36
9	Resultados .....	37
	9.1 Determinación de la concentración de V durante la exposición.....	37
	9.2 Determinación de la concentración de V en sangre.....	37
	9.3 Hallazgos histopatológicos y análisis morfométrico .....	37
	9.4 Inmunohistoquímica CC16.....	44
	9.5 Western blot CC16 .....	46
	9.6 Inmunohistoquímica SP-C .....	48
	9.7 Actividad específica de CYP450 en el pulmón .....	52
10	Discusión .....	57
11	Conclusiones.....	66
12	Perspectivas.....	67
13	Literatura citada.....	68
14	. Apéndice. Artículo requisito para la obtención del grado.....	79
15.	Anexo de soluciones.....	102

## Tabla de Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo</b>
CBNC	Células Bronquiales No Ciliadas
NI	Neumocitos tipo I
NII	Neumocitos tipo II
CYP450	Citocromos 450
CYP1A1	Citocromo 1A1
CYP2B	Citocromo 2B
CYP2E1	Citocromo 2E1
CYP2F2	Citocromo 2F2
V	Vanadio
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de Vanadio
CC16	Clara Cell Protein 16 kDa / Proteína de Célula de Clara 16 kDa
SP-A	Surfactant Protein A / Proteína Surfactante tipo A
SP-B	Surfactant Protein B / Proteína Surfactante tipo B
SP-C	Surfactant Protein C / Proteína Surfactante tipo C
SP-D	Surfactant Protein D / Proteína Surfactante tipo D
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-13	Interleucina 13

## 1 Resumen

El epitelio pulmonar posee distintos tipos celulares que favorecen la adecuación del pulmón a ambientes tóxicos, y cuya fisiología puede ser influida de forma importante por factores sexuales hormonales y no hormonales desde la etapa embrionaria y durante toda la vida de un organismo. Dentro de las células epiteliales destacan las CBNC y los NII que desempeñan funciones de gran relevancia. Las CBNC se localizan principalmente en los bronquiolos y se encargan de repoblar el epitelio bronquiolar, son secretoras, inmunomoduladoras y se encargan del metabolismo de xenobióticos a través de los CYP450. Por otro lado los NII se localizan en el epitelio alveolar, se encargan de repoblar el epitelio, son secretores y se encargan del metabolismo de xenobióticos a través de los CYP450. Ambos tipos celulares podrían estar involucrados en la adecuación pulmonar ante sustancias tóxicas desarrollando una respuesta conocida como “tolerancia” la cual se define como los mecanismos desarrollados por un órgano como consecuencia de la pre-exposición a dosis moderadas de un compuesto y que le permiten adecuarse manifestando menores daños en condiciones de mayor exposición al mismo tóxico. ¿Qué xenobiótico es candidato para explorar la respuesta de tolerancia en el pulmón? El V es una posibilidad. Este metal forma parte de las partículas suspendidas, e *in vivo* se ha reportado que produce toxicidad pulmonar, aunque sus efectos parecen “estabilizarse” en algunos modelos, con el tiempo de exposición. Por lo anterior resulta relevante estudiar la posible participación de las células epiteliales en el desarrollo de tolerancia a V, considerando la posibilidad de respuestas distintas entre machos y hembras.

El objetivo de este trabajo fue identificar algunos de los cambios morfofisiológicos que se presentan en el epitelio pulmonar (bronquiolar y alveolar) como consecuencia del desarrollo de tolerancia a la inhalación de V y determinar sus diferencias por sexo.

Se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa CD1 que se distribuyeron en dos grupos : A y B. El grupo A o control fue expuesto a la inhalación de solución salina al 0.9% 1 hora dos veces por semana, por ocho semanas. El grupo B fue expuesto en dos fases a la inhalación de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; en la primera fase la concentración de exposición fue de 1.56 mg/m<sup>3</sup> de V con inhalación una hora dos veces por semana, por cuatro semanas. Posterior a este periodo se inicio la segunda fase a una concentración de 2.57 mg/m<sup>3</sup> de V con el mismo esquema de exposición anterior. En cada grupo los animales se sacrificaron a las 2, 4, 5, 6 y 8 semanas, por sexo. Para evaluar los cambios producidos por la inhalación y la posible tolerancia se realizó un análisis histopatológico del tejido pulmonar, así como morfométrico, se identificaron los marcadores CC16 y SP-C por inmunohistoquímica y western blot y se evaluaron los cambios en la actividad de los CYP450, tanto en machos como en hembras.

Los resultados histopatológicos demostraron que tanto en machos como en hembras se produjo el desprendimiento de células epiteliales bronquiolares, la hiperplasia epitelial bronquiolar y la infiltración de células inflamatorias. Se demostró que la inhalación de V produjo metaplasia mucoide bronquiolar que incrementó con el tiempo de exposición en la primera fase, y posteriormente disminuyó significativamente en la segunda. En general, se produjeron cambios diferenciales mínimos entre machos y hembras. En cuanto a los marcadores se observó el incremento de CC16 en la primera fase de exposición que se exacerbó en la segunda fase, en ambos sexos. En SP-C no se presentaron cambios relevantes, aunque permitió contar a los NII identificándose hiperplasia de estas células de manera más temprana en las hembras que en los machos. Respecto a los CY450 no se identificaron cambios relevantes asociados con la exposición.

Nuestros datos apuntan a que es posible que se este produciendo tolerancia en el pulmón manifestada como la estabilidad en los cambios histopatológicos producidos sin exacerbación de los mismos en la exposición alta, en ambos sexos. La proteína CC16 secretada por la CBNC incrementó significativamente durante toda la exposición y podría desempeñar un papel crítico en la modulación de la inflamación, que coincidió con la disminución de la metaplasia mucoide bronquiolar y la estabilidad de las alteraciones histopatológicas. Por otra parte, respecto a los neumocitos tipo II observamos una respuesta de hiperplasia que se ha relacionado

con la defensa y reparación del epitelio pulmonar, además de la estabilidad en los niveles de la proteína surfactante tipo C que resulta de gran importancia para el mantenimiento de la función pulmonar. Este trabajo pone de manifiesto la importancia de las células bronquiolares no ciliadas y los neumocitos tipo II en la defensa pulmonar y el desarrollo de tolerancia a V como un metal representante de los contaminantes ambientales. Nuestros hallazgos contribuyen a explicar como los organismos sobreviven ante condiciones ambientales adversas y como los mecanismos de adecuación del pulmón les permiten hacerlo en condiciones relativamente estables.

## 2 Abstract

The pulmonary epithelium has different cell types that favor the adaptation of the lung to toxic environments, and whose physiology can be significantly influenced by hormonal and non-hormonal sexual factors from the embryonic stage and throughout the life of an organism. CBNC and NII are epithelial cells that perform functions of great relevance in lungs. The CBNC are located mainly in the bronchioles and are responsible for repopulating the bronchiolar epithelium, are secretory, immunomodulatory and are responsible for the metabolism of xenobiotics through CYP450. On the other hand, NIIs are located in the alveolar epithelium, are responsible for repopulating the epithelium, are secretory cells and are responsible for xenobiotic metabolism through CYP450. Both cell types could be involved in lung adaptation to toxic substances by developing a response known as "tolerance" which is defined as the mechanisms developed by an organ as a result of pre-exposure to moderate doses of a compound and allowing it to adapt manifesting less damage under conditions of greater exposure to the same toxic. Which xenobiotic is a candidate to explore the tolerance response in the lung? V is a possibility. This metal is part of the suspended particles, and *in vivo* it has been reported to produce pulmonary toxicity, although its effects in some models appear to "stabilize" with exposure time. Therefore, it is relevant to study the participation of epithelial cells in the development of V tolerance, considering the possibility of different responses between males and females.

The objective of this work was to identify the morphophysiological changes that occur in the pulmonary epithelium (bronchiolar and alveolar) as a result of tolerance to V inhalation determining their differences by sex.

Male and female CD1 mice were used and distributed in two groups: A and B. Group A was the control group that was exposed to inhalation of 0.9% saline solution 1 hour twice a week, for eight weeks. Group B was exposed in two phases to the inhalation of V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; in the first phase, the exposure concentration was 1.56 mg / m<sup>3</sup> of V with inhalation one hour twice a week, for four weeks. After this period, the second phase began at a concentration of 2.57 mg / m<sup>3</sup> of V with the same previous exposure scheme. In each group, the animals were sacrificed at 2, 4, 5, 6 and 8 weeks, by sex. To evaluate the changes produced and tolerance, histopathological and morphometric analysis of the lung tissue were performed, CC16 and SP-C markers were identified by immunohistochemistry and western blotting and the changes in the activity of CYP450 were evaluated, both in males and females.

Histopathological results showed in both males and females, detachment of bronchiolar epithelial cells, bronchiolar epithelial hyperplasia, and infiltration of inflammatory cells. Also, the inhalation of V produced bronchiolar mucoid metaplasia that increased with the exposure time in the first phase and subsequently decreased significantly in the second; there were minimal differential changes between males and females. Regarding the markers, the increase in CC16 was observed in the first phase of exposure, which was exacerbated in the second phase, in both sexes. Regarding SP-C, there were no changes in its presence, although it allowed the type II pneumocytes to count, identifying pneumocyte hyperplasia earlier in females than in males. About CYP450 no relevant changes associated with exposure were identified.

Our data indicate that tolerance may be occurring in the lung manifested as the stability in the histopathological changes produced without exacerbation of them, in both sexes. The CC16 protein secreted by CBNC could play a critical role in the modulation of inflammation, which can directly influence the stability of histopathological alterations and the decrease in bronchiolar mucoid metaplasia. Concerning to type II pneumocytes we observed a hyperplasia response that has been related to the defense and repair of the pulmonary epithelium, in addition to the stability in the levels of the surfactant protein type C that is of great importance for the maintenance of lung function. This work highlights the importance of non-ciliated bronchiolar cells and type II pneumocytes in lung defense and the development of vanadium tolerance as a representative metal of environmental pollutants. Our findings help explain how organisms survive adverse environmental conditions and how lung adaptation mechanisms allow them to do so in relatively stable conditions.

### **3 Introducción**

#### **3.1 La Contaminación.**

##### **3.1.1 Aspectos generales de la contaminación.**

Los problemas de contaminación en la actualidad han adquirido mayor importancia dado que el deterioro ambiental que se observa se ha acentuado, y el tema de la contaminación del aire es de gran relevancia.

El Valle de México, Guadalajara, Monterrey, Toluca y Ciudad de Juárez, entre otras ciudades, son claros ejemplos de metrópolis en las que el deterioro en la calidad del aire es uno de los principales problemas ambientales (Onursal y Gautam, 1997; Secretaría del Medio Ambiente, 2011). En cuanto al Valle de México, se considera que la Zona Metropolitana es una de las más contaminadas del mundo; esto debido a la gran cantidad de industrias y automóviles que circulan en ella, con el consecuente consumo de combustibles fósiles, así como sus condiciones geográficas (Rosales-Castillo, 2001; Espinosa et al., 2009).

La atmósfera corresponde a la mezcla de gases y pequeñas partículas líquidas y sólidas que envuelven al planeta. Está formada por varias capas y sus principales componentes son el nitrógeno, el oxígeno y el agua. La contaminación del aire hace referencia a la presencia de cualquier materia o energía presente en la atmósfera que pueda causar un desequilibrio en la misma (Yang y Omaye, 2009). De acuerdo con la Ley Federal para el Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de 1988, la contaminación se define como “la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico” (Ley de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, 1988).

Los contaminantes en el aire son diversos e incluyen: partículas suspendidas (PS) y compuestos gaseosos tales como el ozono, dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), compuestos orgánicos volátiles como el benceno, monóxido de carbono (CO) y dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), entre otros (Pérez et al., 2010; Secretaría del Medio Ambiente, 2011; Mannucci et al., 2015).

A continuación se describen las clases de contaminantes más importantes y sus principales características.

##### **3.1.2 Clasificación de los contaminantes atmosféricos.**

La clasificación de los contaminantes es diversa. En principio se puede considerar la fuente de emisión de estos como una primera forma de clasificarlos y puede ser natural o antropogénica. Los contaminantes naturales provienen de eventos como las erupciones volcánicas, incendios accidentales y toda clase de procesos en los que el hombre no tiene intervención. Por otro lado, los contaminantes antropogénicos se originan directamente por actividades realizadas por el hombre como la quema de combustibles fósiles, la actividad industrial, la agricultura, etc. (Jiménez-Cisneros, 2001).

Una segunda clasificación corresponde a la que se refiere al origen del contaminante que puede ser primario o secundario. Los contaminantes primarios son aquellos que son emitidos directamente a la atmósfera sin sufrir ninguna alteración como el  $\text{SO}_2$ , algunos óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}_x$ ), CO y PS mientras que los

secundarios son aquellos que se forman como resultado de reacciones químicas con otros contaminantes o gases atmosféricos como el ozono (O<sub>3</sub>), algunos óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) (Bersntein et al., 2004).

En cuanto a otros aspectos, los contaminantes difieren en su composición química, tiempo de persistencia en el ambiente, capacidad de ser transportados y los efectos que sean capaces de producir en la salud humana o de otros seres vivos. Sin embargo algunos de ellos comparten ciertas características y pueden ser agrupados de acuerdo a lo propuesto por Kampa y Castanas (2008), en las siguientes clases:

- A. Contaminantes gaseosos: como el SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, CO, O<sub>3</sub> y los compuestos volátiles orgánicos (CVO o VOCs por sus siglas en inglés). Su principal fuente de emisión es la quema de combustibles fósiles siendo de origen antropogénico, excepto el ozono que se produce por una serie de reacciones que involucran al NO<sub>2</sub> y los VOCs en un proceso iniciado por la luz solar. Estos gases se encuentran suspendidos en el aire y son inhalados produciendo sus principales efectos en el sistema respiratorio.
- B. Contaminantes orgánicos persistentes: como los pesticidas, las dioxinas, los furanos y los bifenilos policlorados. Se caracterizan por permanecer en el ambiente largos periodos de tiempo y la magnificación de sus efectos mientras se transportan en el cadena alimenticia. Tienden a depositarse en suelo y agua, siendo su principal vía de entrada la oral.
- C. Metales pesados: como el plomo, mercurio, níquel, plata y algunos otros que propiamente no son pesados pero si metales como el vanadio, el cromo y el manganeso. Son componentes naturales de la corteza terrestre y son transportados a través del aire, el suelo y el agua. Pueden además ser liberados al aire por la combustión y al agua por la eliminación de desechos. La mayoría de ellos son tóxicos en altas cantidades y tienden a bioacumularse en el organismo.
- D. Material particulado: que corresponde a una mezcla compleja de partículas suspendidas en el aire que varían en tamaño y composición y pueden ser producidas por fenómenos naturales o antropogénicos. Sus principales fuentes de emisión natural son la volatilización del suelo por el viento y los incendios, mientras que en las fuentes antropogénicas se encuentra la combustión en los vehículos, las fábricas, la actividad de construcción y los incineradores. Respecto a este material existe una subclasificación de acuerdo con el diámetro aerodinámico de las partículas: las partículas gruesas (diámetro aerodinámico de 2.5-10 µm), las partículas finas (diámetro aerodinámico menor a 2.5 µm hasta 0.1 µm) y las partículas ultrafinas (diámetro aerodinámico menor a 0.1 µm).

### 3.1.3 Vías de exposición a los contaminantes atmosféricos.

Dado que los contaminantes en el aire están suspendidos en el aire, la principal ruta de exposición a estos es a través de la inhalación, seguida de la ingestión, mientras que el contacto a través de la vía dérmica representa una ruta de exposición menor. La contaminación del aire es también una fuente de contaminación para los alimentos y el agua, por lo que la ingestión de los mismos en estos elementos es también importante (Thron, 1996).

Ya sea a través de la inhalación o la ingestión, los contaminantes son absorbidos cruzando las barreras epiteliales pasando hacia la circulación sistémica por la que son capaces de llegar a los distintos sistemas del cuerpo, produciendo distintos efectos tóxicos en ellos.

A través de la inhalación, el sistema respiratorio es uno de los pocos en nuestro organismo que está en contacto directo con el ambiente mediante el aire que respiramos, y por lo tanto en contacto con la gran cantidad de sustancias contaminantes presentes en él; este contacto predispone al sistema respiratorio a desarrollar alteraciones relacionadas con la exposición a los xenobióticos por lo que resulta importante estudiar los efectos que puedan producirse en él.

#### **3.1.4 Efectos adversos de los contaminantes aéreos en el sistema respiratorio.**

Estudios epidemiológicos y modelos animales demuestran la estrecha relación entre la contaminación del aire y la alteración a distintos niveles del sistema respiratorio. Las vías aéreas son las más afectadas por la contaminación, y también las más estudiadas.

En estudios epidemiológicos en infantes, la exposición a contaminantes disminuye la tasa de evolución de la función pulmonar (Rojas-Martínez et al., 2007; Gauderman et al., 2015) e incrementa el riesgo de desarrollo de asma (McConnell et al., 2010).

Muchos contaminantes como el O<sub>3</sub>, las PS, SO<sub>2</sub> y NO<sub>2</sub> tienen efectos irritantes sobre las vías aéreas que producen tos, flemas e hiperreactividad bronquial, efectos que se han demostrado en humanos (Schraufnagel et al., 2019). También se ha demostrado que los contaminantes incrementan el riesgo de pérdida de la función pulmonar con el envejecimiento (Lepeule et al., 2014).

Por otra parte, estudios en adultos estiman que a nivel mundial, la contaminación del aire produce la muerte de aproximadamente 800,000 personas por enfermedad pulmonar obstructiva crónica y de 280,000 personas por cáncer pulmonar (Cohen et al., 2017), al igual que se ha encontrado una asociación entre la exposición a contaminantes aéreos con el incremento en la incidencia de asma en adultos (Young et al., 2014).

En cuanto a evidencias experimentales, diversos modelos demuestran la relación entre la exposición a contaminantes específicos con el desarrollo de alteraciones pulmonares. Algunos ejemplos concretos son abordados en este trabajo.

La exposición a partículas derivadas de diésel (DEPs por sus siglas en inglés) en ratas y ratones incrementa la inflamación de las vías aéreas (Nordenhall et al., 2000) y estas son capaces de iniciar respuestas como la hiperreactividad, el asma (Nordenhall et al., 2001) y la alergia (Díaz-Sánchez et al., 2003).

Otro contaminante que ha sido ampliamente estudiado es el ozono. Los modelos en roedores han demostrado que este gas produce inflamación en el sistema respiratorio (DeLorme et al., 2002; Wagner et al., 2003), disminuye la función pulmonar e incrementa la hiperreactividad de las vías aéreas (Vagaggini et al., 2002).

Por otro lado también se han reportado efectos de la inhalación de otros gases en roedores. La exposición a SO<sub>2</sub> en roedores induce bronco-constricción, disminución de la función pulmonar, además que se ha asociado con la exacerbación de los síntomas del asma (Winterton et al., 2001). El NO<sub>2</sub> también es un gas que se ha reportado exacerba los síntomas del asma (Chauhan et al., 2003), además que produce inflamación en las vías aéreas (Sandstrom et al., 1991, 1992).

Estos y otros muchos estudios demuestran que los contaminantes dañan de manera importante al sistema respiratorio. Sin embargo, el sistema cuenta con una serie de mecanismos de defensa que le permiten mantenerse en un estado funcional favorable, y se ha observado que las células epiteliales desempeñan un papel vital para lograr la homeostasis.

A continuación se detallan los aspectos más importantes de la estructura del sistema respiratorio y de la mucosa de este sistema.

## **3.2 El Sistema Respiratorio**

### **3.2.1 Generalidades del sistema respiratorio**

El sistema respiratorio es similar estructural y funcionalmente entre el humano y los roedores, aunque con algunas diferencias particulares, por lo que estos últimos constituyen un buen modelo para aproximarnos a los eventos fisiológicos que suceden como causa de la exposición a xenobióticos

Las vías aéreas están conformadas por una variedad de estructuras tubulares que cumplen la función de conducir el aire hasta la zona en la que se llevará a cabo el intercambio gaseoso, los alveolos pulmonares.

La zona de conducción del sistema inicia en la cavidad nasal y sigue su trayecto pasando por la faringe, laringe, tráquea, los bronquios y bronquiolos para finalmente llegar a la zona alveolar. En su trayecto el aire se acondiciona, esto es, se filtra, calienta y humidifica, funciones cumplidas por las células que revisten cada una de las regiones. La zona de conducción presenta características histológicas comunes tales como un revestimiento epitelial respiratorio (cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células caliciformes) sobre una lámina propia con abundantes nódulos linfoides, la presencia de cartílago hialino y fibras musculares lisas dispuestas en sentido circunferencial a la luz de los tubos.

La cavidad nasal es el portal de entrada del aire al sistema respiratorio y es un órgano que, como se mencionó antes participa en el acondicionamiento del aire, y sirve como órgano sensorial para la percepción de los olores. Anatómicamente se divide en tres segmentos con características histológicas distintas: el segmento vestibular posee epitelio plano estratificado con glándulas sudoríparas y sebáceas asociadas a pelos gruesos conocidos como vibrisas. El segundo segmento es el respiratorio presenta las características clásicas asociadas a la zona de conducción que se mencionaron antes. El tercer segmento es el olfatorio en el que se localizan neuronas especializadas en la función olfatoria asociadas a células basales y de sostén; en esta porción también se encuentra una lámina propia con nódulos linfoides y unas glándulas serosas cuya secreción facilita la fijación de los odorantes en esta sección.

Posterior a la nariz se localiza la faringe que es un tubo muscular que comunica a las cavidades nasal y oral con la laringe. Este tubo está revestido de epitelio plano estratificado en la orofaringe o respiratorio en la rinofaringe y laringofaringe; debajo del epitelio se localiza la lámina propia con nódulos linfoides y posteriormente fibras de tejido muscular estriado visceral que brindan sostén a la estructura.

Después de la faringe se localiza la laringe que es un tubo sostenido por piezas de cartílago hialino con revestimiento de epitelio respiratorio. En este órgano se encuentran los pliegues vocales (cuerdas vocales) que poseen un estroma muscular el cual facilita su vibración durante la fonación.

Una vez que el aire sale de la laringe entra en la tráquea. Esta corresponde a un tubo sostenido por piezas de cartílago hialino en forma de C, cerrados en la parte posterior por fibras de músculo liso que conforman al músculo traqueal. El revestimiento epitelial de la tráquea corresponde a epitelio respiratorio asociado a una lámina propia con abundantes nódulos linfoides. En la zona de la carina, la tráquea se divide en dos bronquios, uno derecho y otro izquierdo, que entran a cada pulmón respectivamente.

Los bronquios primarios se dividen en bronquios lobares y posteriormente en segmentarios. En el ratón los bronquios primarios están sostenidos por cartílago hialino, mientras que los intrapulmonares no poseen piezas cartilaginosas. Independientemente del tipo de bronquio de que se trate, estos están revestidos por una mucosa con epitelio respiratorio acompañado de una lámina propia con nódulos linfoides y una capa muscular lisa dispuesta circularmente.

Posteriores a los bronquios se localizan los bronquiolos. En la zona de los bronquiolos, el epitelio cambia para convertirse en cilíndrico simple (con escasas células mucoproducidas, y numerosas células ciliadas no ciliadas) y posteriormente en cúbico simple (con células ciliadas y no ciliadas). Debajo del epitelio se localiza la lámina propia, seguida de una capa muscular lisa dispuesta circularmente. Los bronquiolos carecen absolutamente de piezas cartilaginosas de sostén.

Una vez que el aire alcanza la zona alveolar, se lleva a cabo el intercambio de gases a través de la membrana alveolo-capilar. La zona alveolar está revestida por células planas (neumocitos tipo I/NI) que comparten su membrana basal con el endotelio de los capilares alveolares y células cúbicas (neumocitos tipo II/NII). Alrededor del epitelio se localizan abundantes fibras elásticas que brindan distensibilidad al pulmón.

El sistema respiratorio presenta una barrera epitelial que desempeña un papel importante en la defensa de los pulmones contra la exposición a los xenobióticos y permite mantener la homeostasis tisular. Dentro de esta barrera epitelial se encuentran distintos tipos celulares que participan en esta defensa a través de funciones específicas y favorecen la adecuación del sistema y la supervivencia de las células en ambientes tóxicos.

A continuación se describirán con mayor detalle a las células de la mucosa del sistema respiratorio, así como sus funciones.

### **3.3 La mucosa del Sistema Respiratorio**

#### **3.3.1 Descripción general de la mucosa**

La mucosa de las vías aéreas está conformada por una amplia variedad de células especializadas que desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis del sistema; estas incluyen la regulación del equilibrio de fluidos en el pulmón, el metabolismo, la eliminación de compuestos inhalados, la defensa pulmonar contra organismos patógenos y contaminantes, entre otras (Knight y Holgate, 2003; Tam et al., 2011; Ganesan et al., 2013). Estas células son un componente central de la barrera física entre el tejido pulmonar y el aire (Boucherat et al., 2013).

La mayor parte del sistema respiratorio está revestido por epitelio respiratorio que como se mencionó anteriormente es pseudoestratificado ciliado con células caliciformes. En las vías aéreas más profundas como los bronquiolos el revestimiento epitelial cambia sus características, al igual que en los alveolos pulmonares.

A continuación se describirán los tres tipos básicos de epitelios que encontraremos en el sistema: el epitelio respiratorio, el epitelio bronquiolar y el epitelio alveolar.

### 3.3.2 El Epitelio Respiratorio

El epitelio respiratorio reviste la mayor parte de las vías respiratorias altas, desde la cavidad nasal hasta los bronquios, y es pseudoestratificado ciliado con células mucosecretoras (caliciformes). Este epitelio se conforma por distintos tipos celulares con funciones diversas:

- I. Células basales: se localizan a lo largo de las diferentes regiones de las vías aéreas altas, en el epitelio respiratorio y se desempeñan como células madre, ya que poseen la capacidad de regenerarse a sí mismas y originar a las diferentes estirpes epiteliales como las células mucoproductoras y ciliadas, ya sea en condiciones fisiológicas o de daño (Hogan et al., 2014). En las vías aéreas bajas más pequeñas como los bronquiolos y los alveolos, se ha identificado que este tipo celular es escaso o inexistente, y que el epitelio se regenera a partir de células terminalmente diferenciadas como las células CBNC (Hong et al., 2001; Reynolds y Malkinson 2010; Zheng et al., 2017) y los NII (Barkauskas et al., 2013). Se ha reportado también que en condiciones de daño, las células epiteliales diferenciadas pueden cambiar su fenotipo y dar origen a células que expresan características de otro tipo de manera temporal como una respuesta “plástica” a los efectos adversos producidos por los xenobióticos (Hogan et al., 2014).
- II. Células ciliadas: son el tipo celular predominante en las vías aéreas altas y se originan a partir de las células basales o de las secretoras. Estas poseen más de 300 cilios cada una, que tienen la función de desplazar el moco unidireccionalmente, del pulmón hacia la faringe (Knight y Holgate, 2003). Este tipo celular se encuentra en estrecha relación con las células mucosecretoras, ya que la función coordinada de ambas determina la adecuada eliminación y renovación del moco (Gudis y Cohen, 2010).
- III. Células mucoproductoras: son células que se encargan de sintetizar mucinas, que son glucoproteínas de alto peso molecular que forman parte de las mucosecreciones (Tam et al., 2011). Estas mucinas pueden quedarse ancladas en la membrana de las células epiteliales o ser liberadas a la película mucosa extracelular que protege al epitelio que constantemente se remueve y renueva (Williams et al., 2006). El moco producido por estas células es neutro, hialino y poco viscoso y funciona como barrera semipermeable que protege al epitelio de la deshidratación y atrapa a las partículas suspendidas en el aire (Vareille et al., 2011; Boucherat et al., 2013). En las vías aéreas bajas, como los bronquiolos las células mucoproductoras son escasas y conforme las vías se acercan a los alveolos, desaparecen. Sin embargo se ha observado que en situaciones en las que se produce inflamación, como durante la exposición a bacterias, virus, lipopolisacáridos o a xenobióticos, el número de células mucoproductoras incrementa, en un fenómeno conocido como metaplasia mucoide (Williams et al., 2006).

- IV. Células serosas: morfológicamente son semejantes a las células mucosecretoras, sin embargo poseen abundantes gránulos densos en los que acumulan sus secreciones. La naturaleza de su secreción no ha sido claramente identificada (Knight y Holgate, 2003).
- V. Células neuroendocrinas: son células que se encuentran distribuidas en las vías aéreas ya sean solas o formando acúmulos (cuerpos neuro-epiteliales); su función es la secreción de aminas biogénicas y péptidos que intervienen en el desarrollo pulmonar, así como en la función de las vías aéreas en general (Knight y Holgate, 2003).

### 3.3.3 El Epitelio Bronquiolar

Los bronquiolos, como se mencionó con anterioridad son tubos que se originan a partir de los bronquios y por lo tanto poseen una luz más pequeña y un calibre más angosto; están revestidos por epitelio cilíndrico simple conformado por células ciliadas, mucosecretoras y bronquiolares no ciliadas. Conforme la luz del bronquiolo se hace más pequeña, el epitelio cambia a cúbico simple en el que el tipo celular predominante es la célula bronquiolar no ciliada acompañadas de escasas células ciliadas. Las células bronquiolares no ciliadas se localizan principalmente en los bronquiolos conformando cerca del 80% de la población epitelial de estos tubos (Wong et al., 2009), aunque pueden encontrarse además en menor número en otras zonas como los bronquios (en humanos) y en tráquea y bronquios (en roedores).

Las células ciliadas y mucosecretoras cumplen las mismas funciones que desempeñaban en el epitelio respiratorio, mientras que la célula bronquiolar no ciliada cumple una amplia variedad de funciones relevantes en el pulmón, sobre lo que se profundiza a continuación

### 3.3.4 La Célula Bronquiolar No Ciliada

La CBNC, también conocida como célula club o de Clara fue descrita por el anatomista y patólogo alemán Max Clara, quien publicaría su trabajo en 1937 haciéndola famosa (Singh y Katyal, 2000).

Morfológicamente las CBNC son cúbicas, poseen un núcleo basal y un domo apical de longitud variable en el que almacenan gránulos con las secreciones que producen. Estas células poseen un retículo endoplásmico liso muy desarrollado (Stripp et al., 2002; Reynolds y Malkinson, 2010). En cuanto a sus funciones las CBNC realizan lo siguiente:

- I. Son células madre: se ha identificado que se desempeñan como células madre del epitelio bronquiolar y alveolar, diferenciando otras células bronquiolares no ciliadas y ciliadas (Crosby y Waters, 2010; Reynolds y Malkinson, 2010), además de neumocitos tipo II (Zuo et al., 2018). Los modelos animales sugieren que estas células son “progenitoras facultativas” que tienen propiedades funcionales de células terminalmente diferenciadas, pero que pueden cambiar a un estado proliferativo activo con características similares a células madre indiferenciadas, pero con un potencial de proliferación finita (Stripp 2008; Wong et al., 2009).

- II. Son secretoras: el principal producto de secreción de estas células es la proteína de célula de Clara (CCSP) que es un homodímero pequeño conformado por 70 a 77 aminoácidos (10-16 kDa) también conocido como CC16 (Clara Cell protein 16kDa) o CC10 (Clara Cell protein 10kDa). Participa en el mantenimiento de la integridad del epitelio bronquiolar y en la reparación de éste, principalmente cuando el pulmón está expuesto a sustancias tóxicas (Broeckaert et al., 2000; Stripp et al., 2002; Wong et al., 2009). CC16 se ha identificado como una de las principales proteínas presentes en el lavado broncoalveolar, además de encontrarse en el interior de los gránulos de secreción almacenados en el ápice de estas células. Además se ha reportado que la célula bronquiolar no ciliada es capaz de sintetizar y secretar otras proteínas tales como el inhibidor de proteasas de leucocitos (Franken et al., 1989) , la triptasa de Clara (Kido et al., 1992; Kentaro et al., 1993), las proteínas asociadas al surfactante tipo A, B y D (Walker et al., 1986) y Muc5b (Davis y Dickey, 2008).
- III. Son inmunomoduladoras: realizan actividades inmunomoduladoras a través de sus productos de secreción (Snyder et al., 2010; Hiemstra y Bourdin, 2014). El principal producto de secreción de esta célula implicado en la regulación de la función inmunológica es la proteína CC16 (Singh y Katyal, 2000), ya que se ha reportado que este péptido inhibe la actividad de la fosfolipasa A2 que participa en la generación de mediadores lipídicos inflamatorios y se conoce es la principal forma en la que esta proteína actúa modulando la respuesta inflamatoria (Anderson et al., 1994; Jorens et al., 1995; Shiyu et al., 2011). Por otra parte en años recientes se ha reportado que CC16 inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-8 (Tokita et al., 2014) aunque el mecanismo no se ha dilucidado aún.
- I. Son metabolizadoras de xenobióticos: estas células expresan altos niveles de mono-oxigenasas del citocromo 450 (CYP450) lo que les permite metabolizar una gran cantidad de xenobióticos (Ding y Kaminsky, 2003; Kim, 2004) y son consideradas junto con los neumocitos tipo II las células más activas metabólicamente. Estudios *in vivo* señalan que algunas isoformas de CYP450 se expresan de manera más abundante y constitutivamente en estas células; algunas de estas son CYP1A1 (Choudhary et al., 2003; Chang et al., 2006), CYP2B (Lee y Dinsdale, 1993; Choudhary et al., 2003), CYP2E1 (Forkert, 1995), CYP2F2 (Van winkle et al., 1995; Choudhary et al., 2003) entre otras. Diversos autores proponen el análisis de la modificación en la actividad y expresión de estos CYP450 como una forma de monitorear la alteración en la fisiología de las CBNC (Mango et al., 1998). Por otra parte, es importante señalar que la alta expresión de CYP450 en estas células las hace más susceptibles al daño producido por los compuestos generados a través de las reacciones que se llevan a cabo durante la desintoxicación (Hukkanen et al., 2002; Chang et al., 2006).

Debido a todas las funciones que se han mencionado, se considera que esta célula es importante como defensora del epitelio y del pulmón ante distintos tipos de daño, entre los que destaca la exposición a xenobióticos a través de la contaminación.

### 3.3.5 La CBNC como defensora ante la exposición a distintos xenobióticos.

Como se mencionó previamente, la célula bronquiolar no ciliada desempeña funciones vitales para el pulmón, que pueden ser consideradas como elementales en la defensa de este órgano.

A continuación se detallan algunos ejemplos concretos en los que se involucran algunas de las funciones de la CBNC como “defensora” ante la exposición a algunos tóxicos.

Respecto a la capacidad regenerativa de estas células se ha identificado que ante el daño causado por la exposición a distintas clases de xenobióticos que dañan a la población celular bronquiolar, como el naftaleno (Van Winkle et al., 1995), el ozono (Evans et al., 1976, Reynolds et al., 2000) y los óxidos de nitrógeno (Evans et al., 1976), las CBNC proliferan y son capaces de diferenciar a otras células de su misma estirpe o a células ciliadas. Esta función mantiene la integridad del epitelio (Wong et al., 2009).

Respecto a la función secretora de esta célula, se comentó antes que la proteína CC16 es el producto predominante de esta célula. Se ha identificado que, bajo estímulos negativos, como la exposición a sustancias tóxicas pro-oxidantes como el ozono, se presenta hiper-producción e hiper-secreción de CC16 (Xiao et al., 2007, 2013). Además se ha identificado que esta proteína tiene actividades anti-inflamatorias, inmunosupresoras (Chen et al., 2001; Snyder 2010; Liu et al., 2013) y antioxidantes (Mango et al., 1998; Pilon et al., 2016).

*In vitro* se ha demostrado que CC16 atenúa la inflamación disminuyendo la producción de IL-8 (citocina pro-inflamatoria) en células bronquiales, lo que contribuye a atenuar la infiltración de células como los neutrófilos (Tokita et al., 2014). *In vivo* se ha comprobado que ratones deficientes en la producción de CC16 presentan una mayor respuesta inflamatoria cuando son sensibilizados con ovoalbúmina, además que expresan mayores niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL1-13 (Chen-Chen et al., 2001). Por otro lado, en cuanto a la actividad antioxidante de CC16 se propone tiene la capacidad de funcionar como una molécula con propiedades antioxidantes a través de la interacción de las metioninas que forman parte de su estructura con los radicales libres (Pilon et al., 2016). Esta protección por parte de CC16 en nuestro modelo puede jugar un papel importante en la modulación de los efectos adversos del V.

Es interesante comentar que la capacidad secretora de la CBNC puede modificarse radicalmente, cambiando a un claro fenotipo mucosecretor, fenómeno que se conoce como metaplasia mucoide. Antes se mencionó que estas células sintetizan Muc5b, entre otras mucinas que se han reportado; esto normalmente ocurre en niveles muy bajos e indetectables través de técnicas de tinción. Sin embargo cuando el pulmón se expone a agentes tóxicos o agentes patógenos que producen inflamación, las CBNC sintetizan, almacenan y secretan mucinas en altos niveles, que pueden ser detectados a través de tinciones especiales (Ácido Peryódico de Schiff- PAS y/o Azul alciano/Ácido Peryódico de Schiff) (Davis y Dickey, 2008; Curran y Cohn, 2010; Alessandrini et al., 2010). Las CBNC conservan su identidad reteniendo sus características originales como es la síntesis de CC16 (Evans et al., 2004) y una vez que la inflamación cesa, la expresión de mucinas se revierte (Roth et al., 2013). Se ha identificado que este cambio a fenotipo mucosecretor es capaz de proveer cierta protección al epitelio ya que actúa como una barrera física que interactúa con los xenobióticos y patógenos antes que tengan acceso a las células.

Todas estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de la CBNC como “defensora” del epitelio bronquiolar y del pulmón ante la exposición a sustancias tóxicas.

### 3.3.6 El Epitelio Alveolar.

El epitelio alveolar forma una barrera entre la vasculatura del pulmón y el medio externo proveyendo una superficie a través de la cual se puede llevar a cabo el intercambio gaseoso.

Dos células epiteliales distintas revisten la superficie alveolar: células largas y escamosas denominadas células alveolares tipo I o neumocitos tipo I (NI) que ocupan cerca del 95% del área de la superficie y son a través de las cuales los gases cruzan la barrera epitelial. Por otra parte se localizan las células alveolares tipo II o neumocitos tipo II (NII) que son cúbicos y cubren una menor superficie (5%) (Lottes et al., 2014).

Se sabe que ambas células son elementales en el mantenimiento de la homeostasis pulmonar y la funcionalidad del órgano, aunque por la variedad de funciones que cumple el neumocito tipo II se ha reconocido como uno de los defensores del pulmón (Mason y Williams, 1982).

A continuación se detallan los aspectos morfológicos y funcionales de las células alveolares tipo II.

### 3.3.7 Las Células Alveolares Tipo II.

Morfológicamente son células de aspecto cúbico con microvellosidades en la superficie apical y un citoplasma que contiene numerosos cuerpos laminares; en su citoplasma poseen abundante retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y una gran cantidad de mitocondrias (Mason, 2006). Estas células presentan funciones homólogas a las CBNC pero en el epitelio alveolar y a continuación se detallan las más relevantes.

