



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

CARACTERIZACION DE LOS DIFERENTES
SUBTIPOS DE LA CELULA BRONQUIOLAR NO
CILIADA. EN EL MODELO MURINO DE
INHALACION DE VANADIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. CARLOS IVAN FALCON RODRIGUEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL
VAN DER GOES

COMITÉ TUTOR: DR. MARIO AGUSTIN ALTAMIRANO LOZANO
DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

MÉXICO, D.F.

Marzo, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de enero de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **FALCÓN RODRÍGUEZ CARLOS IVAN** con número de cuenta **300106596**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE LA CÉLULA BRONQUIOLAR NO CILIADA. EN EL MODELO MURINO DE INHALACIÓN DE VANADIO"**, realizada bajo la dirección de la: **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE
Secretario: DRA. MARÍA ISABEL GARCÍA PELÁEZ
Suplente: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE
Suplente: DRA. ANNIE PARDO CEMO

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 2012

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) y a la Facultad de Medicina (UNAM)

A CONACYT, por el apoyo recibido Becario: 233789

A los miembros de comité tutor:

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre

Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina. UNAM:

- Téc. Acad. Raquel Guerrero Alquicira*
- Téc. Acad. Verónica Rodríguez Mata*
- Téc. Acad. Francisco Pasos Nájera*
- Téc. Acad. Armando Zepeda Rodríguez*
- Biól. Nelly López Valdez*
- M en C. Gabriela Piñón Zarate*
- Dr. Andrés Castell Rodríguez*

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM:

- Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda*
- Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre*

Departamento de Embriología, Facultad de Medicina. UNAM:

- Téc. Acad. María José Gomora Herrera*
- Dra. María del Carmen Méndez Herrera*

A la Unidad de Bioterio, Facultad de Medicina. UNAM

- M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada, Jefe de la Unidad*
- M.V.Z. Ismael Torres Saldaña*
- M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro*

AGRADECIMIENTOS

Dedicado con mucho cariño y amor:

En primer lugar quiero agradecer a Dios, por darme otra oportunidad de vivir. No la desperdiciare. Gracias por acompañarme en todo momento.

A mis padres:

Por darme esta vida tan maravillosa. Por enseñarme muchos valores, pero sobre todo, la perseverancia, la honestidad y el trabajo. A ellos por creer en mí cada momento de mi existencia. No hay palabras para expresar lo mucho que los quiero y todo el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida. Muchas gracias...

A mis hermanos Adrian y Luis:

Por apoyarme incondicionalmente. También por creer en mí y por los ánimos que me dan.

En general a mi familia por pasar momentos buenos y malos, muchas gracias con todo mi corazón, los quiero mucho. Cada triunfo cosechado es una nueva bendición para nosotros...

A mi jurado que evaluó esta tesis...

A mis amigos del alma, por estar allí cuando los necesito GRACIAS:

De Histo:

Marco, Sac, Ramón, Pilar y Aida...

De ciencias:

Esthela, Diana, Yoli, Juan, Ale, Aravid, Celes, Larisa, Karla, Marisol, Hilda, Adrian, Mónica,

Gracias a todos por los momentos felices y no tan felices. Por seguir riendo. El apoyo es mutuo.

Andrés, Miguel y Bety, por ser tan graciosos, y contar con su apoyo.

Gaby: gracias por los consejos y ayuda brindada... "Pon la mano" jejeje...

A mi laboratorio, donde me forme casi por completo:

Tere, por brindar su amistad y apoyarme en todo momento. GRACIAS.

Caro, Anaid, Vero, Dinorha, Andrea y Sherezada....

Lau, Paty, Adriana, Martha, Isabel, Manuel, Armando, Paco, Marce, Rubén, Lulú, Silvia y Nelly....

A los Miembros del Honorable MS...

Gracias por los momentos de reflexión, de apoyo y risas. Por la linda convivencia que tenemos, espero que nunca se acabe. De ustedes me llevo un parte de su esencia...

Ivonne: Aunque estés lejos, te dedico este trabajo, porque estuviste allí cuando comenzamos esta travesía. Gracias por los momentos en lab de risas y con tus ocurrencias....

Nelly:

Por apoyarme incondicionalmente, por estar en los momentos buenos y malos. Por todos los momentos de reflexión que me hiciste pasar, y por darme ánimos antes de tirar la toalla. Por compartir nuestras vidas y sobre todo por ser alguien muy especial en mi vida. Sin ti no lo hubiera conseguido. Ocupas un lugar especial dentro de mi corazón. Te quiero mucho.

A mi otro laboratorio en Biomédicas

Sandy:

Gracias por apoyarme en todo momento, por toda la paciencia del mundo que tuviste conmigo y por enseñarme nuevas cosas. Por las risas y platicas... Gracias de todo corazón.

Sitlali, Dol, Gaby, Dulce, Mariana, Blanquita, Eve:

Por los momentos de risa y por preocuparse por mí... Muchas gracias.

Gina:

Gracias por el apoyo brindado realizando los experimentos restantes y las risas que pasamos juntos.

Citlalli y Adriana:

Por conocerlas en el lab de biomédicas, por pasar momentos de risas y platicas. A Ti Citlalli, por dejar que te dirigiera en tu proyecto de jóvenes, espero no haberte deformado jejeje...

A cada una de las personas que hizo posible esta tesis..

Dedicado a Todos los que están en mi corazón...

INDICE

| | |
|--|----|
| 1 Resumen..... | 1 |
| 2 Abstract..... | 3 |
| 3 LA CONTAMINACIÓN ATMOSFERICA..... | 5 |
| 3.1 La contaminación en la zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM)..... | 5 |
| 3.2 Partículas suspendidas..... | 6 |
| 4 EL SISTEMA RESPIRATORIO..... | 14 |
| 5 CITOCROMO P450 (CYP 450)..... | 17 |
| 6 ANTECEDENTES..... | 20 |
| 6.2 Poblaciones de la célula de Clara (CC)..... | 22 |
| 6.3 Metales y citocromo P450..... | 26 |
| 7 JUSTIFICACIÓN..... | 28 |
| 8 HIPOTESIS..... | 28 |
| 9 OBJETIVO GENERAL..... | 28 |
| 9.1 Objetivos particulares..... | 28 |
| 10 MATERIAL Y MÉTODO..... | 29 |
| 10.1 Técnicas histoquímicas..... | 32 |
| 10.2 Tinción Azul de alciano/ácido peryódico de schiff (AB/PAS)..... | 33 |
| 10.3 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia..... | 33 |
| 10.4 Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)..... | 34 |
| 10.5 Prueba de actividad..... | 34 |
| 10.6 Análisis de resultados..... | 34 |
| 11 RESULTADOS..... | 35 |
| 11.1 Inmunohistoquímica para citocromo 1A1 (CYP1A1) en bronquiolos pulmonares de ratón..... | 35 |
| 11.2 Inmunohistoquímica para citocromo 1B1(CYP1B1) en bronquiolos pulmonares de ratón..... | 36 |
| 11.3 Inmunohistoquímica para CC10 en bronquiolos terminales de ratón..... | 36 |
| 11.4 Inmunohistoquímica para CC10 y tinción Azul de alciano /PAS en bronquiolos terminales de ratón..... | 36 |
| 11.5 Inmunofluorescencia para CC10, CYP1A1 y CYP1B1 en bronquiolos terminales de ratón..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 11.6 Prueba de actividad (EROD) en pulmones de raton después de la exposición a vanadio inhalado..... | 38 |
| 12 DISCUSIÓN..... | 51 |
| 12.1 Poblaciones de la célula de Clara, proteína CC10 y vanadio..... | 51 |
| 12.2 Pulmón, vanadio y Citocromo P450 | 61 |
| 13 CONCLUSIONES | 73 |
| 14 ANEXO | 74 |
| 14.1 Inmunohistoquímica..... | 74 |
| 14.2 Inmunofluorescencia..... | 74 |
| 14.3 Obtención de la fracción celular S-9..... | 75 |
| 14.4 Fracción microsomal..... | 75 |
| 14.5 Actividad EROD..... | 75 |

Tabla de abreviaturas

AB/PAS: Tinción Azul de Alciano / Acido Peryodico de Shiff.
AhR: Receptor de Hidrocarburos aromáticos.
ARNT: Translocador del receptor de hidrocarburos aromáticos.
BADJ: Unión Bronquiolo-alveolar.
CBNC: Célula Bronquiolar no Ciliada.
Cc: Célula Ciliada.
CC: Célula de Clara o CBNC.
CC10: Proteína de la Célula de Clara (10KDa). También encontrada como CC16, CCSP, Uteroglobina y Secretoglobina 1A1.

Clara^V: Variante de Célula de Clara.
CO: monóxido de carbón.
COV's: Compuestos volátiles.
CYP: Citocromo P450.
CYP1A1: Citocromo 1A1.
CYP1B1: Citocromo 1B1.
DEP: Partículas de escape de diesel.
EROD: Etoxiresorufina o Deetilasa.
HC: hidrocarburos.
HIF-1: Factos de hipoxia inducible 1.
HSP90: Proteína Chaperona.
msnm: Metros sobre el nivel del mar.
NO: óxido nítrico.
NO₂: Dióxido de nitrógeno.
NO_x: Óxidos de nitrógeno.
OH-1: Hemo-oxigenasa 1.
PM: Materia particulada.
PST: Particulas Suspendidas Totales
ROFA: Partículas de residuos de combustibles.
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno.
SO₂: Dióxido de azufre (SO₂).
SP-C: Proteína surfactante de tipo C.
TCDD: Dioxina, 2,3-7,8, Tetraclorodibenzeno.
UAP: Partícula del Valle de UTHA.
vCC; : Variante de la Célula de Clara.
VCE: Variante que expresa CC10.
XRE: Elementos de Respuesta a xenobióticos.
b-NF: b-Naftoflavona.

1 Resumen

El vanadio es un metal de transición que es emitido a la atmósfera durante la combustión de combustibles fósiles. Este metal se adosa a partículas de carbón que ingresan al organismo y es depositado en los bronquiolos, estas estructuras contienen dos células: la célula de Clara (CC) o célula bronquiolar no ciliada (CBNC) y células ciliadas (Cc). La célula de Clara exhibe dos proteínas principales: CC10 y CYP450. CC10, CCSP o Uteroglobina es la principal proteína de la célula de Clara presente a través de los bronquiolos; esta proteína es conocida por exhibir anti-inflamación y función inmunomoduladora en pulmón, y es usada como marcador sensible de daño pulmonar. Por otra parte, la célula de Clara contiene el sistema de enzimas, citocromo P450. Algunos reportes han mencionado la existencia de diferentes subpoblaciones de célula de Clara después de la exposición a naftaleno: una población de célula de Clara resistente a naftaleno llamada variante de célula de Clara (vCC) que expresa la proteína CC10. Además, vCC, no contiene CYP2F2. Recientemente se ha encontrado un nicho potencial identificado en la unión bronquiolo-alveolar y que contiene un segundo tipo de célula de Clara^V que expresa ambos CCSP y SP-C. Algunos reportes muestran el cambio de fenotipo de las células de Clara expuestas a antígenos, resultando en células de Clara positivas a la tinción PAS. Por todo lo anterior es importante analizar el cambio de fenotipo de célula de Clara después de la exposición a vanadio. Para este estudio se utilizaron 40 ratones macho (CD1) 30-35g de peso, fueron distribuidos en 4 grupos: Control, 4 semanas, 6 semanas y 12 semanas de exposición a vanadio inhalado. Sacrificamos 5 ratones por grupo. Los pulmones fueron perfundidos con solución salina vía ventrículo derecho, fijados con paraformaldehído al 4% y fueron insuflados vía intratraqueal. Los pulmones fueron removidos, embebidos en parafina y cortados seriados, en secciones longitudinales. Las células de Clara fueron marcadas con CC10 por inmunohistoquímica y su contraparte teñida con Ab/PAS. Además, se realizó la inmunohistoquímica para CC10, CYP1A1 y CYP1B1. Nuestros resultados muestran a dos poblaciones diferentes de célula de Clara. En el epitelio

bronquiolar terminal y la unión bronquiolo-alveolar (BADJ), la exposición a vanadio genera células de Clara PAS positivas, con gránulos de mucina en el ápice celular de todos los grupos expuestos a vanadio inhalado. En la inmunohistoquímica para CC10, CYP1A1 y CYP1B1. CC10 incrementó linealmente a lo largo de la exposición a vanadio. CYP1B1 incrementó a las 4 semanas de exposición. CYP1A1, incrementó a las 4 y 6 semanas de exposición a vanadio, pero, disminuyó a las 12 semanas de inhalación. La actividad de EROD mostró el mismo comportamiento que en la inmunohistoquímica de CYP1A1. Aunque CYP1A1 y CYP1B1 no son biomarcadores de poblaciones de célula de Clara, porque están en todas las células, antes y después de la exposición a vanadio, lo cual se evidenció en los cortes seriados y en microscopía confocal. La inhalación de vanadio genera dos poblaciones de Célula de Clara, los irritantes causan el mismo efecto sobre la Célula de Clara. Por otro parte, metales y citocromos, son un nuevo tema que necesita ser estudiado.

2 Abstract

Vanadium is a transition metal that is emitted to the atmosphere during combustion of fossil fuels. This metal is adsorbed in carbon particles that enter to the organism and are deposited in bronchioles. The bronchioles contain two cells populations: Clara Cell (CC) or Non-Ciliated Bronchiolar Cell (NCBC) and ciliated cell (Cc). Clara cell exhibit two main proteins: CC10 and CYP450. CC10, CCSP or Uteroglobin protein is the major protein of the Clara cell present thorough the bronchioles; this protein is known to exhibit anti-inflammatory and immunomodulatory functions and is used like a sensitive marker of lung injury. On the other hand, Clara cell contains cytochrome P450 enzymes system. Some reports have mentioned the existence of different subpopulations of Clara cells after naphthalene exposure: a subpopulation of naphthalene-resistant Clara cells (variant Clara cell (vCC) or Clara^v) that express CC10 protein. Furthermore, vCC, do not contain CYP2F2. Recently an additional potential niche has been identified at the bronchoalveolar duct junctions and contains a second type of Clara v that expresses both CCSP and SP-C. Some reports mentioned a phenotype change when Clara cells were antigen exposed, resulting in PAS-positive Clara cells. For all the above, is important to analyze Clara cell phenotype change after vanadium inhalation. To the study CD-1 male mice 30-35 g body weight were distributed in four groups: Control, 4 week, 6 week and 12 week exposure to vanadium. To the study we used 40 male mice (CD-1) 30-35 g were distributed in four groups: Control, 4 week, 6 week and 12 week exposure to vanadium inhalation. Five mice were sacrificed per group, the lungs were perfused with saline solution via right cardiac ventricle, and fixed with paraformaldehyde 4% and was insufflated intratracheally. The lungs were removed, embedded in paraffin and serial cut on longitudinal sections. Clara cells were labeled using a CC10 antibody by Immunohistochemistry and counterpart stained with AB/PAS. Furthermore, we made Immunohistochemistry for CYP1A1 and CYP1B1. On the other hand, five mice were sacrificed by cervical dislocated, and we did EROD activity. Our results show two different subpopulations of Clara cells. The terminal bronchiolar

epithelium and bronchoalveolar duct junctions (BADJ), after exposure to vanadium generated Clara cell PAS-positive, with mucin granules in the cell surface in all group. In the Immunohistochemistry for CC10, CYP1A1 and CYP1B1. CC10 showed linear increased along exposure to vanadium. CYP1B1 increased at the 4 weeks of exposure. CYP1A1, increased at the 4 and 6 weeks of vanadium exposure, but decreased at 12 weeks of inhalation exposure. EROD activity showed the same behavior than Immunohistochemistry for CYP1A1. However, CYP1A1 and CYP1B1 are not biomarkers of the population of Clara cell, because, these are in all Clara cells, before and after exposure to vanadium and showed with confocal microscopy and serial cuts. The vanadium inhalation generates two populations of Clara cells. The irritants cause the same effect on Clara cell. On the other hand, metals and CYP, is a new issue, that need to be studied.

3 LA CONTAMINACIÓN ATMOSFERICA

La contaminación atmosférica se define como la presencia de sustancias en el aire, en cantidades que pueden ser perjudiciales para la vida, afecta estructuras, materiales y ocasionan cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas. Muchas de las actividades del hombre, producen contaminantes atmosféricos tal como el uso de fogatas, la combustión de madera hasta la industrialización y urbanización de las grandes ciudades. También pueden ser de origen natural, dentro de ellas encontramos a las erupciones volcánicas y los incendios forestales (Vallejo et al., 2002).

Un contaminante atmosférico es cualquier sustancia química o biológica (xenobiótico) que al agregarse al aire puede modificar sus características naturales, por ejemplo el humo, los polvos, los gases, las cenizas, las bacterias, los residuos y los desperdicios (Vallejo et al., 2002).