- I. Son células madre: se ha identificado que son responsables de la reparación del epitelio alveolar en caso de daño ya que se desempeñan como células progenitoras tanto de su propia estirpe, como de los NI (Evans et al., 1975; Barkauskas et al., 2013).
- II. Son secretoras: la secreción del surfactante es la función más estudiada y mejor caracterizada del NII; este se encarga de la síntesis de proteínas y lípidos que conforman a esta sustancia que provee una superficie de baja tensión en los alveolos, previniendo el colapso alveolar durante la respiración (Fehrenbach, 2001). El agente surfactante se conforma por glicerofosfolípidos (80%, siendo la dipalmitoil-fosfatidilcolina el más abundante), colesterol (10%) y las proteínas surfactantes (10%) SP-A, SP-B, SP-C y SP-D (Andreeva et al., 2007). Los lípidos que forman a esta sustancia y las proteínas SP-B y SP-C se organizan en los llamados cuerpos laminares de los NII representando a un organelo característico de estas células. Estos cuerpos son secretados a la superficie libre alveolar en donde forman una monocapa entre el aire y el epitelio. Posteriormente SP-A y SP-D son secretadas, de manera independiente de los cuerpos laminares, y se integran a la monocapa (Rooney et al., 2001). SP-A y SP-D contribuyen a la defensa innata del pulmón (Mason et al., 1998), además que se les ha atribuido una importante función antioxidante (Bridges et al., 2000; Terrasa et al., 2005). Por otro lado, SP-B y SP-C incrementan las propiedades tenso-activas del surfactante y estabilizan su estructura (Weaver, 1998), y en últimos años se ha identificado que pueden ser inmunoreguladoras (Mulugeta y Beers, 2006). Cabe mencionar que SP-C es la única proteína del surfactante producida exclusivamente por el neumocito tipo II, por lo que se le considera un marcador de esta célula. Por otra parte, los NII secretan altas cantidades de glutatión reducido que es un importante péptido antioxidante (Mason, 2006).
- III. Son inmunomoduladoras: esta función está íntimamente relacionada con las proteínas del surfactante sintetizadas por el NII Como se mencionó antes, SP-A y SP-D son reguladoras de la

respuesta inmune innata; ambas pertenecen a la familia de las lectinas (colectinas) y son capaces de interactuar con moléculas glucosiladas en la superficie de varios microorganismos (bacterias, hongos, levaduras), actuando como “opsoninas” facilitando su fagocitosis y eliminación por parte de los macrófagos alveolares (Kishore et al., 2006). Además de las colectinas, los NII sintetizan proteínas antimicrobianas como la lisozima,  $\beta$ -defensinas, catelicidinas y lipocalina 2 que pueden actuar como péptidos inmuno-moduladores (Mason, 2006).

- IV. Son transportadoras: desde hace varias décadas se identificó la función de los NII en el transporte transepitelial de sodio, contribuyendo a la movilización de líquido sobre la superficie alveolar hacia la barrera alveolo-capilar (Mason, 1982).
- II. Son metabolizadoras: estas células expresan diversas isoformas de los CYP450 lo que les permite metabolizar distintos xenobióticos (Ding y Kaminsky, 2003; Kim, 2004) y son consideradas junto con las células bronquiolares no ciliadas, las más activas metabólicamente. Estudios *in vivo* señalan que algunas isoformas de CYP450 se expresan más y de manera constitutiva en estas células; algunas de estas son CYP1A1 (Chang et al., 2006), CYP2B (Lee y Dinsdale, 1995), CYP2E1 (Forkert, 1995), CYP2F2 (Van winkle et al., 1995) entre otras. Es importante señalar que la expresión de CYP450 en los neumocitos II los hace más susceptibles al daño producido por los compuestos generados a través de las reacciones que se llevan a cabo durante la desintoxicación (Chang et al., 2006).

Cabe destacar que el papel de esta célula como “defensora” que se mencionó antes está íntimamente relacionada con su función secretora.

### 3.3.8 El neumocito tipo II como defensor ante la exposición a distintos xenobióticos.

Como se mencionó previamente, el neumocito tipo II desempeña funciones vitales para el pulmón, y se le ha considerado como elemental en la defensa de este órgano.

A continuación se detallan algunos ejemplos concretos en los que se involucran algunas de las funciones del NII como “defensor” ante la exposición a algunos tóxicos.

Respecto a la exposición a xenobióticos y la capacidad regenerativa de los NII, existen evidencias que indican que ante el daño producido por la exposición a agentes oxidantes que inducen la muerte de NI como el  $\text{NO}_2$  (Evans et al., 1975) y la bleomicina (Rock et al., 2011; Barkauskas et al., 2013), el epitelio alveolar se repara por la diferenciación de NII en su misma estirpe o en células alveolares tipo I, manteniendo la funcionalidad del órgano.

Se ha observado que durante el daño inducido al pulmón, los NI son más susceptibles que los tipo II y mueren, por lo que los NII son los responsables de repoblar el epitelio. De manera posterior al daño o durante él, los NII se desdiferencian, proliferan y finalmente se diferencian en NII hiperplásicos; más tarde algunas de estas células sufren apoptosis, otras permanecen como NII y otras se transdiferencian a NI (Mason, 2006). Actualmente el proceso de hiperplasia se ha reconocido como una respuesta reparadora del tejido y parece ser esencial para la restauración de la arquitectura alveolar y se ha observado después de la exposición a cadmio (Martin et al., 1985), hidroxitolueno (Adamson et al., 1977),  $\text{NO}_2$  (Barth et al., 1994), sílice (Miller y Hook, 1990) y óxido de titanio (Liu y Yang, 2013), por mencionar a algunos xenobióticos. Estos NII son

funcionalmente normales y son vitales para el mantenimiento de la homeostasis alveolar y de las unidades de intercambio gaseoso.

En relación con la exposición a xenobióticos, una función elemental de defensa es la antioxidante, pues se sabe que la producción de estrés oxidante es uno de los mecanismos de daño más frecuente. A este respecto, se ha reportado que las proteínas SP-A y SP-D protegen a los fosfolípidos del surfactante y a los macrófagos del daño oxidante durante la exposición a metales como el cobre. La actividad antioxidante de estas proteínas se atribuye al dominio de reconocimiento de carbohidratos que poseen en su extremo carboxilo terminal (Bridges et al., 2000). Esto mismo podría suceder ante la exposición a otras moléculas y compuestos pro-oxidantes, aunque ha sido pobremente estudiado.

Además de estas proteínas, los NII continuamente recambian las moléculas de glutatión presentes en el surfactante a su forma reducida, para mantener este mecanismo antioxidante permanentemente activo.

Todas estas evidencias ponen de manifiesto la importancia del NII como “defensor” del epitelio alveolar y del pulmón ante la exposición a sustancias tóxicas.

### 3.4 La tolerancia como respuesta de las células epiteliales ante la exposición a xenobióticos

La exposición a xenobióticos o contaminantes puede producir diversos efectos nocivos en la salud a nivel de todos los sistemas de un organismo. Numerosos estudios demuestran que la inhalación de distintos compuestos producen neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hematotoxicidad, neumotoxicidad, etc. Como se mencionó previamente el sistema respiratorio es uno de los más afectados por la contaminación (Bernstein et al., 2004; Kampa y Castanas, 2008).

Sin embargo también se ha identificado que los individuos pueden desarrollar “tolerancia” a los efectos adversos en su organismo, como consecuencia de la exposición repetida a las sustancias tóxicas inhaladas en diferentes escenarios ocupacionales y ambientales (Wesselkamper et al., 2005).

La tolerancia es un fenómeno reconocido en toxicología, y se ha definido como los mecanismos desarrollados por un órgano contra un contaminante, como consecuencia de la pre-exposición a dosis más bajas del mismo compuesto; la importancia de esta respuesta es que les permite a las células “resistir” la exposición a tóxicos y sobrevivir (Fairchild 1967; Sutherland et al., 2012).

Existen numerosas implicaciones asociadas al desarrollo de tolerancia en la salud de los organismos, teniendo ventajas y desventajas con respecto al desarrollo de efectos nocivos en la salud. Estudios clínicos asociados a la exposición a óxido de zinc (ZnO), endotoxina y ozono, entre otros han demostrado que existe variabilidad inter-individual en la capacidad de desarrollar tolerancia pulmonar posterior a la exposición inhalada a ellos (Wesselkamper et al., 2005).

A continuación se detallan algunos estudios en humanos que abordan el tema de la tolerancia en el sistema respiratorio:

		Efecto negativo	Efecto de tolerancia en los
--	--	-----------------	-----------------------------

Autor	Xenobiótico	asociado a la exposición	individuos
Hackney et al., 1977	Ozono	Alteración de los parámetros de función pulmonar	Recuperación de los parámetros normales de función pulmonar
Horvath et al., 1981	Ozono	Alteración de algunos parámetros de función pulmonar	Recuperación de los parámetros normales de función pulmonar
Blomberg et al., 1999	Dióxido de nitrógeno	Incremento en el número de neutrófilos en los bronquios Incremento en la mieloperoxidasa (MPO) de los neutrófilos Alteración en los parámetros de función pulmonar	Persistencia del incremento de los neutrófilos, además de la MPO.  Recuperación de los parámetros normales de función pulmonar
Jörres et al., 2000	Ozono	Alteración de algunos parámetros de función pulmonar Inflamación (incremento de polimorfonucleares, IL-6, IL-8, IL-10)	No se observan efectos sobre la función pulmonar, aunque la inflamación persistió

En los estudios en humanos la forma de evaluar la tolerancia es a través de la comparación en el tiempo de los efectos sobre el pulmón. El efecto de tolerancia se observa en los tiempos de exposición más largos al tóxico de interés.

En modelos animales, el estudio de la tolerancia se ha abordado desde diferentes perspectivas. En algunos trabajos se comparan los efectos de la exposición aguda a una concentración alta de un compuesto contra los efectos producidos por la exposición repetida a concentraciones más bajas del mismo; el efecto de tolerancia se observa con la exposición repetida. En otros estudios se comparan los efectos que se producen con la exposición repetida a concentraciones bajas del compuesto, seguidas de la exposición repetida a concentraciones más altas del mismo compuesto; el efecto de tolerancia se observa en la exposición repetida a concentraciones altas.

A continuación se detallan algunos estudios en animales que abordan el tema de la tolerancia en el sistema respiratorio:

		Efecto negativo asociado a	Efecto de tolerancia en los
--	--	----------------------------	-----------------------------

Autor	Xenobiótico	la exposición	individuos
Lakritz et al., 1996	Naftaleno	Adelgazamiento del epitelio bronquiolar y pérdida de las células epiteliales. Disminución de la cantidad de gránulos en las CBNC y vacuolización del citoplasma	El epitelio tiene una apariencia normal y no se observa pérdida importante de células epiteliales bronquiolares Hay pocos gránulos en las CBNC y no se observa vacuolización de su citoplasma
Christian et al., 1998	Ozono	Incremento de la respuesta inflamatoria en las vías aéreas bajas	Atenuación de la respuesta inflamatoria en las vías aéreas bajas
Born et al., 1999	Cumarina	Hipertrofia y necrosis de las CBNC en los bronquiolos terminales. Desorganización del epitelio Disminución de la expresión de los CYP450 totales en pulmón	No se observó necrosis de las CBNC en los bronquiolos terminales. La apariencia final del epitelio fue igual a la de los controles. Recuperación de la expresión de los CYP450
West et al., 2003	Naftaleno	Vacuolización de las CBNC y desprendimiento de estas de la lámina basal Incremento de la permeabilidad del epitelio bronquiolar	Disminución de la permeabilidad del epitelio bronquiolar, sin signos de citotoxicidad

Es interesante hacer notar que en los modelos animales destaca la CBNC como participante activa en el desarrollo de este tipo de respuesta en el pulmón.

Los mecanismos por los que ocurre este tipo de respuesta no se han establecido con precisión; sin embargo, se sugiere la participación de la CBNC en la que se ha observado:

- 1 La reducción de la actividad de los CYP450 que estaría relacionada con el metabolismo de tóxicos como el naftaleno y la cumarina. Esta disminución implica una menor formación de los metabolitos tóxicos de estos compuestos, disminuyendo la toxicidad sobre las CBNC (Lakritz et al., 1996; Born et al., 1999).
- 2 La modificación de enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión (GSH), en particular  $\gamma$ -glutamyl-cistein sintetasa ( $\gamma$ -GCS), que es una enzima involucrada en la síntesis de glutatión, que es un importante antioxidante en el pulmón. Este mecanismo se ha relacionado con la tolerancia al naftaleno y a la cumarina (West et al., 2003; Vassallo et al., 2010).
- 3 El incremento en el número de CBNC: en el caso de compuestos pro-oxidantes como el ozono se ha observado el incremento en el número de células bronquiolares no ciliadas en los bronquiolos terminales

(Plopper et al., 1994). Las funciones de estas células, como se mencionó previamente están relacionadas con la defensa del epitelio bronquiolar.

- 4 Incremento en la concentración de CC16: se ha observado que en los pulmones de ratas tolerantes a la exposición a ozono, las CBNC incrementan la expresión de CC16 en los bronquiolos (Dodge et al., 1994). Una de las funciones que se han propuesto para esta proteína es ser una molécula antioxidante, por lo que el incremento sería relevante ante la exposición de un pro-oxidante.

Algo interesante se ha observado al respecto del desarrollo de tolerancia en un estudio comparativo entre machos y hembras. Sutherland y colaboradores reportaron que existen diferencias en la respuesta a la exposición a naftaleno en un mismo modelo que se propone produce tolerancia en los machos. En el caso de las hembras, la tolerancia que se observa es incompleta, es decir, varios de los daños, aunque mínimos persisten, mientras que en los machos la tolerancia que se observa es completa (Sutherland et al., 2012). Una de las observaciones de este trabajo es que en el caso de los machos, el número de CBNC incrementan en los bronquiolos terminales, en los que se observa que el daño por la exposición desaparece a altas concentraciones de naftaleno, mientras que en las hembras se observó incremento en las células ciliadas. Sutherland propone que esta disparidad es la posible razón por la cual se presentan diferencias en la respuesta en ambos sexos.

Otro fenómeno interesante observado fue que en las hembras disminuyó la expresión de la Ligasa Glutamato-Cisteína (GCL) que es importante para la síntesis de glutatión, mientras que en los machos este fenómeno no se produjo. Este hecho se propone también como una explicación más que las hembras no sean capaces de desarrollar tolerancia completa al naftaleno, mientras que los machos si.

Este último estudio demuestra con claridad que las hembras y los machos presentan diferencias en la respuesta de tolerancia. Se ha reportado que el pulmón es un órgano dimórfico incluso desde su desarrollo, por lo que ha continuación se aborda este tema con mayor profundidad.

### 3.5 Dimorfismo pulmonar

Numerosos estudios demuestran que existen diferencias inherentes al sexo en la morfología y fisiología pulmonar, desde el desarrollo de este órgano y durante toda la vida del organismo, y estas diferencias se manifiestan tanto en estado de salud como de enfermedad (Towsend et al., 2012).

*In utero*, tanto en humanos, como en animales se presentan distintas diferencias en relación con el tamaño de los pulmones, de la velocidad con la que se desarrollan las distintas zonas de las vías aéreas, la síntesis y secreción del surfactante, además de los parámetros de función pulmonar. Se sabe por ejemplo que las hembras producen el surfactante de manera más temprana que los machos (Fleisher et al., 1985; Torday y Nielsen, 1987), que las hembras poseen pulmones más pequeños que los machos (Hibbert et al., 1995; Merkus et al., 1996), que las vías aéreas bajas se desarrollan más rápidamente en las hembras que en los machos (Pagtakhan et al., 1984).

Durante la niñez y la adolescencia, una de las diferencias más relevantes entre machos y hembras se presenta en el crecimiento de las vías aéreas y el parénquima pulmonar. En las hembras, este crecimiento se da de manera proporcional entre una zona y otra, mientras que en los machos el crecimiento de las vías aéreas se

retrasa con respecto al del parénquima pulmonar; a este fenómeno se le conoce como disanapsis pulmonar (Becklake et al., 1999).

Estas y otras diferencias que existen entre la anatomía y la fisiología pulmonar en relación al sexo influye también sobre las condiciones de desarrollo de numerosas patologías pulmonares. Un ejemplo claro y que ha sido ampliamente explorado al respecto es el del asma. Los estudios epidemiológicos indican que antes de la pubertad la incidencia de asma es mayor en niños que en niñas, mientras que al inicio de la pubertad y durante la vida reproductiva de las mujeres, la incidencia se revierte (Boezen et al., 2004; Townsend et al., Melgert et al., 2007).

Surge entonces la pregunta importante de ¿cuáles son los factores que influyen en las diferencias observadas entre machos y hembras?

Uno de los aspectos que más se han explorado intentando explicar estas diferencias es el que trata de la influencia de las hormonas sexuales en la fisiología pulmonar. Las hormonas sexuales son capaces de actuar sobre las células a través de una vía genómica (uniéndose con su receptor al ADN) y de la vía no genómica (a través de la unión a receptores de membrana y la posterior regulación de distintas vías de señalización (Simoncini y Genazzani, 2003; Edwards, 2005; Bennett et al., 2010). Numerosos estudios demuestran que dependiendo del tipo celular, la concentración de la hormona esteroidea, la expresión relativa del receptor específico de la hormona, las moléculas co-reguladoras asociadas, así como la regulación de las vías de señalización influyen sobre los efectos que se observan en relación con las hormonas esteroides, convirtiendo la modulación de la función celular en un fenómeno muy complejo (Townsend et al., 2012).

En la siguiente tabla se resumen algunas diferencias que se han observado en estudios epidemiológicos entre hombres y mujeres en relación con la gravedad de algunas patologías pulmonares, así como las diferencias en el daño pulmonar entre machos y hembras asociado a la exposición a algunas sustancias tóxicas.

### **3.6 El vanadio como representante de los agentes xenobióticos inhalados**

#### **3.6.1 Características generales del vanadio**

El vanadio (V) es un elemento de transición perteneciente al grupo VB de la tabla periódica, que puede existir con múltiples valencias (+2, +3, +4, +5), siendo las valencias +3 y +5 las más estables (Cohen, 2015). La forma más común de encontrar a este metal en la naturaleza, en el estado pentavalente, es como pentóxido de vanadio ( $V_2O_5$ ).

En la naturaleza, el V no se encuentra en forma pura, dado que tiende a reaccionar con otros elementos. De manera natural, este metal se encuentra formando parte de diferentes minerales como la carnotita, patronita y vanadinita (Grayson 1983; ATSDR, 1997), además de ser un componente de rocas ricas en azufre y encontrarse en depósitos de petróleo crudo (ATSDR, 1997). Podemos encontrarlo en cuerpos de agua, en los que las concentraciones varían dependiendo de la filtración desde las rocas hacia estos depósitos naturales y de la cercanía con fuentes antropogénicas de este elemento (Barceloux, 1999).

Se encuentra también en pequeñas cantidades en alimentos como la pimienta negra, algunos hongos, espinacas y en mariscos (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

La liberación de V hacia la atmósfera es principalmente consecuencia de la actividad humana, por lo que se puede considerar a este metal como un contaminante del aire que forma parte de las partículas suspendidas. Los petróleos de América son los que contienen la mayor concentración de vanadio; en petróleos crudos provenientes de Venezuela las concentraciones van de 282 a 1,180 mg/g, mientras que en la variedad maya de México, el contenido es de 243 mg/g (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Reportes muestran que el V ha estado presente, tanto en muestras biológicas, como en las partículas suspendidas en el aire que son retenidas en el tejido pulmonar de los habitantes de la Ciudad de México. Fortoul y colaboradores han reportado concentraciones de aproximadamente 1.38  $\mu\text{gV/g}$  de peso seco de pulmón en autopsias practicadas a residentes de la Ciudad de México que vivieron durante la década de los 90's. Esta concentración fue mayor que la reportada en el mismo estudio para la década de los 60's en que las concentraciones encontradas en los pulmones fueron de 1.04  $\mu\text{gV/g}$  de peso seco de pulmón (Fortoul et al., 2002). En la actualidad, no existen datos que aporten más información sobre los niveles de vanadio a los que está expuesta la población mexicana.

El V posee una característica excepcional como biometal que consiste en que puede participar en los procesos biológicos como anión y como catión. En condiciones fisiológicas, el  $\text{V}^{+5}$  predomina como anión vanadato ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) y  $\text{V}^{+4}$  como catión vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ ), aunque pueden presentarse otras especies de aniones y cationes (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Ciertos complejos de V como el vanadato, adoptan la estructura tetraédrica y la distribución de carga atómica del ión fosfato, por lo que se considera que es bioequivalente al fosfato (Scior et al., 2005). Por esta característica que se ha descrito, el vanadato es capaz de mimetizar al fosfato, reemplazándolo en los centros activos de diversas enzimas, propiciando su activación o inhibición, desencadenando distintos efectos celulares (Scior et al., 2005; Goc, 2006). Por otro lado, al ser estructuralmente similar al fosfato, el vanadato es susceptible de ingresar a las células a través de transportadores de fosfato localizados en la membrana plasmática (Davidson et al., 2007).

### 3.6.2 Toxicocinética y Toxicodinamia del V

La presencia de V en la atmósfera es resultado de la quema de combustibles fósiles y las principales rutas de exposición a este metal para la población general son la vía oral y la aérea, mientras que en los trabajadores ocupacionalmente expuestos a polvos y humos que se producen en la combustión de petróleo, carbón y aceites, la principal vía de exposición es la aérea (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999). La absorción de vanadio depende de la ruta de administración y de la solubilidad del compuesto. La principal ruta de absorción de este metal es a través de la vía aérea (~25%), mientras que la vía gastrointestinal (~5-10%) ocupa un lugar secundario. La piel es la menor ruta de exposición y absorción (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Se sabe que en todos los tipos celulares, los iones vanadato ingresan al citoplasma a través de canales transportadores de aniones fosfato y cromato; las formas insolubles de V entran a través de la vía pinocítica.

Una vez dentro de las células, los iones vanadato son convertidos en especies tetravalentes vanadil, por la acción de agentes reductores como el NAD(P)H, ascorbato y glutatión. Estas especies tienen la posibilidad de unirse a proteínas, o ser nuevamente oxidadas a iones vanadato (Cohen 2015).

Una vez que el V ha sido absorbido, es transportado a los tejidos a través del torrente sanguíneo. En el torrente sanguíneo, el 90% del vanadio que es absorbido, se une a proteínas que lo transportan como la albúmina y la transferrina. Los complejos de vanadio se transforman, a través de reacciones de óxido-reducción, en iones vanadil y vanadato dentro de los tejidos y ambas formas (catiónica y aniónica, respectivamente) son distribuidas en el organismo, concentrándose en hueso, pulmones, riñones, bazo e hígado (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999; Goc, 2006).

La mayor parte del V es eliminado a través de la orina y las heces, en dos fases (eliminación bifásica). Los estudios indican que el riñón elimina aproximadamente del 40-60% del metal absorbido dentro de los primeros tres días (Barceloux D.G. y Barceloux D., 1999). Esta primera eliminación corresponde a una fase de eliminación inicial rápida, que es seguida de una fase de eliminación prolongada dentro de los 40-50 días siguientes (Goc, 2006; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006).

Existen reportes que indican que algunos órganos tardan más tiempo en remover el V y por lo tanto permanece más tiempo en ellos, prolongando los posibles efectos tóxicos observados en estos. Algunos ejemplos son el hueso, los músculos y los pulmones (Elinder et al., 1988; French y Jones, 1993).

### 3.6.3 Toxicidad del V en el sistema respiratorio

*In vivo* se ha reportado que el V produce hematotoxicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad y toxicidad pulmonar (Fortoul et al., 2011, 2014), y dado que la vía aérea es la principal ruta de absorción de V resulta relevante estudiar los efectos que este metal pueda producir en el sistema respiratorio.

En la población humana, la exposición aguda a polvos de V puede producir irritación nasal, rinitis, irritación de los ojos, irritación de la garganta, tos persistente, bronquitis y bronconeumonía (Toya et al., 2001). La exposición crónica por inhalación en ambientes laborales induce cambios en los órganos respiratorios y la aparición de bronquitis, rinitis, laringitis y faringitis (Bonner et al., 2000; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Trabajadores expuestos a concentraciones aproximadas de 0.05 y 5.3 mg/m<sup>3</sup> desarrollaron irritación severa en el tracto respiratorio con disnea, tos y dolor en el pecho. Pruebas posteriores de función pulmonar indicaron la posibilidad de un efecto obstructivo en las vías aéreas bajas (Levy et al., 1984).

En modelos experimentales *in vivo*, la exposición a compuestos de V produce traqueítis, bronquitis, bronconeumonía, enfisema, edema pulmonar e inflamación (Toya et al., 2001). Otros estudios demuestran que la exposición a este metal produce alteración de la función pulmonar en monos, presencia de células inflamatorias en lavado bronquial de ratas y monos, además de cambios fibróticos en los pulmones de ratas expuestas a la inhalación o instilación de este compuesto (Knecht et al., 1985; Bonner et al., 1998, 2000; Cohen, 2015).

En ratas y ratones expuestos por tres meses a concentraciones de aproximadamente 2 mg/m<sup>3</sup> a 16 mg/m<sup>3</sup> de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, incrementa la inflamación y la hiperplasia epitelial, mientras que en ratas expuestas a 4 mg/m<sup>3</sup> se presenta fibrosis (NTP, 2002).

En cuanto a mecanismos de toxicidad, se ha reportado que el vanadio produce varios efectos tóxicos en las células que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno, la inhibición de enzimas nucleares y procesos citoplásmicos, así como la alteración en el balance fosforilativo de varias proteínas, frecuentemente a través de la inhibición secundaria de fosfatasas celulares (Cohen, 2015).

### 3.6.4 Estrés oxidante como mecanismo de daño inducido por el vanadio

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas por las células normalmente como resultado de su metabolismo, y funcionan como moléculas clave en el mantenimiento de la homeostasis al participar en diversas vías de señalización (Manke et al., 2013).

Las ERO incluyen a moléculas no radicales derivadas de la reducción molecular del oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno, (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ácido hipocloroso (HOCl) y radicales libres derivados del oxígeno como el anión superóxido (•O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (•OH) entre otros (Dalle-Donne et al., 2005; Di Meo et al., 2016).

En las células, las especies reactivas de oxígeno son producidas principalmente a través de la respiración mitocondrial, aunque hay otras fuentes como las NADPH oxidasas, los microsomas, los peroxisomas y otras enzimas del metabolismo como los CYP450 (Cutler et al., 2005; Birben et al., 2012; Di Meo et al., 2016). Por otra parte, se han identificado factores externos como la exposición a la contaminación, que pueden inducir el incremento en la producción de ERO provocando estrés oxidante (Lodovici y Bigagli, 2011). Dentro de los múltiples componentes de la contaminación están las partículas suspendidas y adosadas a ellas los metales, que incrementan la producción de estas especies en las células induciendo estrés oxidante. Este estrés se ha asociado con efectos adversos como la inflamación, la citotoxicidad y el daño celular en general (Li et al., 2003). Se ha identificado que metales solubles que forman parte de las partículas como el hierro (Fe), níquel (Ni), cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr) y el V generan estos efectos (Knaapen et al., 2002; Leonard et al., 2004).

¿Cuáles son los mecanismos implicados en la formación de especies reactivas de oxígeno por la participación de los metales? Los metales pueden inducir la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton, en la cual el metal reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produciendo al radical hidroxilo (OH•) y un ion del metal oxidado. Se ha identificado que metales como el Co, Cr, Ni, Fe y V pueden ser parte de esta reacción. Otro mecanismo por el cual los metales producen radicales libres es la reacción de Haber-Weiss; en ella un ión metálico oxidado es reducido por el •O<sub>2</sub> y posteriormente reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produciendo radical hidroxilo. Metales como el cobalto, cromo y vanadio pueden participar en esta reacción (Valko et al., 2005; Jomova et al., 2012).

En cuanto a la facilidad con la que los complejos de vanadio se transforman entre los estados de oxidación V, IV (y III), a través de reacciones de óxido-reducción, representa un papel potencialmente importante en la

interacción redox con cisteínas que contienen las proteínas y otros compuestos orgánicos redox-activos, siendo este un mecanismo de toxicidad muy importante del metal (Rehder, 2003).

Las células poseen mecanismos fisiológicos que habitualmente contrarrestan la presencia de especies reactivas manteniéndolas en niveles bajos: los antioxidantes. Estos mantienen los niveles de ERO debajo del umbral tóxico. En condiciones en las que los antioxidantes se encuentran en desequilibrio con las especies reactivas de oxígeno y la balanza se inclina a favor de estas últimas se produce el estrés oxidante (Kohen y Nyska, 2002; Birben et al., 2012). En esta condición existe un desbalance entre las especies reactivas producidas y los antioxidantes disponibles las células (Ray et al., 2012).

Todas las especies reactivas son capaces de interactuar con las biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos), y en condiciones de estrés oxidante, producen efectos negativos sobre estas, alterando sus funciones biológicas, como las que se mencionaron anteriormente sobre el sistema respiratorio. La peroxidación lipídica, la modificación proteica y la oxidación del DNA son claros ejemplos de los daños que se producen por la interacción con las ERO (Weidinger and Kozlov, 2015).

Dado que el V es un metal que produce diversos tipos de daños en el sistema respiratorio, asociados con el estrés oxidante que desencadena, es importante evaluar si las células activan algunos mecanismos que les permitan tolerar la exposición a este metal como un representante de otros componentes de la contaminación.

### 3.7 Antecedentes directos

Como se mencionó, el V es un metal pro-oxidante al que estamos expuestos a través de la vía inhalada, debido a su presencia como parte de las partículas suspendidas y por exposición ocupacional (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006; Assem y Levy, 2012).

Este metal produce diversas alteraciones a nivel sistémico y destaca el sistema respiratorio debido a que es el primer sitio de contacto con el. Llama la atención que en algunos modelos de inhalación de V, este produce una respuesta que podría considerarse relacionada con el fenómeno de tolerancia que antes se definió.

Previamente Knetch y colaboradores (Knetch et al., 1992) en un modelo de exposición sub-crónica a  $V_2O_5$  encontraron que la exposición repetida a este compuesto no desencadenó una respuesta inmune celular en el pulmón, ni incrementó la hiperreactividad bronquial o propició la exacerbación de la respuesta aguda que había sido reportada previamente por el mismo grupo (Knetch et al., 1985), proponiendo una posible respuesta de tolerancia a este metal, sin mayor detalle sobre los posibles mecanismos que favorecieron la respuesta.

Por otra parte datos de nuestro modelo nos sugieren que está ocurriendo un fenómeno parecido al observado por Knetch en el que llama la atención que no se exagera la inflamación en relación con el tiempo de exposición (datos no publicados). Esto podría estar relacionado con el desarrollo de tolerancia.

## 4 Preguntas de Investigación

- I. ¿Cómo puede nuestro modelo de inhalación ser útil para evaluar y estudiar el desarrollo de tolerancia en el pulmón?
- II. ¿Cuáles son algunos de los cambios morfofisiológicos que se presentan en las células del epitelio bronquiolar y alveolar, y como contribuye esto en el desarrollo de tolerancia?
- III. ¿Cuáles son las diferencias en la respuesta que se genera en el pulmón de ratones machos y hembras?

## 5 Justificación

Distintas evidencias demuestran la capacidad del pulmón para resistir el daño generado por algunos compuestos contaminantes, aunque estas adaptaciones han sido poco estudiadas, sobre todo en el área de la tolerancia a compuestos metálicos. Resultados en nuestro modelo sugieren la disminución de los efectos conforme transcurre el tiempo de exposición, lo cual sugiere que de alguna manera, el epitelio pulmonar compensa estos cambios, que pudieran ser distintos entre machos y hembras, dado que el pulmón es un órgano influido de manera importante por las hormonas. Por lo anterior, este estudio pretende determinar los cambios que se presentan en el epitelio bronquiolar y alveolar, como consecuencia de la inhalación de vanadio, y qué relación tienen estos con el desarrollo de tolerancia a este compuesto, con sus posibles diferencias por sexo.

## 6 Objetivos

### 6.1 Objetivo General

Identificar los cambios morfofisiológicos que se presentan en el epitelio pulmonar (bronquiolar y alveolar) como consecuencia del desarrollo de tolerancia a la inhalación de vanadio y determinar sus diferencias por sexo.

### 6.2 Objetivos Particulares

En ratones macho y hembra de la cepa CD-1:

- Examinar los cambios histopatológicos y morfo métricos que se presenten en el epitelio pulmonar como consecuencia de la inhalación de vanadio ( $V_2O_5$ ).
- Analizar los cambios en la presencia de CYP1A1, CYP2B y CYP2E1 en el epitelio pulmonar, mediante inmunohistoquímica.
- Evaluar los cambios en la actividad específica de CYP1A1, CYP2B y CYP2E1 en el pulmón, mediante espectrofotometría de fluorescencia.

- Cuantificar los cambios en la expresión de CYP1A1, CYP2B y CYP2E1, en el pulmón mediante western blot.
- Identificar el efecto sobre los marcadores CC16 (proteína de célula de Clara), y SP-C (proteína de neumocito tipo II) mediante inmunohistoquímica.
- Cuantificar los cambios en la expresión de CC16 y SP-C en el pulmón mediante western blot.

## 7 Hipótesis

La inhalación de concentraciones bajas de vanadio desencadenará efectos relacionados con la tolerancia del epitelio pulmonar al daño, la cual se manifestará en cambios morfológicos, y de la expresión de proteínas relacionadas con este proceso (proteínas de secreción, proteínas de metabolismo de xenobióticos) y se diferenciará por el sexo del animal experimental.

## 8 Metodología

### 8.1 Selección de grupos experimentales

Se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa CD-1 de  $33 \pm 2$  g de peso, que se mantuvieron en ciclos de luz - oscuridad (12:12 h), con agua y alimentación (Purina rodent chow) *ad libitum*. El protocolo experimental se llevó a cabo de acuerdo con la Guía de Cuidado y Uso de animales de Laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council) y la Norma Oficial Mexicana (NOM -062- ZOO-1999), para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los grupos de animales control y experimentales se nombraron como se describe en la tabla siguiente, de acuerdo con el protocolo de inhalación establecido que se detalla más adelante:

Grupos	Concentración de inhalación de V	Número de ratones
Semana 2	1.56 mg/m <sup>3</sup>	10
Semana 4	1.56 mg/m <sup>3</sup>	10
Semana 5	2.57 mg/m <sup>3</sup>	10
Semana 6	2.57 mg/m <sup>3</sup>	10
Semana 8	2.57 mg/m <sup>3</sup>	10

Para cada una de las estrategias experimentales que se realizaron a lo largo del trabajo, se sacrificaron 10 ratones por grupo, correspondientes a 5 controles y 5 expuestos a V.

### 8.2 Determinación de la concentración de V en caja

Con la finalidad de establecer un protocolo de inhalación en dos fases con concentraciones de V distintas en cada una, se prepararon dos soluciones de V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> con molaridad distinta. La primera solución se preparó al 0.01M para la fase I de exposición y la segunda solución se preparó al 0.02M para la fase II. Para cada fase se determinó la concentración de V en la caja de inhalación.

La determinación de las concentraciones de V en la caja se realizó mediante el análisis de filtros colocados en la salida del nebulizador, con una tasa de nebulización de 4 ml/min. Después de cada exposición los filtros se removieron y fueron puestos a peso constante en un horno (Riossa HS-33); posteriormente se fraccionaron en pequeños fragmentos para su digestión. Se utilizaron 100 mg de peso de los filtros, se adicionó ácido nítrico suprapuro y se llevó a cabo el proceso de digestión en un horno de microondas (especial para el tratamiento de muestras) marca CEM modelo MDS 2000. Concluida la digestión se transfirieron las soluciones resultantes a matraces volumétricos de 10 mL para su análisis.

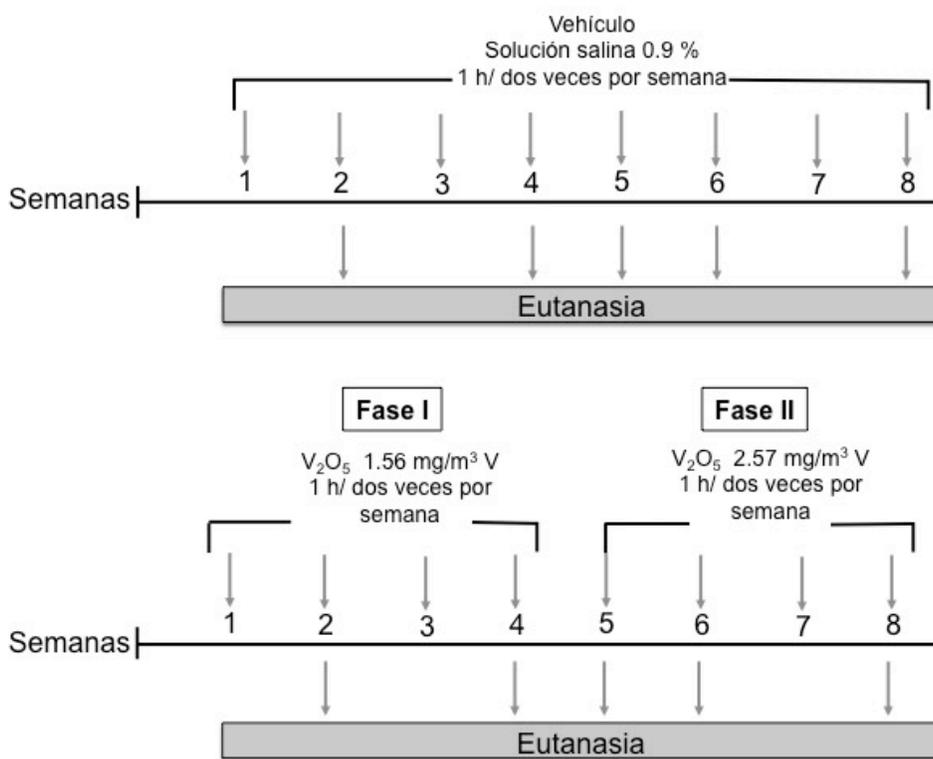
Se preparó una curva de calibración de 5 puntos, de 20 a 100 ppb (ng/mL) de V, se analizaron estas soluciones y con ello se construyó la curva de calibración; las muestras se evaluaron a continuación. Para la preparación de la curva se empleó el estándar certificado de la marca High Purity Standards QCS-27. Las

muestras se analizaron por espectrometría de masas de plasma acoplado por inducción (ICP-MS) empleando un equipo marca Bruker, modelo Aurora M90 con automuestrador acoplado.

### 8.3 Protocolo de inhalación

La exposición se efectuó en una cámara de acrílico transparente (45 X 21 X 35 cm) conectada a un ultranebulizador Yuehua WH 2000®, con una tasa de nebulización máxima de 4mL/minuto.

El grupo control se sometió a la inhalación de solución salina 0.9% una hora dos veces por semana, durante ocho semanas, mientras que los grupos experimentales se expusieron a la inhalación de  $V_2O_5$  en dos fases. Durante la fase I se nebulizó la solución 0.01M exponiendo a los animales a la inhalación de la misma por una hora, dos veces por semana durante un periodo de cuatro semanas. Posteriormente se llevó a cabo la post-exposición fase II, nebulizando la solución 0.02M exponiendo a los animales a la inhalación de la misma bajo el mismo régimen que en la fase I.



El protocolo de inhalación se planteó para analizar el efecto del metal en las células epiteliales pulmonares.

### 8.4 Eutanasia y extracción de órganos

La eutanasia de los animales para la evaluación histopatológica e inmunohistoquímica de los marcadores se realizó por dosis letal de pentobarbital sódico administrado intraperitonealmente (Pisabental, Pisa Agropecuaria), y posteriormente fueron perfundidos con solución salina al 0.9% y solución de paraformaldehído amortiguado al 4%, por vía intracardiaca. Los pulmones fueron extraídos e insuflados

por vía intratraqueal con paraformaldehído amortiguado para ser procesados por la técnica histológica convencional en parafina.

Para la determinación de las concentraciones de vanadio en los órganos, así como para el análisis de la actividad enzimática de los CYP450 y la expresión proteica, la eutanasia se realizó por dislocación cervical para la extracción del tejido.

### **8.5 Determinación de la concentración de vanadio en muestras biológicas**

La determinación de las concentraciones de V en sangre y en los pulmones se realizó siguiendo el mismo protocolo de análisis que se utilizó para determinar la concentración durante la exposición. Esta concentración se reportó como partes por billón (ppb) o nanogramos de vanadio por gramo de peso seco de tejido (ng/g).

### **8.6 Evaluación histopatológica del tejido pulmonar y análisis morfométrico**

La evaluación histopatológica del tejido pulmonar se efectuó mediante el empleo de dos tinciones: hematoxilina-eosina (H-E) y ácido peryódico de Schiff (PAS).

H-E es una tinción de rutina que permite diferenciar la morfología general de los tejidos, a través de la distinción de los componentes ácidos de los básicos en las mismas. La hematoxilina es un colorante catiónico con alta afinidad por los componentes ácidos de las células como los núcleos y zonas ricas en retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres, que se contrastan en color morado. La eosina es un colorante aniónico con alta afinidad por los componentes básicos de las células, tales como el citoplasma (Rodríguez-Mata, 2013).

La reacción del ácido peryódico de Schiff (PAS) es una técnica que se basa en la transformación de radicales 1,2-glicol que se encuentran en los glúcidos en residuos de aldehído, y que se unen a este reactivo, produciendo una coloración magenta en los sitios del tejido en donde existan abundantes polisacáridos (Junqueira- Carneiro, 2013).

La tinción de PAS facilitó el análisis morfométrico del tejido pulmonar que consistió en la medición de la altura del epitelio bronquiolar en la zona de los bronquiolos terminales, así como el conteo de las células bronquiolares PAS positivas de la misma zona.

Para realizar este análisis se tomaron 10 fotomicrografías de 10 bronquiolos terminales en aumento de 40X utilizando un microscopio Olympus modelo BH2-RFCA y una cámara de la misma marca. Una vez obtenidas las imágenes fueron analizadas utilizando los programas Image Pro Plus 4.0 (Media Cybernetics) Adobe Photoshop CC de la forma que se describe a continuación:

- a) Medición de la altura del epitelio bronquiolar: se ubicó la membrana basal del epitelio bronquiolar y utilizando la herramienta para medir distancias, se determinó la altura de las

células epiteliales con el programa Image Pro Plus, previamente calibrado para imágenes obtenidas con el aumento de 40x.

- b) Conteo de células mucoproducidas bronquiolares: se identificaron las células mucoproducidas PAS positivas en una distancia de 100 micrómetros en los bronquiolos terminales.

## 8.7 Inmunohistoquímica

Las laminillas con los tejidos se colocaron en la estufa a 56°C por 20 minutos y posteriormente se colocaron en xilol para desparafinar totalmente. Enseguida los tejidos se re-hidrataron mediante tratamiento con alcoholes (en concentración descendente 100, 96, 70) hasta llegar a agua corriente. Finalmente se enjuagaron con agua destilada.

Después de la desparafinación y rehidratación se procedió a la recuperación antigénica en una olla de presión a 15psi (120 lb) por tres minutos, previa colocación de los tejidos en solución de recuperación antigénica al 2% con reactivo de desmascaramiento Diva Decloaker 20X. Al concluir se dejaron enfriar las laminillas y se lavaron con amortiguador de fosfatos (PBS).

Posteriormente se inactivó la peroxidasa endógena colocando los tejidos en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.9%, por 45 minutos. Al concluir las laminillas se lavaron dos veces con amortiguador de fosfatos y una vez con amortiguador de fosfatos-tween (PBST). Todos los lavados se llevaron a cabo por diez minutos.

Se bloquearon los sitios de unión inespecífica en los tejidos colocando las laminillas en solución de albúmina el 2.5% por una hora. Al concluir las laminillas se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBST. Todos los lavados se llevaron a cabo por diez minutos.

Para la identificación de cada proteína, se colocaron 100 µl de dilución de los anticuerpos siguientes por laminilla:

Anticuerpo	Dilución
Anti-CC16	1:1000
Anti-SPC	1:500

Los anticuerpos se incubaron durante una noche. Al concluir las laminillas se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBST. Todos los lavados se llevaron a cabo por diez minutos. Para amplificar la reacción las laminillas se incubaron por 30 minutos con los anticuerpos secundarios siguientes:

Anticuerpo	Dilución
Anticuerpo anti-cabra	Pre-diluido, de acuerdo con el proveedor
Anticuerpo anti-conejo	Pre-diluido, de acuerdo con el proveedor

Al concluir las laminillas se lavaron dos veces con PBS y una vez con PBST y posteriormente se incubaron con el complejo peroxidasa de rábano (HRP)-estreptavidina por 30 minutos. La inmunoreactividad se identificó incubando los tejidos con 3,3 diaminobencidina tetracloruro al 0.05% por un minuto. Al concluir el revelado, las laminillas se colocaron en PBS para su posterior contratinción.

Para la contratinción, las laminillas fueron colocadas en hematoxilina (previamente filtrada) durante 4 minutos, y posteriormente se retiró el exceso de colorante. Después los tejidos se introdujeron en agua amoniacal por dos segundos, y con agua destilada se retiraron los residuos de la misma.

Finalmente, los tejidos se pasaron por el tren de alcoholes (en orden ascendente), se colocaron en xilol y se montaron con el crubeobjetos utilizando resina de montaje sintética (Hycel).

## **8.8 Obtención de las fracciones citosólica y microsomal en tejido fresco**

Concluido el tratamiento, los ratones fueron sacrificados, se extrajeron los pulmones y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para ser procesados se descongelaron y se colocaron en un volumen de amortiguador para proteínas citosólicas equivalente al triple de su peso en gramos y fueron homogenizados con un homogenizador Heidolph DIAX 900. Una vez obtenido el homogenado, se centrifugó a 10,000 RPMI (9000 G) por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al término de la centrifugación se recuperó el sobrenadante, se homogenizó y se ultra-centrifugó a una velocidad de 34,800 RPMI (105,000 G). Concluida la centrifugación, se recuperó la fracción citosólica (sobrenadante).

El botón se resuspendió con un volumen de amortiguador de fosfatos/sacarosa igual al volumen inicial de la muestra (3ml) para después homogenizarlo. Este homogenizado se ultra-centrifugó a una velocidad de 32,500 RPMI (100 000 G) por 60 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y finalmente el botón obtenido se re-suspendió y homogenizó en  $1/3$  del volumen inicial con amortiguador para fracción microsomal.

## **8.9 Cuantificación de la proteína en las fracciones citosólica y microsomal**

Una vez obtenidas las fracciones, se procedió a la cuantificación de la proteína contenida en las mismas por el método colorimétrico de Bradford con albúmina de suero bovino como estándar. La determinación de la proteína se llevó a cabo en dos diluciones de cada muestra (1:50, 1:80) que fueron mezcladas de manera independiente con solución de Bradford 1:5 (Protein Assay Dye Reagent Concentrate) en placas de 96 pozos.

Se colocaron los cinco puntos de la curva estándar de albúmina y las muestras a cuantificar por triplicado (30 muestras en total por dilución); en cada pozo 10  $\mu\text{l}$  de dilución de la curva o la muestra según fuera el caso y 190  $\mu\text{l}$  de solución de Bradford. Se dejaron reposar por 5 minutos para que la reacción colorimétrica se llevara a cabo y posteriormente las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

La curva y las muestras se distribuyeron como se muestra a continuación:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	M3	M3	M3	M11	M11	M11	M19	M19	M19
B	0.1	0.1	0.1	M4	M4	M4	M12	M12	M12	M20	M20	M20
C	0.2	0.2	0.2	M5	M5	M5	M13	M13	M13	M21	M21	M21
D	0.3	0.3	0.3	M6	M6	M6	M14	M14	M14	M22	M22	M22
E	0.4	0.4	0.4	M7	M7	M7	M15	M15	M15	M23	M23	M23
F	0.5	0.5	0.5	M8	M8	M8	M16	M16	M16	M24	M24	M24
G	M1	M1	M1	M9	M9	M9	M17	M17	M17	M25	M25	M25
H	M2	M2	M2	M10	M10	M10	M18	M18	M18			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	M26	M26	M26									
B	M27	M27	M27									
C	M28	M28	M28									
D	M29	M29	M29									
E	M30	M30	M30									
F												
G												
H												

Esta distribución se llevó a cabo tanto para las muestras diluidas 1:50 como para 1:80.

## 8.10 Western Blot

Conocida la concentración de proteína en cada muestra, éstas se prepararon en condiciones desnaturizantes con amortiguador de carga 1X a 90° C por cinco minutos, cargando 20 mg de proteína por muestra en geles de electroforesis de poliacrilamida- dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 17 y 10%. La electroforesis se corrió a 100V por 1 hora 30 minutos con amortiguador de corrida 1X.

Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa-PVDF en un sistema de transferencia semi-húmeda por una hora a 120 mA. Para verificar la transferencia, las membranas se tiñeron con solución de rojo de Ponceau 0.1%. Después de la tinción las membranas se lavaron con agua destilada y se bloquearon con una solución de albúmina 5% por dos horas a temperatura ambiente.

Concluido el bloqueo, las membranas se lavaron dos veces durante 10 minutos en TBS y una vez en TTBS por 10 minutos. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios anti-CC16 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) y anti-actina de manera independiente (1:1000, cortesía del CINVESTAV) en solución TTBS albúmina 0.5% toda la noche a 4°C.

Después de la incubación de los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas nuevamente con TBS y TTBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a HRP anti-cabra (1: 2500, secondary

rabbit anti goat, Invitrogen) y anti-ratón (1:1000 secondary rabbit anti mouse, Abcam) para el reconocimiento de los anticuerpos primarios CC16 y actina respectivamente.

Ambos anticuerpos se diluyeron en TTBS por una hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron dos veces con TBS y una vez con TTBS antes de la detección de la unión de los anticuerpos mediante quimioluminiscencia detectada con el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (General Electric Company).

### 8.11 Ensayo de actividad enzimática de CYP450 (CYP1A1 y CYP1A2)

Una vez obtenida la fracción microsomal se procedió a realizar los ensayos de actividad enzimática como se describe a continuación.

#### Preparación de los sustratos

Sustrato	Enzima	Concentración (mM)	Peso (mg)	DMSO (ml)
EROD	CYP1A1	0.05	0.012	1
MROD	CYP1A2	0.05	0.114	1

#### Preparación de las soluciones para la curva de resorufina

Solución	Concentración (pmol/ml)	Peso (mg)	Volumen de solución (ml)	Volumen de amortiguador(ml)
A	3.997	0.940	////	1000
B	20	///	2 de A	398
C	10	///	100 de B	100
D	1	///	20 de C	180

#### Curva de resorufina

Solución	Volumen de solución (ml)	Volumen de amortiguador (ml)
0	0	200
5	5 de D	195
10	10 de D	190
25	25 de D	175
50	5 de C	195
100	10 de C	190

250	25 de C	175
500	25 de B	175

### Preparación del NADPH

	Concentración (mM)	Peso (mg)	Volumen de amortiguador (ml)
NADPH	2.5	2.083	1

Pesar la cantidad necesaria considerando que se utilizan 120 ml por cada muestra a analizar. En caso de pesar de más, no regresar material al frasco. Adecuar el volumen para tener la concentración de NADPH requerida.

### Procedimiento

En cada pozo de las muestras y blancos a analizar se colocaron 5 ml de sustrato correspondiente y la cantidad necesaria de microsomas (volumen equivalente a 80 mg de proteína/pozo; excepto para CYP1A2 que requirió 150 mg de proteína/pozo). El volumen final (155 ml) se ajustó con amortiguador de actividad, de acuerdo con la distribución mostrada en el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CM1	M1	M1	M1		M9	M9	M9	CM9	0	0	0
B	CM2	M2	M2	M2		M10	M10	M10	CM10	5	5	5
C	CM3	M3	M3	M3		M11	M11	M11	CM11	10	10	10
D	CM4	M4	M4	M4		M12	M12	M12	CM12	25	25	25
E	CM5	M5	M5	M5		M13	M13	M13	CM13	50	50	50
F	CM6	M6	M6	M6		M14	M14	M14	CM14	100	100	100
G	CM7	M7	M7	M7		M15	M15	M15	CM15	250	250	250
H	CM8	M8	M8	M8		M16	M16	M16	CM16	500	500	500

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CM17	M17	M17	M17		M25	M25	M25	CM25	0	0	0
B	CM18	M18	M18	M18						5	5	5
C	CM19	M19	M19	M19						10	10	10
D	CM20	M20	M20	M20						25	25	25
E	CM21	M21	M21	M21						50	50	50
F	CM22	M22	M22	M22						100	100	100
G	CM23	M23	M23	M23						250	250	250
H	CM24	M24	M24	M24						500	500	500

En la tabla los números 0 a 500 indican los puntos de la curva de resorufina, C: blanco de reacción y M: muestra

Se incubaron las placas a 37°C por 3 minutos en el espectrofotómetro Synergy H4 y posteriormente con una micropipeta multicanal, se añadieron 40 µl de NADPH a cada fila de pozos que contienen la muestra en intervalos de 20s (a los blancos no se les añadió NADPH).

Finalmente se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, en intervalos de 20 s, durante una hora.

#### Ensayo de actividad de CYP450 (CYP2E1).

Se basa en la formación del metabolito fluorescente 2-hidroxi-4-trifluorocumarina (HFC) a partir del 7-metoxi-4-trifluorocumarina (MFC). La reacción se lleva a cabo principalmente por el CYP2E1 pero también pueden estar participando las isoformas CYP2B6, CYP2C9 y CYP2C18.

#### Preparación de los reactivos

Reactivo	Peso molecular (g/mol)	Concentración (mM)	Disolvente
NADPH	833.4	2.5	Amortiguador
MFC	244.17	20	Acetronilo
HFC	230.14	1	Acetronilo

#### Curva de HFC

Preparar a partir de 1000 µl de una solución 1mM de HFC.

Solución	Volumen de solución (µl)	Volumen de amortiguador (µl)
0	0	200
25	5	195
50	10	190
100	20	180
150	30	170
200	40	160
250	50	150
300	60	140

## Procedimiento

En principio se procedió a la dilución del sustrato, colocando en cada pozo 6 ml de MFC 20 mM por cada 120 ml de amortiguador.

En cada pozo de las muestras a analizar se colocaron 40 ml de NADPH y la cantidad necesaria de proteína (volumen equivalente a 80 mg de proteína por pozo). Los blancos de reacción no llevan NADPH y este volumen es sustituido con amortiguador.

Se ajustó con amortiguador a un volumen final de 100 ml, de acuerdo con la distribución mostrada en el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	M1A	M1B	M1C	S1	S1A	S1B	S1C	---	0	0	0
B	C2	M2A	M2B	M2C	S2	S2A	S2B	S2C	---	25	25	25
C	C3	M3A	M3B	M3C	S3	S3A	S3B	S3C	---	50	50	50
D	C4	M4A	M4B	M4C	S4	S4A	S4B	S4C	---	100	100	100
E	C5	M5A	M5A	M5A	C5	S5A	M5B	M5C	---	150	150	150
F	C6	M6A	M6A	M6A	C4	S6A	M6B	M6C	---	200	200	200
G	C7	M7A	M7A	M7A	C4	S7A	M7B	M7C	---	250	250	250
H	C8	M8A	M8A	M8A	C4	S8A	M8B	M8C	---	300	300	300

En la tabla los números 0 a 300 indican los puntos de la curva de HFC, C: blanco de reacción, M: muestra y S: Sustrato. Esta distribución se utilizó para las 25 muestras totales.

Se incubaron las placas a 37°C por 3 minutos en el espectrofotómetro Synergy H4 y posteriormente con una micropipeta multicanal, se añadieron 100 ml del sustrato preincubado a cada fila de pozos que contienen la muestra en intervalos de 20s.

Finalmente se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 409 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm, en intervalos de 3 min, durante una hora.

### 8.12 Análisis Densitométrico

Para el examen de la densidad de la marca obtenida en la inmunohistoquímica, las fotomicrografías se procesaron y fueron separadas en tres canales de color, aunque para el análisis se utilizó solo el canal amarillo para realizar la evaluación con el software de MathLab DensiFe 1.0.0.0. Se analizaron 10 campos de 0.088 mm<sup>2</sup> por ratón elegidos al azar con el objetivo de 40X, de 5 ratones por grupo.

El análisis cuantitativo de las bandas obtenidas en el western blot se llevó a cabo utilizando el software Image J 1.50i (National Health Institutes Bethesda, Maryland USA) para calcular la intensidad de las bandas midiendo la densidad media en píxeles.

### 8.13 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron mediante ANOVA y las diferencias entre los grupos de exposición se identificaron con una prueba *post hoc* de Tukey, considerando una  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativa. Todos los datos son reportados como media  $\pm$  error estándar. Todos los análisis se realizaron con el programa Prisma v. 6.0c (GraphPad, San Diego, CA).

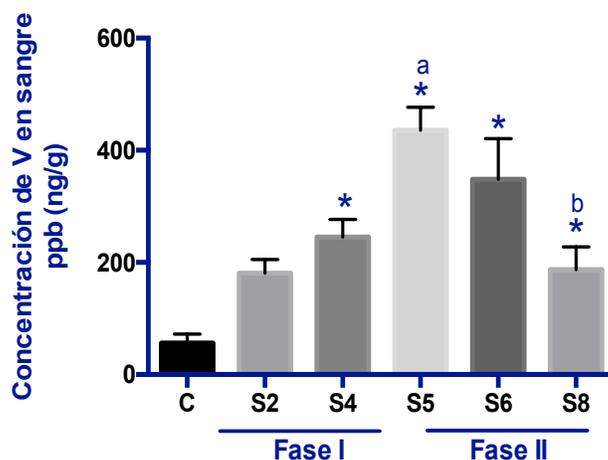
## 9 Resultados

### 9.1 Determinación de la concentración de V durante la exposición

La concentración promedio de V en la cámara de inhalación durante la exposición, utilizando una solución con una molaridad de 0.01 de  $V_2O_5$  fue de  $1.26 \text{ mg/m}^3$ , mientras que la concentración utilizando una solución de  $V_2O_5$  con una molaridad 0.02 fue de  $2.57 \text{ mg/m}^3$ . Estas soluciones se utilizaron para establecer el protocolo de inhalación de dos fases.

### 9.2 Determinación de la concentración de V en sangre

La concentración promedio de vanadio en las muestras de sangre en ambo sexos incrementó de manera significativa a partir de la semana 4 de exposición ( $56.19 \pm 16.23 \text{ ng/g}$ ), y continuo aumentando en las semanas 5 ( $436.0 \pm 40.97 \text{ ng/g}$ ) y 6 ( $348.1 \pm 72.62 \text{ ng/g}$ ) de tratamiento. Al final de la exposición, en la semana 8 la concentración del metal disminuyó ( $187.0 \pm 40.84 \text{ ng/g}$ ) sin diferencia respecto a los controles. La gráfica 1 muestra el comportamiento de las concentraciones de V a lo largo de la exposición.



Gráfica 1. Niveles de V detectados en muestras de sangre de los ratones expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como la media de la concentración de V en ng/g de peso seco  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  *post hoc* (Tukey).  $n=5$ . \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 5.

### 9.3 Hallazgos histopatológicos y análisis morfométrico

En el análisis histológico con hematoxilina-eosina de los pulmones de los ratones control hembras y machos, se observó la estructura normal característica del tejido. En la figura 1 panel A se muestra un corte de pulmón de machos en el que se ve un bronquiolo con epitelio cúbico simple conformado principalmente por células bronquiolares no ciliadas y escasas células ciliadas. Adyacentes al bronquiolo se observan los sacos alveolares íntegros constituidos por NI y NII. No se identificaron cambios relevantes en la estructura del tejido. En la figura 2, panel A se observa un corte de un ratón hembra en el que se observan las mismas características descritas en los machos sin alteraciones relevantes.

En cuanto al análisis histopatológico del tejido pulmonar de los ratones expuestos macho y hembra, se observaron diversas alteraciones asociadas a la inhalación. A partir de la semana 2 se identificaron pequeñas áreas de infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquiolar, zonas de hiperplasia epitelial y desprendimiento de células epiteliales bronquiolares. Se observó también el alargamiento de las células epiteliales bronquiolares, que se comprobó posteriormente con el análisis morfométrico. Todos los cambios permanecieron durante el resto de las semanas de exposición y cualitativamente son semejantes durante todo el tratamiento sin que destaque alguno en particular (Figuras 1 y 2, paneles B,C,D,E y F).

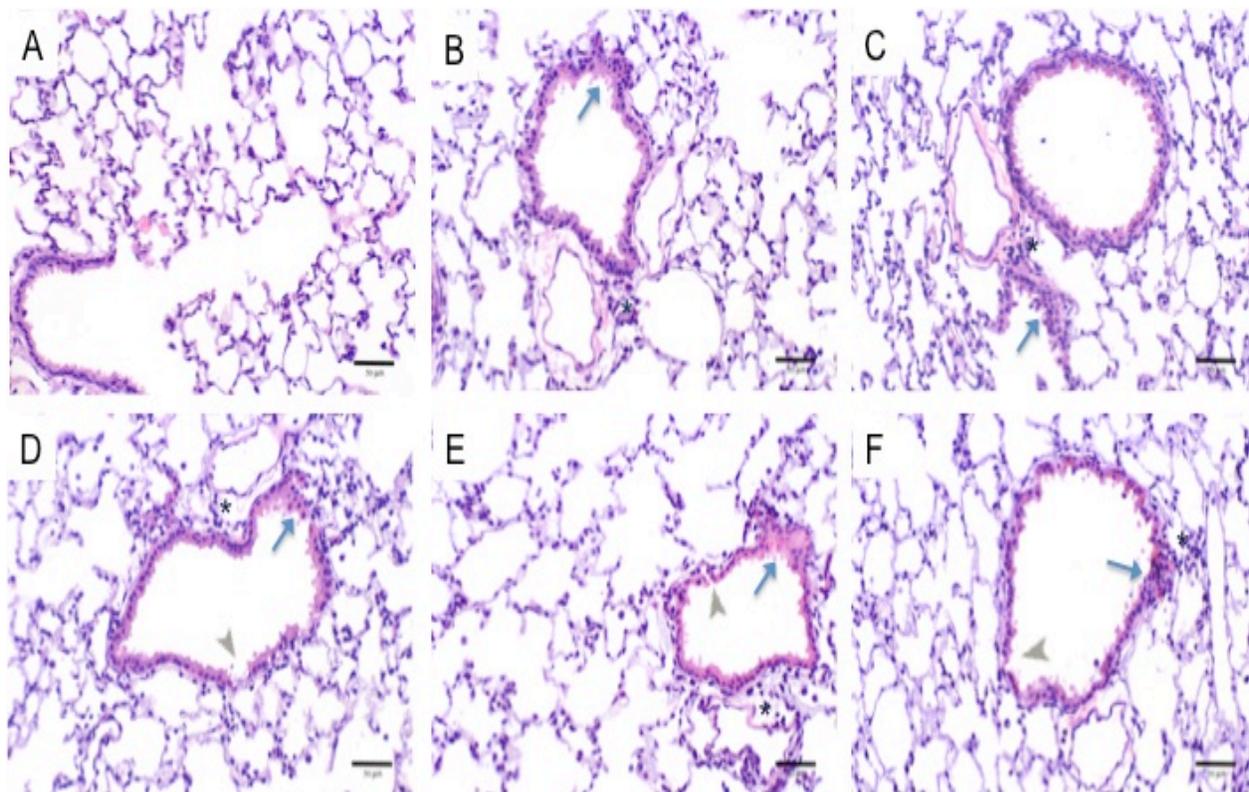


Figura 1. Cambios histopatológicos observados en pulmones de ratones macho posteriores a la inhalación de V. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5, E. Semana 6, F. Semana 8. Las flechas (→) señalan las áreas de hiperplasia epitelial bronquiolar, las cabezas de flecha (>) corresponden a áreas en las que se observó desprendimiento de células epiteliales y los asteriscos (\*) señalan áreas de infiltrado inflamatorio. HE. 200X. Barra 50  $\mu$ m.

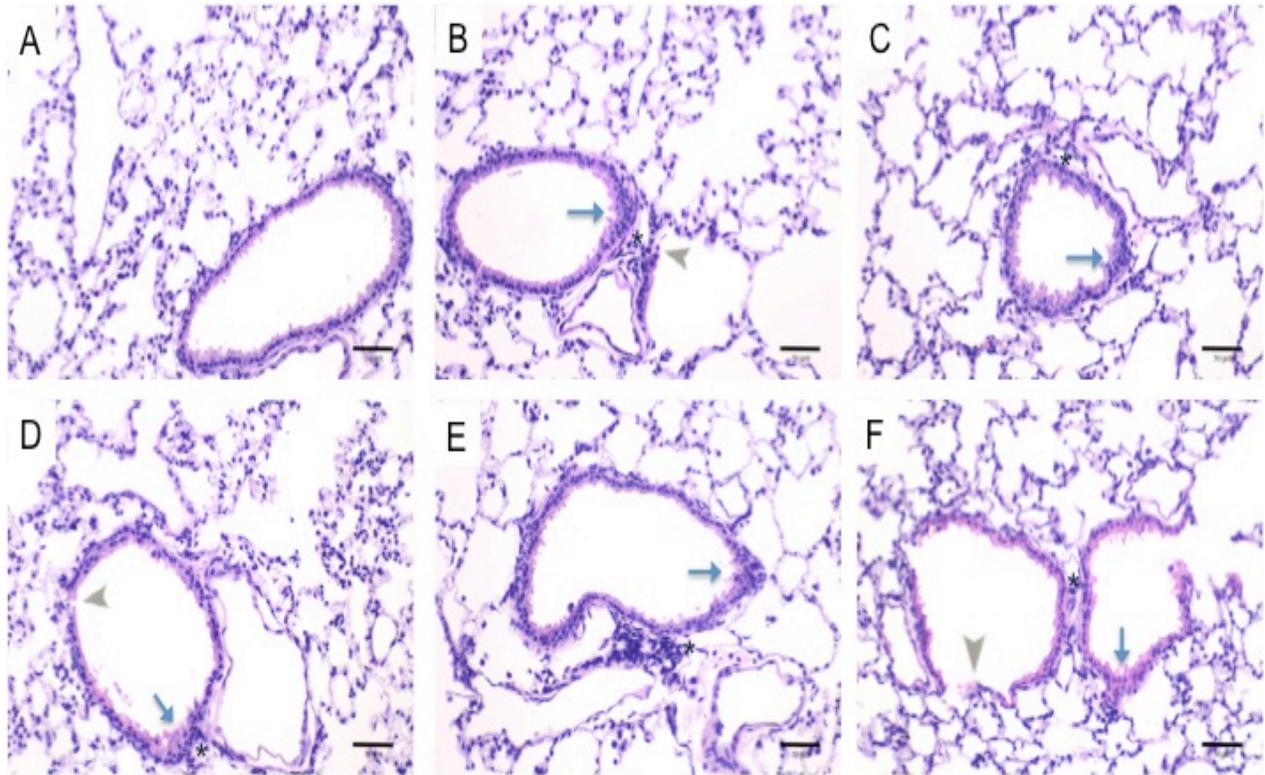


Figura 2. Cambios histopatológicos observados en pulmones de ratones hembra posteriores a la inhalación de V. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5, E. Semana 6, F. Semana 8. Las flechas (→) señalan las áreas de hiperplasia epitelial bronquiolar, las cabezas de flecha (>) corresponden a áreas en las que se observó desprendimiento de células epiteliales y los asteriscos (\*) señalan áreas de infiltrado inflamatorio. HE. 200X. Barra 50  $\mu\text{m}$ .

Con respecto al análisis con el método de PAS, los bronquiolos de los ratones macho presentaron escasas células mucoproducidas en los bronquios, mientras que en los bronquiolos no se encontró ninguna (Figura 3 panel A). Durante el tratamiento con V, la metaplasia mucoide se identificó a partir de la segunda semana de exposición de la fase I y fue incrementando con el tiempo (Figura 3, paneles B y C). Posteriormente durante la fase II de exposición la metaplasia mucoide permaneció aunque en menor grado (Figura 3, paneles D, E, F). En la gráfica 2 se muestran los resultados del conteo de células PAS<sup>+</sup> en los bronquiolos terminales; en ella se muestra el incremento en el número de células mucoproducidas hasta la cuarta semana de la fase I de exposición, mientras que en la fase II el número disminuyó desde la semana 5 y permaneció estable el resto de la exposición, siendo estadísticamente diferente a los controles.

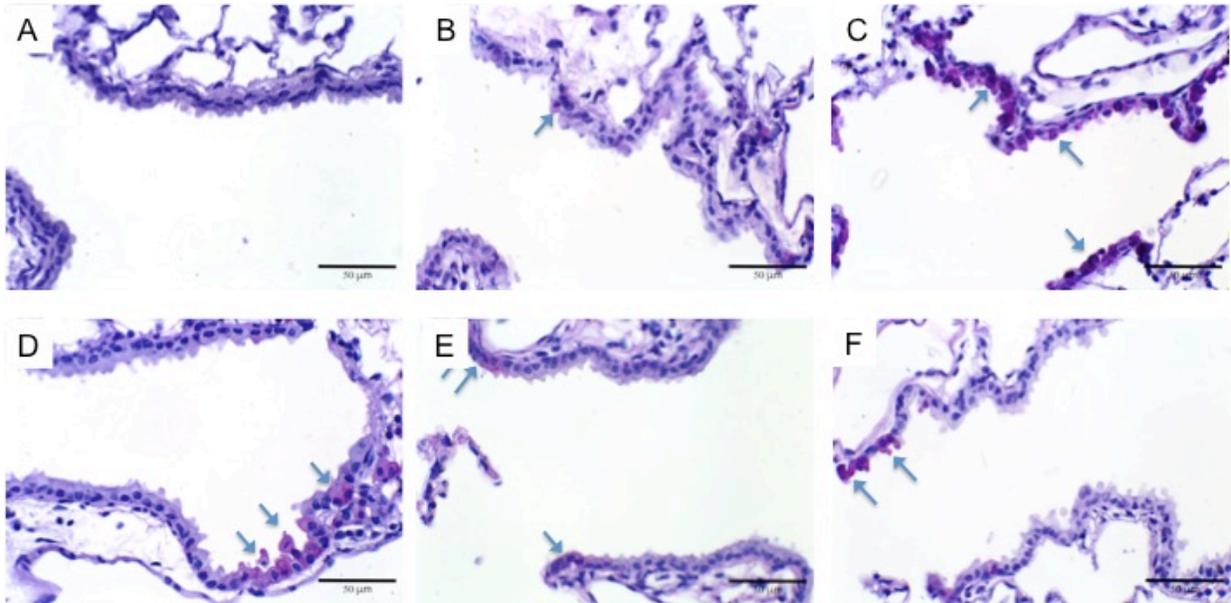
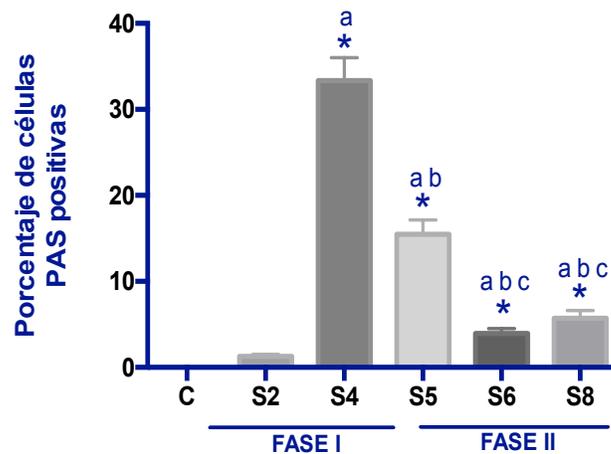


Figura 3. Metaplasia mucoide del epitelio bronquiolar en pulmones de ratones macho. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5, E. Semana 6, F. Semana 8. Las flechas (→) señalan células mucosecretoras en los bronquiolos, de color magenta. Método de PAS. 400X. Barra 50  $\mu$ m.



Gráfica 2. Presencia de células bronquiales mucosecretoras como consecuencia de la inhalación de vanadio en pulmones de ratones macho. Porcentaje de células PAS+ en los bronquiolos terminales de ratones expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como el porcentaje de células PAS positivas  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \* Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2, b. Diferencia con la semana 4, c. Diferencia con la semana 5.

En cuanto a los ratones hembra presentaron escasas células mucoproduktoras en los bronquios, mientras que en los bronquiolos no se encontró ninguna (Figura 4, panel A). Durante el tratamiento con V, las hembras presentaron metaplasia mucoide en los bronquiolos terminales desde la segunda semana de tratamiento, que incrementó en la semana 4 de exposición en la fase I (Figura 4, paneles B y C). Posteriormente, durante la fase II de exposición, la metaplasia mucoide permaneció aunque en menor grado (Figura 4, paneles D, E y F). En la gráfica 3 se muestran los resultados del conteo de células PAS positivas en los bronquiolos terminales;

en ella se observa el incremento en el tiempo en el número de estas células durante la fase I de exposición, mientras que en la fase II el número disminuyó en la semana 5 manteniéndose estable en las semanas 6 y 8 de tratamiento.

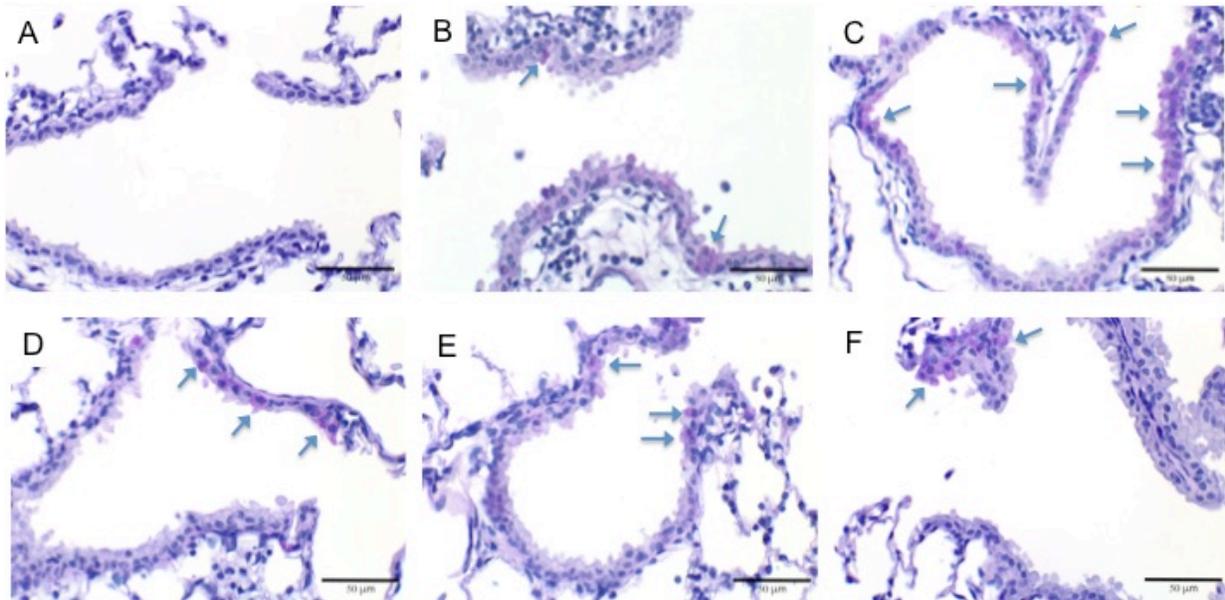
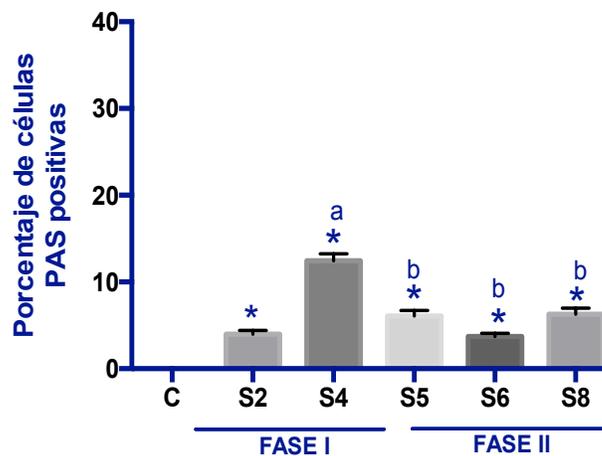


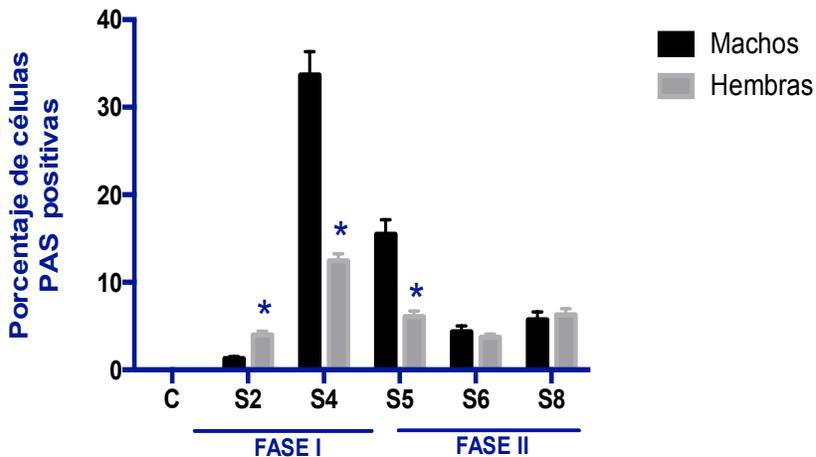
Figura 4. Metaplasia mucoide del epitelio bronquiolar en pulmones de ratones hembra. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5; E. Semana 6; F. Semana 8. Las flechas (→) señalan células de color magenta que corresponden a mucosecretoras en los bronquiolos. Método de PAS. 400X. Barra 50 μm.