3.1 La contaminación en la zona metropolitana de la ciudad de México (ZMCM)

La zona metropolitana es una cuenca ubicada a 2240 metros sobre el nivel del mar (msnm), su extensión territorial es de 1200 Km², además está rodeada de montañas cuya altura es aproximadamente de 1000 msnm. La ciudad de México está considerada como una megaciudad, ya que excede los 10 millones de habitantes, y la contaminación ha sido uno de los problemas más importantes dentro de las megaciudades. Todas estas características y añadiendo la pésima eficiencia en la combustión de los motores de los automóviles por la baja concentración de oxígeno, favorecen el aumento de las concentraciones de los contaminantes en esta región de México (Vallejo et al 2002). En la mayoría de las grandes ciudades se encuentran concentraciones de los siguientes contaminantes: Dióxido de azufre (SO₂), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno

(NO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbón (CO), compuestos volátiles (COV's), hidrocarburos (HC), Ozono (O₃) y partículas suspendidas totales (PST) (Fortoul et al., 2009). Siendo estos últimos los contaminantes más importantes de las megaciudades, y especialmente en la Ciudad de México (Figura 1).

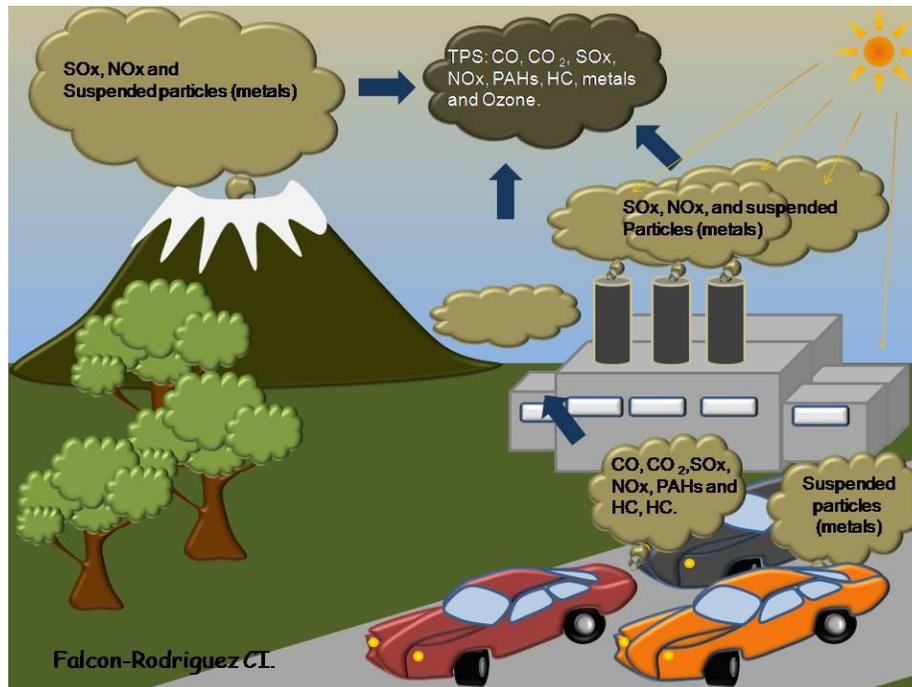


Figura 1. Fuentes naturales y antropogénicas de los diversos contaminantes. Tomado de Fortoul et al., 2009.

3.2 Partículas suspendidas

Las partículas suspendidas o también llamadas PM (materia particulada, por sus siglas en inglés) son una parte fundamental de la contaminación; son sustancias que se desprenden al ambiente como el polvo proveniente de suelos erosionados y caminos sin asfaltar; o que se forman en la atmósfera por reacciones químicas o fotoquímicas, en las que intervienen gases y compuestos orgánicos. (Vallejo et al., 2002). Consisten en núcleos de carbón y en ellos se

adonan otros tipos de partículas, tal como hidrocarburos aromáticos, gases, polvos, iones, material biológico como lipopolisacáridos y metales de transición (Fortoul et al., 2009). Por ejemplo, los metales de transición tal como el vanadio y cobre fueron encontrados en las partículas de residuos de combustibles llamadas ROFA, por sus siglas en ingles, y las partículas del valle de Utah (UAP) por sus siglas en ingles. Las lipoproteínas son un constituyente de UAP de muchas ciudades incluyendo la Ciudad de México. Otra parte importante, son los hidrocarburos aromáticos que se encuentran en las partículas de escape de diesel (DEP) por sus siglas en ingles, siendo estas últimas las que producen mayor daño por su exposición (Bonner et al., 2007) (Figura 2).

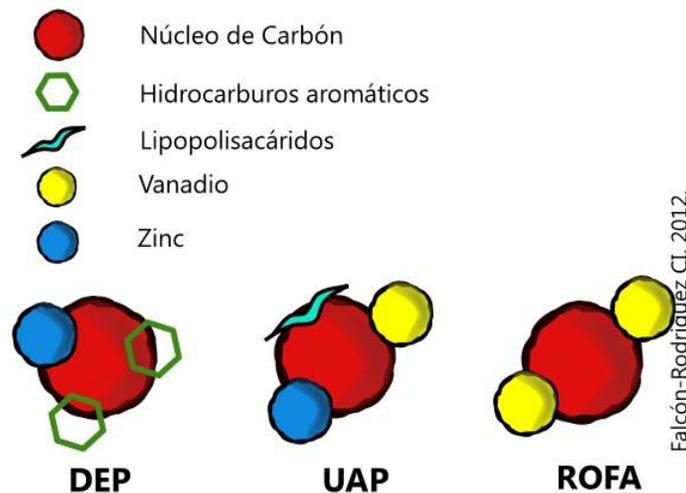


Figura 2. Tipos de partículas suspendidas que se encuentran en las grandes ciudades. DEP (Partículas de escape de diesel), UAP (Partículas del valle de Utah y ROFA (Partículas de residuos de combustibles).

Además de su composición, el tamaño de las partículas juega un papel importante en su comportamiento en la atmósfera: las partículas que miden menos de 10mm, tendrán una vida de horas, suspendidas en la atmósfera, mientras que las partículas finas y ultrafinas, que tiene como diámetro de 1-0.1mm, tendrán una vida media de días a semanas (Mussali-Galante y Fortoul., 2008).

Esta propiedad es un factor importante en la generación de algunas patologías, esto es debido a que dependiendo del tamaño, las partículas se alojarán en sitios específicos, por ejemplo: las partículas que miden más de PM 10 μ m se depositarán en los conductos nasales, mientras que aquellas que midan PM 5 μ m de diámetro llegarán a la tráquea y los bronquios. Por último, las partículas más pequeñas que tienen como diámetro PM 2.5 μ m y/o menores (Ultrafinas) penetran hasta los bronquiolos y alvéolos (Spengler and Wilson, 1996) (Figura 3).

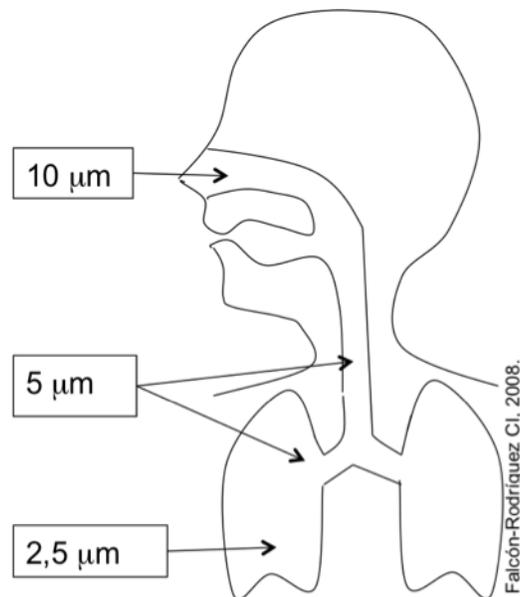


Figura 3. Relación diámetro de las partículas suspendidas y deposito en el aparato respiratorio. Tomado de Falcón-Rodríguez, 2008.

Cada tipo de partícula depositada a lo largo del tracto respiratorio genera daño en ese sitio, tal es el caso de las partículas PM 2.5 μ m, también llamadas partículas finas, las cuales están asociadas con el incremento de enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Mussali-Galante y Fortoul, 2008).

Fortoul et al (1996), reportó que las partículas suspendidas que contienen metales son un problema serio en el aire de la ciudad de México. Además, encontró el

incremento en tejido pulmonar de casos de autopsia de los siguientes metales: Plomo, Cadmio, Níquel y Vanadio.

3.3 Metales

Son la mayor fuente de contaminantes en la atmosfera y los componentes más tóxicos de las PM (Fortoul et al., 2009). Muestran una gran tendencia acumularse en los tejidos del cuerpo humano, además contienen un potencial tóxico en concentraciones relativamente bajas. La exposición constante a ciertos metales producen algunas alteraciones en los tejidos como: inflamación, daño celular y cáncer (Rojas-Lemus, 2009), especialmente en el pulmón, ya que es el punto principal de entrada. La mayoría de los metales suelen producir alteraciones o enfermedades degenerativas dentro del pulmón (tabla 1).

| METALES | PATOLOGIAS ASOCIADAS EN PULMON | |
|----------|---|-----------------------------------|
| Aluminio | Fibrosis intersticial, Asma, Bronquitis, bronquiolitis y neumonitis. | Fortoul y Falcón-Rodríguez, 2007. |
| Arsénico | Cáncer de células no pequeñas. | |
| Berilio | Infiltrado intersticial y fibrosis. | |
| Cadmio | Enfisema, obstrucción crónica y cáncer. | |
| Cobre | Fibrosis, inflamación y ROS. | |
| Plomo | Daño en la Célula bronquiolo no ciliada. | |
| Níquel | Asma y cáncer. | |
| Vanadio | Inflamación y daño en las células bronquiolares no ciliadas o Células de Clara. | |

Tabla 1. Patologías pulmonares por inhalación de metales.

El vanadio ha cobrado gran importancia en las grandes ciudades, tal es caso de Taiwan, en donde Lin et al (2004) reportó niveles de 0.42 ± 0.24 ng/mL de vanadio en muestras de sangre de estudiantes, aún cuando los valores en la

literatura reportaban 0.10 ± 0.07 en residentes cercanos a zonas industriales y de 0.032 a 0.095 ng/mL para la población general. Por otro lado en México, Fortoul et al (2002), reportaron que la cantidad de vanadio aumentó en pulmón de casos de autopsias practicadas a residentes de la ciudad de México que vivieron en la década de los 90's, (1.36 ± 0.08 mg/g en peso seco del pulmón) en comparación con los residentes de la década de los 60's (1.04 ± 0.05 mg/g en peso seco del pulmón).

3.4 Características del vanadio

El vanadio ocupa el lugar 22 entre los elementos más abundantes con una presencia de 0.014 a 0.02% . Participa en la síntesis de clorofila en organismos fotosintéticos y es un micronutriente en especies marinas como: bivalvos, moluscos y tunicados (Kustin et al., 1983), y en mamíferos (Rodríguez-Mercado et al., 2003). En los últimos 10 años el vanadio y sus compuestos han adquirido importancia, ya que se ha empleado en la terapia contra la diabetes y la obesidad. En atletas, se ha usado para el mejoramiento del rendimiento físico y en biología como anticonceptivo vaginal (Rodríguez-Mercado et al., 2003).

Es un metal de transición de color grisáceo con densidad de 6.11g/cm^3 . Su punto de fusión es de 1950°C y el de ebullición es de 3600°C . En la tabla periódica se ubica en la familia VB. Sus estados de oxidación son: -1 a $+5$, aunque los más comunes son: $+3$, $+4$ y $+5$, siendo el pentóxido de vanadio (estado de oxidación $+5$) el compuesto más abundante y de mayor toxicidad (Fortoul et al., 2002). Sus fuentes de emisión son dos, las fuentes naturales, como las erupciones volcánicas. Por otro lado, las fuentes antropogénicas incluyen: la combustión de petróleo, carbón y aceites. También se encuentra en los depósitos de vapor de gas, humos de aceites o combustibles y en las plantas generadoras de electricidad (Bonner et al., 2000), siendo las fuentes principales de emisión la combustión de petróleo y carbón (Rodríguez-Mercado et al., 2003). Especialmente

el petróleo de países como: México, Venezuela, Irán y Kuwait, contienen altas concentraciones de este metal (Fortoul et al., 2002). Aunque también se le puede encontrar en algunos alimentos como la pimienta negra, hongos, semillas de eneldo, perejil y mariscos (Rojas et al., 1999).

3.5 Usos del vanadio

El vanadio se utiliza en varios procesos, como: catalizador en la oxidación de sulfuros a sulfatos y de alcohol a acetaldehído, además, cataliza reacciones químicas (Dill et al., 2004). También se ha utilizado en la catálisis para manufacturar vidrio amarillo, el cual retiene la luz UV. Es utilizado en la fabricación de anilinas que sirven para teñir de color negro y amarillo, en las cerámicas, además de la elaboración de colorantes utilizados en la industria textil (Lewis, 1997). De igual manera, se propuso su uso en el tratamiento de la anemia, diabetes mellitus, tuberculosis y sífilis. En el deporte se usó como un elemento traza en suplementos alimentarios y anabólicos (Fortoul et al., 2002). En la metalúrgica sirve para la elaboración de un sin fin de productos metálicos y aleaciones que son muy resistentes y de bajo peso (Rojas-Lemus, 2009).

La exposición a partículas y especialmente las ROFA, genera patologías pulmonares como la EPOC (asma, bronquitis crónica y enfisema pulmonar) (Churg et al., 2003). Por otra parte, el vanadio +5, se distribuye en el núcleo, las mitocondrias, los microsomas y en el citoplasma de las células (Rodríguez-Mercado et al., 2003).

El pentóxido de vanadio, es altamente tóxico y la administración de salud y seguridad ocupacional (OSHA, por sus siglas en inglés), ha limitado la exposición de 0.05 mg/m^3 de polvos de pentóxido de vanadio y 0.1 mg/m^3 de humo de pentóxido de vanadio en lugares de trabajo de 8-40h, semanas de trabajo. (Galanis et al., 2009). Además, existe evidencia de que el Vanadio genera

Especies Reactivas de Oxígenos (ROS), ya que son la principal causa de daño por exposición (Rodríguez-Mercado et al., 2003).

3.6 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

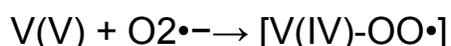
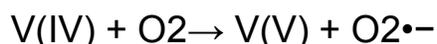
Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares que contiene uno o más electrones desapareados. La presencia de un electrón desapareado confiere un grado de reactividad química bajo una molécula de radical libre (Valko et al., 2004, 2005). Dentro de las especies reactivas que dan origen a los radicales libres, se encuentran las especies reactivas las de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) por sus siglas en inglés (Valko et al., 2004, 2005).

Las ROS pueden ser producidas por sustancias endógenas y exógenas. Las principales fuentes endógenas son: procesos inflamatorios mediados por los neutrófilos y los macrófagos, la catálisis de los productos de la mitocondria y el transporte de electrones (Cadenas, 1989, Valko et al., 2005), por los peroxisomas y vía citocromo P450 (Inoue et al., 2003).

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

En un estudio realizado por Poli et al (2004), observaron que después de la exposición a varios agentes xenobióticos, los niveles de ROS se incrementaban. La producción de ROS después de la exposición es un importante mediador de daño en las estructuras celulares, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (estrés oxidante), además de observar cambios en la concentración de calcio, cambios que repercuten de manera significativa en la homeostasis celular (Valko et al., 2005).

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



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



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

4 EL SISTEMA RESPIRATORIO

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

La tráquea está formada por una mucosa que esta revestida por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con células mucoproducidas. En la submucosa se encuentran abundantes fibras elásticas, glándulas y vasos sanguíneos que nutren su epitelio (Geneser 2006).

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

Los bronquios son una derivación de la tráquea. Se encuentran formados por los mismos elementos de la tráquea, a excepción del cartílago que tiene una disposición en placas alrededor del bronquio (Ross et al., 2005). Esta porción sufre ramificaciones y transición del epitelio generando así a los bronquiolos.

4.1 Bronquiolos

Los bronquiolos representan las últimas 14 ramificaciones del conducto principal, su diámetro es menor a 1mm, su pared carece de cartílago, glándulas y en su epitelio carece de células mucoproducidas (Geneser, 2006). Cada bronquiolo lleva consigo una vena y una arteria (Tortora y Derrickson., 2007). Su epitelio es cilíndrico a cúbico simple, formado de células ciliadas (Cc) y células bronquiolares no ciliadas (CBNC) o células de Clara (CC), además de presentar núcleos basales y esféricos (Geneser, 2006) (Figura 4).