Gráfica 3. Presencia de células bronquiolares mucosecretoras como consecuencia de la inhalación de V en pulmones de ratones hembra. Porcentaje de células PAS+ en los bronquiolos terminales de ratones expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como el porcentaje de células PAS positivas ± el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \* Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2, b. Diferencia con la semana 4.

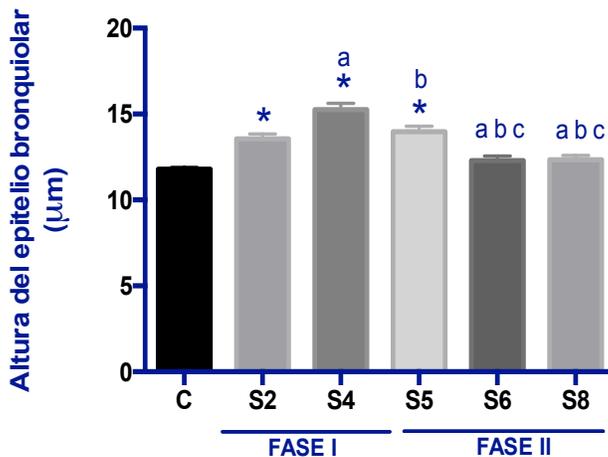
El análisis comparativo entre machos y hembras respecto de las diferencias en el número de células bronquiolares PAS positivas demostró que las hembras presentaron metaplasia mucoide bronquiolar de manera más temprana que los machos, pero una vez que la metaplasia se presentó en los machos el número

de células fue mayor que en las hembras. En las últimas dos semanas de exposición de la fase II de exposición el número de células PAS positivas fue igual en ambos sexos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la presencia de células bronquiolares mucosecretoras posteriores a la inhalación de V. Los valores están expresados como el porcentaje de células PAS positivas  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \* Diferencia entre machos y hembras.

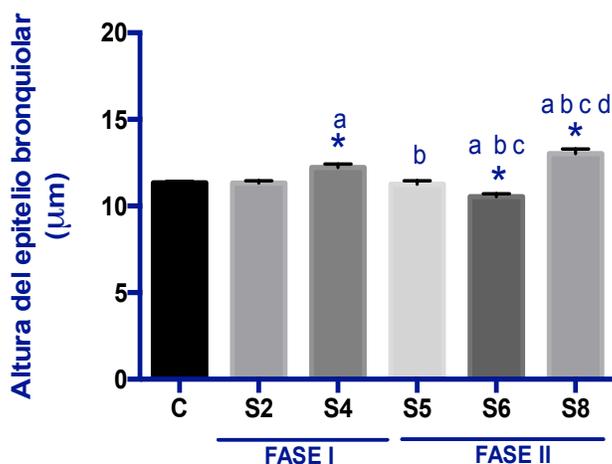
Respecto al análisis morfométrico asociado a la modificación en la altura de las células bronquiolares, en los machos se observó un cambio notable desde la semana 2 de exposición que prosiguió en la semana 4. Al iniciar la fase II las células permanecieron con una forma alargada, aunque con altura menor que en la fase I (gráfica 5).



Gráfica 5. Altura de las células bronquiolares en pulmones de ratones macho. Los valores están expresados como la altura de las células en micrómetros  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2, b. Diferencia con la semana 4, c. Diferencia con la semana 5.

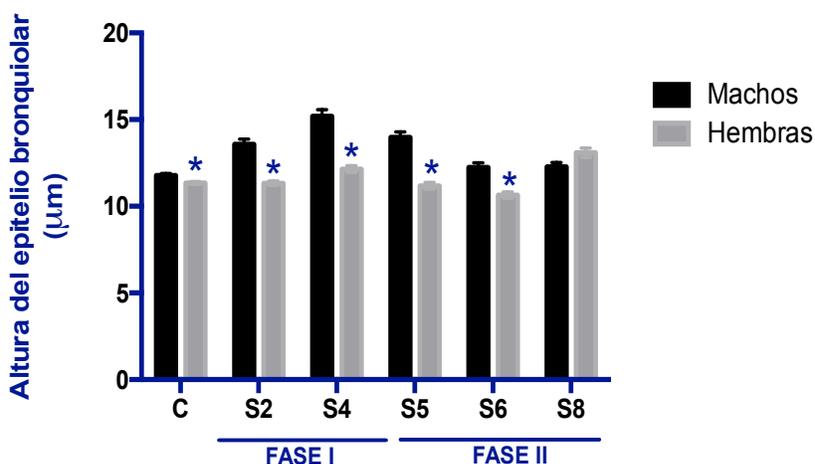
En las hembras también se observó el alargamiento de las células, aunque en menor grado que en los machos; en las semanas 2 y 4 las células incrementaron en altura, regresando a su tamaño control al inicio de la fase

II. En la semana 6 las células disminuyeron de tamaño alargándose nuevamente al final de la exposición en la semana 8 (gráfica 6).



Gráfica 6. Altura de las células bronquiales en pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la altura de las células en micrómetros ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 4, c. Diferencia con la semana 5, d. Diferencia con la semana 6.

El análisis comparativo entre machos y hembras respecto de las diferencias en la altura de las células epiteliales bronquiales demostró que desde los ratones control, existen diferencias en el tamaño de estas células siendo mayor en los machos. La exposición a V en las fases I y II produjo el alargamiento de las células, siendo más notable en los machos. Al final de la fase II la altura de las células en ambos sexos fue igual (gráfica 7).



Gráfica 7. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la altura de las células bronquiales posteriores a la inhalación de V. Los valores están expresados como la altura de las células en micrómetros ( $\mu\text{m}$ )  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencia entre machos y hembras.

## 9.4 Inmunohistoquímica CC16

La figura 5 muestra la presencia del marcador de CBNC CC16 en el pulmón de ratones macho y las modificaciones producidas por la inhalación de V. El panel A muestra que en los pulmones control, la marca de CC16 fue relativamente homogénea en el citoplasma de las CBNC, concentrándose en el ápice de algunas células (figura 5, panel A). Al iniciar la fase I de exposición, en la semana 2 de tratamiento la marca se mantuvo igual que en los controles (panel B), y posteriormente en la semana 4 CC16 incrementó su presencia significativamente (panel C). En la fase II de exposición la marca de CC16 incremento de forma evidente en relación con el tiempo. La gráfica 8 muestra el análisis densitométrico en el que se evidenció el incremento de CC16 a partir de la semana 4 de exposición de la fase I y continuó aumentando en la fase II.

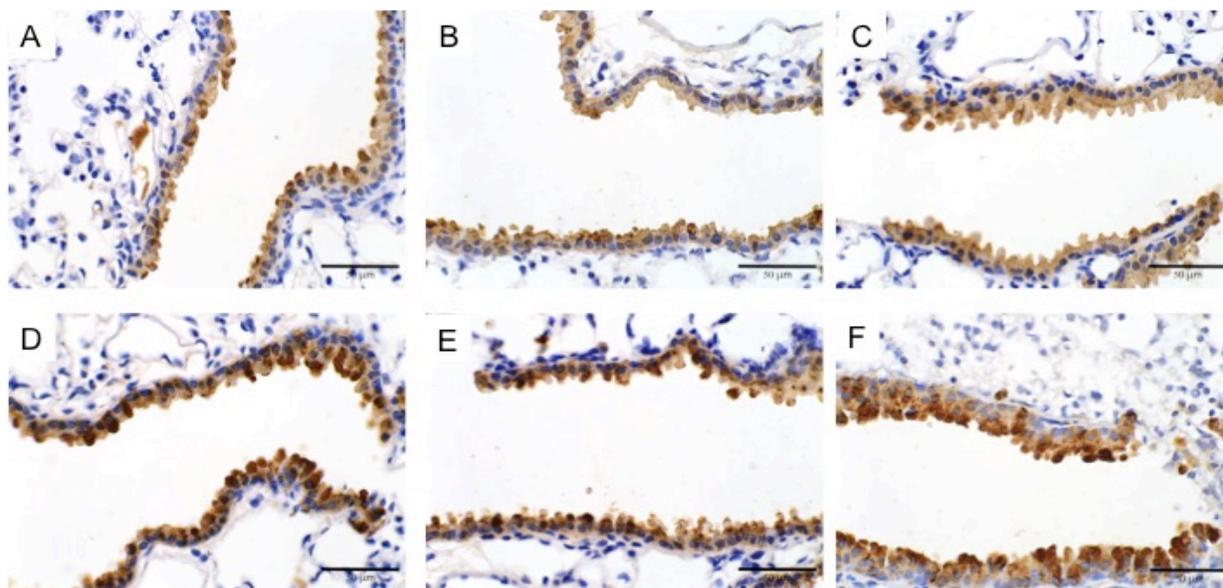
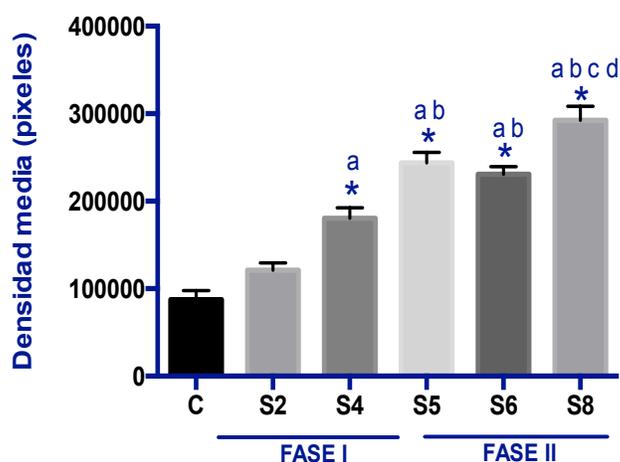


Figura 5. Inmunohistoquímica para CC16 en el epitelio bronquiolar en pulmones de ratones macho. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5, E. Semana 6, F. Semana 8. 400X. Barra 50 µm.



Gráfica 8. Presencia de CC16 en el epitelio bronquiolar y el efecto de la inhalación de V. Densitometría de la marca en las CBNC de los animales expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como la media de la densidad en pixeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 4, c. Diferencia con la semana 5, d. Diferencia con la semana 6.

En el caso de las hembras, el patrón de cambio que se observó en la presencia de la proteína fue similar a los machos. La figura 6 panel A muestra a CC16 en los bronquiolos de los controles en los que la distribución de la marca es homogénea. En la semana 2 de exposición la marca fue homogénea aunque ligeramente más intensa e incrementó notablemente en la semana 4 de la fase I. En la fase II la marca incrementó de manera evidente desde el inicio y se mantuvo durante el resto del tratamiento. La gráfica 9 muestra el análisis densitométrico de la marca que evidenció el incremento de la proteína a partir de la semana 2 de exposición de la fase I y continuó aumentando en la fase II.

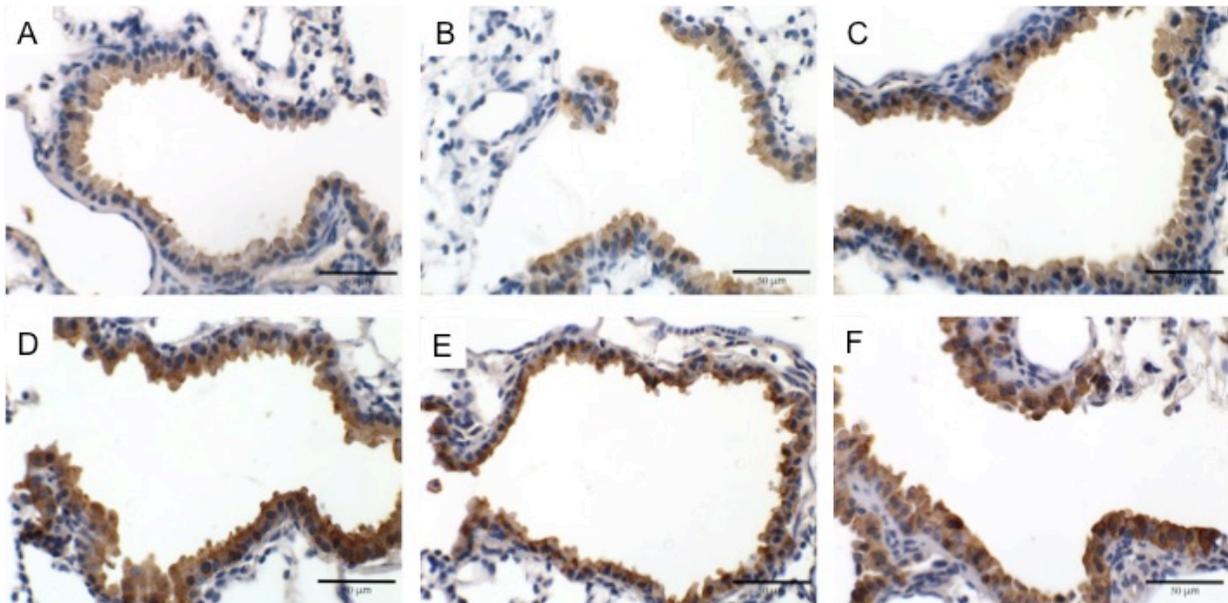
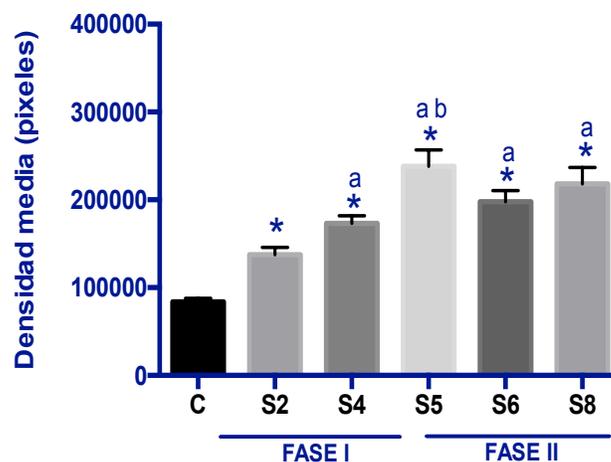
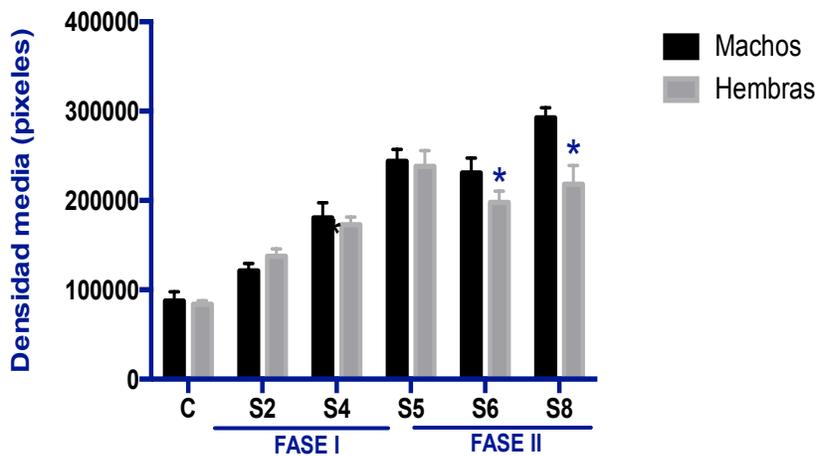


Figura 6. Inmunohistoquímica para CC16 en el epitelio bronquiolar en pulmones de ratones hembra. A. Control, B. Semana 2, C. Semana 4, D. Semana 5, E. Semana 6, F. Semana 8. 400X. Barra 50  $\mu$ m.



Gráfica 9. Cambios en la presencia de CC16 en el epitelio bronquiolar por efecto de la inhalación de V. Densitometría de la marca en las células bronquiolares de los animales expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como la media de la densidad en pixeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 4, c. Diferencia con la semana 5.

El análisis comparativo entre machos y hembras respecto de las diferencias en la presencia de CC16 en el epitelio bronquiolar demostró que al final de la exposición, en las semanas seis y ocho de la fase II de exposición las hembras presentaron menor densidad de proteína en las células bronquiolares que los machos (gráfica 10).



Gráfica 10. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la densidad de la marca de CC16 en las células bronquiolares, posteriores a la inhalación de V. Los valores están expresados como la media de la densidad en píxeles  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencia entre machos y hembras.

### 9.5 Western blot CC16

El análisis por WB de CC16 confirmó la variación en la expresión de la proteína observada previamente por IHQ en los pulmones de los ratones macho y hembra. En la figura 7 se observan las bandas correspondientes a los grupos control y expuestos de los ratones macho. Es notable el incremento en la densidad de las bandas durante la fase II de inhalación. La gráfica 11 corresponde al análisis densitométrico de las bandas en el que se observó que la expresión del marcador incrementó significativamente desde la semana dos de exposición y continuó aumentando el resto del tratamiento.

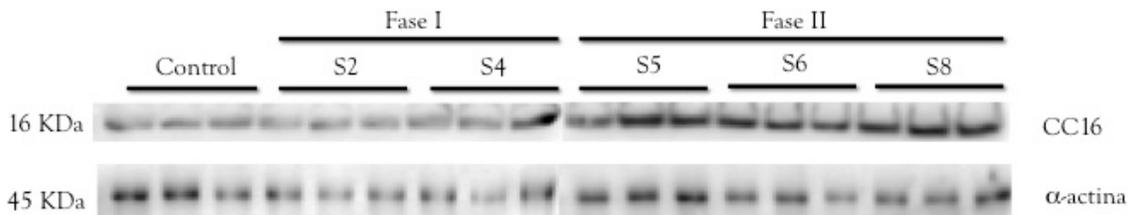
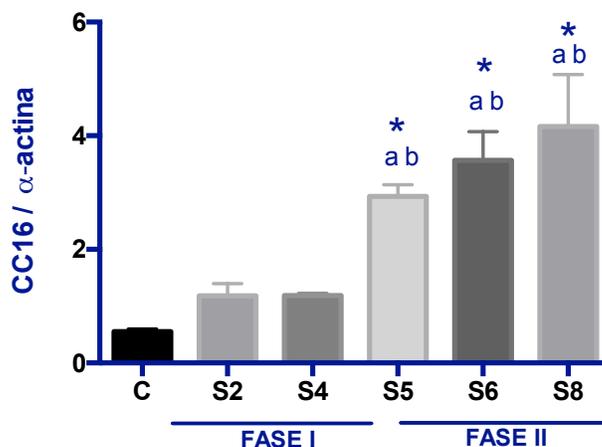


Figura 7. Análisis de la expresión de CC16 en homogenizados de pulmón de ratones macho. La  $\alpha$ -actina se utilizó como marcador de carga.



Gráfica 11. Cambios en la expresión de CC16 en homogenizados de pulmón de ratones macho. Los valores están expresados como la relación de la media de la densidad en pixeles entre CC16 y el marcador de carga  $\alpha$ -actina  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 4.

En cuanto a la expresión del marcador en las hembras, este presentó un patrón de cambio similar al de los machos, aunque el incremento significativo se presentó hasta que inició la fase II de exposición (figura 8). En la gráfica 12 se observan los cambios en la expresión de la proteína.

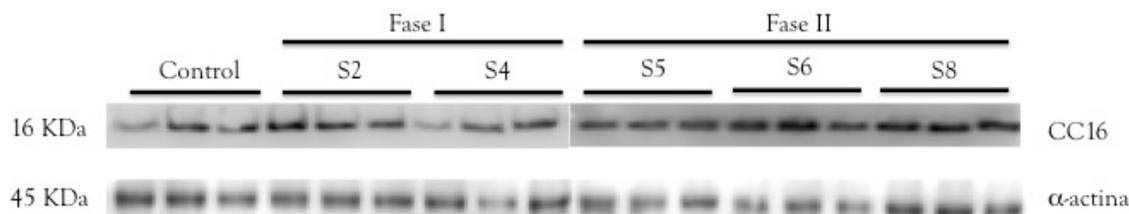
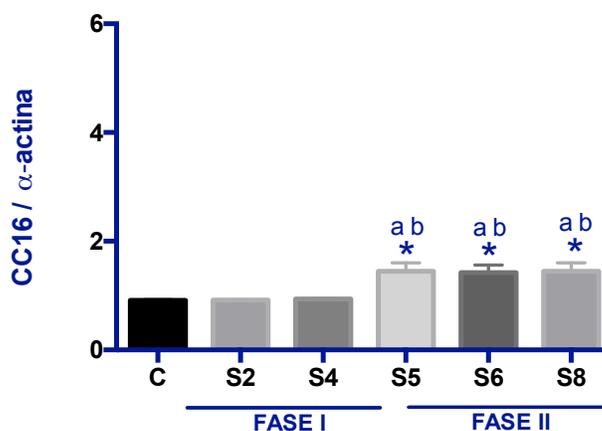


Figura 8. Análisis de la expresión de CC16 en homogenizados de pulmón de ratones hembra. La  $\alpha$ -actina se utilizó como marcador de carga. Los valores están expresados como la densidad media en pixeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey).



Gráfica 12. Cambios en la expresión de CC16 en homogenizados de pulmón de ratones hembras. Los valores están expresados como la media de la densidad en pixeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2. b. Diferencia con la semana 4.

El análisis comparativo entre machos y hembras respecto de las diferencias en la expresión de CC16 demostró que en las hembras la expresión de la proteína total fue mayor que en los machos desde los controles y durante la fase I de exposición. En la fase II la expresión en ambos sexos fue igual (gráfica 13).

Gráfica 13. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la expresión de CC16. Los valores están expresados como la media de la densidad en píxeles  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencias entre machos y hembras.

## 9.6 Inmunohistoquímica SP-C

La figura 9 muestra la presencia del marcador específico de NII, la proteína SP-C en los pulmones de los ratones macho. El panel A muestra la presencia homogénea del marcador en los neumocitos de los ratones control y posteriormente en los paneles B, C, D, E y F se observan los NII marcados en los ratones expuestos a V. El análisis densitométrico demostró que no se presentaron cambios relevantes en la presencia de la proteína en ninguna de las semanas de exposición (gráfica 14).

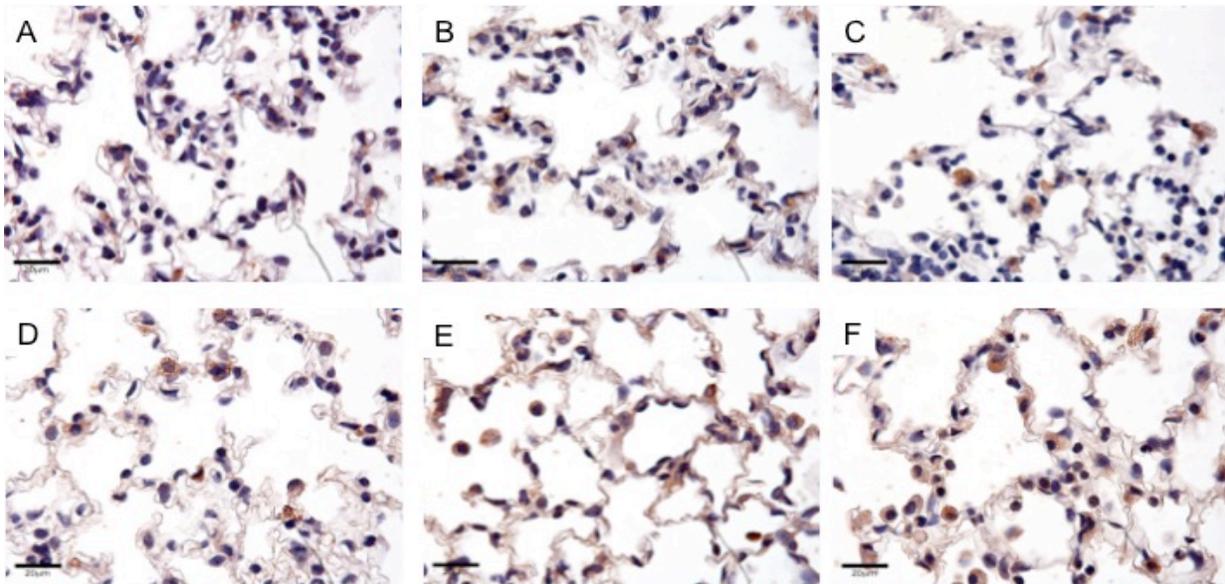
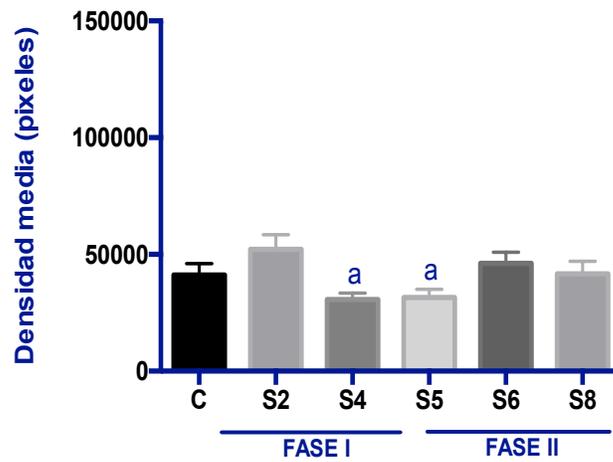


Figura 9. Inmunohistoquímica para SP-C en el epitelio alveolar en pulmones de ratones macho. A. Control. B. Semana 2. C. Semana 4. D. Semana 5. E. Semana 6. F. Semana 8. 1000X. Barra 20  $\mu$ m.



Gráfica 14. Presencia de SP-C en el epitelio alveolar por efecto de la inhalación de V. Densitometría de la marca en los NII de los animales expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como la media de la densidad en pixeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). a. Diferencia con la semana 2.

En cuanto a las hembras, la figura 10, panel A muestra la presencia del marcador en los NII de las ratonas control, mientras que los paneles B, C, D, E y F corresponden a los pulmones de los ratones expuestos a V. El análisis densitométrico demostró que no se presentaron cambios relevantes en la expresión de la proteína en ninguna de las semanas de exposición (gráfica 15).

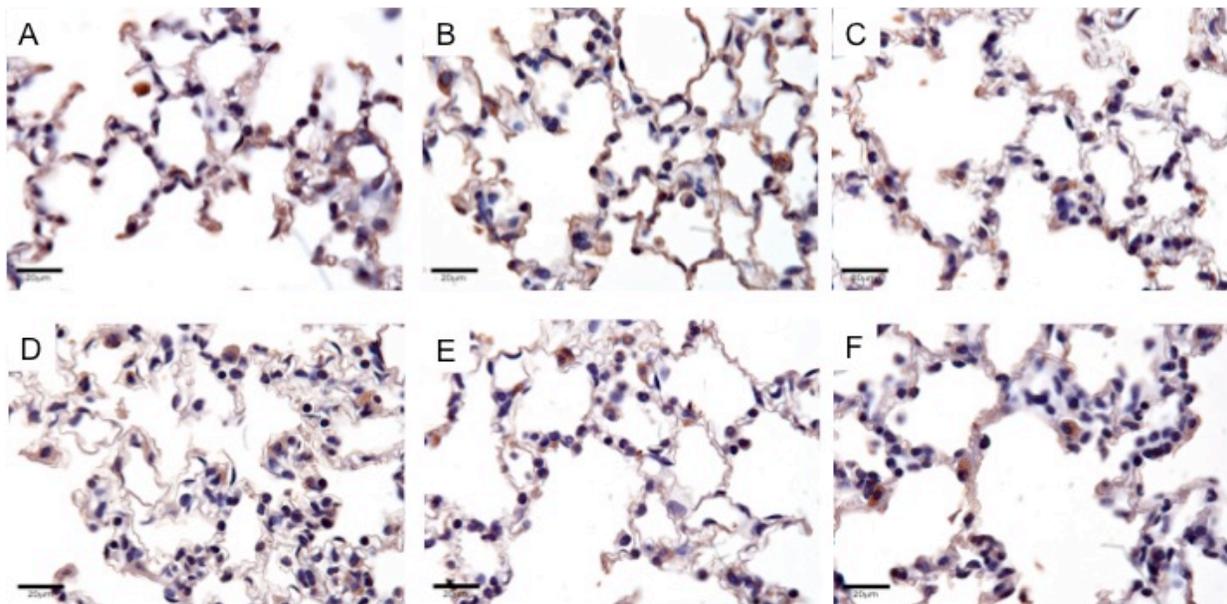
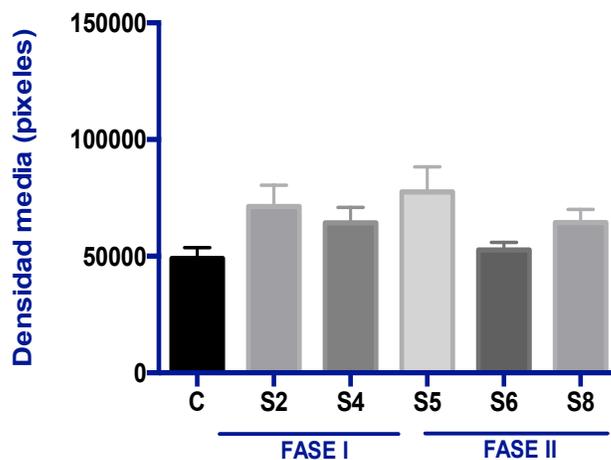
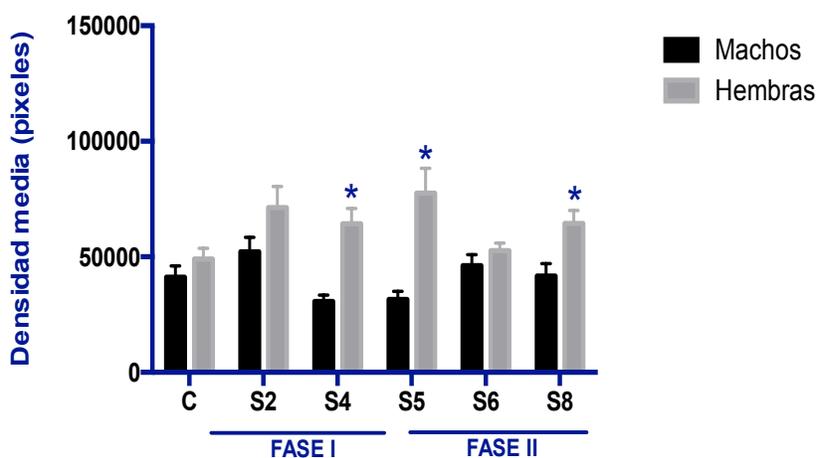


Figura 10. Inmunohistoquímica para SP-C en el epitelio alveolar en pulmones de ratonas hembra. A. Control. B. Semana 2. C. Semana 4. D. Semana 5. E. Semana 6. F. Semana 8. 1000X. Barra 20  $\mu$ m.



Gráfica 15. Presencia de SP-C en el epitelio alveolar por efecto de la inhalación de V. Densitometría de la marca en los NII de los animales expuestos y no expuestos. Los valores están expresados como la media de la densidad en píxeles  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$ . Sin diferencias significativas.

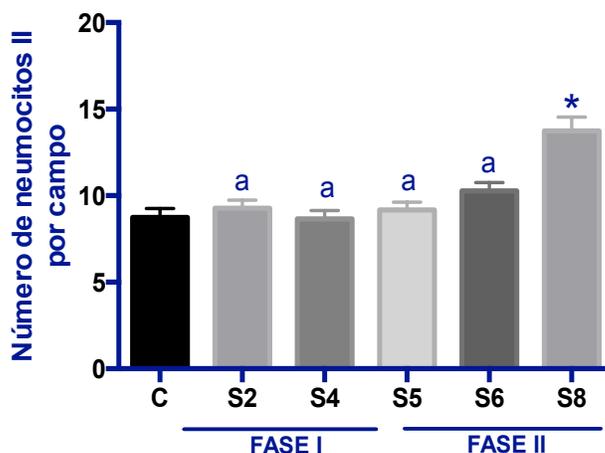
El análisis comparativo entre machos y hembras demostró que las hembras presentaron mayor densidad de SP-C en las semanas 4, 5 y 8 con respecto a los machos (gráfica 16).



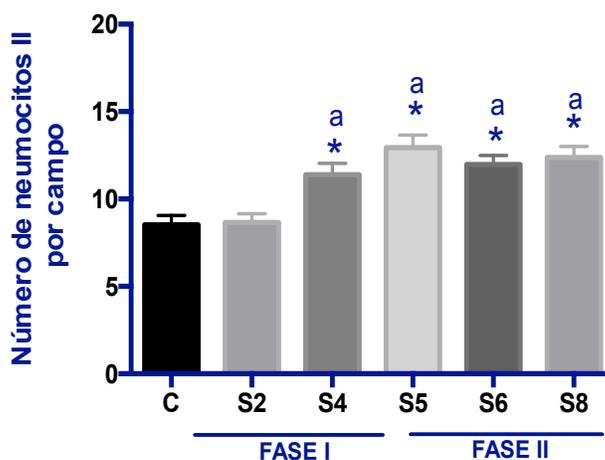
Gráfica 16. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la presencia de SP-C. Los valores están expresados como la media de la densidad en píxeles  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencias entre machos y hembras.

Dado que no se presentaron cambios relevantes en la presencia de la proteína SP-C, se determinó no analizar la expresión por WB.

Por otra parte, utilizando la marca con SP-C se cuantificaron el número de NII por campo para identificar si se presentó hiperplasia de estas células. El análisis cuantitativo demostró que tanto en los ratones macho como en las hembras, se presentó hiperplasia. En los machos la hiperplasia se identificó hasta la semana 8, al final de la fase II de exposición (gráfica 17), mientras que en las hembras se presentó desde la semana 4 de la fase I y continuó estable durante la fase II (gráfica 18).

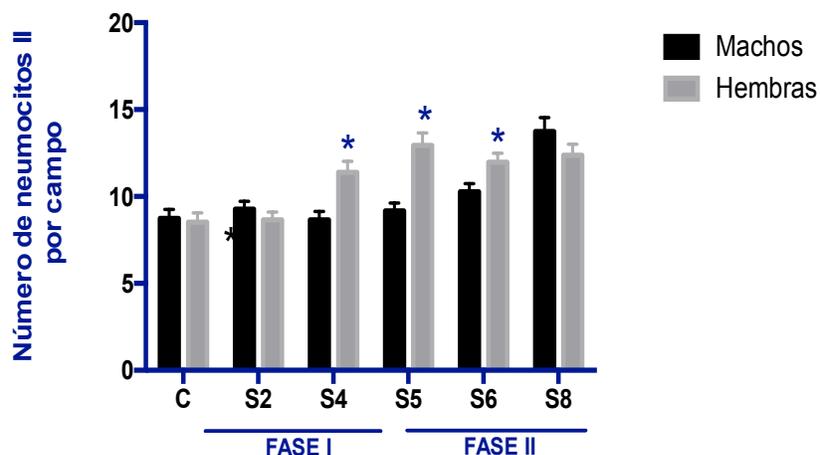


Gráfica 17. Hiperplasia epitelial alveolar en los pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la media del número de NII  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \* Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 8.



Gráfica 18. Hiperplasia epitelial alveolar en los pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la media del número de NII  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \* Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 2.

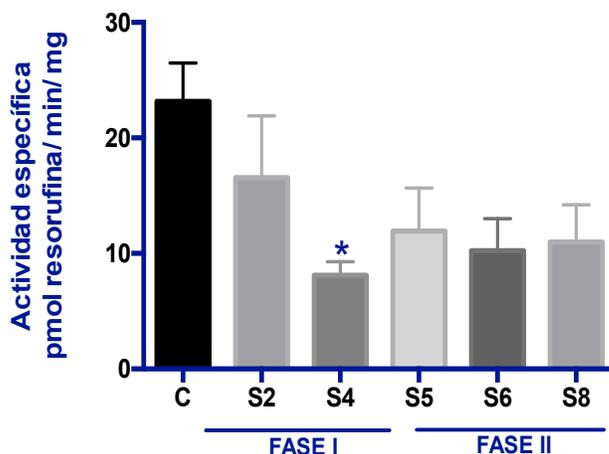
El análisis comparativo entre machos y hembras respecto de la hiperplasia epitelial de los NII demostró que en las hembras la hiperplasia se produjo más tempranamente, manteniéndose en las semanas 5, 6 y 8, mientras que en los machos el número de células en las semanas 4, 5 y 6 permaneció sin cambios relevantes. Al final de la exposición la hiperplasia producida en los machos causó que no se presentaran diferencias estadísticas en la semana 8 con respecto a las hembras (gráfica 19).



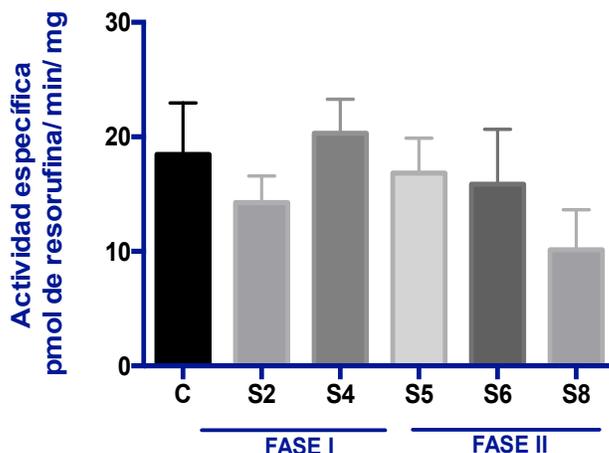
Gráfica 19. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en el número de NII por campo. Los valores están expresados como la media de la densidad en píxeles  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencias entre machos y hembras.

### 9.7 Actividad específica de CYP450 en el pulmón

El análisis de la actividad específica de los CYP450 no mostró cambios relevantes asociados con la exposición a V. En los machos, CYP1A1 se expresó constitutivamente en los controles, mostrando disminución en la actividad en la semana 2, para luego permanecer sin cambios significativos (gráfica 20) el resto de la exposición, mientras que en las hembras se expresó constitutivamente sin ningún cambio asociado a la exposición (gráfica 21).

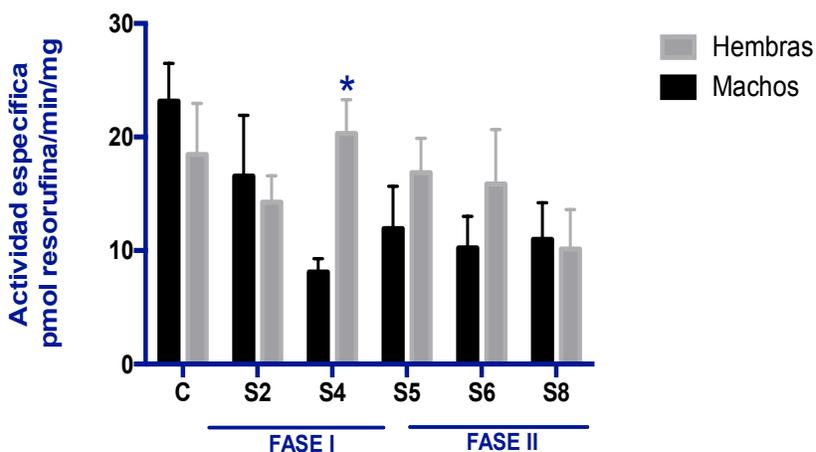


Gráfica 20. Cambios en la actividad específica de CYP1A1 en pulmones de ratones macho. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencias con el control.