La célula de Clara, presenta gran versatilidad ya que sus funciones van desde ser una célula madre hasta ser metabólicamente activa en el pulmón (Reynolds y Malkinson, 2010)



Figura 4. Se observa la característica histológica de los bronquiolos, con sus dos tipos celulares: Célula de Clara (CC) y la Célula ciliada (Cc).

4.2 Célula bronquiolar no ciliada (CBNC) o célula de Clara (CC).

En 1937 el histólogo Alemán Max Clara identificó a la CC por sus distintivos gránulos en el citoplasma, indicando su función secretora (Boers et al., 1999). A partir de este descubrimiento, comenzó a estudiarse con más detalle la CC. En 1980, se estudió su ultraestructura celular. En 1983, se descubrió su función en el metabolismo de xenobióticos y detoxificación. En 1986, se descubre su función progenitora de las Cc. En 1990 se reportó que es una fuente importante de proteína CC10, y para el año 2001, se identifican por primera vez la variante de CC, un subtipo celular (Reynolds y Malkinson, 2010), a partir de este año, se comenzó hablar de poblaciones de la célula de Clara.

La CC es multifuncional, en todas las especies animales muestra las mismas características morfológicas, cabe resaltar que su ápice contiene una cúpula, en la cual almacena de forma discreta una proteína específica, llamada CC10 (Reynolds y Malkinson, 2010). El análisis ultraestructural y morfométrico aclaró la función de esta célula, además otros estudios demostraron su papel en la manutención de la barrera, secreción y metabolismo (Stripp y Reynolds, 2008; Reynolds y Malkinson, 2010), así como ser una Stem cell o célula madre, teniendo como función repoblar el epitelio bronquiolar, diferenciándose a Cc, CC y variante CC (vCC) como la que produce mucinas (Reynolds y Malkinson, 2010).

La comparación entre especies estableció la diversidad de marcadores biológicos para la CC. Contienen una proteína específica llamada secretoglobina (SCGB1A1), lo que permite identificar a todas sus variantes celulares (Reynolds et al., 2002). Las proteínas de esta familia SCGB están referidos como Uteroglobina, llamada así para CC de humanos y conejos o Proteína secretora de la célula de Clara (CCSP o CC10) para ratones y ratas (Reynolds y Malkinson, 2010), y CC16 mencionado por otros autores (Bolton et al., 2008). Aunque en la literatura, cualquier nombre usado, hace referencia a la misma proteína SCGB1A1 (Reynolds y Malkinson, 2010).

Junto con la proteína CC10, la CC es capaz de secretar otro grupo de proteínas tales como las Proteínas del surfactante (SP) A y D (Bolton et al., 2008).

En algunos tipos de células de Clara, el daño estimula la producción de moco (Reynolds y Malkinson, 2010), esto se ha observado con la tinción de azul de Alciano/Acido peryódico de Schiff (AB/PAS) por sus siglas en inglés, y que tiñe moco ácido y neutro (Evans et al., 2004). Por otra parte contienen un organelo que ocupa más del 40% del volumen citoplasmático, llamado Retículo Endoplásmico Liso, en el encontramos enzimas llamadas Citocromo P450 (CYP) por sus siglas en inglés, y cuya función es metabolizar a los agentes xenobióticos (Vasallo et al., 2004; Gamer et al., 2004; Castell et al., 2005).

4.3 Proteína CC10

CC10 es una proteína esteroide inducible que es secretada de manera abundante por las CC (Bolton et al., 2008). Presenta una secuencia homóloga con la uteroglobina de conejo en útero (Barry et al., 1992).

Su función es la inmunomodulación y anti-inflamación (Bolton et al., 2008), en respuesta a infecciones o daño pulmonar (Shan et al., 2003), además es un inhibidor de la fosfolipasa A₂ (Vanspawuen et al., 2011). En humanos y animales, se ha documentado su función inmunomoduladora, ya que en pacientes asmáticos y con fibrosis, la proteína CC10 se reduce drásticamente (Ye et al., 2004), mientras que, en pacientes con neumonía intersticial idiopática, incrementan los niveles de CC10 en lavados bronquiolaveolares (Vanspawuen et al., 2011), Por otro lado, se ha reconocido que es un marcador sensible de daño pulmonar, por lo que se ha propuesto como un biomarcador periférico de enfermedades respiratorias (Bolton et al., 2008). Es un marcador molecular de estas células en bronquiolos proximales (Reynolds et al., 2002), además la CC es una de las células que contiene al Citocromo P450 en grandes cantidades (Castell et al., 2005).

5 CITOCROMO P450 (CYP 450)

El Citocromo P450 (CYP) es un grupo de hemoproteínas que contienen Hierro y exhiben un máximo de absorción a 450nm. Son las primeras enzimas en reaccionar en la oxidación de fármacos, carcinógenos y esteroides (Guengerich, 2003). Son un grupo de enzimas que contienen sustratos inespecíficos, además son los que se encuentran en mayor cantidad dentro de la célula y son los más estudiados (Gómez-Lechón, 2001).

En los mamíferos todos los CYP's se encuentran ubicados en Reticulo endoplásmico liso, pero solo 5 familias se encuentran en las mitocondrias. Los CYP obtienen sus electrones de la cadena respiratoria, mientras que, los del

retículo interactúan con electrones provenientes de la flavoproteína NADPH-P450 reductasa, necesaria para llevar a cabo las reacciones de oxido-reducción (Guengerich, 2003). De esta manera se solubilizan los compuestos extraños y puede inactivarlos y/o eliminarlos (Guengerich y Shimada 1991). Usa un par de átomos de oxígeno, y solo uno de estos es incorporado en la molécula sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua, siguiendo la reacción (Guengerich, 2003):



R: Sustrato; RO: Producto

Todas estas enzimas funcionan en la primera fase del metabolismo de xenobióticos (Figura 5).

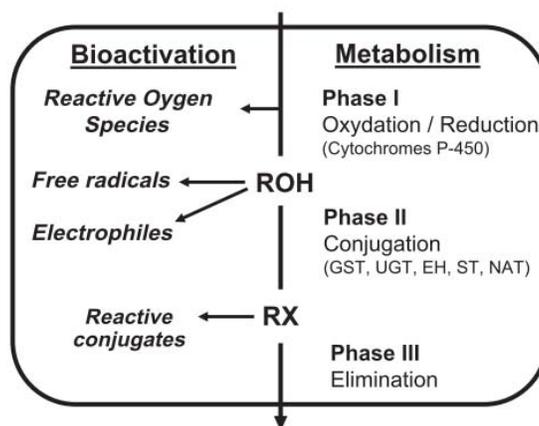


Figura 5. Metabolismo y bioactivación de compuestos. Fase 1, reacciones de oxido-reducción, en los que interviene el CYP450. Fase 2. Reacciones de conjugación y la Fase 3, eliminación de sustancias, a través de orina, heces o transpiración. Tomado de Castell et al., 2005.

Además, existen aproximadamente 200 familias de CYP y 2000 isoformas, cada subfamilia está formada por proteínas que comparten más del 40% de similitud en la secuencia de aminoácidos, y una subfamilia comparte más del 55%. De esta manera, se usan letras, de la A-E, para designar la subfamilia y por

numero arábigo para indicar el gen individual que ordena la síntesis (Repetto et al., 2009) (Figura 6).

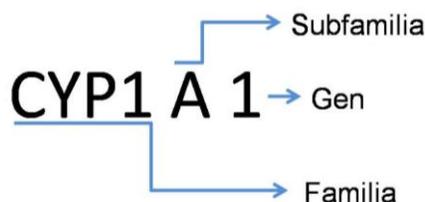


Figura 6. Nomenclatura de los CYP, Ejemplo de la nomenclatura del CYP1A1.

Los principales metabolizadores de xenobióticos se incluyen en tres familias: CYP1, 2 y 3. Dentro de estas tres familias encontramos diferentes isoformas. Todas las isoformas presentan gran versatilidad funcional, ya que pueden catalizar un elevado número de sustratos (Castell et al., 2005).

5.1 Citocromo P450 extrahepático

Aunque el hígado es el órgano que posee mayor nivel de expresión de citocromo P450 (CYP) y el más activo en el metabolismo de moléculas, tanto exógenas como endógenas, también existe metabolismo extrahepático a diferentes niveles en otros lugares del organismo. Otros tejidos y órganos, especialmente aquellos que constituyen vías de acceso de los xenobióticos al organismo, tales como el tracto respiratorio y gastrointestinal, de eliminación como el riñón, o de barrera como la piel, también expresan un número considerable de isoenzimas del CYP, y por tanto poseen capacidad potencial de biotransformación (Gomez-Lechon, 2001) (Figura 7).

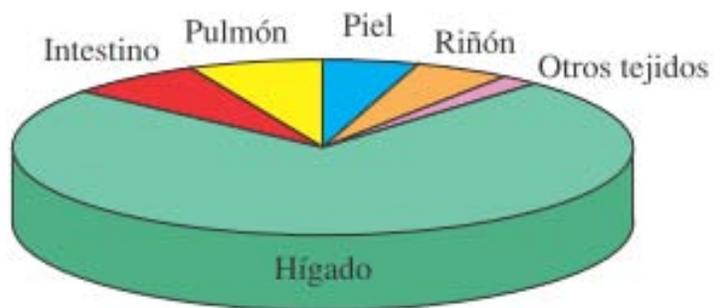


Figura 7. Expresión de los CYP en diferentes tejidos. Tomado de Gómez-Lechón, 2001.

Como mencione anteriormente, el tracto respiratorio es el punto principal de entrada de muchos de los agentes xenobióticos y el pulmón es el punto principal de metabolismo de estos. En algunos estudios se mencionan al menos dos diferentes tipos celulares de Clara que contienen diferentes tipos de CYP y metabolizan o son resistentes a la exposición de algunos compuestos.

6 ANTECEDENTES

Existen pocos estudios respecto a las poblaciones de célula de Clara, sin embargo, los experimentos realizados hacen referencia a dos marcadores tratados con anterioridad, CC10 y CYP, para evidenciar subtipos de CC después de la exposición a distintos agentes xenobióticos.

6.1 Células de Clara y el citocromo P450

Fanucchi et al (1997), estudió la relación entre edad, expresión de la proteína CC10, CYP y la exposición a naftaleno, compuesto derivado del petróleo, carbón y humo del cigarro (Morris y Buckpitt, 2009) (Figura 8).

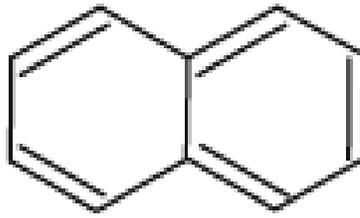


Figura 8. Estructura química del Naftaleno. Tomado de Mastandrea et al., 2005.

Para su estudio, utilizaron ratones adultos, 7 y 14 días de nacidos. Se les administró una sola inyección de naftaleno intraperitoneal a las siguientes dosis (25, 50 y 100 mg/kg) y se sacrificaron a las 24 horas. En este estudio evidenció la cito-diferenciación de las células usando dos marcadores específicos, la proteína CC10 y el sistema de monooxigenasa CYP, en especial CYP2B y CYP2F2, así como su actividad de ellos. La prueba de inmunohistoquímica fue positiva gradualmente a las diferentes edades de los ratones. Los ratones adultos mostraron mayor presencia de proteína CC10, en especial, en los bronquiolos terminales y distales, pero no en los conductos bronquiolo-alveolares. La inmunohistoquímica para el CYP2B y realizada en ratones de 19 días de nacidos, mostró ser negativa para este CYP. En ratones postnatales, la marca fue mayor, pero, en ratones adultos, la marca fue intermedia aproximándose a ratones de 8 y 14 días de nacidos, pero, en bronquiolos terminales la marca fue similar a ratones de 21 y 28 días de nacidos. Por lo que se concluyó que, la marca aumenta con la edad.

En el caso del CYP2F2 la marca no fue detectada en fetos de ratón, pero, en ratones adultos, la marca aumentó en bronquiolos terminales, aunque también se observaron pocas células marcadas en los conductos broquiolo-alveolares.

El metabolismo del naftaleno fue determinado por la formación de dihidrodiol y glutathion conjugado 2, en vías aéreas aisladas de los ratones. La

mayoría del dihidrodiol es formado por el CYP2F2, aunque pequeñas porciones también fueron formados por el CYP2B. Los resultados mostraron que la formación del dihidrodiol es más baja en los ratones de 7 días de nacidos, comparado con los ratones adultos. En el caso del conjugado 2, no hubo diferencia entre ratones de 7 y 14 días de nacidos, en relación con ratones adultos. La actividad del CYP2B fue caracterizada por la formación del conjugado 1 y 3. El conjugado 3 no cambio con la edad de los animales, pero la formación del conjugado 1 aumento en relación con su edad. La prueba de actividad de los CYP en pulmones de ratón, mostró que, aumenta conforme aumenta su edad. Sin embargo, la exposición a naftaleno produce daño tóxico en algunas células, aquellas células que no contienen CYP2F2 son resistentes a este compuesto, como lo veremos más adelante.

6.2 Poblaciones de la célula de Clara (CC)

En 1987, Broody et al, en uno de los primeros reportes de poblaciones mencionan que las células de Clara tienen una considerable capacidad de auto-renovación, y su potencial de diferenciación parece ser bastante limitado. A esta conclusión llegaron, después de trabajar con CC aisladas de conejo e inoculadas en tráquea de rata. Por otra parte, Van winkle et al., (1995), encontró la diferenciación de CC, después de ser retados los ratones a naftaleno.

Sin embargo, no fue hasta que Hong et al., (2001), establecieron que los cuerpos neuroepiteliales (NEBs) secuestran las células regenerativas que contribuyen a la repoblación después de la reducción de CC. Se identificaron dos poblaciones resistentes a compuestos químicos, la CC que contiene CC10, y la variante que expresa CC10 (vCE o vCC). Esto soportaría la idea de tener “Stem cells” en los bronquiolos pulmonares.

Giangreco et al (2002), también utilizó naftaleno, en adultos machos (FVB/n) de 2-4 meses de edad. Se les administró naftaleno con aceite de maíz, a una dosis de 275mg de naftaleno/Kg de peso del animal.

Los resultados de este estudio, identificaron a una nueva “Stem cell”, que contribuye a regenerar el epitelio bronquiolar después del agotamiento de Células de Clara. Las Células positivas para CC10, se identificaron por inmunohistoquímica e hibridación in situ en numerosos bronquiolos terminales, La población resistente que expresa CC10, fue restringida a las uniones bronquiolo-alveolares (BADJ, por sus siglas en ingles). Retomando parte de los CYP, las “Stem cells”, muestran un fenotipo diferente, que les confiere cierta protección, además, de tener una característica particular, no contienen la proteína CYP2F2, por lo cual no metabolizan el naftaleno y no se observan efectos tóxicos en estas células.

Sin embargo, la exposición a diversos eventos, tales como; infecciones, alergias o estímulos irritantes, causan el aumento en número de células productoras de mucinas, en ratones y humanos (Evans et al., 2004).

Evans et al., (2004), utilizó ratones hembra de, 4–6 semanas de edad (BALB/c). Los ratones fueron sensibilizados con Ovoalbumina (20mg) vía intraperitoneal. Cuatro inyecciones por semana. Una vez sensibilizados, los ratones fueron expuestos 30 minutos a solución salina 0.9% en el caso de los controles, y ovoalbúmina en solución salina, en el caso de los expuestos. Utilizando un nebulizador AeroMist CA-209 (CIS-US, Inc., Bedford, MA).

Los resultados mostraron que aproximadamente el 60% de células que son CC10 positivas, se transforman en productoras de moco (+AB/PAS), en los conductos proximales, pero no en los conductos distales, tal es el caso de los bronquiolos terminales, por lo que se concluyó en este experimento, que el fenotipo mucoprodutor está limitado a la CC de regiones proximales. Además, las

células que no son CC10 positivas, su fenotipo no cambió, fueron negativas para la tinción AB/PAS.

Sin embargo, el número de células AB/PAS+ disminuye significativamente después de 21 a 90 días de exposición a antígenos, comparado con el pico más alto que fue a los 7 días de exposición.

Por otra parte, Plopper et al., (1983), refiere que la célula de Clara es una de los tres tipos celulares que mantienen una capa de moco dentro del pulmón. En su análisis en microscopía electrónica, evidenció que estas células contienen retículo endoplásmico y vesículas de secreción electrón-densas. Sin embargo, el grupo de Evans et al., (2004), mostró las mismas estructuras, solo que en bronquiolos de organismos control y corresponden a las vesículas de secreción de la proteína CC10. Por otro lado, ellos reportaron vesículas electrón-lúcidas, en las CC mucoproducidas, después de ser expuestas a antígenos.

Todo lo anterior, demuestra que existe al menos "Stem cells" dentro del epitelio bronquiolar, cuyas características incluyen el fenotipo indefinido, pluripotente, tasa baja de proliferación, y una vida larga. Estas células se restringen a microambientes específicos, llamados nichos de "Stem cells" (Reynolds et al., 2000). Se ha demostrado la existencia de poblaciones de células que expresan CC10 (EC) dentro de los cuerpos neuroepiteiales (NEB, por sus siglas en inglés), en el epitelio bronquiolar (Giangreco et al., 2002; Ronald et al., 2008). En esta región, las células resistentes a naftaleno, se les conoce como variante de Célula de Clara (vCC) o variante de Clara (vC), que expresa la proteína CC10. Además existe otro tipo de célula de Clara, la cual produce proteína CC10 y la proteína surfactante de tipo C (SP-C), proteína que comparte con el neumocito de tipo II (Ronald et al., 2008). Existen diferentes mecanismos y lugares en donde se localizan algunos tipos celulares dispuestos en sitios específicos, que pueden renovar a los diferentes tipos de células e incrementar

las células ciliadas, o cualquier otro fenotipo, tal como lo demuestra la siguiente figura (Figura 9). (Rawlins y Hogan., 2006)

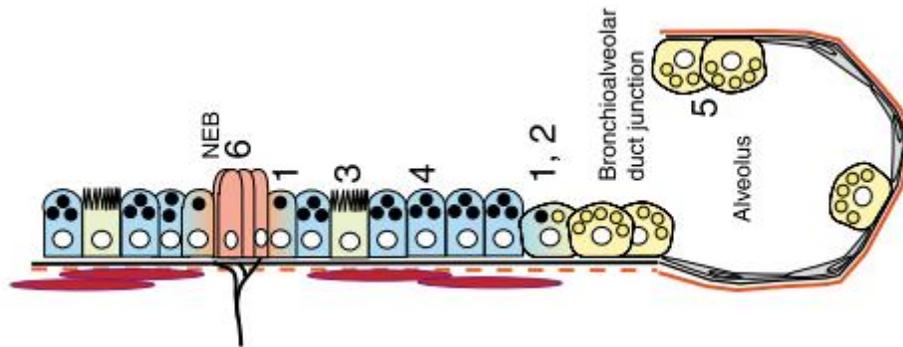


Figura 9. Localización de los diferentes tipos celulares de regeneración en bronquiolos y alveolos. (1) variante de célula de Clara (vCC), son células adyacentes a los cuerpos neuroepiteliales (NEBs) y a la unión bronquio-alveolar, las cuales son resistentes a Naftaleno y proliferan después del daño. Si todas las células de Clara son destruidas y no se repara, el ratón muere. (2) Presuntas "Stem cells" bronquiolo-alveolar, que se auto renuevan en cultivo después de la separación de flujo aéreo y da lugar a múltiples linajes, podrían dar origen a vCC. (3) Células ciliadas. (4) Célula de Clara, proliferan después de daño por NO_2 , para dar origen a células ciliadas, pero no es conocido si, todas las células tienen este potencial. (5) Neumocitos de tipo II, dan origen a neumocitos de tipo I. (6) cuerpos neuroepiteliales, pueden generar así mismo, y/o linajes diferentes. Tomado de Rawlins y Hogan., 2006).

En general, el daño inducido a los bronquiolos por naftaleno, ha identificado la diferenciación potencial de vCE (variante que expresa CC10 o vCC) y células de Clara, en la (Figura 10), se muestran las diferentes variedades de Células de Clara en pulmones normales de adultos (Reynolds y Malkinson., 2010).

La disminución de poblaciones celulares, a través de la administración de tóxicos como el Naftaleno y/o cualquier otro compuesto, no disminuye el potencial regenerativo en los bronquiolos terminales, que son sitios de resistencia y de renovación inmediata. Después de la disminución de CC, las células progenitoras de los bronquiolos terminales con capaces de renovarse y repoblar hacia diferentes fenotipos celulares apropiados de esta región (Giangreco et al., 2002).

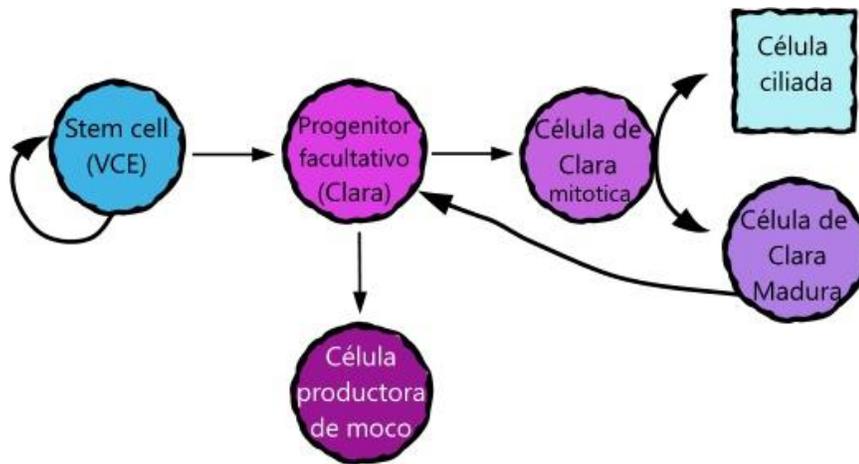


Figura 10. Diversidad de Células de Clara. El daño epitelial activa a las Células “Stem cell” (vCE) para la generación de células progenitoras facultativas. Aunque el daño también puede producir nuevamente la diferenciación a un intermediario mitótico (Tipo A), para generar dos células; la Célula ciliada y la célula madura (Tipo B). Esta última puede diferenciarse a células de Clara facultativas. El contacto con algunos tóxicos produce el cambio de fenotipo hacia una célula de Clara mucoprodutora. Modificado de Reynolds et al., 2010.

Los datos anteriormente mencionados sugieren que existen poblaciones celulares que son resistentes a compuestos tóxicos, y que participan como “Stem cells” en la regeneración del epitelio bronquiolar y que tienen diversos marcadores, como CC10 y CYP, y que pueden tener de acuerdo al fenotipo que presenten (Giangreco et al., 2002).

6.3 Metales y citocromo P450

Como se revisó anteriormente, algunos compuestos tóxicos generan poblaciones de CC que contienen diferentes tipos de CYP. Aunque existen pocos estudios sobre este tema en pulmón y en relación con la Célula de Clara.

Andrew et al., (2003), cultivaron la línea celular ¹BEAS-2B1 junto con algunos metales tales como: cadmio, níquel arsénico y cromo. Lo que reportaron

¹ Células epiteliales bronquiolares humanas

fue la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo y eliminación, dentro de este pool de enzimas, no se encontró expresado el CYP1B1.

Una isoforma de CYP más estudiada con metales, es el CYP1A1. Existen algunos reportes, utilizando diferentes metales y/o diferentes modelos, ya sea líneas celulares o modelos animales.

Uno de los primeros estudios fue realizado por Falkner et al (1993) , usando As^{3+} , resulto en la inhibición de la actividad del CYP1A1, en todos los tejidos de cobayos. En especies acuáticas el Hg^{2+} , incrementan los niveles de proteína CYP1A1 en células de glándula rectal de tiburón, pero la actividad no fue medida. En hígado de Lubina, este metal induce la actividad de CYP1A1. También, en la línea celular Hepa 1c1c7, aumenta el RNAm sin afectar la actividad del CYP1A1 (Anwar-Mohamed et al., 2009)..

Por otro lado, el Pb^{2+} , disminuye la actividad, en ausencia o presencia de PAHs, que son inductores para el CYP1A1 (Anwar-Mohamed et al., 2009)..

En cultivos primarios de hepatocitos, la exposición a Cd^{2+} , disminuyó la actividad del CYP1A1. Además, este mismo efecto se observó en ratas de la cepa Sprague-Dawley, pero disminuye en el intestino, tanto los CYP totales y el CYP1A1, pero no en hígado (Anwar-Mohamed et al., 2009).

Otro estudio realizado por Anwar-Mohamed et al., (2008), en el cual utilizaron vanadio (V^{5+}), y TCDD (2,3-7,8, tetraclorodibenzeno, un activador del CYP1A1. Usando la línea celular Hepa 1c1c7. Las células se trataron con diferentes concentraciones de V^{5+} (25, 50, 100 y 250 mM) + 1nM de TCDD. Los resultados mostraron que aún con la inducción del CYP1A1 con el TCDD, el vanadio disminuye la actividad conforme aumenta su concentración.

7 JUSTIFICACIÓN

En los párrafos anteriores se ha expuesto la importancia que tiene la contaminación en la divergencia de poblaciones de Célula Bronquiolar no Ciliada o Célula de Clara. Sabemos que un componente importante dentro de las partículas es el vanadio, este elemento ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, existen muchos estudios sobre la generación de poblaciones de la célula de Clara, utilizando diferentes tipos de contaminantes, pero ninguno con metales, especialmente vanadio. Por todo esto, nos interesa evaluar la capacidad del vanadio para generar poblaciones celulares después de la exposición a dicho metal (utilizando nuestro modelo de inhalación de vanadio), ya que la partícula que la contiene mide 2.5µm de diámetro y es fácilmente depositada en los bronquiolos, sitio donde se encuentra la Célula de Clara.

8 HIPOTESIS

La exposición a vanadio inducirá en el epitelio bronquiolar, específicamente en la célula de Clara, cambios fenotípicos que se manifestaran con la presencia en de moco, o de algunas enzimas como CYP1A1 o CYP1B1, y proteína CC10. Además, todos estos cambios se relacionaran con el tiempo de exposición.

9 OBJETIVO GENERAL

Identificar morfológicamente las poblaciones de la CC en ratón, en el modelo por inhalación de vanadio a los diferentes tiempos de exposición.

9.1 *Objetivos particulares*

- Identificar histológicamente los subtipos de la célula bronquiolar después de la inhalación de vanadio, mediante la tinción de Azul de Alciano/PAS (AB/PAS).

- Caracterizar las poblaciones de CC mediante inmunohistoquímica, usando las proteínas: CC10, CYP 1A1 y CYP 1B1.
- Localizar las proteínas anteriormente mencionadas para identificar las diversas poblaciones de células de Clara, mediante microscopia confocal (CC10, CYP1A1 y CYP1B1) en cortes seriados.
- Realizar la prueba de actividad en pulmón para CYP1A1.
- Relacionar las modificaciones en las poblaciones de CC de acuerdo con el tiempo de exposición.

10 MATERIAL Y MÉTODO

Para cumplir con los objetivos propuestos, se utilizaron 40 ratones macho de la cepa CD1 (30-35g de peso), divididos en 4 grupos, cada grupo contenía 10 ratones. Los cuales se expusieron a pentóxido de vanadio (V_2O_5) a una concentración de 0.02M, 1 hora, 2 veces por semana. El grupo control, inhaló solamente el vehículo, solución salina (1h/2 veces/semana). La inhalación se realizó utilizando un nebulizador ultrasónico Yuehua Modelo WH-802. Guandong Yuehua Medical Instrument Factory Co, Ltd.

| Grupo | No de ratones | Exposición |
|------------|---------------|--|
| Control | 10 | 1h/2 veces/semana (solución fisiológica) |
| 4 semanas | 10 | 1h/2 veces/semana (vanadio) |
| 6 semanas | 10 | 1h/2 veces/semana (vanadio) |
| 12 semanas | 10 | 1h/2 veces/semana (vanadio) |

En todos los grupos, se sacrificaron los animales, previa anestesia, administrada vía Intraperitoneal con pentobarbital sódico (20mg/Kg de peso del animal) a las 4, 6, 12 semanas de exposición y el grupo control respectivamente. Solo 5 ratones de cada grupo fueron anestesiados. Se abrió de la cavidad torácica y se cortó la parrilla costal, se realizó la perfusión in vivo, una vez lavados los

pulmones con solución salina y fijados a capacidad pulmonar con paraformaldeído al 4%, se realizó la técnica histológica, los pulmones se incluyeron en parafina de manera longitudinal (figura 11), y se cortaron (cortes seriados) en el micrótomoto rotatorio (cortes <5mm de grosor). Después de todo esto, se realizaron las inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia y la tinción de AB/PAS. Las muestras realizadas para inmunohistoquímicas se evaluaron por microscopia de campo claro y se realizó la densitometría (densidad media de color café). (Figura 12).

La tinción AB/PAS, también se evaluó mediante el mismo método. En este último se contó el número total de células dobles positivas, en relación con el total de células en cada bronquiolo. Para las muestras realizadas con inmunofluorescencia, se evaluaron en el microscopio confocal.

Los otros 5 ratones, de cada grupo, se sacrificaron por dislocación cervical en una campana de flujo laminar, se extrajeron los pulmones, se lavaron con solución salina estéril e inmediatamente se congelaron en hielo seco, para después almacenarlos a -70°C en el ultracongelador.

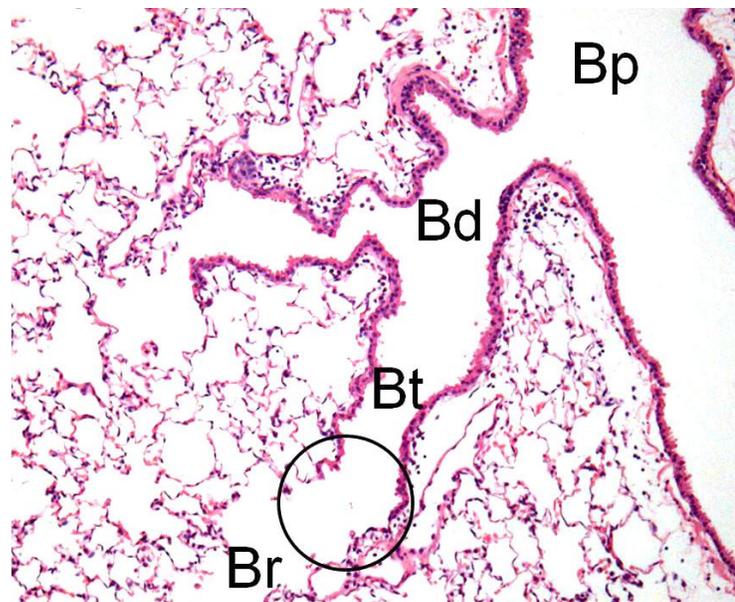


Figura 11. Corte longitudinal de pulmón, teñido con Hematoxilina-Eosina. Se aprecian las diferentes secciones de los bronquiolos: Bp, bronquiolo proximal. Bd, bronquiolo distal. Bt, Br,

bronquiolo terminal. Circulo, señala la unión bronquiolo-alveolar y Br, bronquiolo respiratorio. En este estudio, evaluamos los bronquiolos terminales y regiones bronquiolo-alveolares.

Una vez colectadas todas las muestras, se procesaron para obtener la fracción microsomal, que contiene enzimas P450, para evaluar la actividad en pulmón del CYP1A1. Se tomaron las lecturas en el fluorómetro Versa Fluor de Biorad, Una vez obtenidos los resultados, se realizó en análisis estadístico (figura13).

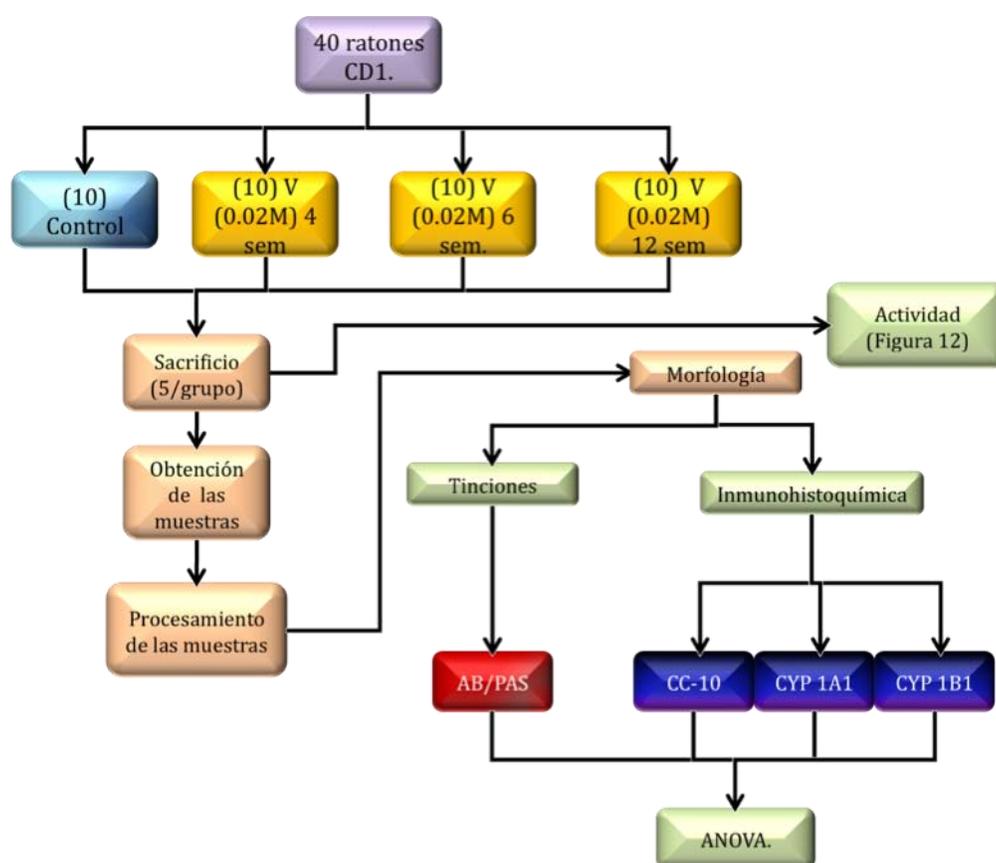


Figura 12. Resumen del método. Primera parte del método desarrollado en la tesis.