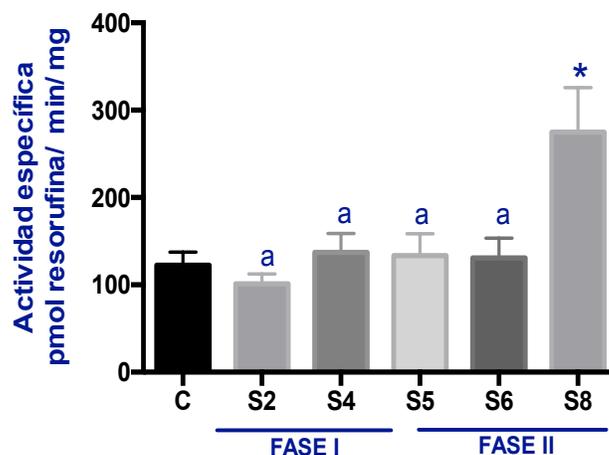
Gráfica 21. Actividad específica de CYP1A1 en pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$ . \*Sin diferencias significativas.

El análisis comparativo entre machos y hembras de la actividad de CYP1A1 demostró que únicamente se registró diferencia significativa en la semana 4 de la fase I de exposición en la que las hembras presentaron mayor actividad específica. (gráfica 22).

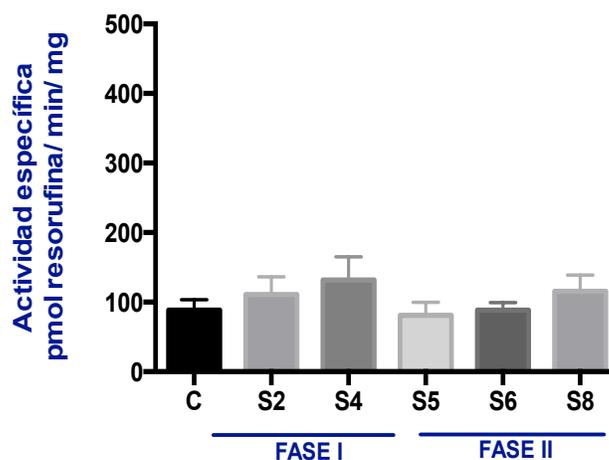


Gráfica 22. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la actividad específica de CYP1A1. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, t se Student  $p \leq 0.05$ . \*Diferencias entre machos y hembras.

Por su parte, CYP2B se expresó constitutivamente en los pulmones de los ratones machos control, mostrando únicamente incremento significativo en su actividad hasta la semana 8 de tratamiento (gráfica 23). En las hembras CYP2B se expresó constitutivamente en los controles, sin ningún cambio posterior asociado a la exposición (gráfica 24).

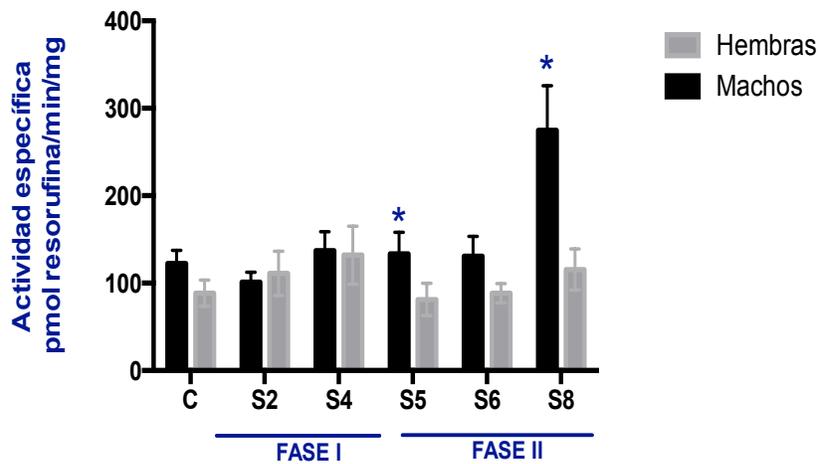


Gráfica 23. Actividad específica de CYP2B en pulmones de ratones macho. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 8.



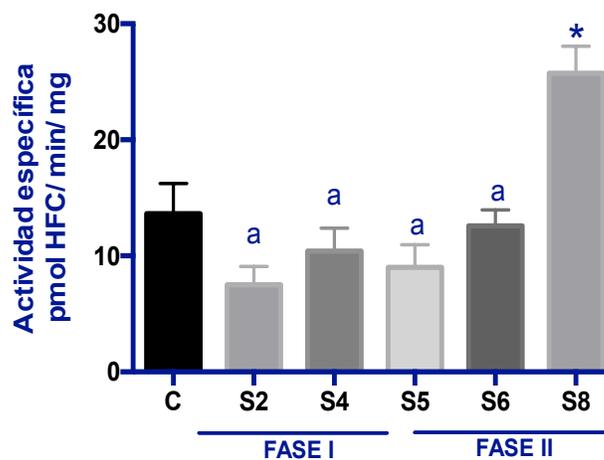
Gráfica 24. Actividad específica de CYP2B en pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$ . Sin diferencias significativas.

El análisis comparativo entre machos y hembras de la actividad de CYP2B mostró cambios significativos en las semanas 5 y 8 de exposición, siendo mayor en los machos (gráfica 25).

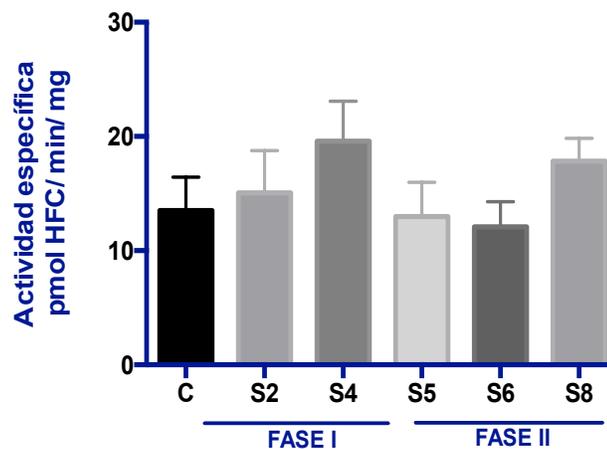


Gráfica 25. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la actividad específica de CYP2B. Los valores están expresados como la media de picomoles de resorufina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencias entre machos y hembras.

Por otra parte, en los machos CYP2E1 incrementó su actividad al final de la exposición (gráfica 26), en la semana 8, mientras que en las hembras no hubieron cambios (gráfica 27).

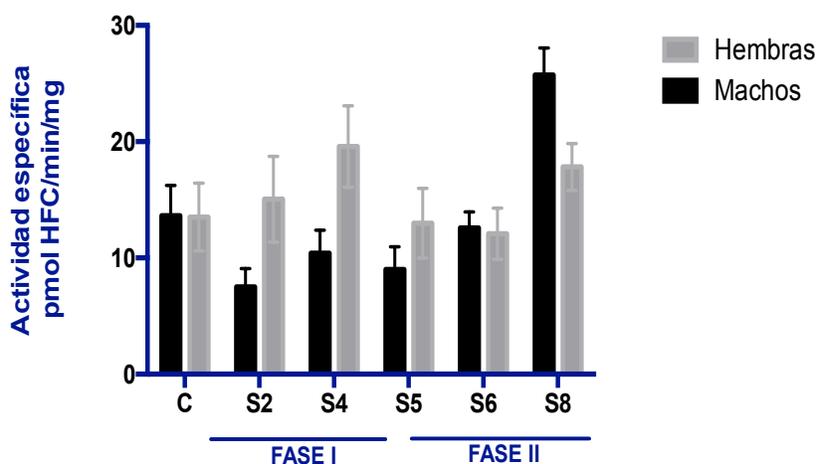


Gráfica 26. Actividad específica de CYP2E1 en pulmones de ratones macho. Los valores están expresados como la media de picomoles de 2-hidroxi-4-trifluorocumarina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$  post hoc (Tukey). \*Diferencia con el control, a. Diferencia con la semana 8.



Gráfica 27. Actividad específica de CYP2E1 en pulmones de ratones hembra. Los valores están expresados como la media de picomoles de 2-hidroxi-4-trifluorocumarina/min/mg  $\pm$  el error estándar, ANOVA  $p \leq 0.05$ . Sin diferencias significativas.

El análisis comparativo entre machos y hembras de la actividad específica de CYP2E1 demostró que no se presentaron diferencias significativas entre sexos.



Gráfica 25. Comparación entre machos y hembras de los cambios producidos en la actividad específica de CYP2E1. Los valores están expresados como la media de picomoles de 2-hidroxi-4-trifluorocumarina/min/mg  $\pm$  el error estándar, t de Student  $p \leq 0.05$ . Sin diferencias significativas.

Dado que los cambios observados no fueron relevantes, se determinó no analizar la expresión por WB.

## 10 Discusión

La exposición a diversos contaminantes atmosféricos ejerce diversos cambios en el epitelio respiratorio que han sido motivo de varios reportes. Uno de los sitios en los que este efecto es más evidente es el bronquiolo no respiratorio, sitio en el que ubica la CBNC que desarrolla diversas funciones en el pulmón que van desde el reemplazo del epitelio dañado, el metabolismo de agentes xenobióticos y nuestra propuesta es que también participa en el proceso de tolerancia a la agresión de diversos contaminantes, como es el caso del material particulado en el que se adhieren metales como el vanadio, motivo de este estudio.

El estudio de la tolerancia implica como se mencionó anteriormente el establecimiento de modelos en los que se evalúen los efectos a concentraciones distintas de un compuesto, tratando de identificar si una concentración baja favorece la activación de mecanismos que permitan un menor daño si el organismo se expone a concentraciones más altas.

De acuerdo con los resultados de nuestro modelo, se observó que la concentración de exposición a vanadio fue mayor al utilizar la solución 0.02 M en comparación con la solución 0.01M. Con estos datos se aseguró la exposición de los animales a dos concentraciones distintas, una más baja que la otra, estableciendo un modelo adecuado para estudiar la tolerancia. Después del tratamiento, se analizaron los niveles del metal en sangre para verificar la presencia del mismo en el organismo. Respecto de estos niveles se registró el aumento gradual en la concentración del metal durante las semanas 4, 5 y 6, y se detectó que en la semana 8 los niveles del metal disminuyeron inesperadamente, dinámica que se observó tanto en machos como en hembras, sin diferencias. El aumento en la concentración de V en sangre en relación con el tiempo de exposición fue lo esperado, mientras que el decremento repentino en la semana 8 podría ser favorecido en primera instancia, por un mayor depósito y acumulación de V en los órganos blandos como el pulmón, el hígado y los riñones, además de los órganos duros como los huesos (Rhoads y Sanders, 1985; Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Son necesarios estudios posteriores en nuestro modelo en relación con la acumulación de V en los órganos de los organismos expuestos en para verificar esta hipótesis.

Respecto de la acumulación de V en los distintos órganos se han explorado distintos aspectos en otros modelos. Por un lado se ha propuesto que la participación de proteínas tipo metalotioneínas podrían estar involucradas en la desintoxicación o quelación del vanadio, propiciando su depósito en los órganos. En el hígado, utilizando espectrometría de masas (HPLC/ICP-MS), Kobayashi y colaboradores comprobaron la unión del V a una proteína de bajo peso molecular no identificada con características similares a la metalotioneína II que tiene la capacidad de unirse a este metal reteniéndolo en el órgano (Kobayashi et al., 2006); si esto ocurre en nuestros animales podría contribuir a su disminución en la sangre y su acumulación en el hígado.

Aunado a esto, la interacción del V con metalotioneínas podría estar ocurriendo también en los pulmones y riñones, dado que estos órganos expresan estas proteínas de manera importante (Inoue et al., 2009; Sabolic et al., 2010). En el pulmón se ha comprobado que, durante la exposición a agentes oxidantes como el ozono, dióxido de nitrógeno y oxígeno, además de la exposición a metales como el cadmio, se induce la expresión de metalotioneínas como respuesta a ellos (Mango et al., 1998; Lau et al., 2006; Johnston et al., 2008). En riñón, la exposición a metales como el cadmio también induce la expresión de estas proteínas y desempeñan un papel crucial en la retención del metal en éste y otros órganos (Klaassen et al., 2009; Sabolic et al., 2010). La

interacción del V con estas proteínas podría ser un factor que promueva su acumulación en estos dos órganos blandos.

Por otra parte, en el tejido óseo, en el que se ha registrado se retienen concentraciones importantes de V, se ha propuesto que este depósito está relacionado con la analogía estructural entre el fosfato y el vanadato, lo cual favorecería el intercambio del primero por el segundo en la matriz ósea (Davidson et al., 2007; Baran, 2008). Esto contribuiría a la acumulación del metal y la reducción de su disponibilidad en la sangre.

Es importante tener en consideración además del aspecto de la acumulación de V en los órganos blandos y duros, la posibilidad de su eliminación en el pulmón. Este órgano es el primer sitio de interacción con el metal, y en él existen diversos mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que es posible estén implicados en la desintoxicación este órgano (Rahman et al., 2006) y la consecuente disminución del metal en sangre. Los principales antioxidantes no enzimáticos en el pulmón son el glutatión, las vitaminas C y E, los carotenos y el ácido úrico (Rock et al., 1993; Comhair y Erzurum, 2002; McFadden et al., 2005), mientras que dentro de los sistemas enzimáticos principales encontramos a las superóxido dismutasas (MnSOD and CuSOD), catalasa y las peroxidasas (Rahman et al., 2006). Estudios han demostrado que diferentes especies de  $V^{+4}$  y  $V^{+5}$  interactúan con el glutatión reducido (GSH), siendo este uno de los mecanismos más importantes de desintoxicación del metal (Ferrer et al., 1991; Pessoa et al., 2002).

Otra proteína que podría estar participando en la desintoxicación del V es CC16, que incrementó de manera importante en nuestro modelo en relación con el tiempo de exposición, y cuya función antioxidante se explicará más adelante. El incremento de CC16 se dió de manera más importante durante la fase II de exposición y curiosamente la reducción significativa del V en sangre se produjo al final de esta fase sugiriendo una relación entre ambos parámetros.

Respecto de los cambios histopatológicos reportados en este estudio, los mismos se han identificado en otros modelos murinos de exposición a V. Respecto de la respuesta inflamatoria, se ha reportado que tanto la inhalación de distintas concentraciones de V (NTP, 2002; Ress et al., 2003), como la instilación intratraqueal (Pierce et al., 1996; Toya et al., 2001; Wang et al., 2003) producen la activación de la respuesta inflamatoria pulmonar. En nuestro modelo de inhalación se observó infiltrado inflamatorio perivascular y peribronquiolar que concuerda con los hallazgos antes mencionados. Sin embargo llama la atención que aparentemente este cambio se mantuvo sin modificaciones relevantes durante toda la exposición, independientemente de la concentración (1.56 y 2.57 mg/m<sup>3</sup> de V) y del sexo de los animales; esto es que el incremento en la concentración del metal en la fase II de exposición no exacerbó la respuesta observada durante la fase I.

Una respuesta similar fue reportada por Knetch y colaboradores, notando que en su modelo de exposición subcrónica a 0.5 mg V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/m<sup>3</sup> (6 h/ por 5 días/por 26 semanas), la exposición repetida a V no desencadenó una respuesta inmune celular, además que no incrementó la hiperreactividad bronquial o propició la exacerbación de la respuesta aguda que había sido reportada previamente por el mismo grupo (Knetch et al., 1985, 1992). Aunque nuestro modelo de exposición y el modelo de Knetch son distintos, ambos sugieren que de alguna manera los animales desarrollan algún tipo de tolerancia como resultado de la exposición repetida al V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Respecto de la hiperplasia de la célula bronquiolar, se ha reportado que la inhalación de V produce esta alteración en bronquiolos y alveolos (NTP, 2002; Ress et al., 2003), al igual que la instilación de compuestos

del mismo metal (Toya et al., 2001), y este cambio se ha relacionado con la inducción de mediadores pro-inflamatorios que pueden desencadenar también la proliferación celular como IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ . En nuestro modelo se identificó hiperplasia epitelial bronquiolar desde la segunda semana de exposición en la fase I, que se mantuvo durante toda la exposición sin cambios relevantes durante el resto del tratamiento en ambos sexos. El cambio en la concentración del V no propició el aumento de la hiperplasia

Surge la pregunta de ¿que podría contribuir a que se presente este tipo de respuesta? La proteína CC16 es candidata para una posible explicación. Anteriormente se mencionó la importancia de esta proteína como inmunomoduladora en el pulmón participando en el mantenimiento de la homeostasis en el órgano. *In vitro* se ha demostrado que CC16 atenúa la inflamación disminuyendo la producción de IL-8 (citocina pro-inflamatoria) en células bronquiales, lo que contribuye a atenuar la infiltración de células como los neutrófilos (Tokita et al., 2014). La disminución de la producción de esta citocina podría contribuir también a la modulación del proceso de hiperplasia que como se mencionó puede desencadenar la proliferación epitelial bronquiolar (Bonner 2000). Estudios *In vivo* apoyan el papel de CC16 en la regulación de la producción de citosinas; se ha comprobado que ratones deficientes en la producción de CC16 presentan una mayor respuesta inflamatoria cuando son sensibilizados con ovoalbúmina, además que expresan mayores niveles de citocinas pro-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Chen-Chen et al., 2001).

Por otra parte, cuando la exposición crónica a distintas clases de contaminantes disminuye la expresión de CC16 en el epitelio bronquiolar, los organismos se vuelven más susceptibles a desarrollar una respuesta inflamatoria en el pulmón. Gowdy y cols, reportaron en un modelo murino de inhalación de partículas derivadas de diesel (DEPs por sus siglas en inglés) que la disminución de CC16 y proteínas del surfactante (SP-A y SP-D) en homogenizados de pulmón y lavado broncoalveolar coincide con la sobre-expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-13 y TNF- $\alpha$  (Gowdy et al., 2008). Estas evidencias ponen de manifiesto la importancia de esta proteína en la modulación de la inflamación.

En nuestro modelo, en ambos sexos, observamos que el marcador CC16 incrementó en el tejido pulmonar en la fase I de inhalación como se detectó por inmunohistoquímica en las células bronquiales, y posteriormente, en la fase II la densidad de CC16 incrementó nuevamente de forma significativa. Además se observó la redistribución de la proteína, concentrándose principalmente en la región apical de las células bronquiales. Este incremento de CC16 se comprobó mediante WB en los homogenizados de pulmón y podría explicar porque los ratones no presentaron infiltrado inflamatorio ni hiperplasia exacerbados en la segunda fase de exposición, como se observó en los resultados histopatológicos.

Es importante considerar que de acuerdo con la técnica utilizada para la detección de CC16 se obtuvieron resultados ligeramente distintos. Los resultados de la IHQ demostraron que el cambio en los niveles de la proteína a nivel local en los bronquiolos terminales fue mayor en los machos que en las hembras, mientras que en el WB el aumento de CC16 fue mayor en las hembras que en los machos. Esta diferencia podría estar relacionada con alteraciones en otras células que también producen CC16 en las vías aéreas, como en el epitelio traqueal y bronquial, que no se evaluaron mediante IHQ pero que si están influyendo en los cambios observados, lo que se relacionaría con la inmunodetección por WB en homogenizados totales de pulmón. Estos hallazgos sugieren que el sexo del animal influye de manera importante en la modulación de la expresión de CC16 en el pulmón como lo sugieren Nomori y colaboradores (Nomori et al., 1996).

Es interesante hacer notar que la literatura indica que en el desarrollo de tolerancia a la inhalación de ozono, que es un agente pro-oxidante, la densidad de CC16 en las células bronquiolares en el tejido pulmonar es mayor cuando los animales se exponen a este gas, que en los controles no expuestos, además que la distribución citoplasmática de los gránulos que contienen a la proteína se modifica, concentrándose en la región apical de las células (Dodge et al., 1994), lo cual se ha propuesto contribuye al desarrollo de esta respuesta. Este resultado concuerda con los hallazgos en este estudio y contribuye a la hipótesis de que CC16 favorece la tolerancia a V.

Cabe mencionar en este punto que con el incremento en la presencia de CC16 se detectó un aumento en la altura de las células epiteliales bronquiolares; esta relación se ha observado también en otros modelos de exposición y se piensa tiene que ver con la mayor producción de proteínas por parte de las CBNC (Dodge et al., 1994). Este incremento en la altura del epitelio fue más importante en los machos que en las hembras, lo cual concuerda con el incremento en la presencia de CC16 que fue mayor en los machos. Sobre estas y otras diferencias entre sexos se discutirá más adelante.

Además de la relación de la exposición a V con el efecto inmunomodulador de CC16, no hay que perder de vista su efecto antioxidante. Se sabe que muchas de las alteraciones producidas por la exposición a vanadio se atribuyen a la generación de estrés oxidante (Rodríguez-Mercado y Altamirano-Lozano, 2006). Se ha reportado que la proteína CC16 tiene la capacidad de funcionar como una molécula con propiedades antioxidantes a través de la interacción de las metioninas que forman parte de su estructura con los radicales libres (Pilon et al., 2016). Esta protección por parte de CC16 en nuestro modelo puede jugar un papel importante en la modulación de los efectos adversos del V, favoreciendo el desarrollo de tolerancia.

Por otra parte, como se mencionó previamente, en el pulmón existen otros mecanismos antioxidantes muy importantes que es posible estén participando en la modulación del estrés oxidante en el órgano, tales como el glutatión, las vitaminas C y E, los carotenos, el ácido úrico (Rock et al., 1993; Comhair and Erzurum, 2002; McFadden et al., 2005), las superóxido dismutasas (MnSOD and CuSOD), la catalasa y las peroxidasas (Rahman et al., 2006).

Considerando que el pulmón es un órgano que esta constantemente expuesto a un ambiente pro-oxidante, resulta muy importante y relevante la presencia de estos mecanismos para contrarrestar la gran cantidad de especies reactivas que se están generando en el tejido. Estas defensas están principalmente en las células epiteliales de la mucosa proveyendo una protección adecuada contra los efectos adversos de las especies reactivas (van der Vliet, 2015). Antes se mencionó que se ha demostrado que diferentes especies de  $V^{+4}$  y  $V^{+5}$  interactúan con el glutatión reducido (GSH), constituyendo un mecanismo importante en la inactivación de las mismas, impidiendo que interactúen con las biomoléculas en las células (Ferrer et al., 1991; Pessoa et al., 2002).

Estos mecanismos más la acción antioxidante de CC16 podrían ser relevantes para contrarrestar los efectos oxidantes inducidos por la inhalación de V y podrían en parte explicar porque no se exacerban los cambios histopatológicos identificados principalmente en el epitelio bronquiolar.

Respecto de los otros cambios observados, es interesante notar que el incremento en la concentración de CC16 coincidió en la segunda fase de exposición con la disminución del número de células mucoproducidas

PAS+ que se observó en los resultados en ambos sexos, aunque la metaplasia mucoide fue más drástica en los machos, diferencia sobre la que se discutirá mas adelante.

Por una parte se ha reportado que la exposición a V produce el cambio en el fenotipo de estas células que se manifiesta con la síntesis de mucinas AB/PAS+; esta metaplasia mucoide se ha relacionado directamente con la inflamación causada por el tratamiento a través de la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 (Toya et al., 2001; Bonner, 2000). Otros tóxicos cuya inhalación produce metaplasia mucoide bronquiolar son las partículas suspendidas y el ozono. *In vivo* se ha reportado que la exposición a partículas ultrafinas induce metaplasia mucoide en las vías aéreas bajas, además de hipersecreción mucosa (Alessandrini et al., 2010), mientras que Kumagai y cols. reportaron metaplasia mucoide bronquiolar en ratones expuestos a ozono (Kumagai et al., 2017). Esta respuesta por parte del epitelio bronquiolar se ha relacionado con la respuesta inflamatoria producida por estos tóxicos.

Dado que se conoce que la respuesta inflamatoria esta directamente relacionada con el cambio en el fenotipo de las CBNC, y esta inflamación se relaciona con la disminución en la expresión de CC16, podemos inferir que el incremento en CC16 disminuye la inflamación y esto influirá directamente en el fenómeno de metaplasia. Esta disminución se podría atribuir a una reversión en el fenotipo de las células bronquiales propiciada por el incremento de la expresión de la proteína CC16 que se produce a partir de la semana tres de exposición de la fase I y permanece estable durante la fase II.

La reversión en el fenotipo de la CBNC ha sido reportada por Roth y colaboradores en un modelo de alergia crónica inducida por ovoalbúmina (OVA). En este modelo se presenta metaplasia mucoide de las células bronquiales con la subsecuente disminución en la síntesis y secreción de CC16 y SP-D, además de la disminución en la síntesis de CYP2E1 (Roth et al., 2013). Estos cambios fenotípicos en las CBNC se revirtieron farmacológicamente utilizando Montelukast, un compuesto antagonista del receptor tipo 1 de los leucotrienos, que reduce notablemente la inflamación y la hipersecreción mucosa en modelos experimentales (Kumar et al. 2003; Henderson et al. 2006). Considerando que en nuestro modelo CC16 incrementó de forma importante y esta proteína es inhibidora de la actividad de la fosfolipasa A2 que participa en la vía de producción de mediadores lipídicos inflamatorios como los leucotrienos (Jorens et al., 1995; Shiyu et al., 2011), es factible proponer que esta sobre-producción de CC16 este participando en la reversión de la metaplasia mucoide que observamos.

Otro aspecto importante relacionado con la CBNC y que se exploró en este estudio es la regulación de la actividad de los CYP450; como se mencionó estas células expresan altos niveles de mono-oxigenasas del citocromo 450 lo que les permite metabolizar una gran cantidad de xenobióticos (Ding y Kaminsky, 2003; Kim, 2004). Mango y colaboradores proponen analizar la expresión de los CYP450 como una forma de evaluar la integridad del epitelio de las vías aéreas, especialmente de las CBNC que expresan en mayor cantidad estas enzimas. Se ha reportado en distintos modelos de daño pulmonar, que la alteración de la CBNC a distintos niveles se relaciona directamente con la modificación de la expresión y actividad de los citocromos. En su modelo de exposición a ozono reportaron que la exposición crónica a este gas disminuyó significativamente la transcripción de CYP2F2 (Mango et al., 1998). Otro ejemplo es el estudio de Roth y colaboradores abordado previamente, en el que el tratamiento con OVA modificó de manera importante la expresión de CYP2E1, a pesar de que esta molécula no es metabolizada por este citocromo (Roth et al., 2013).

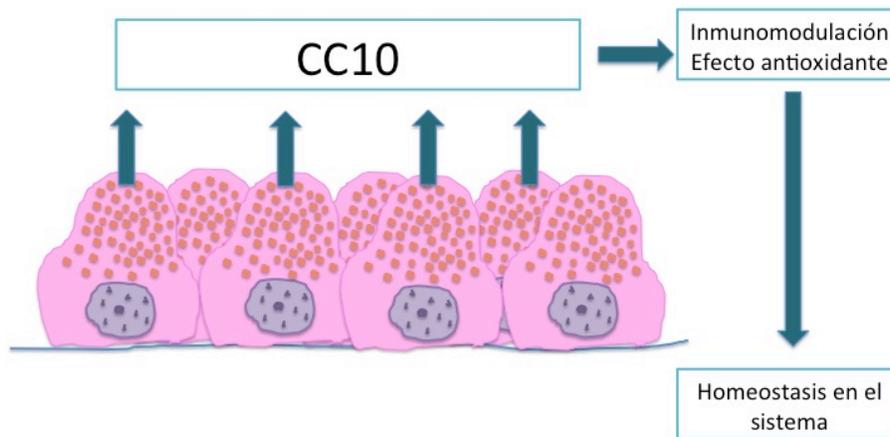


Figura 11. Participación de la CBNC y CC10 en el mantenimiento de la homeostasis en el pulmón.

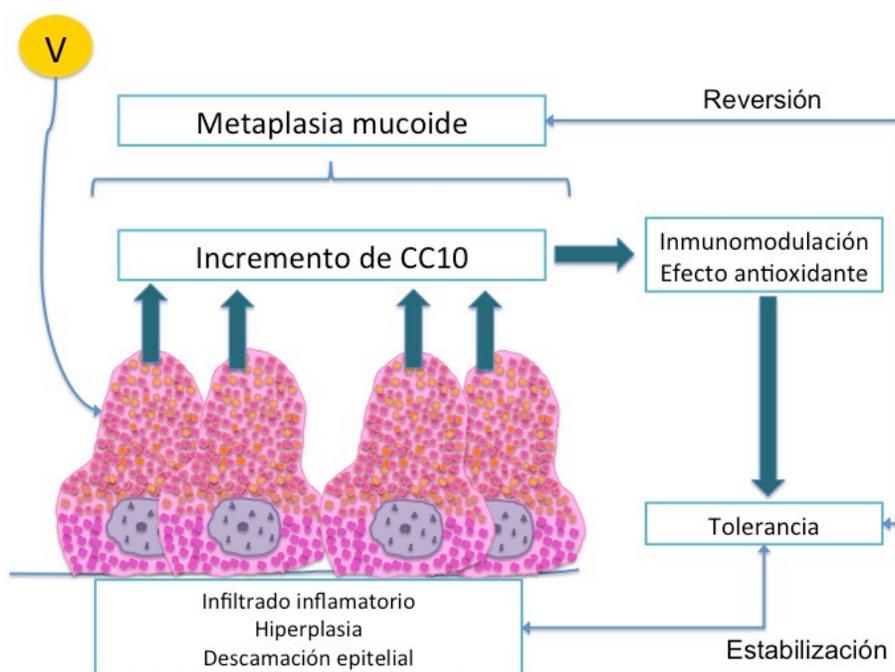


Figura 12. Participación de la CBNC y CC10 en el mantenimiento de la homeostasis en el pulmón y su posible relación con el desarrollo de tolerancia.

En nuestro estudio, las diferencias en la actividad específica de los CYP450 con respecto al tiempo de exposición fueron mínimas, lo cual quizás tenga relación con la variabilidad interindividual en los grupos experimentales. También es importante considerar que, quizás la integridad del epitelio bronquiolar, especialmente las CBNC, no está comprometida a un nivel en el que se detecten cambios en la expresión de estas enzimas. La modificación de la actividad presentó ligeras diferencias entre sexos, específicamente debido a la alteración en machos, mientras que en las hembras ninguna de las tres isoformas presentó diferencias con respecto al tiempo. Sobre esto se discutirá más adelante.

En cuanto a los hallazgos relacionados con los NII, se observó hiperplasia de estas células en ambos sexos, que como se mencionó antes este relacionado con el daño al epitelio alveolar, especialmente a los NI que son más

susceptibles que los tipo II. Durante el daño inducido al pulmón, se ha observado que los NI mueren, y los NII son los responsables de repoblar el epitelio; cuando esto sucede estas células se desdiferencian y proliferan convirtiéndose en NII hiperplásicos que presentan todos los marcadores característicos de su estirpe celular. Posteriormente algunas de estas células sufren apoptosis, otras permanecen como NII y otras se transdiferencian a NI (Mason, 2006). Actualmente el proceso de hiperplasia se ha reconocido como una respuesta reparadora del tejido pulmonar, parece ser esencial para la restauración de la arquitectura alveolar y se ha observado después de la exposición a cadmio (Martin et al., 1985), hidroxitolueno (Adamson et al., 1977), NO<sub>2</sub> (Barth et al., 1994), sílice (Miller y Hook, 1990) y óxido de titanio (Liu y Yang, 2013), por mencionar a algunos.

Se considera que los NII hiperplásicos son funcionalmente normales y vitales para el mantenimiento de la homeostasis alveolar y de las unidades de intercambio gaseoso. Es importante considerar que los NII de manera normal producen y secretan diferentes proteínas que protegen el epitelio alveolar del daño oxidante, entre las que destacan las proteínas del surfactante especialmente SP-A y SP-D que se ha reportado inhiben la peroxidación lipídica del surfactante y el daño oxidante a células como los macrófagos alveolares, por mecanismos que aun no han sido claramente dilucidados (Bridges et al., 2000; Terrasa et al., 2005). Además de estas proteínas, los NII secretan altas cantidades de glutatión reducido que es un importante péptido antioxidante (Mason, 2006). Estos mecanismos serían importantes defensores del epitelio alveolar ante la exposición a V.

En cuanto al marcador SP-C las diferencias fueron mínimas, permaneciendo estable durante casi todo el tratamiento, y aunque se cuantificaron más NII el marcador no cambio de forma relevante. Este hecho sugiere que el tratamiento con vanadio interfiere con la producción de SP-C en los neumocitos, por lo cual no se observó el incremento esperado de esta proteína, salvo en momentos muy específicos del tratamiento, aunque los niveles no disminuyeron con respecto a los controles. Estudios *in vitro* demuestran que la proteína SP-C es blanco de las especies reactivas de oxígeno, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el •O<sub>2</sub>, lo que produce modificaciones en sus aminoácidos, resultando en la oligomerización de la proteína y la consecuente reducción del reconocimiento por parte del anticuerpo anti-SP-C por western blot (Rodríguez-Capote et al., 2006). Estos hallazgos son una posible explicación a nuestros resultados, dado que la inhalación de V produce estrés oxidante, que podría resultar en la modificación de la proteína y la reducción de su interacción con el anticuerpo anti-SP-C utilizado para identificar el marcador por inmunohistoquímica. Es importante considerar sin embargo, que esta modificación como consecuencia del estrés oxidante no esta afectando de manera tal que se produzca la disminución de SP-C con respecto a los controles. Esto último podría estar relacionado con la regulación de los niveles de estrés oxidante que antes se mencionó.

El hecho de que la proteína surfactante tipo C no disminuya por debajo de los niveles de los controles podría representar una ventaja para el pulmón, ya que es una proteína que estabiliza el surfactante (Weaver, 1998) y cumple funciones inmunoregulatoras (Mulugeta y Beers, 2006). Se requieren más estudios para determinar los efectos de la inhalación del V en los otros componentes del surfactante y precisar su participación en el desarrollo de tolerancia a este metal.

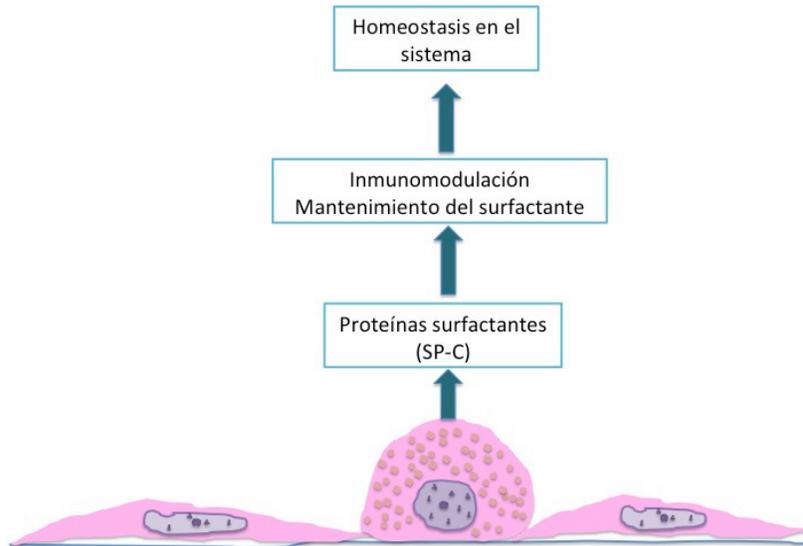


Figura 13. Participación de los NII y SP-C en el mantenimiento de la homeostasis en el pulmón.

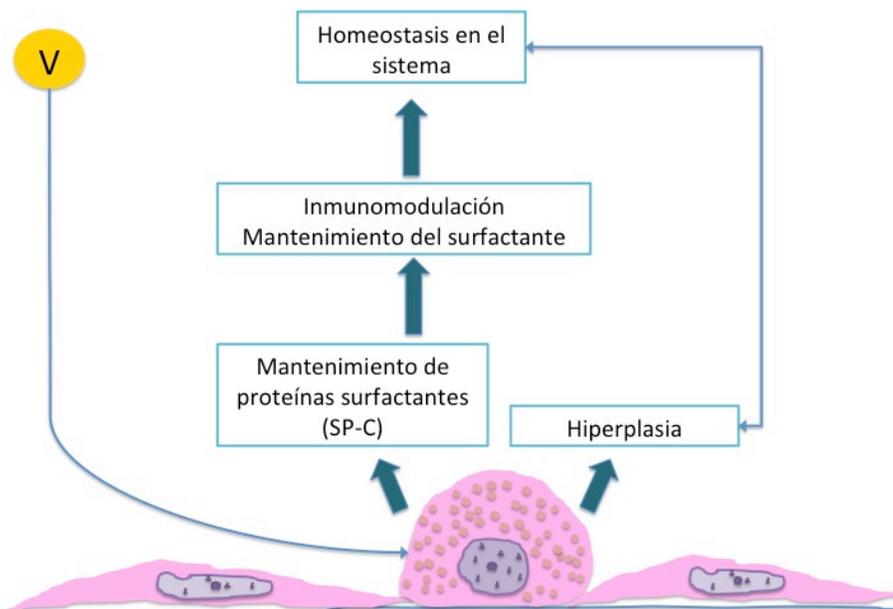


Figura 14. Participación de los NII y SP-C en el mantenimiento de la homeostasis en el pulmón y su posible relación con el desarrollo de tolerancia.

Finalmente consideremos las diferencias en los daños entre machos y hembras en nuestro modelo. Es importante hacer notar que, aunque se observaron diferencias en algunos hallazgos, el resultado final de la exposición en ambos sexos fue el mismo. Los cambios histopatológicos (hiperplasia, infiltrado inflamatorio y desprendimiento del epitelio bronquiolar), observados fueron aparentemente iguales tanto en machos como en hembras, mientras que los cambios en la altura del epitelio bronquiolar, la metaplasia mucoide bronquiolar, la modificación en la presencia de CC16 en el epitelio bronquiolar y la alteración en la actividad específica de los CYP450 fue más importante en los machos que en las hembras. A las 8 semanas de exposición los cambios anteriores se equipararon entre sexos. En cuanto al cambio en la expresión de CC16 en homogenizados totales de pulmón y la hiperplasia de los NII, se observó que las hembras fueron más susceptibles que los machos.

Numerosos estudios tanto en humanos como en modelos animales han demostrado que los cambios observados en las respuestas fisiológicas normales y en las patológicas tienen una relación estrecha con las hormonas sexuales masculinas y femeninas (Carey et al., 2007; Townsend et al., 2012). Se ha demostrado que en tejido pulmonar se expresan receptores de estrógenos, progesterona y testosterona, lo cual influye en la fisiología de este órgano (Giannopoulos y Smith, 1982; Couse et al., 1997; Kimura et al., 2003), y que claramente el pulmón es un órgano dimórfico.