Figura 13. Resumen del método. Segunda parte del método desarrollado en la tesis.

10.1 Técnicas histoquímicas

Las técnicas histológicas son un conjunto de recursos prácticos que se utilizan para evidenciar las estructuras microscópicas de los elementos anatómicos, histológicos y citológicos de los seres vivos (González-Morán., 2008).

La composición química de los organismos presenta una gran porción de moléculas de agua en las células de los diversos tejidos. Esta característica es un factor muy importante para la observación microscópica, ya que debido a la refringencia del agua se dificulta observar los componentes estructurales de las células. Para evitar este fenómeno se recurre a las técnicas de colorantes, que tienen como función teñir diferentes componentes celulares y tisulares. La tinción es la combinación química de las moléculas del colorante con las moléculas de la célula (González-Morán., 2008).

10.2 Tinción Azul de alciano/ácido peryódico de schiff (AB/PAS)

La tinción PAS (periodic acid-Schiff, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos químicos más empleados en histología. En la tinción PAS se trata el material con ácido peryódico, que oxida los 1,2-glicoles formándose grupos aldehído. Con el reactivo de Schiff, los aldehídos reaccionan dando un color rojo luminoso. Con polisacáridos no substituidos, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos, la tinción PAS da una reacción de color específica. Combinando la tinción PAS con azul alciano pueden identificarse, además mucosustancias ácidas (glucosaminoglicanos) (González-Morán., 2008), mucinas acidas y DNA (Fortoul y Castell., 2010)

10.3 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

La inmunohistoquímica ha llegado a establecerse como una técnica histoquímica de rutina para identificar constituyentes celulares de tejidos (antígenos) por medio de interacciones antígeno-anticuerpo. La existencia del sitio de unión del anticuerpo se identifica, ya sea por marcaje directo del anticuerpo o por uso de un segundo método de marcaje (González-Morán., 2008).

Las pruebas histoquímicas son aplicaciones de reacciones químicas y bioquímicas en la técnica histológica, con el fin de localizar y determinar de ciertas moléculas, coloreadas y que apoyen, tanto a histólogos, patólogos y científicos (Fortoul y Castell., 2010).

La inmunofluorescencia, al igual que la inmunohistoquímica, se usa para el marcaje de proteínas, mediante anticuerpos, pero los anticuerpos son fluorescentes. Las moléculas de colorantes fluorescentes (fluorocromos) se unen químicamente a las moléculas de anticuerpos, lo que hace posible observar los

sitios de reacción con los antígenos con el microscopio de luz ultravioleta (González-Morán., 2008).

10.4 Cuantificación de proteínas (Método de Bradford)

Basado en el cambio de color del colorante azul de Coomasie G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos. Esta unión del colorante con las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595nm. Por lo tanto, este método se basa en la propiedad del azul brillante de Coomasie G-250 de presentarse en dos formas con colorantes brillantes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une a la proteína. Experimentalmente se mide la diferencia de absorbencia entre 595 y 465 nm (Bradford., 1976).

10.5 Prueba de actividad

La prueba de actividad para CYP1A1, EROD, es una prueba en la que el sustrato 7-etoxiresorrufina, sufre la pérdida de un grupo etílico para formar el producto fluorescente resorrufina por medio de la enzima 7-etoxiresorrufina-o-detilasa (CYP1A1). La actividad catalítica hacia el sustrato es un indicador de la cantidad de enzima presente y es medida como concentración de resorrufina producida por mg de proteína por minuto ($\text{mol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$), la reacción se evalúa en un fluorómetro a 520 nm (Kennedy y Jones, 1994).

10.6 Análisis de resultados

Una vez realizadas las inmunohistoquímicas de las diferentes muestras, se analizaron (50 campos para cada exposición) con el programa Image J v1.44, en donde se midió la densidad media de color de la marca para cada anticuerpo (CC10, CYP1A1 y CYP1B1). Una vez obtenidos los valores de la densidad media,

se realizó la prueba de ANOVA, ajustada con Tukey, en el programa estadístico Prisma v5.04. Las muestras realizadas por inmunofluorescencia se evaluaron con el microscopio confocal. Las muestras teñidas con la técnica AB/PAS, junto con su corte seriado, en inmunohistoquímica para CC10, se contaron el número de células dobles positivas (CC10+ y AB/PAS+), y su relación con el total de células en cada bronquiolo, para obtener un porcentaje de células doble positivas. Se realizó también la prueba de ANOVA, ajustada con Tukey en el programa Prisma v5.04.

Para la prueba de actividad, también se aplicó la prueba de ANOVA (Tukey), en el programa estadístico mencionado con anterioridad. En el anexo 1, describimos como se realizaron las técnicas empleadas en este trabajo.

11 RESULTADOS

Los cambios pulmonares, y especialmente en el epitelio bronquiolar, están relacionados con la presencia de los marcadores evaluados en la célula de Clara a través del tiempo de exposición, evidenciando los siguientes cambios:

11.1 Inmunohistoquímica para citocromo 1A1 (CYP1A1) en bronquiolos pulmonares de ratón

La exposición a vanadio en los organismos, causó el aumento en la marca para CYP1A1 a las 4 semanas de exposición (figura 13-B), siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo control (figura 13-A). Sin embargo a las 6 semanas de exposición (figura 13-C) la marca disminuyó significativamente al igual que a las 12 semanas (figura 13-D y figura 14), ambos en comparación con el grupo control. En todos los grupos, la marca fue evidente en la parte apical de las Células de Clara. La prueba de ANOVA realizada a la

densitometría para CYP1A1, corroboró el aumento significativo a las 4 semanas de exposición a vanadio (figura 14).

11.2 Inmunohistoquímica para citocromo 1B1(CYP1B1) en bronquiolos pulmonares de ratón

Por otra parte, en el caso de la inmunohistoquímica para CYP1B1, aumento de manera significativa, a las 4, 6 y 12 semanas de exposición (figura15-A, B y C), con respecto al grupo control (figura15-A). La prueba de ANOVA para la densitometría muestra este aumento significativo (figura 16). La localización de la marca fue igualmente en la parte apical, igual que para la proteína CYP1A1.

11.3 Inmunohistoquímica para CC10 en bronquiolos terminales de ratón.

La inhalación de vanadio causó el aumento significativo de la proteína CC10, conforme aumenta el tiempo de exposición. El grupo control, mostró células de Clara con marca en la región apical (figura 17-A), para las 4 semanas la marca se mostró en la misma zona que en el grupo control, pero aumento significativamente. Pero, a las 6 y 12 semanas, la marca de la proteína se ubico en toda la célula (región apical, lateral y basal), además, se aprecia el aumento en la presencia de la proteína. La grafica de la densitometría, sustenta lo observado en este resultado (figura18), sin embargo se correlaciona mejor en la figura 19.

11.4 Inmunohistoquímica para CC10 y tinción Azul de alciano /PAS en bronquiolos terminales de ratón.

La inmunohistoquímica para CC10 y la tinción AB/PAS en cortes seriados, se evidencio al menos en dos poblaciones de célula de Clara: el grupo control (figura 20-A) mostró ser positivo para CC10 y su contraparte AB/PAS (figura 20-B),

no se aprecian células positivas para esta tinción. Grupo expuesto a 6 semanas a vanadio inhalado, mostró en la inmunohistoquímica, que las células de Clara son positivas para CC10 (flecha roja y azul), las células ciliadas son negativas para esta proteína (flecha negra) (figura 20-C), su contraparte, teñida con AB/PAS, evidencia que las células positivas para CC10 y también lo son para la tinción AB/PAS (flecha roja), y muestra otro tipo de célula de Clara que es positivo para CC10, pero es negativo para AB/PAS (flecha azul). En el grupo expuesto a a12 semanas, los tipos celulares se mantienen de igual forma que en lo encontrado a las 6 semanas de exposición a vanadio inhalado, pero disminuye el porcentaje de células comparando con las 6 semanas. El grupo de 4 semanas, no mostrado, aumentó significativamente en relación con el grupo control, y presento los mismos tipos celulares que a las 6 semanas y 12 semanas. En todos los casos, las células dobles positivas (CC10+ y AB/PAS+) se localizaron en la región de los bronquiolos terminales y en la unión bronquiolo-alveolar. La gráfica del porcentaje de células dobles positivas representa este resultado (figura 21).

11.5 Inmunofluorescencia para CC10, CYP1A1 y CYP1B1 en bronquiolos terminales de ratón.

Los cortes seriados y marcados para las tres proteínas no mostraron subfamilias de células de Clara con CYP1A1 y/o CYP1B1. Todas las células de Clara presentaron los dos marcadores en todas las inhalaciones. El grupo control, presentó en las células de Clara (flechas amarillas) positivas para CC10 (figura 22-A), CYP1A1 (figura 22-B) y CYP1B1 (figura 22-C). También mostraron Células Ciliadas (flechas rosa), negativas para CC10.

Para el grupo expuesto a 4 semanas de vanadio inhalado, el resultado fue el mismo, las células de Clara son positivas (Flechas amarillas) para CC10 (figura 22-D), CYP1A1 (figura 22-E) y CYP1B1 (figura 22-C). El grupo expuesto por 6 semanas a vanadio inhalado, mostraron que las células de Clara son positivas (Flecha amarilla) para las proteínas CC10 (figura 23-A), CYP1A1 (figura 23-B) y

proteína CYP1B1 (figura 23-C) en los cortes seriados. Las células ciliadas (flechas rosa) señala la célula ciliada, negativa para CC10 (figura 23-A), pero, positiva para CYP1A1 (figura 23-B) y positiva para CYP1B1 (figura 23-C).

El grupo expuesto a 12 semanas de vanadio inhalado, mostró muchas células de Clara, que son positivas para los tres marcadores, CC10 (figura 23-D), CYP1A1 (figura 23-E) y CYP1B1 (figura 23-F) y como señalan las flechas amarillas.

11.6 Prueba de actividad (EROD) en pulmones de raton después de la exposición a vanadio inhalado

La inhalación de vanadio causó el aumento significativo de la actividad del CYP1A1 a las 4 y 6 semanas de exposición con respecto al grupo control (Figura 24). Sin embargo, el grupo expuesto a 12 semanas a vanadio, disminuyó la actividad del CYP1A1 con respecto al control.

INMUNOHISTOQUIMICA PARA CITOCROMO 1A1 EN BROQUIOLOS TERMINALES DE RATON

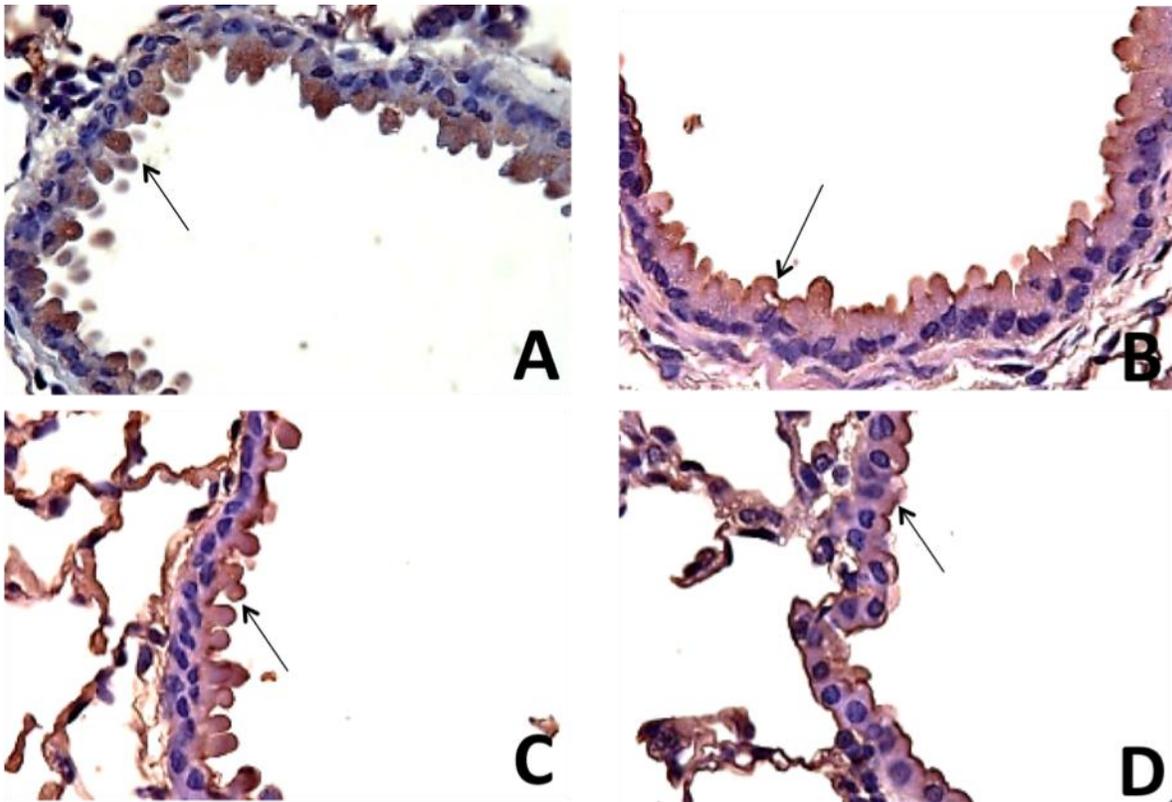


Figura 13. Inmunohistoquímica para CYP1A1 en bronquiolos pulmonares de ratón. (A) Bronquiolo de organismo control, la marca del CYP1A1 (color café), se aprecia en el epitelio bronquiolar, las células de Clara son positivas para esta proteína, y se observa la marca en su ápice (flecha). (B) Bronquiolo de organismo expuesto a 4 semanas a vanadio, las células presentan el mismo patrón de marca que el control, la marca se ubica en la región apical de las células de Clara (flecha). (C) Bronquiolo de organismo expuesto a 6 semanas, la localización de la proteína sigue siendo apical (flecha). (D) bronquiolo de organismo expuesto a 12 semanas, se observa la disminución significativa en la marca de la proteína CYP1A1, en relación con su control. 100X.

ANALISIS ESTADISTICO DE LA INMUNOHISTOQUIMICA PARA CYP1A1

DENSITOMETRIA DE CYP 1A1 EN BRONQUIOLOS PULMONARES DE RATON

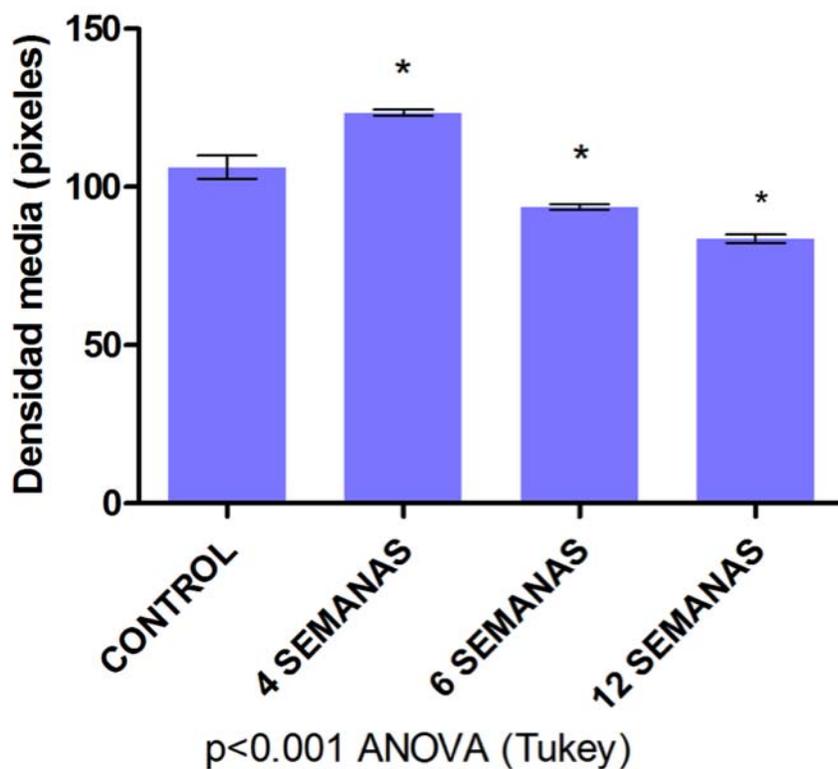


Figura 14. Densitometria de CYP1A1 en bronquiolos pulmonares de ratón. El análisis estadístico de la densitometría en el grupo control, mostró la presencia basal de la proteína CYP1A1, sin embargo, a las 4 semanas de exposición a vanadio inhalado, se observa el aumento significativo en la presencia de proteína, comparando con el grupo control, pero, a las 6 y 12 semanas de inhalación se aprecia disminución significativa en la presencia de proteína, en relación al grupo control.