Desde la etapa fetal, las hormonas sexuales influyen de manera importante en el desarrollo del sistema respiratorio. *In utero*, se presentan diferencias en relación con el tamaño de los pulmones, la velocidad con la que se desarrollan las distintas zonas de las vías aéreas, la síntesis y secreción del surfactante, además de los parámetros de función pulmonar. Se sabe por ejemplo que las hembras producen el surfactante de manera más temprana que los machos (Fleisher et al., 1985; Torday y Nielsen, 1987), que las hembras poseen pulmones más pequeños que los machos (Hibbert et al., 1995; Merkus et al., 1996) y que las vías aéreas bajas se desarrollan más rápidamente en las hembras que en los machos (Pagtakhan et al., 1984), entre otros datos interesantes. Estas diferencias se atribuyen en estos estudios a los efectos hormonales sobre el sistema.

Las hormonas sexuales en el pulmón y otros órganos son capaces de actuar sobre las células a través de una vía genómica (uniéndose con su receptor al ADN) y de la vía no genómica (a través de la unión a receptores de membrana y la posterior regulación de distintas vías de señalización (Simoncini y Genazzani, 2003; Edwards, 2005; Bennett et al., 2010). Algunos estudios demuestran que dependiendo del tipo celular, la concentración de la hormona esteroidea, la expresión relativa del receptor específico de la hormona, las moléculas co-reguladoras asociadas, así como la regulación de las vías de señalización, influyen sobre los efectos que se observan en relación con las hormonas esteroides sexuales, convirtiendo la modulación de la función celular en un fenómeno muy complejo (Carey et al., 2007; Townsend et al., 2012).

Los efectos de las hormonas sexuales también se han explorado en relación con la susceptibilidad a la exposición a distintos contaminantes y el sexo. Distintos trabajos en los que se evalúa el efecto de la exposición a xenobióticos en machos y hembras apuntan a que las hembras son más susceptibles al daño. Por ejemplo van Winkle y colaboradores reportaron que durante la exposición a naftaleno, los daños que se produjeron principalmente en las CBNC se presentaron de manera más temprana en las hembras que en los machos, además de que el daño fue más extenso en estas últimas (van Winkle et al., 2002). Por su parte Cabello y colaboradores encontraron diferencias en la respuesta inflamatoria desencadenada por la exposición a ozono entre machos y hembras, siendo más drástica en las últimas (Cabello et al., 2015). Los mecanismos que determinan estas diferencias entre sexos aun no han sido identificados con claridad.

La mayoría de nuestros resultados apuntan a que los machos fueron más susceptibles a la inhalación de V mostrando un efecto mayor en los parámetros determinados en el modelo, contrario a lo que señalan la mayoría de las evidencias respecto a que las hembras son más susceptibles, aunque no hay que perder de vista que al final de la exposición el efecto se equiparó entre sexos. Este último hallazgo apunta a que las hormonas sexuales no tienen un impacto importante en la respuesta observada en este estudio. ¿Es posible que exista alguna alteración en las hormonas sexuales que esté modificando la respuesta de los organismos diluyendo las diferencias entre sexos que se han reportado en otros estudios? Analicemos el fenómeno de metaplasia mucoide, que se presentó en machos y hembras con la misma tendencia, aunque fue más drástica en los primeros. Este hallazgo es curioso, puesto que la literatura muestra en distintos estudios, que en las hembras el fenómeno de metaplasia se produce con mayor intensidad, lo que se ha relacionado con el efecto del 17-

**B** estradiol sobre el incremento en la expresión de mucinas en las células mucosecretoras (Amanuma y Suzuki, 1987; Dammann et al., 2000; Tam et al., 2014), aunque este fenómeno no se ha precisado en relación con las CBNC. Curiosamente en nuestro modelo de inhalación se ha reportado la disminución de 17-**B** estradiol y progesterona en ratones hembra (Meléndez-García, 2014) lo cual podría estar relacionado con el hecho de que se observe un menor efecto sobre la metaplasia mucoide de las CBNC en las hembras, si es que ésta tuviera relación con la presencia de los estrógenos como se mencionó previamente.

Si el 17-**B** estradiol y la progesterona disminuyen en las hembras expuestas a V, esto podría contribuir a explicar el porqué de encontrar una respuesta más drástica en los machos que en las hembras, aunque esto requiere de estudios más detallados al respecto.

## 11 Conclusiones

Como se mencionó anteriormente la tolerancia es un fenómeno que se ha observado en el pulmón expuesto a diversos contaminantes y sustancias, que se produce como consecuencia de la pre-exposición a dosis bajas de un compuesto y que se observa en una exposición posterior a una concentración mayor. Sin embargo, no se han establecido claramente los factores que podrían contribuir al desarrollo de esta respuesta.

Nuestro modelo de inhalación resultó útil para el estudio del desarrollo de tolerancia en el pulmón, ya que observamos que durante la fase II de exposición los daños permanecieron igual que en la fase I. Cualitativamente se determinó que los daños en la fase de exposición alta fueron semejantes a los observados en la fase I.

Es relevante mencionar que las células epiteliales desempeñaron un papel fundamental en el desarrollo de tolerancia. Las CBNC y los neumocitos tipo II parecen tener un papel relevante en este tipo de respuesta. Las proteínas de secreción de estas células (CC16 y SP-C) resultaron candidatos importantes para desarrollar tolerancia a la inhalación de vanadio.

Nuestro modelo mostró que la pre-exposición a  $1.56 \text{ mg/m}^3$  indujo la sobre-expresión de CC16 en el pulmón, que podría tener un efecto directo sobre los cambios inflamatorios observados y la modificación en el fenotipo mucoproducción de las células bronquiales no ciliadas.

Aunque los patrones de respuesta entre los machos y las hembras resultaron parecidos, los machos respondieron más al reto que implicó la exposición a vanadio. Es importante considerar que un mayor efecto en algunos parámetros podría favorecer la respuesta de tolerancia de los machos.

El modelo de inhalación propuesto en este estudio fue útil para identificar este tipo de respuesta en el pulmón y especialmente pone de manifiesto la importancia de la proteína CC16 en la protección del pulmón y en el desarrollo de tolerancia a la exposición al vanadio.

Una limitación de este estudio es que los marcadores no se identificaron en lavado broncoalveolar, lo que podría apoyar los hallazgos de su incremento como parte de la defensa del epitelio por la inhalación del metal. Para comprobar su participación, será interesante explorar su modificación en lavado broncoalveolar, además de la evaluación directa sobre la inflamación en el modelo.

## 12 Perspectivas

Este trabajo abre la posibilidad a la exploración de varias interrogantes interesantes asociadas con la exposición a V y la tolerancia, algunas son:

- Estudiar el efecto directo sobre el proceso inflamatorio, explorando las diferencias producidas en citocinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ .
- Analizar el efecto sobre los procesos antioxidantes, identificando enzimas y moléculas con estas propiedades.
- Explorar si los fenómenos desencadenados en este modelo podrían favorecer la tolerancia a otros xenobióticos administrados simultáneamente con el V.

### 13 Literatura citada

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1997. ATSDR's Toxicological Profiles:Vanadium. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, CRC Press, Inc.
- Adamson I.Y.R., Bowden D.H., Cote M.G., Witschi,H. 1977. Lung injury induced by butylated hydroxytoluene. Cytodynamic and biochemical studies in mice. *Lab.Invest.* 36:26-32.
- Alessandrini F., Weichenmeier I., van Miert E., Takenaka S., Karg E., Blume C., Mempel M., Schulz H., Bernard A. and Behrendt H. (2010). Effects of ultrafine particles-induced oxidative stress on Clara cells in allergic lung inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* 7,11-24.
- Amanuma K., Suzuki. K.T. 1987. Effect of intratracheal instillation of cadmium chloride in phospholipids in alveolar wash fluid. *Toxicology.* 44: 321-328.
- Anderson O., Nordlund-Moller L., Barnes H.J., Lund J. 1994. Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein: determination of ligand binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 269: 19081-19087.
- Andreeva A.V., Kutuzov M.A., Voyno-Yasenetskaya T. 2007. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293: L259-L271.
- Assem, F. L., Levy, L. S. 2012. Vanadium, 209-224.
- Barceloux D.G, Barceloux D. 1999. Vanadium . *Clin Toxicol.* 37(2): 265-278.
- Barkauskas C.E., Cronce M.J., Rackley C.R., Bowie E.J., Keene D.R., Stripp B.R., Randell S.H., Noble P.W., Hogan B.L.M. 2013. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J. Clin Invest.* 123(7): 3025-3036.
- Baran E.J. 2008. Vanadium Detoxification: Chemical and Biochemical Aspects. *Chem. Biodivers.* 5:1475-1484.
- Barth P. J., Müller B., Wagner U., Bittinger A. 1994. Assessment of proliferative activity in type II pneumocytes after inhalation of NO<sub>2</sub> by AgNOR-analysis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 46(4): 335-342.
- Becklake M.R., Kauffmann F. 1999 Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax.* 54:1119-1138.
- Bennett N.C., Gardiner R.A., Hooper J.D., Johnson D.W., Gobe G.C. 2010. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 42:813-827.
- Bernstein J.A., Alexis N., Barnes C., Bernstein I.L., Nel A., Peden D., Diaz-sanchez D., Tarlo S.M., Brock W., Bernstein J.A. 2004. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114(5): 1116-1123.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. 2012. *World Allergy Organization Journal.* 5(1): 9-19.
- Blomberg A., Krishna M.T., Helleday R., Söderberg M., Ledin M-C, Kelly F.J., Frew A.J., Holgate S.T., Sandström T. 1999. Persistent airway inflammation but accommodated antioxidant and lung function responses after repeated daily exposure to nitrogen dioxide. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:536-543.
- Boezen H.M., Jansen D.F., Postma D.S. 2004. Sex and gender differences in lung development and their clinical significance. *Clin. Chest Med.* 25:237-245.
- Bonner, J. C., Lindroos, P. M., Rice, A. B., Moomaw, C. R., and Morgan, D. L. 1998. Induction of PDGF receptor- $\alpha$  in rat myofibroblasts during pulmonary fibrogenesis *in vivo*. *Am. J. Physiol.* 274: L72-L80.
- Bonner J.C., Rice A.B., Moomaw C.R., Morgan D.L. 2000. Airway Fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278: L209 - L216.

- Born S.L., Fix A.S., Caudill D., Lehman-mckeeman L.D. 1999. Development of Tolerance to Clara Cell Necrosis with Repeat Administration of Coumarin. *Toxicol. Sci.* 309(51): 300–309.
- Boucherat O., Boczkowski J., Jeannotte L., Delacourt C. 2013. Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways. *Exp. Lung Res.* 39(4-5): 207-216.
- Bridges J.P., Davis H.W., Damodarasamy M., Kuroki Y., Howles G., Hui D.Y., McCormack F. 2000. Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J. Biol. Chem.* 275(49): 38848–38855.
- Broeckaert F., Bernard A. 2000. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clin. Exp. Allergy.* 30: 469–475.
- Cabello N., Mishra V., Sinha U., DiAngelo S. L., Chronos Z. C., Ekpa N. A., Silveyra P. 2015. Sex differences in the expression of lung inflammatory mediators in response to ozone. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 309(10): L1150–L1163.
- Carey M.A., Card J.W., Voltz J.W., Germolec D.R., Korach K., Zeldin D.C. 2007. The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 293: L272–L278.
- Chang H., Chang L.W., Cheng Y., Tsai W., Tsai M., Lin P. 2006. Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol. Sci.* 89(1): 205–213.
- Chauhan A.J., Inskip H.M., Linaker C.H., Smith S., Schreiber J., Johnston S.L. 2003. Personal exposure to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and the severity of virus-induced asthma in children. *Lancet.* 361:1939-1944.
- Chen L.C., Zhang Z., Myers A.C. and Huang S.K. 2001. Cutting Edge: Altered pulmonary eosinophilic inflammation in mice deficient for Clara cell secretory 10-kDa protein. *J. Immunol.* 167(6): 3025-3028.
- Choudhary D., Jansson I., Schenkman J.B., Sarfarazi M., Stoilov I. 2003. Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 414: 91–100.
- Christian D.L., Chen L.L., Scannell C.H., Ferrando R.E., Welch B.S., Balmes J.R. 1998. Ozone-induced inflammation is attenuated with multiday exposure. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 158(2), 532–537.
- Cohen A.J., Brauer M., Burnett R. 2017. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet.* 389(10082):1907-1918.
- Comhair S.A., and Erzurum S.C. 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283: L246–L255.
- Couse J.F., Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology.* 138: 4613–4621.
- Crosby L.M., Waters C.M. 2010. Epithelial repair mechanisms in the lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology,* 298(6): L715–L731.
- Curran D.R. and Cohn L. 2010. Advances in mucous cell metaplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42(3): 268–275.
- Cutler R.G., Plummer J., Chowdhury K, Heward C. 2005. Oxidative Stress Profiling. Part II. Theory, Technology, and Practice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1055: 136–158.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews.* 24: 55–99.

- Dammann CE, Ramadurai SM, McCants DD, Pham LD, Nielsen HC. 2000. Androgen regulation of signaling pathways in late fetal mouse lung development. *Endocrinology* 141: 2923–2929.
- Davidson T., Ke Q., Costa M. 2007. Chapter 5. Selected Molecular Mechanisms of metal Toxicity and Carcinogenicity. : Nordberg, G., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T (Eds.). *Handbook on the Toxicology of Metals*. Estados Unidos de América: Academic Press, Elsevier.pp. 79-100.
- Davis C.W., Dickey B.F. 2008. Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 2008. 70:487–512.
- DeLorme M.P., Yang H., Elbon-Copp C., Gao X., Barraclough-Mitchell H., Bassett D.J. 2002. Hyperresponsive airways correlate with lung tissue inflammatory cell changes in ozone-exposed rats. *J. Toxicol. Environ. Health.* 65:1453-70.
- Diaz-Sanchez D, Proietti L, Polosa R. 2003. Diesel fumes and the rising prevalence of atopy: an urban legend? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 146-52.
- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. 2016. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-44.
- Ding X., Kaminsky L.S. 2003. Human extrahepatic cytochromes p450: function in xenobiotic metabolism and tissue selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003. 43:149–73.
- Dodge D. E., Rucker R. B., Pinkerton K. E., Haselton C. J. and Plopper C. G. 1994. Dose dependent tolerance to ozone: III. Elevation of intracellular Clara cell 10-kDa protein in central acini of rats exposed for 20 Months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127(1): 109–123.
- Edwards D.P. 2005. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 335–376.
- Elinder C.G. Gerhardsson L., Oberdoerster G. 1998. Biological monitoring of toxic metals- overview. En: *Biological monitoring of toxic metals*. W.T. Clarkson, L. Friberg, F. Nordberg, R. Sanger (Eds). Plenum Press, Nueva York. pp. 1-71.
- Espinosa G., Golzarri J.I., Ponciano-Rodríguez G., Gaso M.I., Mena M., Segovia N., Vazquez-Lopez C., Sajo-Bohus L. 2009. Population vulnerability due to the exposure to radon and airborne particulate matter (PM10), in Mexico City. *Radiat. Meas.* 44: 1028–1031.
- Evans C.M., Williams O.W., Tuvim M.J., Nigam R., Mixides G.P., Blackburn M.R., DeMayo F.J., Burns A.R., Smith C., Reynolds S.D., Stripp B.R., Dickey B.F. 2004. Mucin is produced by Clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31: 382–394.
- Evans M. J., Cabral L.J., Stephens R.J., Gustave Free. 1975. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO<sub>2</sub>. *Exp. Mol. Pathol.* 22: 142-150.
- Evans MJ, Johnson LV, Stephens RJ, Freeman G. 1976. Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>. *Lab. Invest.* 5(3):246-257.
- Fairchild E.J. 1967. Tolerance Mechanisms. *Archives of Environmental Health: An International Journal.* 14(1): 111-126.
- Fehrenbach H. 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res.* 2:33–46.
- Ferrer E.G., Williams P.A.M., Baran E.J. 1991. A spectrophotometric study of the VO<sup>2+</sup>-glutathione interactions. *Biological Trace Element Research.* 30(2): 175–183.
- Fleisher B., Kulovich M.V., Hallman M., Gluck L. 1985. Lung profile: sex differences in normal pregnancy. *Obstet Gynecol.* 66:327–330.

- Forkert P. 1995. CYP2E1 Is Preferentially Expressed in Clara Cells of Murine Lung: Localization by In Situ Hybridization and Immunohistochemical Methods. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 12: 589-596.
- Fortoul T.I, Quan-Torres A., Sánchez I., López I.E, Bizarro P., Mendoza M.L, Osorio L.S, Espejel-Maya G., Avila-Casado M. del C, Ávila-Costa M.R, Colín-Barenque L., Villanueva D.N, Olaiz-Fernandez G. 2002. Vanadium in ambient air: concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico City residents in the 1960s and 1990s. *Arch. Environ. Health.* 57(5):446-449.
- Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutierrez G., Ustarroz-Cano M., Colín-Barenque L., Montaña L.F., García-Pelaez I., Bizarro-Nevarés P., López-Valdez N., Falcón-Rodríguez C.I., Jimenez-Martínez R.S., Ruíz-Guerrero M.L., López-Zepeda and Muñiz-Rivera-Cambas A. 2011. Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J. Biom. Biotechnol.* 1-11
- Fortoul T. I., Rodríguez-Lara V., González-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutiérrez G., Ustarroz-Cano M., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., García-Pelaez I., Montaña L.F., Jimenez-Martínez R.S., López-Valdez N., Ruíz-Guerrero M.L., Meléndez-García N.A., García-Ibarra F.A., Martínez-Báez V., Zapata Alfaro D., Muñoz-Rivera-Cambas A., López-Zepeda L.S., Quezada-Maldonado E.M., Cervantes Yépez S. 2014. Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chim. Acta.* 420, 8-15.
- Franken C., Meijer C.J.L.M., Dijkman J.H. 1989. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 493-498.
- French R.J., Jones J.H. 1993. Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Lif Sci.* 52: 339-346.
- Ganesan S., Comstock A.T., Sajjan U.S. 2013. Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers.* 1(4): 24997-1- 24997-9.
- Gauderman WJ, Urman R, Avol E, et al. Association of improved air quality with lung development in children. *N Engl J Med.* 2015;372(10):905-913.
- Giannopoulos G, Smith SK. 1982. Androgen receptors in fetal rabbit lung and the effect of fetal sex on the levels of circulating hormones and pulmonary hormone receptors. *J Steroid Biochem* 17: 461-465.
- Goc A. 2006. Biological activity of vanadium compounds. *Cent Eur J Biol.* 1(3): 314-332.
- Gowdy K., Krantz Q.T., Daniels M., Linak W.P., Jaspers I. and Gilmour M.I. 2008. Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229: 310-319.
- Grayson, M. 1983. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Vol 23. 3a ed. John Wiley & Sons. New York. 688-704.
- Gudis D.A., Cohen Noam A. 2010. Cilia Dysfunction. *Otolaryngol Clin North Am.* 43(3): 461-472.
- Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. 2010. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional De Medicina. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996.
- Hackney J.D., Linn W.S., Mohler J.G., Collier C.R. 1977. Adaptation to short-term respiratory effects of ozone in men exposed repeatedly. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 43(1):82-85.
- Henderson W.R. Jr, Chiang G.K., Tien Y.T., Chi E.Y. 2006. Reversal of allergen-induced airway remodeling by cyslt1 receptor blockade. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173, 718-728.
- Hibbert M., Lannigan A., Raven J., Landau L., Phelan P. 1995. Gender differences in lung growth. *Pediatr Pulmonol* 19:129-134.
- Hiemstra P.S., Bourdin A. 2014. Club cells, CC10 and self-control at the epithelial surface. *Eur.Respir. J.* 44(4): 831-832.

- Hogan B., Barkauskas C.E., Chapman H.A., Epstein J.A., Jain R., Hsia C., Niklason L., Calle E., Le A., Randell S.H., Rock J., Snitow M., Krummel M., Stripp B., Vu T., White E.S., Whitsett J.A., Morrissey E.E. 2014. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. 15(2): 123-138.
- Hong K.U., Reynolds S.D., Giangreco A., Hurley C.M., Stripp B.R. 2001. Clara cell secretory protein-expressing cells of the airway neuroepithelial body microenvironment include a label-retaining subset and are critical for epithelial renewal after progenitor cell depletion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24(6):671-681.
- Horvath S.M., Gliner J.A., Folinsbee L.J. 1981. Adaptation to Ozone: Duration of Effect. *American Review of Respiratory Disease*. 123(5): 496-499.
- Hukkanen J., Pelkonen O., Hakkola J., Raunio H. 2002. Expression and Regulation of Xenobiotic-Metabolizing Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Lung. *Critical Reviews in Toxicology*. 32(5): 391-411.
- Kumar R.K., Herbert C., Thomas P.S. et al. 2003. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 349-355.
- Inoue K., Takano H., Shimada A., Satoh M. 2009. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. *Mediators of Inflammation*. 2009: 1-7.
- Jiménez-Cisneros, B. 2001. La Contaminación Ambiental en México. Causas, efectos y tecnología apropiada. México. Limusa. Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C. Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA.
- Jomova K., Baros S., Valko M. 2012. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry*. 37(2): 127-134.
- Johnston C.J., Oberdörster G., Finkelstein J.N. 2001. Recovery from oxidant-mediated lung injury: response of metallothionein, MIP-2, and MCP-1 to nitrogen dioxide, oxygen, and ozone exposures. *Inhal. Toxicol.* 13, 689-702.
- Jorens P.G., Sibille Y., Goulding N.J., van Overveld F.J., Herman A.G., Bossaert L., De Bcker W.A., Lauwerys R., Flower R.J., Bernard A. 1995. Potential role of clara cell protein, an endogenous phospholipase A2 inhibitor, in acute lung injury. *Eur Respir J*.8 (10): 1647-1653.
- Jörres R., Holz O., Zachgo W., M, P. T. I. M., Koschyk S., Üller B. M., Agnussen H. M. 2000. The Effect of Repeated Ozone Exposures on Inflammatory Markers in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Mucosal Biopsies. *Am J Respir Crit Care Med*. 161(2): 1855-1861.
- Junqueira-Carneiro, 2013. Capítulo 1. Métodos de estudio en Histología. En: Junqueira-Carneiro. *Histología Básica, texto y atlas*. Editorial Panamericana. pp. 2-20.
- Kampa M., Castanas E. 2008. Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* 151: 362-367.
- Kentaro S., Kawaguchi Y., Kishino Y., Kido H. 1993. Electron immunohistochemical localization in rat bronchiolar epithelial cells of tryptase Clara, which determines the pneumotropism and pathogenicity of Sendai virus and influenza virus. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 89-93.
- Kido H., Yokogoshi Y., Sakai K., Tashiro M., Kishino Y., Fukutomi A., Katunuma N. 1992. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 267(19): 13573-13579.
- Kim J.H., Sherman M.E., Curriero F.C., Guengerich F. P., Strickland P. T., Sutter, T. R. 2004. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol. Appl. Pharm.* 199(3): 210-219.
- Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel AD, Akahira J, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H. 2003. Expression of androgen receptor and 5 $\alpha$ phareductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible

correlation with branching morphogenesis. *Clin. Sci. (Lond)* 105: 709-713.

- Kishore U., Greenhough T.J., Waters P., Shrive A. K., Ghai R., Kamran M. F., Chakraborty, T. 2006. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Molecular Immunology*. 43(9): 1293-315.
- Klaassen, C. D., Liu, J., Diwan, B. A. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238(3): 215-220.
- Knaapen A.M., Shi T., Borm P.J.A., Schins R.P.F. 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cel. Biochem.* 234-235:317-326.
- Knecht E.A., Moorman W.J., Clark J.C., Lynch D.W., Lewis, T.R. 1985. Pulmonary effects of acute vanadium pentoxide inhalation in monkeys. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132(6):1181-1185.
- Knecht E.A., Moorman W.J., Clark J.C., Hull R.D., Biagini R.E., Lynch D.W., Simon S.D. 1992. Pulmonary reactivity to vanadium pentoxide following subchronic inhalation exposure in a non-human primate animal model. *J. Appl. Toxicol.* 12(6): 427-434.
- Knight D.A., Holgate S.T. 2003. The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*. 8: 432-446.
- Kobayashi K., Himeno S., Satoh M., Kuroda J., Shibata N., Seko Y. and Hasegawa T. 2006. Pentavalent vanadium induces hepatic metallothionein through interleukin-6-dependent and independent mechanisms. *Toxicol.* 228, 162-170.
- Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30(6): 620-650.
- Kumagai K., Lewandowski R.P., Jackson-Humbles D.N., Buglak N., Li N., White K., Van Dyken S.J., Wagner J.G. and Harkema J.R. 2017. Innate lymphoid cells mediate pulmonary eosinophilic inflammation, airway mucous cell metaplasia, and type 2 immunity in mice exposed to ozone. *Toxicol. Pathol.* 45: 692-704.
- Lakritz J., Chang A., Weir A., Nishio S., Hyde D., Philpot R., Buckpitt A. and Plopper C. 1996. Cellular and metabolic basis of Clara cell tolerance to multiple doses of cytochrome P450-activated cytotoxicants. I: Bronchiolar epithelial reorganization and expression of cytochrome P450 monooxygenases in mice exposed to multiple doses of naphthalene. *Pharmacol. Exp. Ther.* 278(3): 1408-1418.
- Lau A., Zhang J., and Chiu J. 2006. Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: Roles of thec-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 215:1-8.
- Lee M.J., Dinsdale D. 1995. The subcellular distribution of NADPH-cytochrome P450 reductase and isoenzymes of cytochrome P450 in the lungs of rats and mice. *Biochem. Pharmacolog.* 49(10): 1387-1394.
- Leonard S., Harris G., Shi X. 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37(12): 1921-1942.
- Lepeule J., Bind M.A., Baccarelli A.A., Koutrakis P., Tarantini L., Litonjua A., Sparrow D., Vokonas P., Schwartz J.D. 2014. Epigenetic influences on associations between air pollutants and lung function in elderly men: the normative aging study. *Environ. Health Perspect.* 122(6):566-572.
- Levy, B. S., Hoffman, L., and Gottsegen, S. 1984. Boilermakers' bronchitis. *J. Occup. Med.* 26, 567-570.
- Ley general del equilibrio ecológico y la protección al Ambiente. Texto vigente. Diario Oficial de la Federación el 28 de enero de 1988. Estados Unidos Mexicanos.- Presidencia de la República.

- Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Health Perspect.* 111(4): 455–460.
- Liu S., Yang, Z. 2013. Evaluation of the Effect of Acute and Subacute Exposure to TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Oxidative Stress. *Oxidative Stress and Nanotechnology: Methods and Protocols*. In D. Armstrong, D. J. Bharali (Eds.) (pp. 135–145). Totowa, NJ: Humana Press.
- Lodovici Maura, Bigagli E. 2011. Oxidative Stress and Air Pollution Exposure. *Journal of Toxicology*. 1-9.
- Lottes R.G., Newton D.A., Spyropoulos D.D., Baatz J.E. 2014. Alveolar type II cells maintain bioenergetic homeostasis in hypoxia through metabolic and molecular adaptation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 306: L947–L955.
- McFadden S.L., Woo J.M., Michalak N., and Ding D. 2005. Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear. Res.* 202: 200–208.
- Mango G.W., Johnston C.J., Reynolds S.D., Finkelstein J.N., Plopper C.G., Stripp B.R. 1998. Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways. *Am. J. Physiol.* 275 (19): L348–L356.
- Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. 2013. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *BioMed Res. Int.* 1-15.
- Mannucci P.M., Harari S., Martinelli I., Franchini M. 2015. Effects on health of air pollution: a narrative review. *Intern. Emerg. Med.* 10(6): 657–662.
- Martin F.M., Witschi H.P. 1985. Cadmium-induced lung injury: cell kinetics and long-term effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80: 215-227.
- Mason R.J., Williams M.C., Widdicombe J.H., Sanders M.J., Misfeldt D.S., Berry L.C. 1982. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6033–6037.
- Mason R.J., Greene K., Voelker D.R. 1998. Surfactant protein A and surfactant protein D in health and disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 275 (1):L1-L13.
- Mason Robert J. 2006. Biology of alveolar type II cells. *Respirology.* 11: S12–S15.
- McConnell R., Islam T., Shankardass K., Jerrett M., Lurmann F., Gilliland F., Gauderman J., Avol E., Künzli N., Yao L., Peters J, Berhane K. 2010. Childhood incident asthma and traffic-related air pollution at home and school. *Environ. Health Perspect.* 118(7):1021-1026.
- Melgert B.N., Ray A., Hylkema M.N., Timens W., Postma D.S. 2007. Are there reasons why adult asthma is more common in females? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 7: 143–150.
- Merkus P.J., ten Have-Opbroek A.A., Quanjer P.H. 1996. Human lung growth: a review. *Pediatr. Pulmonol.* 21: 383–397.
- Miller B.E., Hook G.E. 1990. Hypertrophy and hyperplasia of alveolar type II cells in response to silica and other pulmonary toxicants. *Environ. Health Perspect.* 85: 15–23.
- Mulugeta S., Beers M.F. 2006. Surfactant protein C: Its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect.* 8: 2317-2323.
- National Toxicology Program (NTP). 2002. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Vanadium Pentoxide (CAS No. 1314-62-1) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). Technical Report Series No. 507. NIH Publication No. 02-4441. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.
- Nomori H, Horio H, Takagi M Kobayashi Y, Hirabayashi Y. 1996. Clara cell protein correlation with hyperlipidemia. *Chest.* 110:680–684.

- Nordenhall C., Pourazar J., Blomberg A., Levin J.O., Sandstrom T., Adelroth E. 2000. Airway inflammation following exposure to diesel exhaust: a study of time kinetics using induced sputum. *Eur. Respir. J.* 15:1046-1051.
- Nordenhall C., Pourazar J., Ledin M.C., Levin J.O., Sandstrom T., Adelroth E. 2001. Diesel exhaust enhances airway responsiveness in asthmatic subjects. *Eur. Respir. J.* 17:909-915.
- Onursal, B., Gautam, Surhid P. 1997. Vehicular air pollution : experiences from seven Latin American urban centers. World Bank technical paper ; no. WTP 373. Washington, D.C. : The World Bank.
- Pagtakhan R.D., Bjelland J.C., Landau L.I., Loughlin G., Kaltenborn W., Seeley G., Taussig L.M. 1984. Sex differences in growth patterns of the airways and lung parenchyma in children. *J. Appl. Physiol.* 56:1204-1210.
- Perez L., Rapp R., Künzli N. 2010. The Year of the Lung: outdoor air pollution and lung health. *Swiss Med. Wkly.* 140: E1-E7.
- Pessoa J., Tomaz I., Kiss T., Kiss E., Buglyó P. 2002. The systems VIVO2+ glutathione and related ligands: a potentiometric and spectroscopic study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 7(3): 225-240.
- Pierce L.M., Alessandrini F., Godleski J.J. and Paulauskis J.D. 1996. Vanadium induced chemokine mRNA expression and pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138, 1-11.
- Pilon A.L., Winn M.E., Clayton R.S. and Hariprakash H. 2016. Modification of CC10 protein by Reactive Oxygen Species: A novel anti-inflammatory mechanism. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193:5907.
- Plopper C.G., Chu F., Haselton C.J., Peake J., Wu J., Pinkerton K.E. 1994. I. Dose Dependent Tolerance to Ozone. Tracheobronchial Epithelial Reorganization in Rats After 20 Months' Exposure. *Am J Pathol.* 144:404-421.
- Rahman I., Biswas S. K., and Kode A. 2006. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533: 222-239.
- Ray P.D., Huang B.W., Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24(5): 981-990.
- Rehder D. 2003. Biological and medicinal aspects of vanadium. *Inorg. Chem. Commun.* 6: 604-617.
- Ress N.B., Chou B.J., Renne R., Dill J., Miller R., Roycroft J.H., Hailey J.R., Haseman J.K. and Bucher J.R. 2003. Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* 74: 287-296.
- Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H.T., Stripp B.R. 2000. Neuroepithelial Bodies of Pulmonary Airways Serve as a Reservoir of Progenitor Cells Capable of Epithelial Regeneration. *Am. J. Pathol.* 156 (1): 269-278.
- Reynolds, S.D., Malkinson, A.M. 2010. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 42(1): 1-4.
- Rhoads K., Sanders C.L. 1985. Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environ. Res.* 36: 359-378.
- Rock C.L., Rodriguez J.L., Khilnani R., Lown D.A. and Parker R.S. 1993. Carotenoids and antioxidant nutrients following burn injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 691, 274-276.
- Rock J.R., Barkauskas C.E., Cronic M.J., Xue Y., Harris J. R., Liang J., Noble P.W. Hogan B.L.M. 2011. Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108(52): E1475-E1483.

- Rodríguez-Capote K., Manzanares D., Haines T., Possmayer F. 2006. Reactive oxygen species inactivation of surfactant involves structural and functional alterations to surfactant proteins SP-B and SP-C. *Biophysical Journal*. 90: 2808–2821.
- Rojas-Martínez R., Pérez-Padilla R., Olaiz-Fernández G., Mendoza-Alvarado L., Moreno-Macías H., Fortoul T., McDonnell W., Loomis D., Romieu I. 2007. Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico City. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 176(4): 377-384.
- Rodríguez-Mercado J.J. and Altamirano-Lozano, M.A. 2006. Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 22(4): 173–189.
- Rooney S.A. 2001. Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol. A. Mol. Integr. Physiol*. 129: 233–243.
- Rosales-Castillo J.A., Torres-Meza V. M., Olaiz-Fernández G., Borja-Aburto V. H. 2001. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos. *Salud Pública Mex*. 43:544-555.
- Roth F.D., Quintar A.A., Leimgruber C., García L., Uribe Echevarría, E. M., Torres A. I., Maldonado C.A. 2013. Restoration of the normal Clara cell phenotype after chronic allergic inflammation. *Int. J. Exp. Path*. 94: 399-411.
- Sabolić I., Breljak D., Škarica M., Herak-Kramberger C.M. 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals*. 23(5): 897–926.
- Sandstrom T., Ledin M.C., Thomasson L., Helleday R., Stjernberg N. 1992. Reductions in lymphocyte subpopulations after repeated exposure to 1.5 ppm nitrogen dioxide. *Br. J. Ind. Med*. 49:850-854.
- Sandstrom T., Stjernberg N., Eklund A., Ledin M.C., Bjermer L., Kolmodin-Hedman B. 1991. Inflammatory cell response in bronchoalveolar lavage fluid after nitrogen dioxide exposure of healthy subjects: a dose-response study. *Eur Respir J*. 4:332-339.
- Schraufnagel D.E., Balmes J.R., Cowl C.T., De Matteis S., Jung S., Mortimer K., Perez-Padilla R., Rice M.B., Riojas-Rodriguez H., Sood A., Thurston G.D., To T., Vanker A., Wuebbles D.J. 2019. Air Pollution and Noncommunicable Diseases. A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems. *Chest*. 155(2):417-426.
- Scior T., Guevara-García A., Bernard P., Do Q., David D., Laufer S. 2005. Are Vanadium Compounds Drugable? Structures and Effects of Antidiabetic Vanadium Compounds: A Critical Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 5: 995-1008.
- Secretaria del Medio Ambiente. Proyecto Piloto Retrofit en vehículos A Diesel en la Ciudad de México. Contaminación del aire y transporte vehicular en la ZMVM. México, 2011. Disponible en: [www.sma.df.gob.mx/retrofit](http://www.sma.df.gob.mx/retrofit).
- Shiyu S., Zhiyu L., Mao Y., Lin B., Lijia W., Tianbao Z., Jie C., Tingyu L. 2011. Polydatin up-regulates clara cell secretory protein to suppress phospholipase A2 of lung induced by LPS in vivo and in vitro. *BMC Cell Biol*. 12(31): 1-13.
- Simoncini T., Genazzani A.R. 2003. Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur. J. Endocrinol*. 148:281–292.
- Singh G., Katyal S. 2000. Clara Cell Proteins. *Annals New York Academy of Science*. p.p.43-58.
- Stripp B.R., Reynolds S.D., Boe I.-M., Lund J., Power J.H.T., Coppens J.T., Plopper C.G. 2002. Clara Cell Secretory Protein Deficiency Alters Clara Cell Secretory Apparatus and the Protein Composition of Airway Lining Fluid. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 27(2): 170–178.
- Stripp BR. 2008. Hierarchical organization of lung progenitor cells: is there an adult lung tissue stem cell? *Proc Am Thorac Soc*. 25: 695–698.

- Snyder J.C., Reynolds S.D., Hollingsworth J.W., Li Z., Kaminski N., Stripp, B.R. 2010. Clara Cells Attenuate the Inflammatory Response through Regulation of Macrophage Behavior. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 42(2): 161-171.
- Sutherland K.M., Edwards P.C., Combs T.J. and Van Winkle L. S. 2012. Sex differences in the development of airway epithelial tolerance to naphthalene. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 302, 68-81.
- Tam A., Wadsworth S., Dorscheid D., Man S.F.P., Sin D.D. 2011. The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 5(4): 255-273.
- Tam A., Wadsworth S., Dorscheid D., Man S.P., Sin D.D. 2014. Estradiol increases mucus synthesis in bronchial epithelial cells. *PLOS ONE* 9(6): e100633.
- Terrasa A.M., Guajardo M.H., de Armas Sanabria E., Catalá A. 2005. Pulmonary surfactant protein A inhibits the lipid peroxidation stimulated by linoleic acid hydroperoxide of rat lung mitochondria and microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1735: 101- 110.
- Thron, R. W. 1996. Direct and Indirect Exposure to Air Pollution. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 114(2): 281-285.
- Tokita E., Tanabe T., Asano K., Suzaki H., Rubin B.K. 2014. Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *European Respiratory Journal.* 44(4): 1002-1010.
- Torday J.S, Nielsen H.C. 1987. The sex difference in fetal lung surfactant production. *Exp. Lung Res.* 12:1-19.
- Toya T., Fukuda K., Takaya M. and Arito H. 2001. Lung lesions induced by intratracheal instillation of vanadium pentoxide powder in rats. *Industrial Health.* 39(1): 8-15.
- Townsend E.A., Miller V.M., Prakash Y.S. 2012. Sex Differences and Sex Steroids in Lung Health and Disease. *Endocrine Reviews.* 33(1): 1-47.
- Vagaggini B., Taccola M., Cianchetti S., Carnevali S., Bartoli M.L., Bacci E. 2002. Ozone exposure increases eosinophilic airway response induced by previous allergen challenge. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 16:1073-7.
- Van der Vliet, A. 2015. Chapter 25 - Antioxidant Defenses in the Lung. In R. A. B. T.-C. B. of the N. L. (Second E. Parent (Ed.) San Diego: Academic Press. pp. 489-507.
- Van Winkle L.S., Buckpitt A.R., Nishio S. J., Isaac J.M., Plopper C.G. 1995. Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.* 269(6): L800-L818.
- Vareille M., Kieninger E., Edwards M.R., Regamey N. 2011. The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(1):210-229.
- Wagner J.G., Van Dyken S.J., Wierenga J.R., Hotchkiss J.A., Harkema J.R. 2003. Ozone exposure enhances endotoxin-induced mucous cell metaplasia in rat pulmonary airways. *Toxicol. Sci.* 74:437-46.
- Walker S.R., Williams M.D., Benson B. 1986. Immunocytochemical localization of the major surfactant proteins in type II cells, Clara cells, and alveolar macrophages of rat lung. *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1137-1148.
- Wang L., Medan D., Mercer R., Overmiller D., Leonard S., Castranova V., Shi X., Ding M., Huang C. and Rojanasakul Y. 2003. Vanadium - induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* 195, 99-107.
- Weaver T.E. 1998. Synthesis, processing and secretion of surfactant proteins B and C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 1408(2): 173-179.