INMUNOHISTOQUIMICA PARA CYP1B1 EN BROQUIOLOS TERMINALES DE RATON

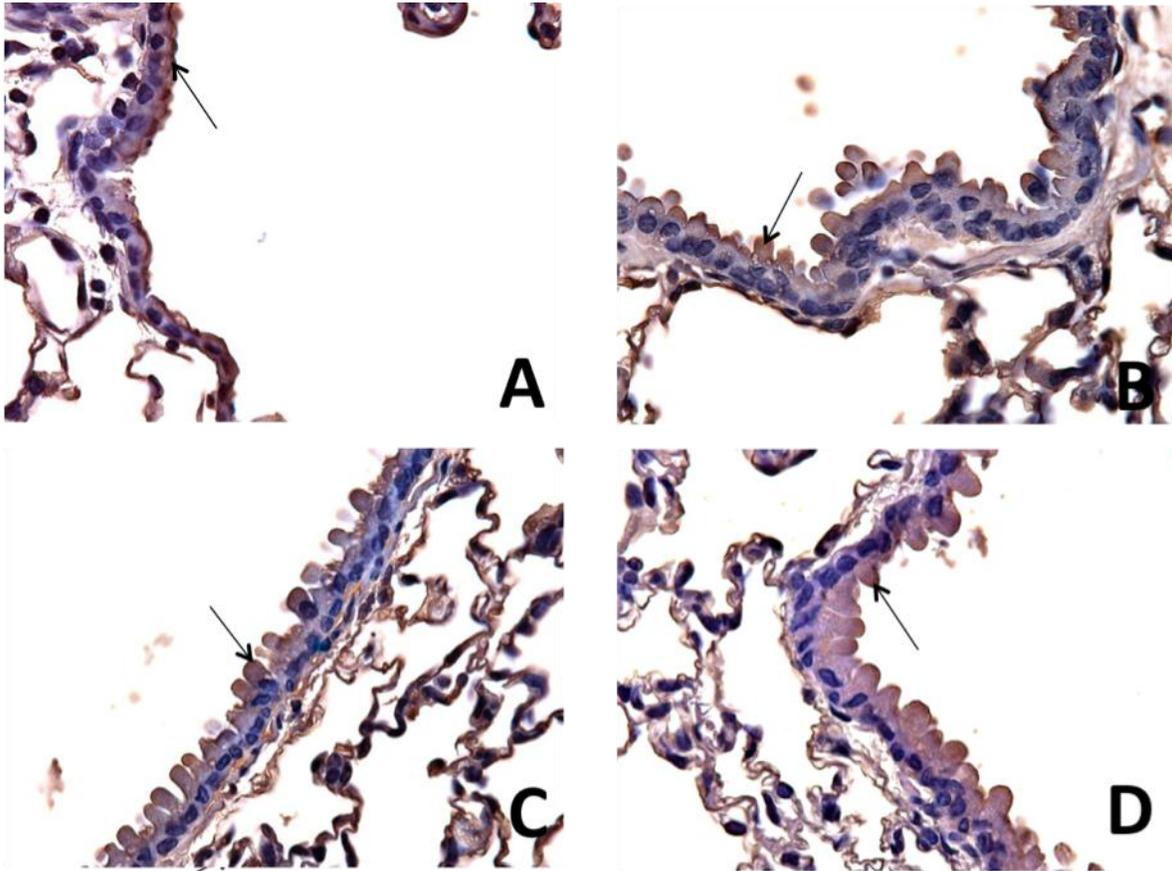


Figura 15. Inmunohistoquímica para CYP1B1 en bronquiolos pulmonares de ratón. (A) Bronquiolo de organismo control, la marca del CYP1B1 (color café), se aprecia en el epitelio bronquiolar, solo que la marca es mucho menos intensa, que el CYP1A1. Las células de Clara son positivas para esta proteína, y se observa la marca en su ápice (flecha). (B) Bronquiolo de organismo expuesto a 4 semanas a vanadio, las células presentan el mismo patrón de marca que el control, la marca se ubica en la región apical de las células de Clara (flecha). (C) Bronquiolo de organismo expuesto a 6 semanas, la localización de la proteína sigue siendo apical (flecha). (D) Bronquiolo de organismo expuesto a 12 semanas, se observa el aumento en la presencia de proteína con respecto del grupo control. 100X.

ANALISIS ESTADISTICO DE LA INMUNOHISTOQUIMICA PARA CYP1B1

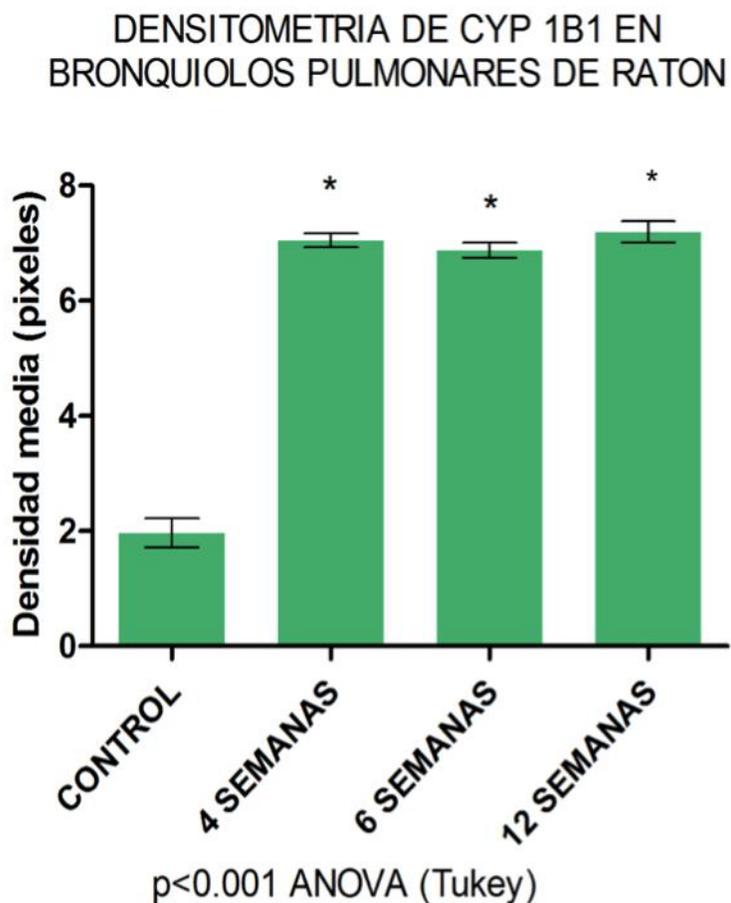


Figura 16. Densitometria de CYP1B1 en bronquiolos pulmonares de ratón. El análisis estadístico de la densitometría en el grupo control, mostró la presencia basal de la proteína CYP1B1. Los grupos expuestos a 4, 6 y 12 semanas a vanadio inhalado, aumentaron significativamente la presencia de la proteína, en relación con el grupo control.

INMUNOHISTOQUIMICA PARA CC10 EN BROQUIOLOS TERMINALES DE RATON

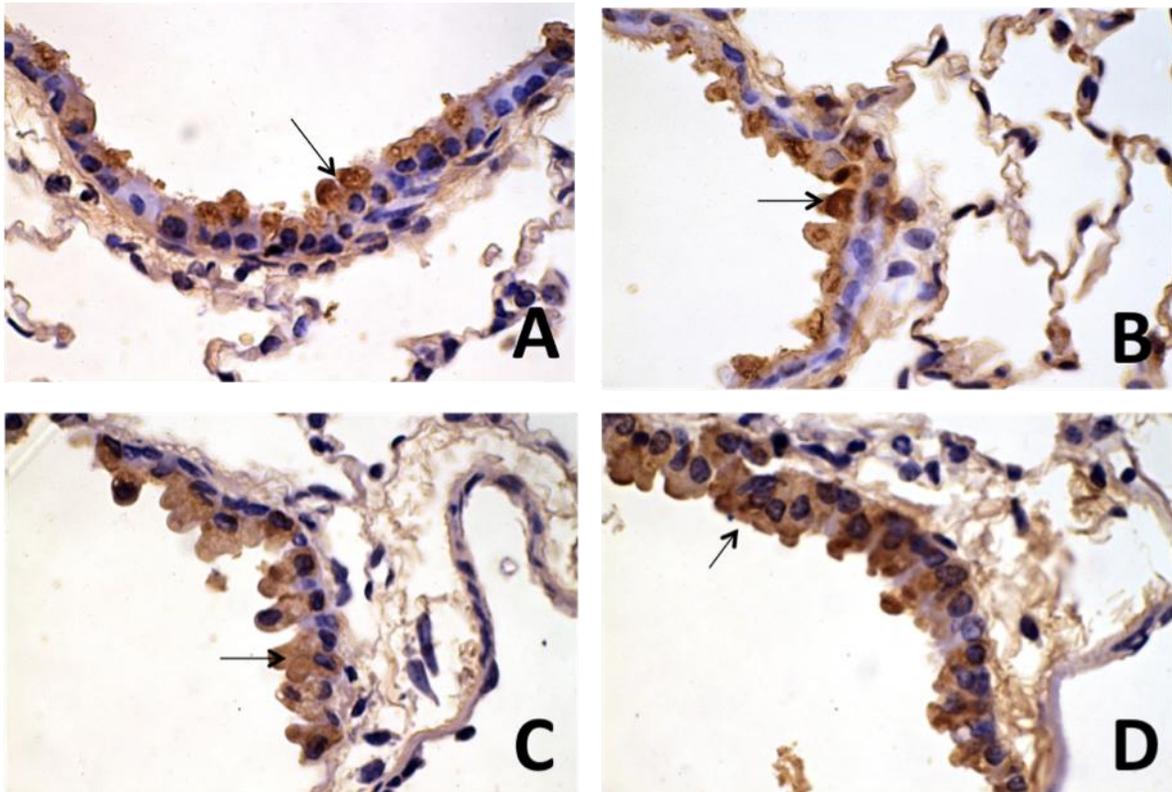


Figura 17. Inmunohistoquímica para CC10 en bronquiolos pulmonares de ratón. (A) Bronquiolo de organismo control, la marca del CC10 (color café), se aprecia en el epitelio bronquiolar, exclusivamente en las Células de Clara, y se ubica en el ápice de ellas (flecha). (B) Bronquiolo de organismo expuesto a 4 semanas a vanadio, las células presentan el mismo patrón de marca que el control, la marca se ubica en la región apical de las células de clara (flecha). (C) Bronquiolo de organismo expuesto a 6 semanas, toda la célula se encuentra marcada, no solo es apical, sino basal y lateral (flecha). (D) bronquiolo de organismo expuesto a 12 semanas, se observa el aumento en la presencia de proteína con respecto del grupo control, la proteína se ubica, al igual que en los organismos expuestos a 6 semanas. 100X.

ANALISIS ESTADISTICO DE LA INMUNOHISTOQUIMICA PARA CC10

DENSITOMETRIA DE CC10 EN BRONQUIOLOS PULMONARES DE RATON

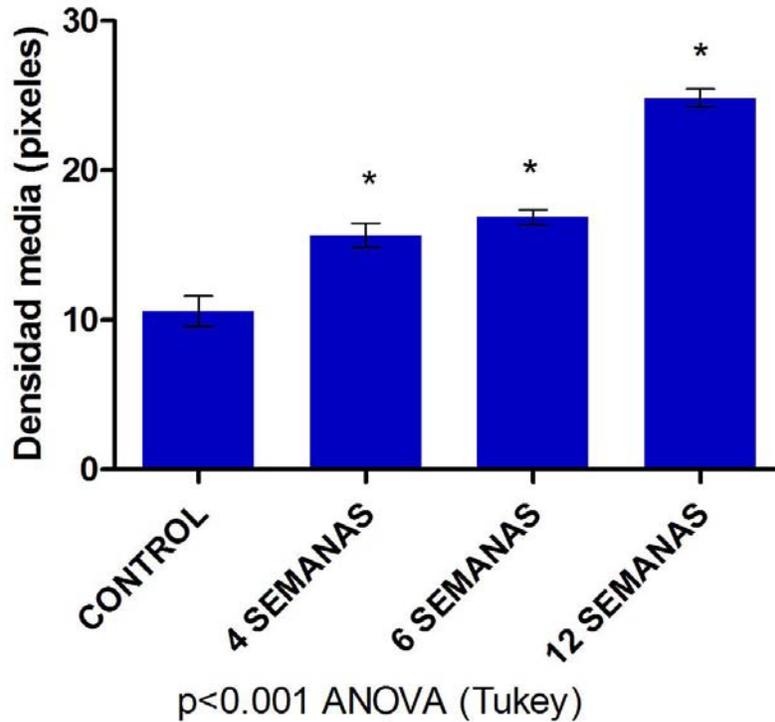


Figura 18. Densitometría de la proteína CC10 en bronquiolos pulmonares de ratón. El análisis estadístico de la densitometría en el grupo control, mostró la presencia basal de la proteína CC10. Los grupos expuestos a 4, 6 y 12 semanas a vanadio inhalado, aumentaron significativamente la presencia de la proteína, en relación con el grupo control. El aumento mostrado en la grafica pareciera mostrar una correlación entre las semanas de exposición y la densidad en la presencia de la proteína.

REGRESION LINEAL ENTRE LA EXPOSICION Y LA PRESENCIA DE PROTEINA CC10

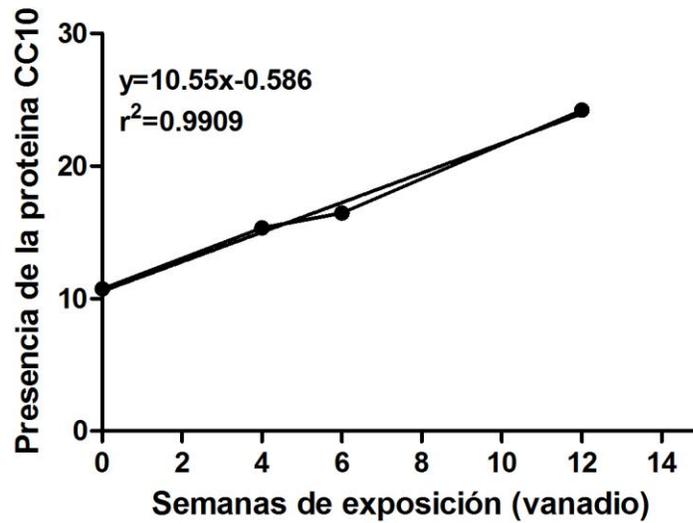


Figura 19. Regresión lineal de la exposición y la presencia de la proteína CC10. Se aprecia la correlación entre las semanas de exposición y el aumento en la presencia de la proteína CC10, con una $r^2=0.9$. Este resultado sustenta el aumento proporcional de la proteína en las células de Clara en relación con las semanas de exposición.