- Weidinger A., Kozlov A. 2015. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen Species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules*. 5: 472-484.
- Wesselkamper S.C., Chen L.C., Gordon T. 2005. Quantitative trait analysis of the development of pulmonary tolerance to inhaled zinc oxide in mice. *Respiratory Research*. 6: 73.
- West J.A.A., Van Winkle L.S., Morin D., Fleschner C.A., Forman H.J., Plopper C. G. 2003. Repeated Inhalation Exposures to the Bioactivated Cytotoxicant Naphthalene (NA) Produce Airway-Specific Clara Cell Tolerance in Mice. *Toxicol. Sci*. 75: 161-168.
- Williams O.W., Sharafkhaneh A., Kim V., Dickey B.F., Evans C.M. 2006. Airway Mucus. From Production to Secretion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 34: 527-536.
- Winterton D.L., Kaufman J., Keener C.V., Quigley S., Farin F.M., Williams P.V. 2001. Genetic polymorphisms as biomarkers of sensitivity to inhaled sulfur dioxide in subjects with asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 86:232-238.
- Wong A.P., Keating A., Waddell T.K. 2009. Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytherapy*. 11(6): 676-687.
- Xiao C., Guo L., Qi R. and Xi S. 2007. Effects of air mixed certain pollutants on the expression of CC16 and certain cytokine in pulmonary tissue of rats. *Wei Sheng Yan Jiu*. 36(6):679-682.
- Xiao C., Li S., Zhou W., Shang D., Zhao S., Zhu X., Chen K. and Wang R. 2013. The effect of air pollutants on the microecology of the respiratory tract of rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 36: 588-594.
- Yang W., Omaye S.T. 2009. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutat. Res*. 674: 45-54.
- Young M.T., Sandler D.P., DeRoo L.A., Vedal S., Kaufman J.D., London S.J. 2014. Ambient air pollution exposure and incident adult asthma in a nationwide cohort of US women. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 190(8):914-921.
- Zheng D., Soh B.S., Yin L., Hu G., Chen Q., Choi H., Han J., Chow V., Chen, J. 2017. Differentiation of Club Cells to Alveolar Epithelial Cells In Vitro. *Scientific Reports*. 7: 41661.
- Zuo W.L., Shenoy S.A., Li S., O'Beirne S. L., Strulovici-Barel Y., Leopold P. L., Crystal R.G. 2018. Ontogeny and Biology of Human Small Airway Epithelial Club Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 198(11): 1375-1388.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12: 1161-1208.
- Van Winkle L.S., Gunderson A.D., Shimizu J., Baker G.I., Brown C. 2002. Gender differences in naphthalene metabolism and naphthalene-induced acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol*. 282: L1122-L1134.
- Vassallo J.D., Kaetzel R.S., Born S.L., Lewis C.L., Lehman-McKeeman L.D., Reed D.J. 2010. *g*-Glutamyl transpeptidase null mice fail to develop tolerance to coumarin- induced Clara cell toxicity. *Food Chem. Toxicol*. 48: 1612-1618.

## 14. Apéndice. Artículo requisito para la obtención del grado

López-Valdez N., Guerrero Palomo G., Rojas-Lemus M., Bizarro-Nevarés P., González-Villalva A., Ustarroz-Cano M., Rivera-Fernández N., Fortoul TI. 2019. The role of the Non-Ciliated Bronchiolar Cell in the tolerance to inhaled vanadium of the bronchiolar epithelium. *Histology and Histopathology*. DOI: 10.14670/HH-18-165.

# **HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY**

ISSN: 0213-3911  
e-ISSN: 1699-5848

Submit your article to this Journal (<http://www.hh.um.es/Instructions.htm>)

**The role of the Non-Ciliated Bronchiolar Cell in tolerance to inhaled vanadium of the bronchiolar epithelium**

**Authors:** Nelly López-Valdez, Gabriela Guerrero-Palomo, Marcela Rojas-Lemus, Patricia Bizarro-Nevarés, Adriana Gonzalez-Villalva, Martha Ustarroz-Cano, Norma Rivera-Fernández and Teresa I. Fortoul

DOI: 10.14670/HH-18-165  
Article type: ORIGINAL ARTICLE  
Accepted: 2019-09-18  
Epub ahead of print: 2019-09-18

This article has been peer reviewed and published immediately upon acceptance.  
Articles in "Histology and Histopathology" are listed in Pubmed.  
Pre-print author's version

**The role of the Non-Ciliated Bronchiolar Cell in tolerance to inhaled vanadium of the bronchiolar epithelium.**

Nelly López-Valdez (ORCID 0000-0002-0525-1074)<sup>1,2</sup>, Gabriela Guerrero-Palomo (ORCID 0000-0002-8357-7600)<sup>1</sup>, Marcela Rojas-Lemus (ORCID 0000-0002-5613-146X)<sup>1</sup>, Patricia Bizarro-Nevarés (ORCID 0000-0003-2005-9045)<sup>1</sup>, Adriana Gonzalez-Villalva (ORCID 0000-0002-5693-107X)<sup>1</sup>, Martha Ustarroz-Cano (ORCID 0000-0002-1213-487X)<sup>1</sup>, Norma Rivera-Fernández (0000-0002-1251-7993)<sup>3</sup>, ORCID Teresa I. Fortoul (ORCID 0000-0002-3507-1365)<sup>1-4</sup>.

1. Department of Cellular and Tissular Biology, School of Medicine, UNAM. México city.
2. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. México city
3. Department of Microbiology and Parasitology. School of Medicine, UNAM, México city.
4. Corresponding Author: Department of Cellular and Tissular Biology, School of Medicine, UNAM; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, México city. e-mail: fortoul@unam.mx

**Running title**

NCBC and vanadium inhalation

**Key words: NCBC, CC16, Vanadium, tolerance, phenotype**

## Abstract

The Non-Ciliated Bronchiolar Cell (NCBC) is responsible for the defense and maintenance of the bronchiolar epithelium. Several cellular defense mechanisms have been associated with an increase in the secretion of CC16 and changes in the phenotype of the cell; these mechanisms could be linked to tolerance to the damage due to exposure to inhaled Particulate Matter (PM) of the epithelium. These defense mechanisms have not been sufficiently explored. In this article, we studied the response of the NCBC to inhaled vanadium, an element which adheres to PM. This response was measured by the changes in the phenotype of the NCBC and the secretion of CC16 in a mouse model. Mice were exposed in two phases to different vanadium concentrations;  $1.27 \text{ mg/m}^3$  in the first phase and  $2.56 \text{ mg/m}^3$  in the second phase. Mice were sacrificed on the 2nd, 4th, 5th, 6th and 8th weeks. In the second phase, we observed the following: sloughing of the NCBC, hyperplasia and small inflammatory foci remained without changes and that the expression of CC16 was higher in this phase than in phase I. We also observed a change in the phenotype with a slow decrease in both phases. The increase in the secretion of CC16 and the phenotype reversion could be due to the anti-inflammatory activity of CC16. The changes observed in the second phase could be attributed to the tolerance to inhaled vanadium.

## Introduction

The non-ciliated bronchiolar cell (NCBC) performs numerous essential functions in the lung. These cells are located mainly in the bronchioles, and in rodents they constitute about 80% of the population of the bronchiolar epithelium (Wong et al., 2009). They function as stem cells (Crosby and Waters, 2010; Reynolds and Malkinson, 2010; Zuo et al., 2018), perform immunomodulatory activities through their secretion products (Snyder et al., 2010; Hiemstra and Bourdin, 2014) and metabolize xenobiotics using P450 monooxygenases (Hukkanen et al., 2002; Chang et al., 2006). They also have anti-inflammatory, immunosuppressive (Chen-Chen et al., 2001; Snyder, 2010; Liu et al., 2013) and antioxidant activities (Mango et al., 1998; Pilon et al., 2016). The NCBC can change its phenotype to mucosecreting (PAS+ and / or AB / PAS+) when exposed to toxic agents (Curran and Cohn, 2010; Alessandrini et al., 2010).

These cells produce the CC16 protein (club cell protein, CC10 or CCSP) that participates in the maintenance of the integrity of the bronchiolar epithelium and in its repair, mainly when the lung is exposed to toxic substances (Broeckaert et al., 2000; Stripp et al., 2002; Wong et al., 2009); under these stimuli, a hyper-production and hyper-secretion of CC16 have been reported (Xiao et al., 2007, 2013).

There is evidence of the participation of the NCBC in the development of tolerance to the damage caused by exposure to different types of toxic substances and environmental pollutants such as naphthalene, coumarin, methylene chloride, trichloro-ethylene, ozone and zinc oxide. Tolerance is a recognized phenomenon in toxicology, and has been defined as the mechanisms an organ develops, the lung in this case, against a substance as a consequence of pre-exposure to lower doses of the same substance; the importance of this response is that it allows the cells to "resist" toxic exposure and survive (Fairchild, 1967; Sutherland et al., 2012). The mechanisms by which this type of response occurs have not yet been established with precision; however, the participation of the NCBC is suggested (Lakritz et al., 1996; Born et al., 1999; West et al., 2002; Vassallo et al., 2010).

Vanadium (V) is a pro-oxidant element to which we are exposed through inhalation due to occupational or environmental exposure and because of its presence in the particulate matter (PM) (Rodríguez-Mercado and Altamirano-Lozano, 2006; Assem and Levy, 2012). *In vivo* it has been reported that compounds of this element, such as vanadium pentoxide (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), produce hematotoxicity, hepatotoxicity, neurotoxicity and pulmonary toxicity (Fortoul et al., 2011, 2014). Previously, Knetch (1992), in a model of subchronic exposure to V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> found that repeated exposure to this compound did not trigger a cellular immune response, nor did it increase bronchial hyperreactivity or cause exacerbation of an acute response that had been previously reported by the same group. This suggests a possible tolerance response to this metal without further details about the possible mechanisms that favored this response (Knetch et al., 1992).

Due to the important protective role of the NCBC in the lung and its possible participation in the tolerance mechanism, the objective of this study was to evaluate the response of this cell in relation to the change in its phenotype to mucosecreting and the production of CC16 as a possible mechanism related to the tolerance to inhaled vanadium (Rodríguez-Mercado and Altamirano-Lozano, 2006; Fortoul et al., 2011).

## Materials and Methods

### Mice

Male mice of strain CD-1 weighing  $33 \pm 2$  g obtained from the vivarium of the Faculty of Medicine of the National Autonomous University of Mexico were used. The mice were randomly distributed in special plastic boxes and maintained in light-dark cycles (12:12 h), with water and food (Purina rodent chow) *ad libitum*. The animals were handled in accordance to the Laboratory Animal Care and Use Guide (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council) and the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999), for the production, care and use of laboratory animals. This study was approved by the Research and Ethics Commissions of the Faculty of Medicine of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) with the number FM/DI/071/2017.

### Experimental protocol

The inhalation protocol was performed according to Fortoul et al., (2014), with some modifications. A total of 90 mice were used and distributed in two groups (A and B) of 45 animals each. Group A was the control group; these mice were exposed to 0.9% saline inhalation for one hour, twice a week, for eight weeks. Group B was exposed in two phases to the inhalation of  $V_2O_5$  (99.99% purity, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); in the first phase, the exposure was performed using a  $V_2O_5$  [0.01 M] solution, the inhalations were applied for one hour, twice a week, for four weeks. The second phase began when a [0.02 M] solution of  $V_2O_5$  was used with the same exposure scheme as before. A total of 18 animals (9 controls and 9 exposed) were sacrificed on the 2nd, 4th, 5th, 6th and 8th weeks.

Exposure in all the groups was performed in a transparent acrylic chamber (45 X 21 X 35 cm) connected to an ultra Yuehua WH 2000® nebulizer, with a maximum nebulization rate of 4mL/minute with 80% of the nebulized particles with aerodynamic diameters from 1 to 5.0  $\mu$ m.

### Determination of vanadium concentration

The determination of vanadium concentrations in the inhalation chamber was made by analyzing the filters placed at the nebulizer outlet, with a nebulization rate of 4 mL/ min. After each exposure, the filters were removed and then placed in an oven until a constant weight was obtained (Riossa HS-33); afterwards, they were fractionated into small pieces to be digested. One hundred mg of the weight of the filters were used, then, suprapur nitric acid was added, and the digestion process was performed in a microwave oven (CEM model MDS 2000). Once the digestion was completed, the resulting solutions were transferred to 10 mL volumetric flasks for analysis.

A calibration curve of 5 points, from 20 to 100 ppb (ng/mL) of vanadium, was prepared. These solutions were analyzed and then used to build the calibration curve. Afterwards, the samples were evaluated. For the preparation of the curve, the certified standard QCS-27 ICP 27 (High Purity Standards, Charleston, South Carolina) was used. The samples were analyzed by mass spectrometry of induction-coupled plasma (ICP-MS) using a Bruker equipment, model Aurora M90 with coupled autosampler.

### Determination of the concentration of vanadium in the blood

The determination of the concentrations of vanadium in the blood was performed following the same analysis protocol that was used to determine the concentrations during the exposure. The concentration of the metal was reported as parts per billion (ppb) or nanograms of vanadium per gram of dry weight of tissue (ng/g).

### **Euthanasia and organ harvesting**

For each analysis (the determination of vanadium in the blood, the histopathological evaluation and the immunohistochemistry, the western blot WB) three mice were sacrificed per week of exposure for each group (A and B).

The euthanasia of the animals for the determination of the concentrations of vanadium in the blood and the WB was performed by cervical dislocation. In the case of the histopathological and the immunohistochemical evaluation, euthanasia was performed by a lethal dose of sodium pentobarbital administered intraperitoneally (Pisabental, Pisa Agropecuaria) in a concentration of 35 mg/kg of weight, and subsequently perfused with 0.9% saline and 4% of buffered paraformaldehyde solution intracardially. The lungs were extracted and insufflated intratracheally with buffered paraformaldehyde to be processed by the histological technique in paraffin.

### **Histopathological and morphometric analysis of the lung tissue**

Slices 3  $\mu$ m thick were obtained from the lungs and were stained afterwards. The histopathological evaluation of the lung tissue was performed using two staining techniques: hematoxylin-eosin (HE) to analyze the general structure of the lung tissue and histochemistry with Peryodic Acid Schiff (PAS) for the identification of PAS+ mucosecreting cells in the terminal bronchioles.

The morphometric analysis was performed using photomicrographs obtained from the lungs that were stained with PAS. An Olympus microscope (model BH2-RFCA) with a camera of the same brand was used for the analysis. Once obtained, the images were analyzed using ImageJ (V1.50i, National Health Institutes Bethesda, Maryland USA) to count the cells and record the number of mucosecreting PAS+ cells with a length of 100  $\mu$ m in the terminal bronchioles. The cell count was performed in 10 terminal bronchioles per lung, per mouse, and was transformed into a percentage of PAS+ cells to do the statistical analysis.

### **Determination of CC16 in the lung tissue**

The tissues were dewaxed with xylol and dehydrated in a train of alcohols in increasing order (70%, 96%, 100%). Subsequently, an antigenic recovery was performed by incubation in a 2% Diva Decloacker recovery solution (Diva Decloacker 20x, BioCare Medical, Pacheco, California) at 15 psi. The endogenous peroxidase was inhibited with 3% hydrogen peroxide for 15 minutes (JT Baker, Phillipsburg, New Jersey). Nonspecific antigens were blocked with a 5% bovine albumin solution (MP Biomedicals, Santa Ana, California). The tissues were incubated with primary anti-CC16 antibody (anti-CC16 antibody, 1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at 4°C overnight. Subsequently, the tissues were incubated with a secondary anti-goat antibody for 30 minutes at room temperature and then incubated with a drop of the streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) complex (Goat on rodent HRP Polymer, BioCare Medical, Pacheco, California). The immunoreactivity was identified by incubation with 0.05% diaminobenzidine tetrachloride (Invitrogen, Camarillo, California). Finally, the sections were counterstained with hematoxylin. Some samples were only incubated with the secondary antibody and served as negative controls.

### **Determination of CC16 in lung homogenates**

For this technique, the lungs of the mice were homogenized with a Heidolph DIAX 900 homogenizer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The homogenate was centrifuged at 30,000 RPMI (9000 G) for 15 minutes; the supernatant was recovered and subsequently centrifuged at 34,800 RPMI (105,000 G), recovering the supernatant (cytosolic fraction). Subsequently, the protein concentration obtained in the cytosolic fraction was determined with a Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, Hercules, California);

albumin V was used as positive control. Samples were prepared under denaturing conditions (in charge buffer with 2-mercaptoethanol, 10% SDS, glycerol, bromophenol blue, 90 ° C for five minutes); 20 mg of protein per sample were loaded on 17 and 10% sodium polyacrylamide-dodecylsulfate electrophoresis (SDS-PAGE) gels. Then, they were transferred to nitrocellulose-PVDF membranes (Merck Millipore, Tullagreen, Cork, Ireland) in a semi-wet transfer system for one hour at 120 mA. The membranes were blocked with a solution of 5% albumin in Tris buffer (TBS), washed twice in TBS and incubated with the primary anti-CC16 antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas) and an anti-actin primary antibody (1:1000, kindly donated by Dr. José Manuel Hernández, CINVESTAV-México) in Tween20/TBS solution (TTBS) overnight at 4 °C. Subsequently the membranes were washed again with TTBS and incubated with the secondary antibodies anti-goat (1:2500, secondary rabbit anti-goat, Invitrogen, Camarillo, California) and anti-mouse (1:1000 secondary rabbit anti-mouse, Abcam, Cambridge, Massachusetts) for the recognition of the primary antibodies against CC16 and actin respectively. Both antibodies were coupled to HRP and diluted in TTBS for one hour at room temperature. The membranes were washed three times with TTBS and once with TBS before detection of antibody binding by chemiluminescence detected with the Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit (General Electric Company, Uppsala, Sweden).

#### **Processing of the images**

The lung slides were observed under an Olympus microscope (model BH2-RFCA, Tokyo, Japan) and photomicrographs of lung parenchyma and terminal bronchioles were taken at 20X and 40X respectively, with a digital camera (Evolution MP Color, Media Cybernetics). The images were later processed with Adobe Photoshop CC 2019 (Ps. V. 20.04), and the processing included adjusting the brightness and contrast, in addition to changing the background to white.

#### **Densitometric analysis**

The photomicrographs were processed and separated in three-color channels for the examination of the density of the mark obtained in the immunohistochemistry, but only the yellow channel was used to perform the evaluation with the MathLab DensiFe software 1.0.0.0. We analyzed 5 mice per group; for each mouse, 10 fields of 0.088 mm<sup>2</sup> were chosen randomly with the 40X objective.

The quantitative analysis of the bands obtained in the WB was performed using ImageJ 1.50i (National Health Institutes Bethesda, Maryland USA). This software allowed us to calculate the intensity of the bands by measuring the average density in pixels.

#### **Statistical analysis**

The data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA), and the differences between the groups were identified with a Tukey *post hoc* test, considering  $p \leq 0.05$  as statistically significant. All the data were reported as mean  $\pm$  standard error. All the analyses were performed with Prisma v. 6.0c (GraphPad, San Diego, CA).

### **Results**

#### **Determination of the V concentration in the box**

To achieve vanadium exposure in two different concentrations, low and high, the average concentration of V in the inhalation chamber during exposure was determined using a solution of [0.01M] V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, the concentrations recorded were of 1.26 mg/m<sup>3</sup> of vanadium, while the concentration using a V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> solution with a [0.02 M] was of 2.57 mg/m<sup>3</sup>.

### **Determination of the concentration of V in the blood**

Once the mice were exposed, the average concentration of V in the blood was determined to ensure the presence of the metal in the organism. The concentration recorded in the controls was of  $59.19 \pm 16.23$  ppb (ng/g dry weight); during week two of V exposure, higher levels of V were detected, but these were not different from controls ( $180.5 \pm 24.87$  ppb), this concentration increased significantly from week 4 of exposure ( $245.4 \pm 31.13$  ppb). At the beginning of phase II of the exposure, on week 5, a significant increase in the concentration of the metal ( $436.0 \pm 40.97$  ppb) was observed, but no changes were registered in week 6 ( $348.1 \pm 72.62$  ppb) of the treatment. At the end of the exposure, on week 8, the concentration of the metal decreased significantly ( $146.3 \pm 40.84$  ppb). Figure 1 shows the behavior of the concentration of the metal throughout the treatment.

### **Histopathological findings and morphometric analysis**

In the histological analysis with hematoxylin-eosin of the lungs of the control mice, the typical structure of the tissue was identified. Figure 2 panel A shows the cut of a bronchiole in which we observed the simple cubic epithelium formed mainly by NCBC and scarce ciliated cells. The NCBC presented its typical cubic shape with a characteristic apical protrusion. The intact alveolar sacs constituted by type I pneumocytes (flat cells) and type II pneumocytes (cubic) were observed adjacent to the bronchioles. No relevant changes in tissue structure were identified.

Regarding the histopathological analysis of the lung tissue of the exposed mice, several alterations were observed. We identified on week 2 of inhalation, small foci of perivascular and peribronchiolar inflammatory infiltrate, areas of bronchiolar epithelial hyperplasia and sloughing of the NCBC. In some cells the movement of the nuclei towards the apical zone was observed. All the changes remained the same during the rest of the exposure weeks and qualitatively they were similar throughout. At the beginning of phase II bronchial epithelial cell sloughing was identified, as well as enlargement of NCBCs (Figure 2 panels B-F).

Regarding the morphometric analysis with the PAS stain, in the lungs of the controls, a few mucosecreting cells were found in the bronchi, whereas in the bronchioles none was observed (Figure 3, panel A). Mucous metaplasia developed during the treatment with V, it started on the second week of exposure of phase I and increased with time (Figure 3, panels B and C). During phase II of exposure, mucous metaplasia continued but was observed to a lesser extent (Figure 3 panel D). Graph 3 shows the results of the percentages of positive PAS cells in the terminal bronchioles; in the controls, the percentage of cells was zero, while exposure to V led to the appearance and increase of mucosecreting cells in the bronchioles. On week 2 of the exposure, the percentage was  $1.27 \pm 0.24\%$ , and increased significantly on week 4 ( $33.36 \pm 2.66\%$ ). At the beginning of phase II, on week 5 of exposure, the percentage of cells decreased significantly to  $15.47 \pm 1.68\%$  and this decrease remained until week 6 ( $4.36 \pm 0.47\%$ ) and 8 ( $5.71 \pm 0.91\%$ ) without significant changes.

### **Determination of CC16 in the lung tissue**

Immunohistochemistry showed the presence of the CC16 marker in the non-ciliated bronchiolar cells in the control group in all weeks of exposure. The marker in this group was relatively homogeneous (Figure 4, panel A), while the inhalation of V resulted in an increase in the presence of CC16. At the beginning of phase I of exposure, CC16 in the bronchiolar epithelium remained as in control group; this pattern was observed on week 2 of inhalation without significant changes. On week 4 CC16 increased its presence (Figure 4, panel B). On week 5, at the beginning of phase II, the presence of CC16 increased

again (Figure 4, panel C) and remained so until the end of the exposure (Figure 4, panel D).

The densitometric analysis showed baseline levels of CC16 in the controls and an increase in the density of the protein from the second week of the exposure to V, without it being significant. At week 4, the density of CC16 was significantly higher and at the beginning of phase II, CC16 increased significantly again and remained constant on week 6. At the end of the exposure on week 8, the density of the marker increased again (Graph 4).

#### **Determination of CC16 in the lung homogenates**

WB detected the expression of CC16 in the lungs of the control mice but this was modified by the inhalation of V (Figure 5). On weeks 2 and 4 of phase I of exposure, no significant difference was detected in the expression of the marker (it was the same as in the controls) while on weeks 5, 6 and 8 of the exposure, during phase II, the expression of CC16 increased significantly while remaining stable (Graph 5).

#### **Discussion**

The results showed that vanadium inhaled at the two concentrations (1.57 and 2.56 mg/m<sup>3</sup>) produced alterations in the lung such as peribronchiolar and perivascular infiltrate, and various modifications of the bronchiolar epithelium such as hyperplasia and sloughing of the NCBC. These alterations occurred during the entire exposure time, without relevant changes when modifying the exposure concentration.

On the other hand, the change in the phenotype of the NCBC to mucosecreting was identified and the cell quantification evidenced the gradual increase in the number of PAS+ cells during phase I of exposure. However, increasing the concentration of the element during phase II showed a significant decrease in the number of mucosecreting cells.

As for CC16, it increased significantly in the bronchiolar epithelium in phase I of exposure and afterwards, during the second phase, the increase in the marker expression was significantly higher than in phase I.

#### **Vanadium concentration**

The exposure concentration of V was higher when using the [0.02 M] solution compared to the [0.01 M]. With this data, the animals were exposed to two different concentrations, one lower than the other, establishing an adequate model to study tolerance. Regarding the blood levels, a gradual increase in the concentration of the metal was observed from weeks 4, 5 and 6. However, we observed that during week 8, the levels of V in the blood unexpectedly decreased. This could be explained by the deposition and accumulation of V in soft organs such as the lung and the liver, and in hard organs such as the bone (Rhoads and Sanders, 1985; Rodríguez-Mercado and Altamirano-Lozano, 2006).

Another possible explanation could be that metallothioneins, particularly in the liver, could be acting as metal chelators according to what has been demonstrated by Kobayashi et al. (2006), using mass spectrometry (HPLC / ICP-MS), by testing the binding of V to an unidentified low-molecular-weight protein with characteristics similar to metallothionein II that could have the ability to bind with this element and retaining it in the liver (Kobayashi et al. al., 2006). The latter has not yet been explored.

The interaction with metallothioneins could also be happening in the lung, since it is an organ in which these proteins are expressed in an important way. It has been proven that during exposure to oxidizing agents such as ozone, nitrogen dioxide and oxygen, and to metals such as cadmium, their expression can be induced in response to these (Mango et al., 1998; Lau et al., 2006; Johnston et al., 2001).

It is also possible that vanadium interacts with other antioxidant proteins, such as CC16, which increased significantly in our model, and whose antioxidant function will be explained later on. CC16 could contribute in an important way in the detoxification of this metal in the lung.

### **Lung and Non-ciliated bronchiolar cells changes**

The histopathological changes reported in this study have been identified in other murine models of exposure to V. Regarding the inflammatory response, it has been reported that the inhalation of the two different concentrations of V (NTP, 2002; Ress et al., 2003) and the intratracheal instillation (Pierce et al., 1996, Toya et al., 2001; Wang et al., 2003) produce the activation of the pulmonary inflammatory response. In our inhalation model, perivascular and peribronchiolar inflammatory foci were observed and it apparently remained unchanged during the whole exposure, independently of the exposure concentration (1.56 and 2.57 mg/m<sup>3</sup> of V); meaning that the increase in the concentration of the metal in phase II of exposure did not exacerbate the response observed during phase I.

The CC16 protein may be behind the possible explanation of why in phase II the inflammatory response did not increase. In our model, we observed that CC16 increased in the lung tissue when the organisms were exposed to the inhalation of V at a concentration of 1.56 mg/m<sup>3</sup> as detected by immunohistochemistry in the bronchiolar cells, and subsequently, when exposed to a higher concentration (2.57 mg/m<sup>3</sup>), the density of CC16 increased again significantly. In addition, the redistribution of the protein was observed concentrated mainly in the apical region of the cells. This increase in CC16 was confirmed by WB in the lung homogenates and could explain why the mice did not present an exacerbated inflammatory infiltrate in the second phase of the exposure, as observed in the histopathological results.

The importance of this protein as an immunomodulator in the lung was previously mentioned. *In vitro* it has been shown that CC16 attenuates inflammation by decreasing the production of IL-8 (a pro-inflammatory cytokine) in bronchial cells, which attenuates the infiltration of cells such as neutrophils (Tokita et al., 2014). *In vivo*, it has been shown that mice deficient in the production of CC16 have a greater inflammatory response when they are sensitized with ovalbumin, in addition to expressing higher levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL1-13 (Chen-Chen et al., 2001). When chronic exposure to different classes of pollutants decreases the expression of CC16 in the bronchiolar epithelium, organisms become more susceptible to develop an inflammatory response in the lung. Gowdy (2008) reported that the inhalation of particles derived from diesel (DEP) that decrease of CC16 and surfactant proteins (SP-A and SP-D) in the lung homogenates and bronchoalveolar lavage coincides with over-expression of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-13 and TNF- $\alpha$  (Gowdy et al., 2008), demonstrating the relation between the decrease in CC16 and inflammation.

Dodge (1994) indicated that in the development of tolerance to ozone, which is a pro-oxidant agent, the density of CC16 in the bronchiolar cells increases when animals are exposed to this gas in comparison to the controls; also, the cytoplasmic distribution of the

granules that contain the protein is modified and accumulates in the apical region of the cells (Dodge et al., 1994); these results coincide with our findings.

Regarding bronchial cell hyperplasia, it has been reported that V-inhalation produces this alteration in the bronchioles and alveoli (NTP, 2002; Ress et al., 2003), as well as the instillation of compounds of the same element (Toya et al. al., 2001). This change has been linked with the induction of pro-inflammatory mediators such as IL-6, IL-8, and TNF $\alpha$  that can also trigger cell proliferation (Bonner et al., 2000). In our model, bronchiolar epithelial hyperplasia was identified from the first week of exposure in phase I, and it remained constant throughout the exposure without any relevant changes during the rest of the treatment. The change in the concentration of V did not cause the increase in hyperplasia. It would be interesting to further explore the effect of the CC16 on the expression of pro-inflammatory cytokines in our model.

Many of the alterations produced by the exposure to V are attributed to the generation of oxidative stress (Rodríguez-Mercado and Altamirano-Lozano, 2006). Previous reports show that CC16 has the ability to function as a molecule with antioxidant properties through the interaction of methionines that are part of its structure (Pilon et al., 2016) which can attenuate the toxic effects of vanadium in the lung in our model. It could also be involved in the detoxification of vanadium; however further research is needed.

In addition to the antioxidant activity of CC16, it is important to take into consideration the activity of metallothioneins in the lung as regulators of oxidative stress. As mentioned above, metals induce the expression of these proteins that act as chelators and trappers of reactive oxygen species (ROS); also, it has been reported that these play an important role in the development of tolerance to metals such as zinc (Wesselkamper et al., 2001) and cadmium in the lung (Lau et al., 2006).

Furthermore, in addition to metallothioneins, the lung has a large variety of enzymatic and non-enzymatic antioxidant mechanisms that contribute to the defense against oxidizing agents (Rahman et al., 2006). The main non-enzymatic antioxidants in the lung are glutathione, vitamins C and E, carotenoids and uric acid (Rock et al., 1993, Comhair and Erzurum, 2002; McFadden et al., 2005). Superoxide dismutases (MnSOD and CuSOD), catalase and peroxidases are the major enzymatic antioxidants in this organ (Rahman et al., 2006).

There is evidence that suggests that an increase in the levels of glutathione favors tolerance to oxidizing compounds exposure such as coumarin in the lung, decreasing its susceptibility (Vassallo et al., 2010). The relationship between tolerance and the activity of other antioxidants in the lung has not been sufficiently studied; hence, it would be relevant and interesting to study this more as well as its relationship with tolerance to vanadium exposure and other metals.

It is important to note that the qualitative evaluation of the lung tissue showed that during phase I the aforementioned changes occurred in a subtle way. In phase II of the experiment, in which the concentration of V increased, the changes remained stable. As previously mentioned, a similar response was reported by Knetch (1992) noting that in his model of subchronic exposure to 0.5 mg/m<sup>3</sup> (V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (6 h/ for 5 days/ for 26 weeks), the repeated exposure to V did not trigger a cellular immune response, nor did it increase bronchial hyperreactivity or cause exacerbation of the acute response that had been previously reported by the same group (Knetch et al., 1992). Although our exposure model differs from Knetch's model, both suggest that animals develop some type of tolerance as a result of repeated exposure to V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

The increase in the concentration of CC16 coincides in the second phase of exposure with the decrease in the number of mucosecreting PAS+ cells. It has been reported that exposure to V produces a change in the phenotype of these cells that manifests itself with the synthesis of AB/PAS+ mucins; this mucoid metaplasia has been directly linked to the inflammation produced by the treatment through the production of TNF $\alpha$  and IL-6 (Toya et al., 2001, Bonner et al., 2000). Other agents that produce bronchiolar mucoid metaplasia by inhalation are PM and ozone. *In vivo* it has been reported that the exposure to ultrafine particles induces mucoid metaplasia in the lower airways, in addition to mucosal hypersecretion (Alessandrini et al., 2010), while Kumagai et al. reported bronchiolar mucoid metaplasia in mice exposed to ozone (Kumagai et al., 2017).

Since it is well known that the inflammatory response is directly related to the changes in the phenotype of the NCBC and this inflammation is associated to the decrease in the expression of CC16, it can be inferred that the increase in CC16 decreases inflammation and this will directly influence the phenomenon of metaplasia. This decrease in PAS+ mucosecretory cells in phase II could be attributed to a reversal in the phenotype of the cells favored by the increase in the expression of CC16 that begins on week 3 of the exposure on phase I and remains stable during phase II.

As it was previously mentioned, tolerance is a phenomenon that has been observed in lungs exposed to various contaminants and substances. However, the factors that could contribute to the development of this response have not yet been clearly established. Our model shows that the pre-exposure to V at 1.56 mg/m<sup>3</sup> induces the increase of CC16, which could have a direct effect on the inflammatory changes and on the modification in the mucosecreting phenotype of the NCBC observed at 2.57 mg/m<sup>3</sup>.

### **Conclusions**

The V-inhalation model proposed in this study was useful for identifying the changes that suggest tolerance in the bronchiolar epithelium and highlights the importance of CC16 in the protection of the lung as our results demonstrated. These phenomena could in part explain the effects that favored the "resistance" of the lung when exposed to pollution and helps to understand the importance of NCBC and its protein CC16 in the development of this tolerance.

One limitation of this study is that CC16 was not identified in the bronchoalveolar lavage, which could support the findings of its increase as part of the epithelium's defense. To confirm its participation, it would be interesting to explore its modification in the bronchoalveolar lavage, in addition to the direct evaluation on the inflammation in this model.

### **Acknowledgements**

Authors thank Raquel Guerrero-Alquicira, from Departamento de Biología Celular y Tisular, School of Medicine, UNAM, for tissue-samples histological process; to Sandra Luz Hernandez-Ojeda for WB technical support; to Francisco Pasos-Nájera and Armando Zepeda-Rodríguez for the photographic image process.

Thanks to Alejandra Núñez-Fortoul for reviewing and editing the manuscript.

Nelly López Valdez thanks to Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México for the training received; this article constitutes a partial fulfillment of the requirements of her PhD Graduate Program.

#### **Declaration of Conflicting Interests**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### **Funding**

This project was partially supported by PAPIIT UNAM IN200418. Nelly López Valdez was supported by a CONACyT scholarship (No. 346684). Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### **References**

Alessandrini F., Weichenmeier I., van Miert E., Takenaka S., Karg E., Blume C., Mempel M., Schulz H., Bernard A. and Behrendt H. (2010). Effects of ultrafine particles-induced oxidative stress on Clara cells in allergic lung inflammation. *Part. Fibre Toxicol.* 7,11-24.

Assem F.L. and Levy L.S. (2012). Inhalation toxicity of Vanadium. In: *Vanadium. Biochemical and Molecular Biological Approaches.* Michibata H. (ed). Springer Science+Business Media. Netherlands. pp. 209-224.

Bonner J.C., Rice A.B., Moomaw C.R. and Morgan D.L. (2000). Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L209-L216.

Born S.L., Fix A.S., Caudill D. and Lehman-McKeeman L.D. (1999). Development of tolerance to Clara cell necrosis with repeat administration of coumarin. *Toxicol. Sci.* 309, 300-309.

Broeckaert F., Clippe A., Knoop B., Hermans C. and Bernard A. (2000). Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 923, 68-77.

Chang H., Chang L.W., Cheng Y., Tsai W., Tsai M. and Lin P. (2006). Preferential induction of CYP1A1 and CYP1B1 in CCSP-positive cells. *Toxicol. Sci.* 89, 205-213.

Chen L.C., Zhang Z., Myers A.C. and Huang S.K. (2001). Cutting Edge: Altered pulmonary eosinophilic inflammation in mice deficient for Clara cell secretory 10-kDa protein. *J. Immunol.* 167, 3025-3028.

Comhair S.A. and Erzurum S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol., Lung Cell. Mol. Physiol.* 283, L246-L255.

Crosby L.M. and Waters C.M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 298, 715-731.

Curran D.R. and Cohn L. (2010). Advances in mucous cell metaplasia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 268-275.

Dodge D.E., Rucker R.B., Pinkerton K.E., Haselton C.J. and Plopper C.G. (1994). Dose-dependent tolerance to ozone: III. Elevation of intracellular Clara cell 10-kDa protein in central acini of rats exposed for 20 Months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 109-123.

Fairchild E.J. (1967). Tolerance Mechanisms. *Arch. Environ. Occup. Health.* 14, 111-126.

Fortoul T. I., Rodriguez-Lara V., Gonzalez-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutierrez G., Ustarroz-Cano M., Colín-Barenque L., Montaño L.F., García-Pelaez I., Bizarro-Nevarés P., López-Valdez N., Falcón-Rodríguez C.I., Jimenez-Martínez R.S., Ruíz-Guerrero M.L., López-Zepeda and Muñoz-Rivera-Cambas A. (2011). Vanadium inhalation in a mouse model for the understanding of air-suspended particle systemic repercussion. *J. Biom. Biotechnol.* 1-11.

Fortoul T. I., Rodriguez-Lara V., González-Villalva A., Rojas-Lemus M., Cano-Gutiérrez G., Ustarroz-Cano M., Colín-Barenque L., Bizarro-Nevarés P., García-Pelaez I., Montaño L.F., Jimenez-Martínez R.S., López-Valdez N., Ruíz-Guerrero M.L., Meléndez-García N.A., García-Ibarra F.A., Martínez-Báez V., Zapata Alfaro D., Muñoz-Rivera-Cambas A., López-Zepeda L.S., Quezada-Maldonado E.M. and Cervantes-Yépez S. (2014). Inhalation of vanadium pentoxide and its toxic effects in a mouse model. *Inorganica Chim. Acta.* 420, 8-15.

Gowdy K., Krantz Q.T., Daniels M., Linak W.P., Jaspers I. and Gilmour M.I. (2008). Modulation of pulmonary inflammatory responses and antimicrobial defenses in mice exposed to diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 229, 310-319.

Hiemstra P.S. and Bourdin A. (2014). Club cells, CC10 and self-control at the epithelial surface. *Eur. Respir. J.* 44, 831-832.

Hukkanen J., Pelkonen O., Hakkola J. and Raunio H. (2002). Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing Cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit. Rev. Toxicol.* 32, 391-411.