INMUNOHISTOQUIMICA PARA CC10 Y TINCION AB/PAS

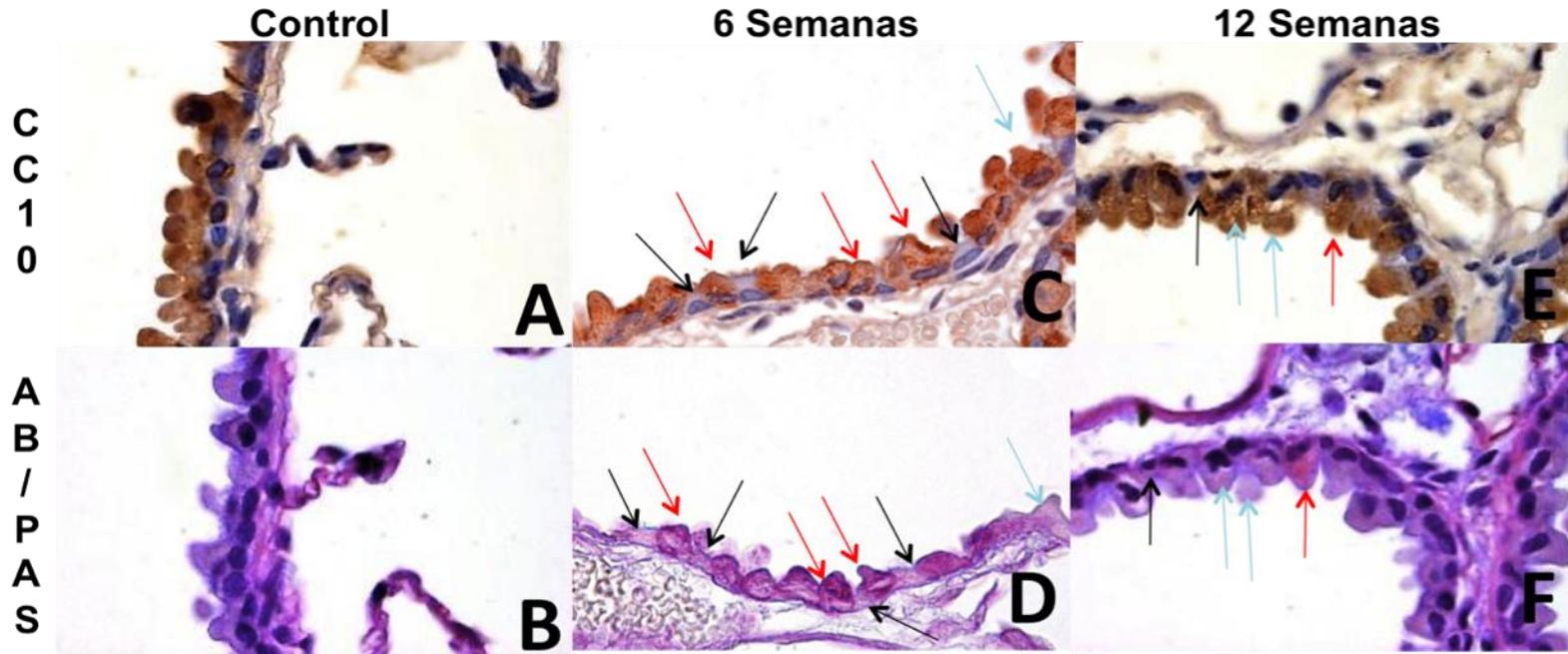


Figura 20. Inmunohistoquímica y tinción AB/PAS en cortes seriados. (A) Bronquiolo de organismo control con inmunohistoquímica (CC10). Su contraparte (B) con tinción Azul de alciano/PAS. Solo se observan células CC10 positivas. (C) Inmunohistoquímica para CC10 y su contraparte (D) en Azul de Alciano/PAS, de 6 semanas de exposición a vanadio, en ambas fotos se observan Células ciliadas (flecha negra), Células de Clara solo positivas para CC10 (Flecha azul) y Células de Clara positivas para CC10 y AB/PAS (flechas rojas). Bronquiolo de organismo expuesto a 12 semanas (E) inmunohistoquímica para CC10 y su contraparte (F) tinción AB/PAS. En ambas fotos se aprecian dos tipos celulares de Clara, Células de Clara solo CC10+ (flecha azul) y Células de Clara CC10+ y AB/PAS+ (Flecha roja) y la célula ciliada (Flecha negra). 100X.

ANALISIS ESTADISTICO DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS DOBLES POSITIVAS (CC10+ Y AB/PAS+)

PORCENTAJE DE CELULAS DE CLARA POSITIVAS PARA AB/PAS Y CC10 EN BRONQUIOLOS PULMONARES DE RATON

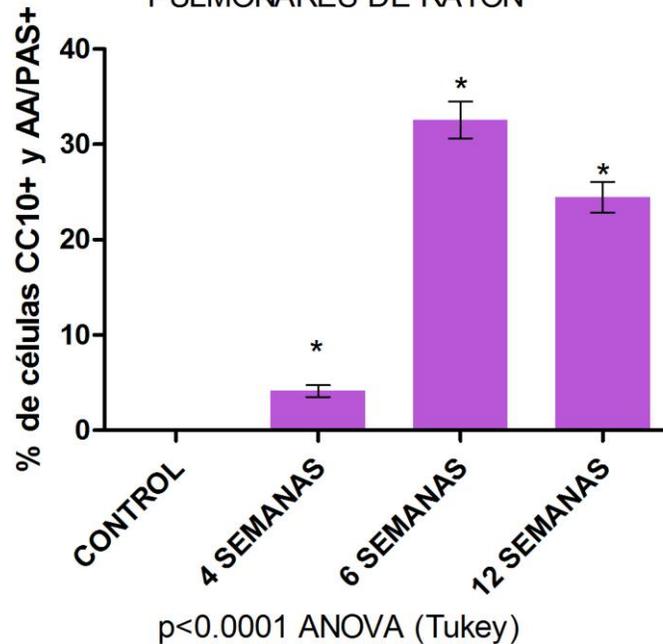


Figura 21. Porcentaje de células dobles positivas (CC10+ y AB/PAS+) en bronquiolos pulmonares de ratón después de la exposición a vanadio. La gráfica muestra en el grupo control, que no existen células positivas para los dos marcadores utilizados. Conforme aumentan las semanas de exposición a vanadio, tal es el caso de las 4 semanas, encontramos alrededor de 5% de células dobles positivas, este aumento es significativo en relación al grupo control. En el caso de las 6 semanas de exposición, aumentan considerablemente el porcentaje de células doble positivas, con respecto a las 4 semanas, y significativamente en comparación con el grupo control. Sin embargo, a las 12 semanas de exposición, el porcentaje de células doble positivas disminuye a diferencia del grupo expuesto a 6 semanas, aunque esta disminución sigue siendo significativamente alta en comparación con el grupo control.

INMUNOFLUORESCENCIA (CC10, CYP1A1 Y CYP1B1)

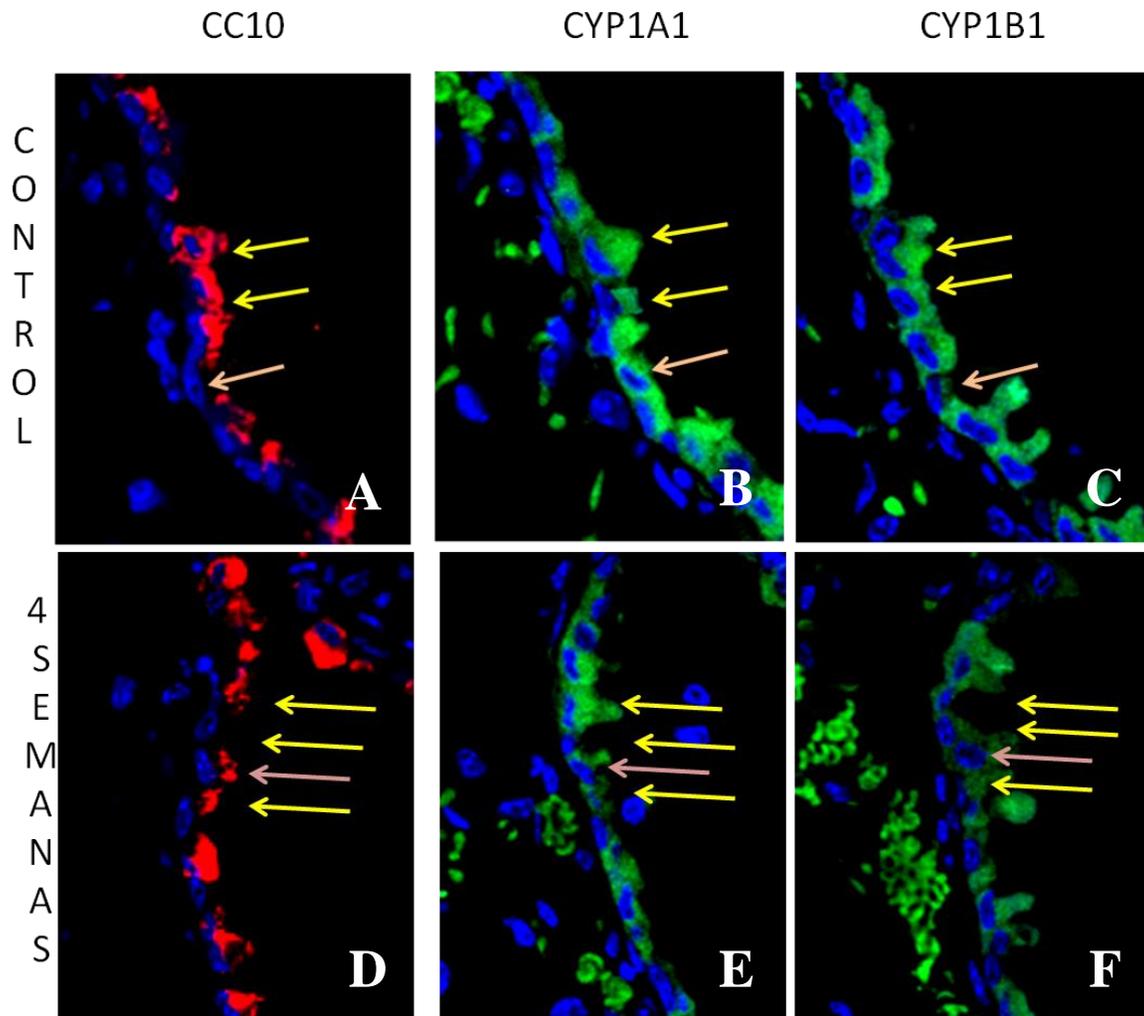


Figura 22. Inmunofluorescencia. Proteína CC10 (A), CYP1A1 (B) y proteína CYP1B1 (C) en cortes seriados. Las flechas amarillas señalan a células de Clara y las Flechas rosa señala célula ciliada. La células de Clara presentan la proteína CC10, CYP1A1 y CYP1B1, Sin embargo, las células ciliadas son negativas para CC10, aunque son positivas para los dos CYP's. Todo esto en el grupo control. Para el grupo expuesto a 4 semanas a vanadio el resultado fue el mismo, las células de Clara son positivas para CC10, y los dos CYP's (flecha amarilla) (D, E y F). Las células ciliadas son negativas para CC10 (flecha rosa) (A), pero no para los CYP's, aunque pareciera ser que contienen siempre más una isoforma que otra. 40X.

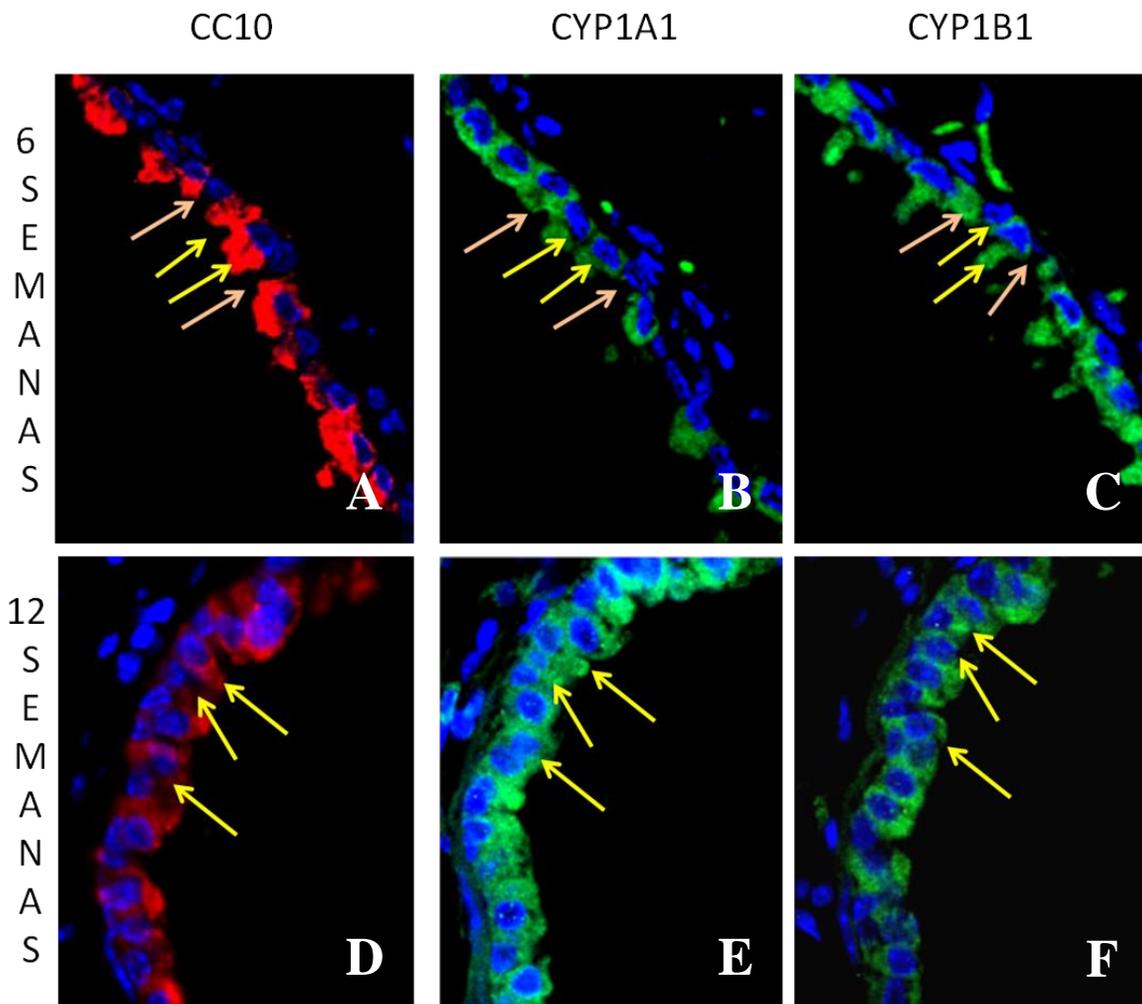


Figura 23. Inmunofluorescencia. Grupo expuesto por 6 semanas a vanadio inhalado. Proteína CC10 (A), CYP1A1 (B) y proteína CYP1B1 (C) en cortes seriados. Las flechas amarillas señalan a células de Clara, siendo positivas para CC10 (A), CYP1a1 (B) y CYP1B1 (C). Las Flechas rosa señala la célula ciliada, negativa para CC10 (A), pero, positivas para CYP1A1 (C) y positiva para CYP1B1 (C). El grupo expuesto a 12 semanas a vanadio inhalado, mostró muchas células de Clara, que son positivas para los tres marcadores, CC10 (D), CYP1A1 (E) y CYP1B1 (F) y como señalan las flechas amarillas. 40X

PRUEBA DE ACTIVIDAD PARA CITOCROMOS

ACTIVIDAD DE CYP 1A1 EN PULMON DE RATON

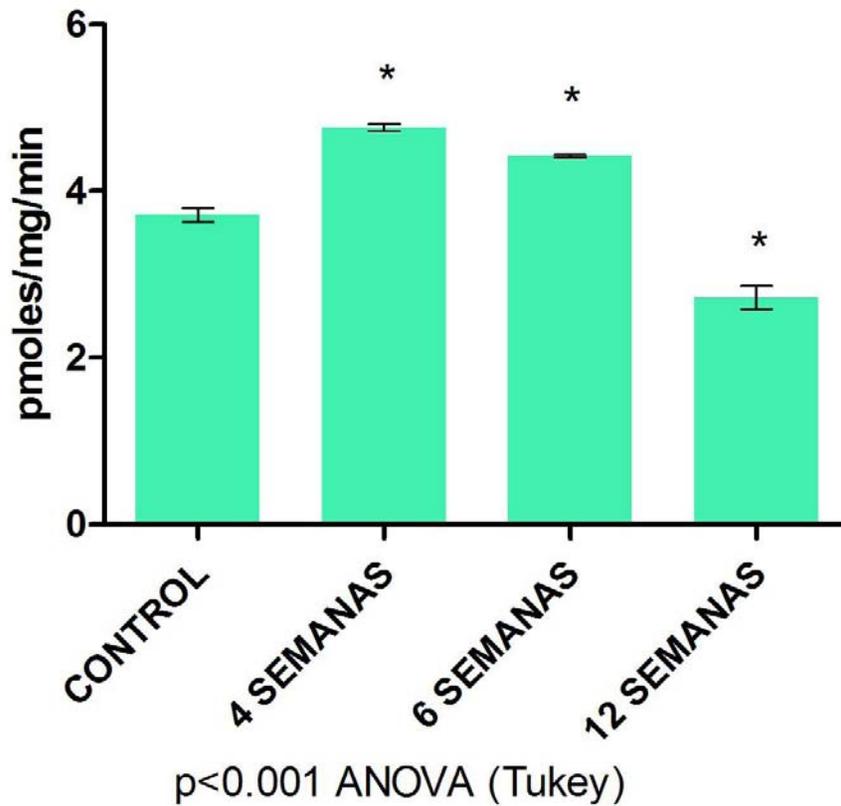


Figura 24. Prueba de actividad EROD para CYP1A1. La grafica muestra, en el grupo control la actividad basal del CYP1A1, sin embargo, a las 4 y 6 semanas aumenta significativamente con respecto del grupo control. El grupo expuesto por 12 semanas a vanadio inhalado, disminuye significativamente en relación con el grupo control.