Johnston C.J., Oberdörster G. and Finkelstein J.N. (2001). Recovery from oxidant-mediated lung injury: response of metallothionein, MIP-2, and MCP-1 to nitrogen dioxide, oxygen, and ozone exposures. *Inhal. Toxicol.* 13, 689-702.

Knecht E.A., Moorman W.J., Clark J.C., Hull R.D., Biagini R.E., Lynch D.W., Boyle T.J. and Simon S.D. (1992). Pulmonary reactivity to vanadium pentoxide following subchronic inhalation exposure in a non-human primate animal model. *J. Appl. Toxicol.* 12, 427-434.

Kobayashi K., Himeno S., Satoh M., Kuroda J., Shibata N., Seko Y. and Hasegawa T. (2006). Pentavalent vanadium induces hepatic metallothionein through interleukin-6-dependent and -independent mechanisms. *Toxicol.* 228, 162-170.

Kumagai K., Lewandowski R.P., Jackson-Humbles D.N., Buglak N., Li N., White K., Van Dyken S.J., Wagner J.G. and Harkema J.R. (2017). Innate lymphoid cells mediate pulmonary eosinophilic inflammation, airway mucous cell metaplasia, and type 2 immunity in mice exposed to ozone. *Toxicol. Pathol.* 45, 692-704.

Lakritz J., Chang A., Weir A., Nishio S., Hyde D., Philpot R., Buckpitt A. and Plopper C. (1996). Cellular and metabolic basis of Clara cell tolerance to multiple doses of cytochrome P450-activated cytotoxicants. I: Bronchiolar epithelial reorganization and

expression of cytochrome P450 monooxygenases in mice exposed to multiple doses of naphthalene. *Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 1408-1418.

Lau A., Zhang J., and Chiu J. (2006). Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: Roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215, 1-8.

Liu Y., Yu H. J., Wang N., Zhang Y. N., Huang S. K., Cui Y. H. and Liu Z. (2013). Clara cell 10-kDa protein inhibits TH17 responses through modulating dendritic cells in the setting of allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 387-394.

Mango G.W., Johnston C.J., Reynolds S.D., Finkelstein J.N., Plopper C.G. and Stripp B.R. (1998). Clara cell secretory protein deficiency increases oxidant stress response in conducting airways. *Am. J. Physiol.* 275, 348-356.

McFadden S.L., Woo J.M., Michalak N. and Ding D. (2005). Dietary vitamin C supplementation reduces noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Hear. Res.* 202, 200-208.

National Toxicology Program. (2002). NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.* 507, 1-35.

Pierce L.M., Alessandrini F., Godleski J.J. and Paulauskis J.D. (1996). Vanadium induced chemokine mRNA expression and pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138, 1-11.

Pilon A.L., Winn M.E., Clayton R.S. and Hariprakash H. (2016). Modification of CC10 protein by Reactive Oxygen Species: A novel anti-inflammatory mechanism. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 193, 5907.

Rahman I., Biswas S. K. and Kode A. (2006). Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur. J. Pharmacol.* 533, 222-239.

Ress N.B., Chou B.J., Renne R., Dill J., Miller R., Roycroft J.H., Halley J.R., Haseman J.K. and Bucher J.R. (2003). Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* 74, 287-296.

Reynolds S.D. and Malkinson A.M. (2010). Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42, 1-4.

Rhoads K. and Sanders C.L. (1985). Lung clearance, translocation, and acute toxicity of arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, lead, selenium, vanadium, and ytterbium oxides following deposition in rat lung. *Environ. Res.* 36, 359-378.

Rock C.L., Rodriguez J.L., Khilnani R., Lown D.A. and Parker R.S. (1993). Carotenoids and antioxidant nutrients following burn injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 691, 274-276.

Rodríguez-Mercado J.J. and Altamirano-Lozano, M.A. (2006). Vanadio: contaminación, metabolismo y genotoxicidad. (Vanadium: Pollution, metabolism and genotoxicity). *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22, 173-189.

Snyder J.C., Reynolds S.D., Hollingsworth J.W., Li Z., Kaminski N. and Stripp B.R. (2010). Clara cells attenuate the inflammatory response through regulation of macrophage behavior. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42, 161-171.

Stripp B.R., Reynolds S.D., Boe I., Lund J., Power J.H.T., Coppens J.T., Wong V., Reynolds P.R. and Plopper C.G. (2002). Clara cell secretory protein deficiency alters Clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 170-178.

Sutherland K.M., Edwards P.C., Combs T.J. and Van Winkle L.S. (2012). Sex differences in the development of airway epithelial tolerance to naphthalene. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 302, 68-81.

Tokita E., Tanabe T., Asano K., Suzuki H. and Rubin B.K. (2014). Club cell 10-kDa protein attenuates airway mucus hypersecretion and inflammation. *Eur. Respir. J.* 44, 1002-1010.

Toya T., Fukuda K., Takaya M. and Arito H. (2001). Lung lesions induced by intratracheal instillation of vanadium pentoxide powder in rats. *Industrial Health.* 39, 8-15.

Vassallo J.D., Kaetzel R.S., Born S.L., Lewis C.L., Lehman-McKeeman L.D. and Reed D.J. (2010). Gamma-glutamyl transpeptidase null mice fail to develop tolerance to coumarin-induced Clara cell toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1612-1618.

Wang L., Medan D., Mercer R., Overmiller D., Leonard S., Castranova V., Shi X., Ding M., Huang C. and Rojanasakul Y. (2003). Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: Role of reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* 195, 99-107.

Wesselkamper S.C., Chen L.C. and Gordon T. (2001). Development of Pulmonary Tolerance in Mice Exposed to Zinc Oxide Fumes. *Toxicol. Sci.* 60,144-151.

West J., Williams K. J., Toskala E., Nishio S.J., Fleschner C., Forman H.J. and Plopper C.G. (2002). Induction of tolerance to naphthalene in Clara cells is dependent on a stable phenotypic adaptation favoring maintenance of the glutathione pool. *Am. J. Pathol.* 160, 1115-1127.

Wong A.P., Keating A. and Waddell T.K. (2009). Airway regeneration: the role of the Clara cell secretory protein and the cells that express it. *Cytherapy.* 11, 676-687.

Xiao C., Guo L., Qi R. and Xi S. (2007). Effects of air mixed certain pollutants on the expression of CC16 and certain cytokine in pulmonary tissue of rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 36,679-682.

Xiao C., Li S., Zhou W., Shang D., Zhao S., Zhu X., Chen K. and Wang R. (2013). The effect of air pollutants on the microecology of the respiratory tract of rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 588-594.

Zuo W.L., Shenoy S.A., Li S., O'Beirne S. L., Strulovici-Barel Y., Leopold P.L., Wang G., Staudt M.R., Walters M.S., Mason C., Kaner R.J., Mezey J.G. and Crystal R.G. (2018). Ontogeny and biology of human small airway epithelial club cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 1375-1388.

## Figures legends

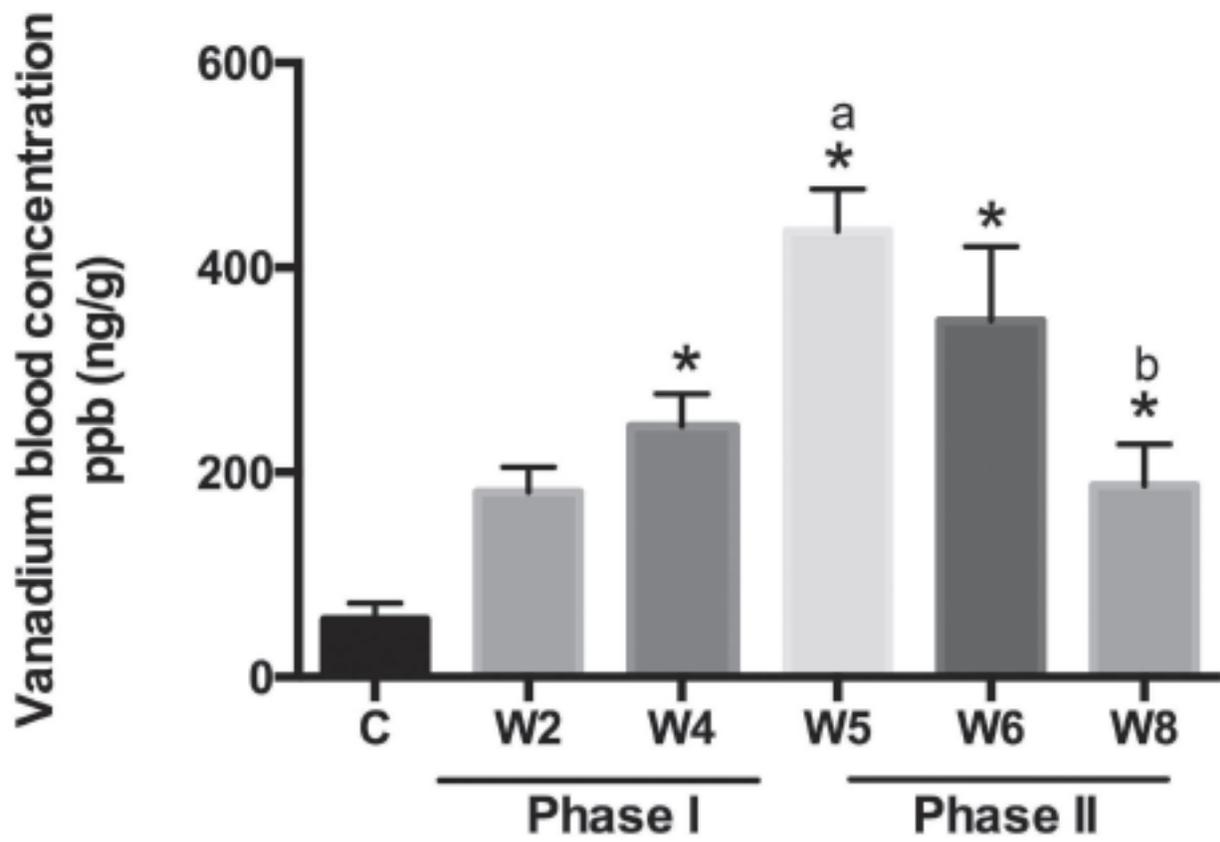
Figure 1. Vanadium levels (ng/g dry weight) detected in the blood samples of the exposed and unexposed mice. The values are expressed as the mean concentration of V in ng/g of dry weight  $\pm$  standard error, ANOVA  $p \leq 0.05$  *post hoc* (Tukey). \*: control versus exposed; a: difference versus W2; b: difference versus W5.

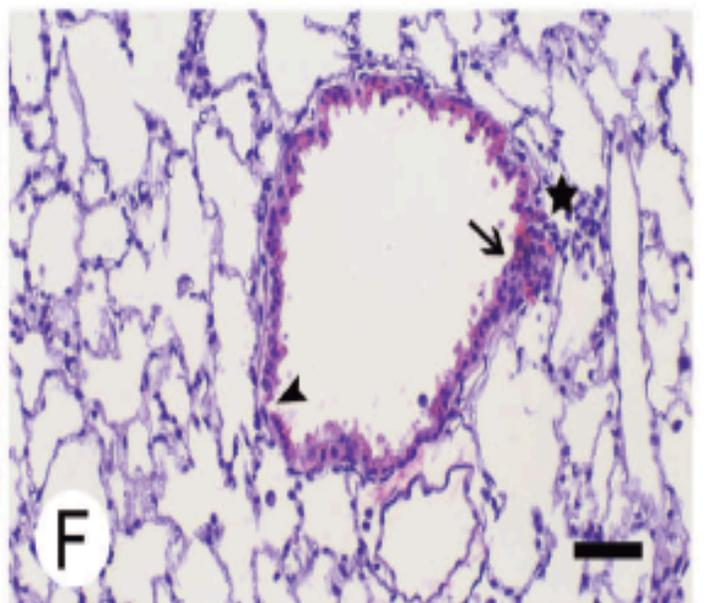
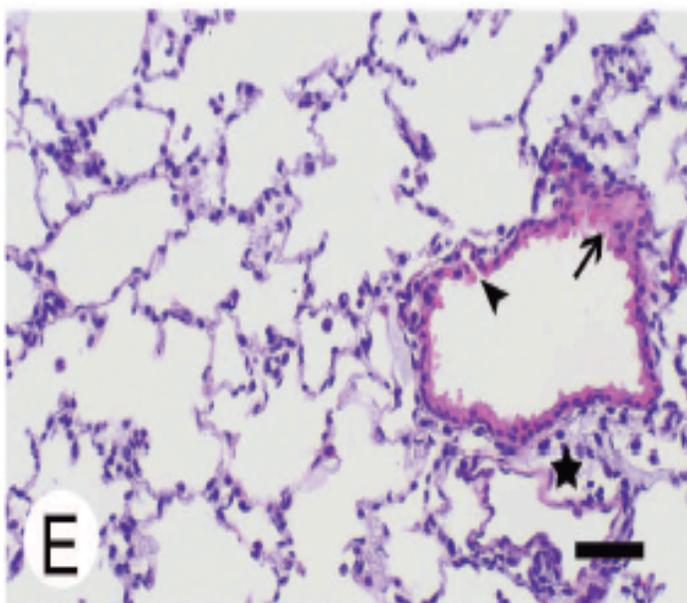
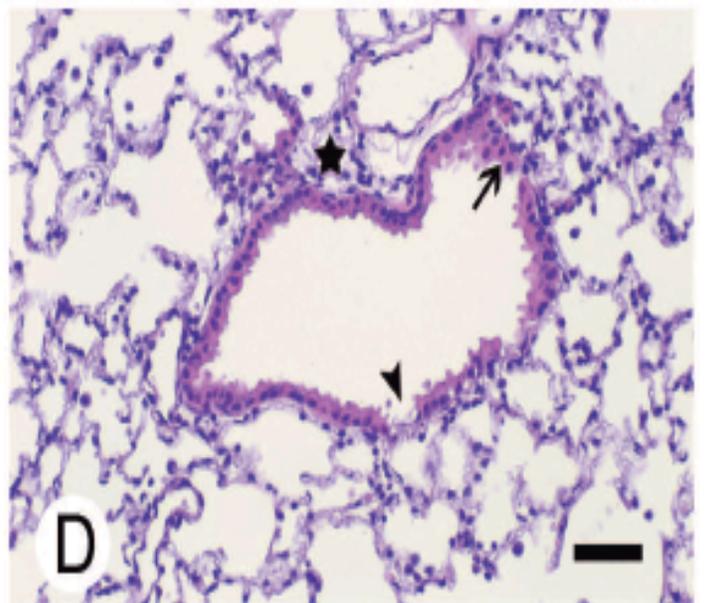
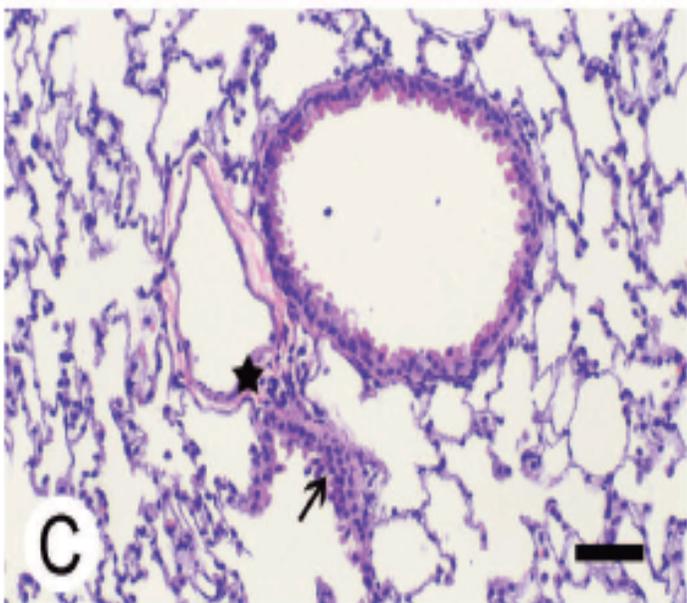
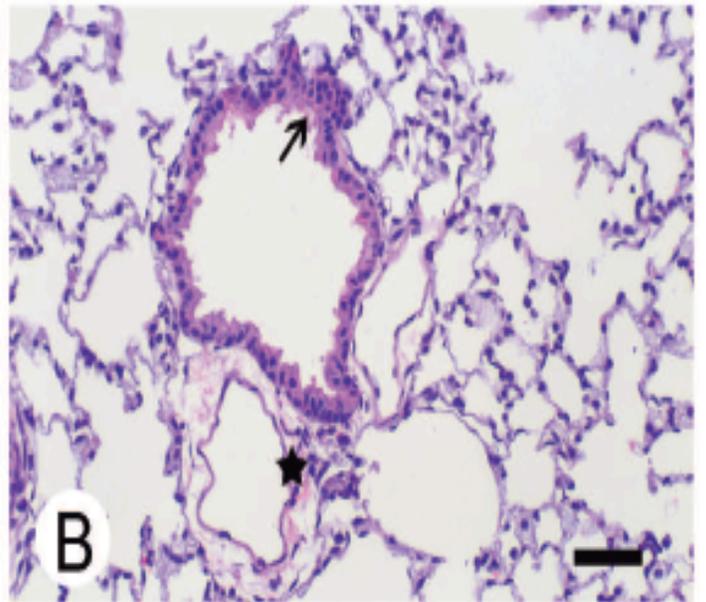
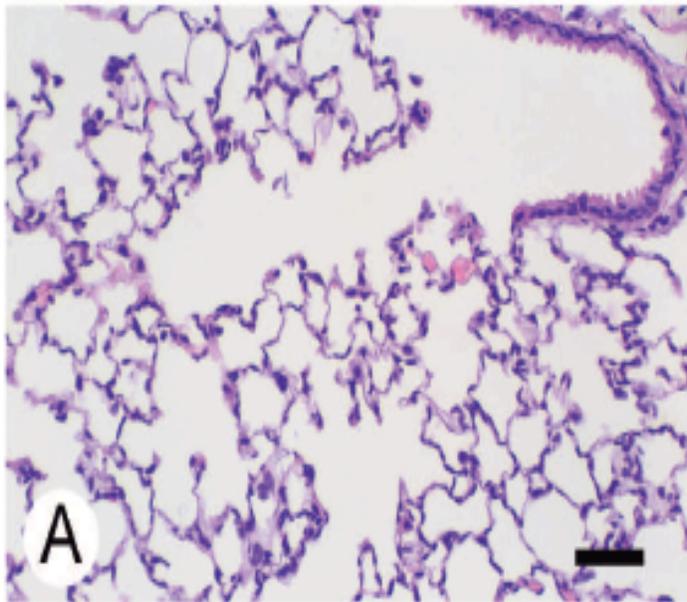
Figure 2. Pulmonary histopathological changes produced by V inhalation. The arrows ( $\rightarrow$ ) indicate the areas where bronchiolar hyperplasia was identified; the arrowheads ( $>$ ) indicate the areas where bronchiolar epithelial sloughing was observed and the stars (\*) small foci of inflammatory infiltrate. Panel A. Control lung; panel B. 2 weeks of exposure; panel C. 4 weeks; panel D. 5 weeks; panel E. 6 weeks; panel F. 8 weeks. Hematoxylin-eosin stain. Bar 50  $\mu$ m.

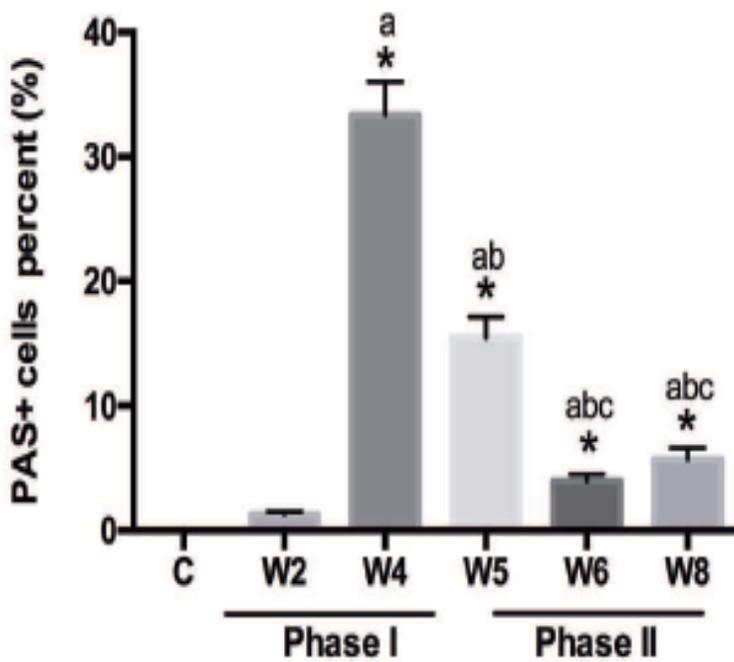
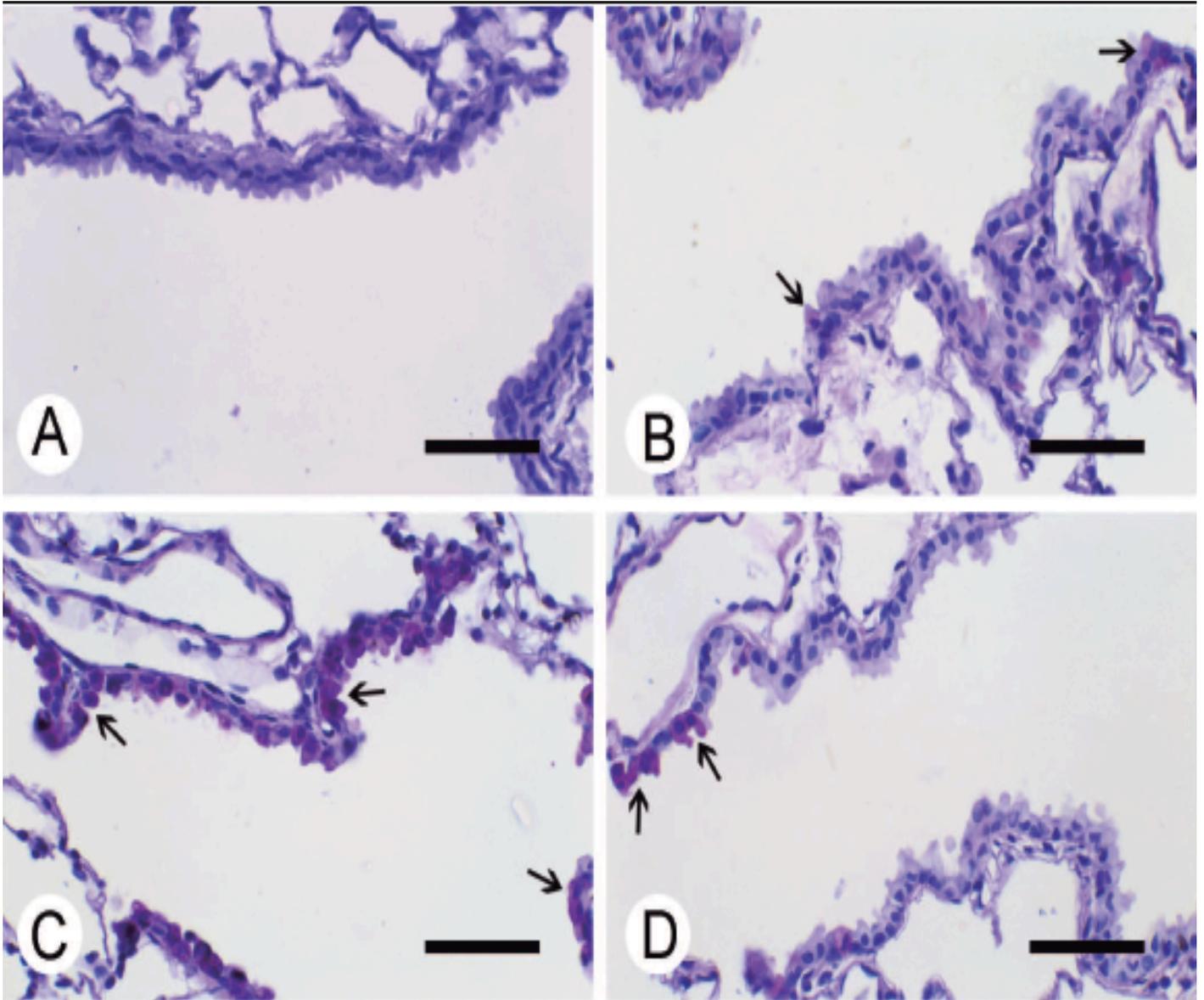
Figure 3. Mucoid metaplasia of the bronchiolar epithelium. The arrows ( $\rightarrow$ ) indicate the PAS+ mucosecreting bronchiole cells. In the bronchioles of the control mice (panel A) no PAS+ cells were observed. Since week 2 (panel B), the PAS+ cells began to appear in the bronchioles and on week 4 (panel C) the number of cells increased noticeably. On week 5 (panel D), at the beginning of phase II of exposure, the number of cells decreased noticeably. PAS stain. Bar 50  $\mu$ m. The graph shows the percentage of PAS+ cells in the terminal bronchioles of exposed and unexposed mice. The values are expressed as the percentage of cells PAS+  $\pm$  standard error, ANOVA  $p \leq 0.05$  *post hoc* (Tukey). \*: control versus exposed; a: difference versus W2; b: difference versus W4; c: difference versus W5.

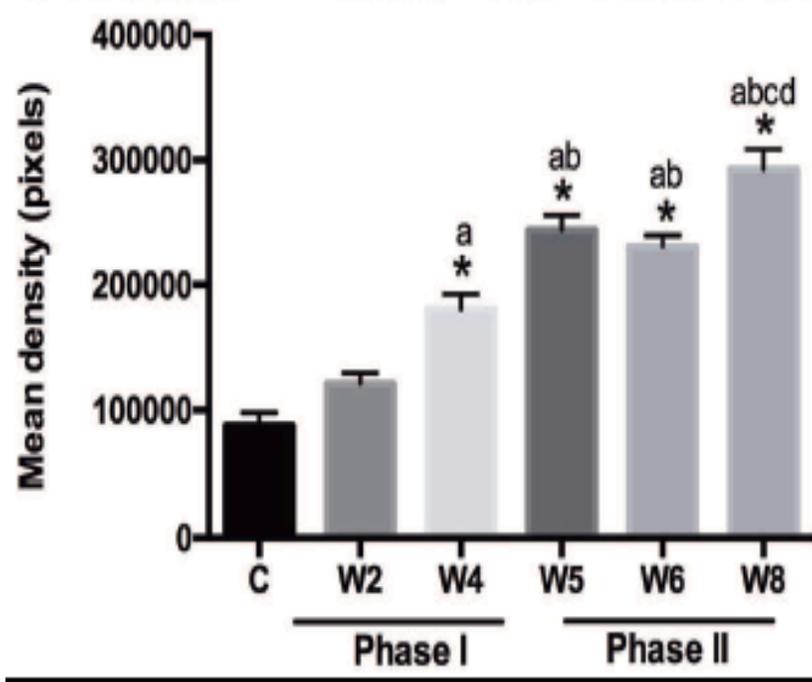
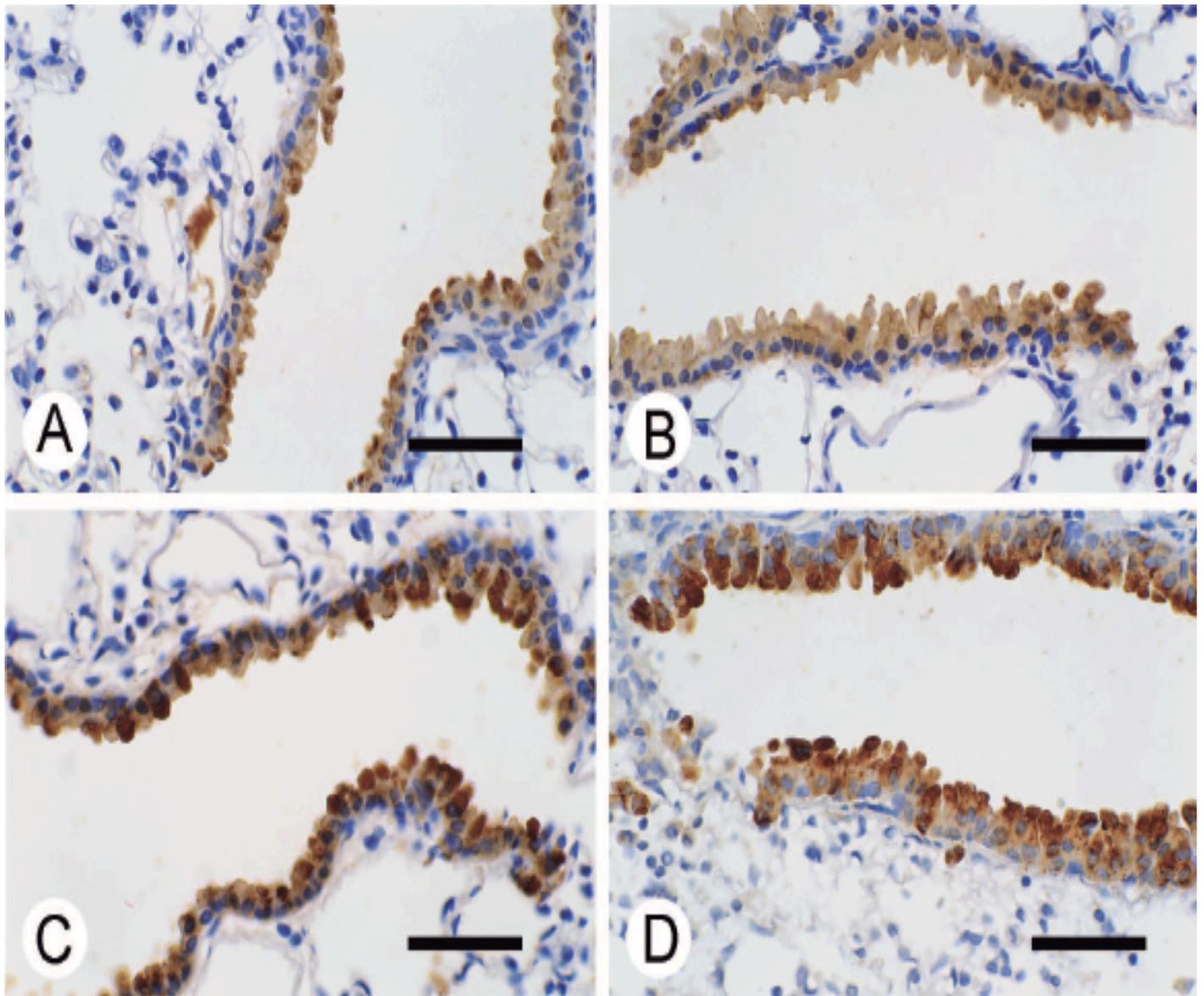
Figure 4. Immunohistochemistry for CC16 in the bronchiolar epithelium. In the control lungs (panel A), the baseline CC16 mark is observed in the bronchiolar cells, which increased with the exposure from phase I on week 4 (panel B). On phase II, the CC16 mark increased noticeably (panel C) and continued on week 8 (panel D). Bar 50  $\mu$ m. The graph shows densitometry of the CC16 label in the NCBC of the exposed and unexposed mice. The values are expressed as the average density in pixels  $\pm$  standard error, ANOVA  $p \leq 0.05$  *post hoc* (Tukey). \*: control versus exposed; a: difference versus W2; b: difference versus W4; c: difference versus W5; c: difference versus W6.

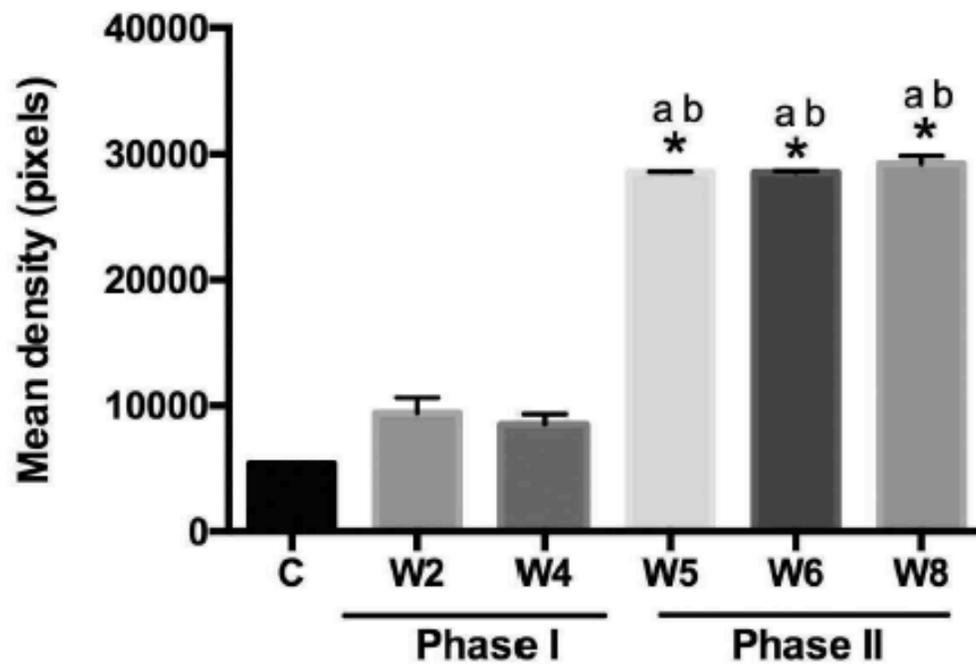
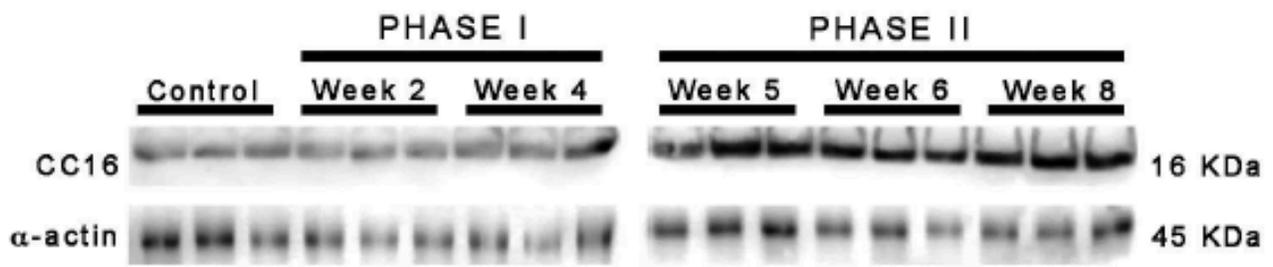
Figure 5. The effect of V on the expression of CC16 in the lung homogenates. By observing the bands from the controls, the expression of CC16 was identified and in phase I the expression of the marker did not change. In phase II an increase in the marker was observed. The graph shows the analysis of the expression of CC16 in lung homogenates as an effect of V. The  $\alpha$ -actin protein was used as a loading marker. The values are expressed as the mean density in pixels and represent the mean  $\pm$  standard error, ANOVA  $p \leq 0.05$  *post hoc* (Tukey). \*: control versus exposed; a: difference versus W2; b: difference versus W4.











## 15. Anexo de soluciones

- Solución salina fisiológica 0.9% pH 7.4

NaCl	9 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Paraformaldehído 4% pH 7.4

### Solución A

Paraformaldehído	40 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 ml

Preparar la solución en campana

### Solución B

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.28 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5 g
NaCl	0.6 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	500 ml

Mezclar las soluciones A y B y ajustar el pH.

## Inmunohistoquímica (IHQ)

- Amortiguador de fosfatos (PBS) 10X pH 7.3

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	11.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Amortiguador de fosfatos-tween (PBST) 1X

Amortiguador de Tris 10X	100 ml
Tween 20X	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Solución de recuperación antigénica

Solución Diva Decloaker 20X	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	38 ml

- Peróxido de hidrógeno 0.9%

Peróxido de hidrógeno 30%	3 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml

- Solución de bloqueo albúmina 2.5%

Albúmina	2.5 g
TTBS 1X	100 ml

### Obtención de fracciones

- Amortiguador para obtención de la fracción citosólica pH 7.4

Tris	2.42 g
KCl	11.18 g
EDTA	292.24
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Amortiguador para obtención de la fracción S9

Tris	2.42 g
KCl	11.18 g
EDTA	292.24
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Amortiguador para obtención de la fracción microsomal

EDTA	
DTT	
Glicerol	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

## Western blot (WB)

- Amortiguador de Tris base 1.5M pH 8.8

Tris base	18.15 g	91 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml	500 ml

- Amortiguador de Tris base 0.5 M pH 6.8

Tris base	6.05 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml

- Amortiguador de carga 2X

Tris base 0.5 M	2.5 ml
SDS 10%	4 ml
2- mercaptoetanol	200 ml
Glicerol	2 ml
Pironina	0.05 mg
Azul de bromofenol	0.05 mg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.3 ml

- Amortiguador de corrida 10X

Tris base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS 10%	100 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Amortiguador de transferencia 10X

Tris base	30.3 g
Glicina	144.15 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml

- Amortiguador de transferencia 1X

Amortiguador de transferencia 10X	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1000 ml
Metanol	200 ml

- **Amortiguador de Tris 10X pH 7.6**

Tris base	24.2 g
NaCl	80 g
HCl	38 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	962 ml

- **Amortiguador de Tris-tween (TTBS) 1X**

Amortiguador de Tris 10X	100 ml
Tween 20X	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	999 ml

- **Solución de bloqueo albúmina 5%**

Albúmina	5 g
TTBS 1X	100 ml

- **Acrilamida/bisacrilamida**

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0.8 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml

Filtrar la solución con papel de 0.45 mm y almacenar a 4°C en oscuridad

- **SDS 10%**

SDS	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml

- **Persulfato de amonio 10%**

Persulfato de amonio	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 ml

- Geles de acrilamida

Gel separador		
4 geles	10%	17%
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dest	16 ml	5.28 ml
Tris 1.5M	10 ml	
SDS 10%	400 ml	
Acrilamida/bisacrilamida	13.2 ml	21.76 ml
Persulfato de amonio PSA	280 ml	
TEMED	28 ml	

Gel concentrador	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dest	12.2 ml
Tris 1.5M	5 ml
SDS 10%	200 ml
Acrilamida/bisacrilamida	2.6 ml
Persulfato de amonio PSA	240 ml
TEMED	28 ml

### Ensayos de actividad enzimática

- Amortiguador de actividad pH 7.6

Tris base	1.51 g
MgCl <sub>2</sub>	1.27 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250 ml

Filtrar la solución con papel de 0.45 mm y almacenar a 4°C.

- Amortiguador de actividad CYP2E1 pH 7.4

#### Solución A

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.74 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 ml

Tomar 8.02 ml de la solución A para preparar el volumen final del amortiguador.

#### Solución B

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.68 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 ml

Tomar 1.98 ml de la solución B para preparar el volumen final del amortiguador.

A los 10 ml de solución A+B añadir 61 mg de  $\text{MgCl}_2$  hexahidratado y aforar a 100 ml. Posteriormente filtrar la solución con papel de 0.45 mm