12 DISCUSIÓN

Estudios mencionados anteriormente, han mostrado que las células de epitelio bronquiolar y en especial la CC, cambia su fenotipo, para dar origen a poblaciones celulares que son imprescindibles en los bronquiolos, tal es el caso de nuestro modelo de vanadio inhalado. En este trabajo se evidenció que la exposición a vanadio, a partir de la cuarta semana de exposición, aumenta el número de la variante de Células de Clara (vCC) mucoproductoras en bronquiolos terminales de ratón. Se ha reportado que en pulmón de ratón existen diferentes tipos de Células de Clara secretoras de proteína CC10, su función y localización depende del microambiente en donde se encuentren.

12.1 Poblaciones de la célula de Clara, proteína CC10 y vanadio

En bronquiolos proximales de ratones, las células que expresan CC10 se han reportado por producir moco en respuesta a antígenos. El epitelio bronquiolar de humano, contienen un subtipo de célula de Clara, PAS positivo, característico de células mucoproductoras y positiva para CC10 característico de este tipo celular. Aunque la regulación de las células positivas para CC10 en la metaplasia mucoide es desconocido hasta este momento. Metaplasia es el cambio reversible de un tipo de célula madura a otro debido a un estímulo ambiental (Cui et al., 2011). Aunque, en nuestros resultados, el termino metaplasia mucoide se refiere a las células de Clara (CC10+), que son positivas también para la tinción AB/PAS.

Evans et al (2004), reportó la presencia de CC positivas para AB/PAS, después de exponer a ratones a un coctel de antígenos, el resultado fue evidente en bronquiolos proximales, distales, pero no en bronquiolos terminales y unión bronquiolo-alveolar. Por lo que la producción de moco está restringida exclusivamente a vías aéreas distales, al menos en este estudio (Bronquiolos terminales y unión bronquiolo-alveolar).

En nuestro estudio, los resultados evidenciaron que las CC mucoproductoras se localizan en los bronquiolos terminales y unión bronquio-alveolar, aunque también se observaron en bronquiolos proximales, sitios en donde el número de células de Clara aumenta hasta la unión bronquiolo-alveolar (Figura 20). Sin embargo, la exposición a irritantes, tal como el cigarro o el ozono, e incluso en nuestro modelo de vanadio inhalado, es lo que causa el cambio de un fenotipo de célula de Clara a Célula de Clara mucoproductora. Inclusive, eventos inflamatorios, resultan en la sobreexpresión de más de un gen relacionado con la producción de mucinas en la CC (Evans et al., 2004). En otros estudios, se ha reportado, que los neutrófilos inducen cambios en el epitelio, resultando en metaplasia mucoide (Figura 25). Lo que es un hecho, es que nuestro modelo de vanadio inhalado, ha demostrado infiltrado inflamatorio en los animales expuestos, tales como linfocitos y neutrófilos (Falcón-Rodríguez, 2008), y no evaluado en este trabajo.

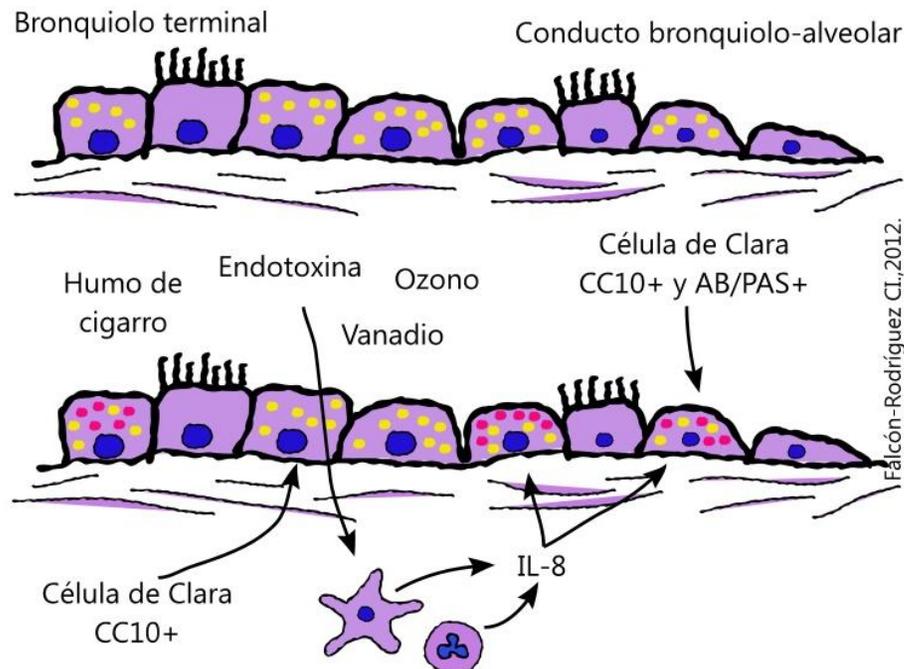


Figura 25. Poblaciones de célula de Clara. En un principio, todas las células de Clara del epitelio bronquiolar son CC10+, el cambio de fenotipo a mucoproductor, se da exclusivamente en las regiones del bronquiolo terminal y conducto bronquiolo-alveolar. Y es resultado de la exposición a agentes irritantes, tal como humo de cigarro, endotoxinas y el vanadio, los cuales generan infiltrado inflamatorio en el pulmón. El vanadio aumenta el infiltrado inflamatorio en el tejido conectivo subyacente.

Voynow et al., (2004) trataron animales con la elastasa de neutrófilos, que es una proteasa de serina, presente en cantidades nanomolares a micromolares en el líquido bronquiolo-lalveloar de pacientes con bronquitis crónica y fibrosis quística (Lundgren et al., 1994). Lo que observaron fue el aumento de neutrófilos en pulmón. Además, algunas proteasas inflamatorias, incluyendo la elastasa de neutrófilos, proteinasas de *Pseudomonas* y la catepsina G, se han reportado por estimular la secreción de mucinas en las glándulas submucosas (Voynow et al., 2004).

Dentro de las proteasas, también se encuentran las metaloproteinasas, que aumentan la expresión de genes para mucinas *in vitro*. Las proteasas de serina, específicamente la elastasa de neutrófilo y la tripsina pancreática, inducen la metaplasia mucoide en hamster. La triptasa también contribuye en modelos animales de asma (ratón) a metaplasia mucoide. El mecanismo por el cual las proteasas inducen la metaplasia aún es desconocido (Voynow et al., 2004).

Otros estudios han mostrado que las partículas inhaladas, o mediadores de inflamación pueden activar la metaplasia de estas células. Las endotoxinas inducen la metaplasia mucoide en pulmón de ratón (Yanagihara et al., 2001), y en la cavidad nasal de rata (Shimizu et al., 1996), además, puede potencializarse por la exposición a ozono en epitelio bronquiolar de rata. Las toxinas ambientales pueden estimular la remodelación de las vías aéreas (aumento de músculo liso, aumentos de producción de sustancias mucoides y vascularización) y las células pueden comenzar a secretar moco, además, existe la asociación entre la producción de moco y la respuesta inflamatoria (Yanagihara et al., 2001). En general, la elastasa de neutrófilo, estimula la secreción de mucinas e incrementa la expresión de genes de mucinas (Voynow et al., 2004).

El humo de cigarro y la acroleína, incrementan la expresión de glucoproteínas (moco) en vías aéreas de ratón y rata (Voynow et al., 2004). En bronquiolos, observaron que la elastasa de neutrófilos produce metaplasia de células mucoproducidas, y este cambio estaba restringido a las vías proximales,

en estas regiones se encontraron células PAS positivas, que probablemente están relacionadas a los diferentes microambientes del tracto respiratorio. Aunque la producción de moco se ha considerado una alteración de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). En estudios reciente se ha estudiado la importancia del tabaco u otros componentes como la acroleína, los cuales están sumamente relacionados con la activación del factor del receptor de crecimiento epidermal EGFR (Kim et al., 2002). y las MAPK, por lo que, estarían jugando un papel importante en la producción de moco (Yu et al., 2011).

En experimentos *in vitro* (células NCI-H292), el ligando de EGFR induce la expresión de proteína y gen CC10. También IL-13 estaría induciendo la expresión de CC10 por un mecanismo indirecto, relacionado con el reclutamiento de neutrófilos y subsecuente expresión, además de la activación de EGFR. En ratas libres de patógenos o cualquier otro compuesto, se relaciona este cambio por la activación del EGFR y subsecuente fosforilación corriente debajo de moléculas como Ras, Raf, MAP cinasas y P44/42 MAP cinasa (Kim et al., 2002).

En pacientes asmáticos, la inflamación de la vía aérea y la hiperreactividad bronquial a diversos estímulos produce inflamación, en la cual participan infinidad de tipos celulares y numerosos mediadores de inflamación, aunque la participación de los linfocitos T cooperadores de tipo (Th2), puede ser crítica en esta enfermedad. Las citocinas que producen los linfocitos de tipo Th2, que secretan IL-4, y estimula la producción de IgE, la IL-5 activa eosinófilos y la IL-13 estimula la producción de moco, activa la síntesis de mucinas (Kumar et al., 2008).

La IL-13 induce metaplasia mucoide en vía área de rata, por mecanismos indirectos, relacionados con el reclutamiento de neutrófilos y subsecuente activación de EGFR (Kim et al., 2002). También se ha observado que la instilación de IL-13 en ratones estimula la presencia de mucinas en la célula de Clara (Evans et al., 2004). Por otra parte, los niveles de la proteína CC10 están regulados por los niveles de Interferon gama (IFN-g), esto se ha observado, en modelo murino, en los cuales la administración de IFN-g, en dosis de 10^3 U/ml por la vía

intratraqueal, incrementaban la expresión del RNAm de CC10, en comparación con los ratones controles (administración de solución salina) (Magdaleno et al., 1997). Aunque en reportes de exposición a vanadio, éste inhibe la producción de IFN-g (Coehn et al., 1996).

Las Partículas Suspendidas Totales (PST) estimulan mediadores inflamatorios por activación de señales celulares que dirigen el aumento o disminución en la expresión de genes. La reactividad de las partículas se debe en gran parte a la capacidad de generar ROS, los cuales activan a el receptor de Tirosina cianasa, MAPK y el factor de transcripción NF-kB y STAT-1 (Bonner et al., 2007). El receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) es el mayor blanco de la activación por partículas (Bonner et al 2000). ROS inhiben la fosfatasa de tirosina (PTP), asociada con el dominio intracelular de EGFR. La inactivación de PTP resulta en la fosforilación corriente debajo de las MAPk (Bonner et al., 2007).

Por otra parte, el vanadio es capaz de producir Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), y mediante señalizaciones se ha relacionado con la producción de mucinas en las células (Yu et al., 2011). Tal es el caso del peroxovanadato, es estructuralmente similar a la molécula de fosfato y actúa como un potente inhibidor irreversible del PTP. A través de la inhibición de PTP, el vanadio activa a EGFR vía ligando independiente. La activación resulta en la activación de MAPK, como se mencionó anteriormente. La MAPK, juegan un papel importante en el crecimiento celular, desarrollo y diferenciación (Davis et al 1995). El vanadio es un fuerte activador de NF-kB y STAT-1, el cual media la producción de citocinas pro inflamatorias y apoptosis. También se activa NF-kB en el epitelio respiratorio. La exposición a ROFA (Partículas de residuos de combustibles) incrementa la producción de citocinas de respuesta Th2, reclutamiento de eosinófilos e hiperrespuesta en ratones sensibilizados con ovoalbúmina (Gavett et al., 1999).

En el caso de las partículas productos de la combustión del diesel (DEP), aumentan la producción de citocinas de respuesta Th2, incluyendo IL-13, éste a su vez estimula la expresión de TGF-b1, un potente estimulador de la producción de

colágeno (Lee et al., 2001; Bonner et al., 2007), y reportado en otros modelos de exposición a vanadio. Respuesta que nuestro grupo de trabajo no ha encontrado hasta la fecha. El vanadio es capaz de activar la interleucina IL-8, a su vez activa a neutrófilos, los cuales se adhieren en el epitelio, para dar lugar a una cascada de señalización que resulta en la metaplasia mucoide, probable inducción mediante la elastasa de neutrófilo (Kim et al., 2002).

Por otro lado, Yu et al., (2011), usando a ratones hembra de la cepa AKR (6-8 semanas de edad). Se les administró pentóxido de vanadio (V_2O_5) 4 mg/kg de peso del animal, en dos tiempos (día 1 y día 7), vía instilaciones laríngeas y sacrificadas a los 8 días. Los resultados mostraron infiltrado inflamatorio y las células de los bronquiolos fueron positivas para AB/PAS.

Sin embargo, en este experimento probaron si existe alguna implicación de la vía EGFR-MAPK, encontrando que, la producción de moco es independiente de esta vía en cultivo de células NCI-H292, las cuales fueron tratadas con 200ml de pentóxido de vanadio. Pero, explorando la vía RAF1-IKK-NF-kB, usando inhibidores para algunas proteínas cinasas, tal como PKA, PKG, PKC, y concluyeron que, solo NF-kB y RAF1 inhibido, son capaces de inhibir de manera significativa la expresión del gen de mucinas MUC5AC (Figura 26) (Yu et al., 2011).

Otro evento indispensable para la producción por parte de las células de moco, es la glucosilación de proteínas, llevado a cabo en el aparato de Golgi, e implicado en el tráfico vesicular y la secreción de este material (moco). Aunque, se necesitan de otros tipos de proteínas como, las proteínas SNARE, que son receptores de membrana internos y sirven para que la vesículas se anclen y puedan fusionarse a través de otra proteína, la RabGTPasa, que ayuda en la fusión de la vesícula a la membrana (Davis y Dickey., 2008).

En realidad, se necesitan muchas proteínas para generar a una célula mucoprodutora, sin embargo, existen un grupo que son indispensables. La

fosfolipasa C (PLC), que hidroliza al PIP₂, para generar dos segundos mensajeros, 1,2 diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Lodish et al., 2005). En (Davis y Dickey., 2008). Por lo que PLC juega un papel importante en la regulación de secreción de mucinas (Figura 26).

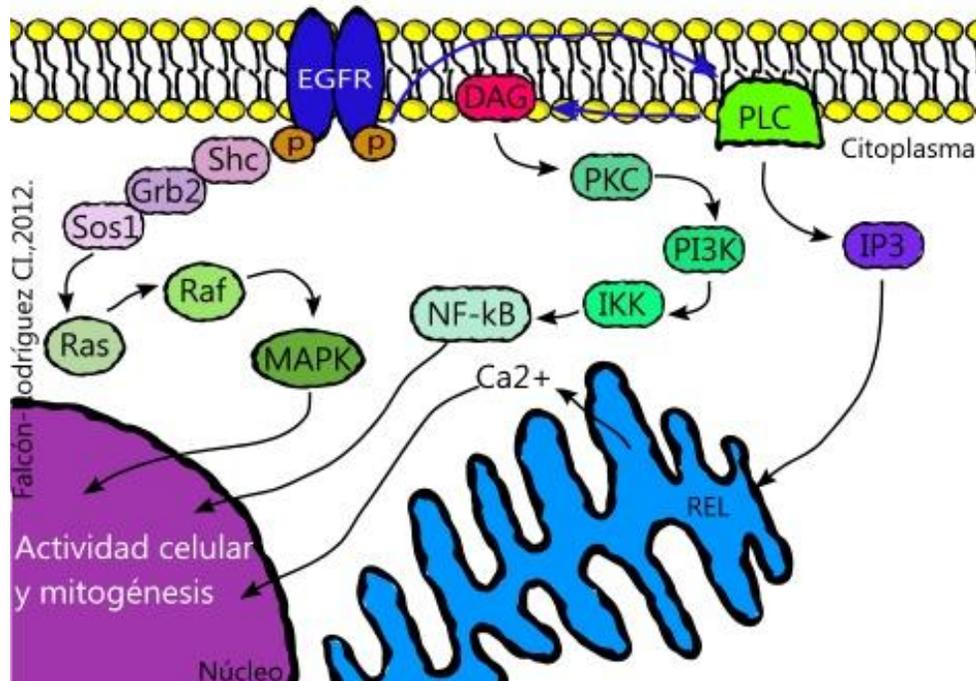


Figura 26. Mecanismo de acción celular utilizado por el vanadio y relacionado con el cambio de fenotipo a mucoprodutor. Normalmente el Factor de crecimiento epidérmico (EGFR), fosforila Ras, RAF y a las MAPK, las cuales están implicadas en la diferenciación celular, crecimiento etc. Sin embargo, Este mismo receptor activa a la fosfolipasa C (PLC, la cual genera DAG y IP₃. Este último regula la salida de Calcio desde el Retículo endoplásmico liso (REL), y que es necesario para el transporte vesicular dentro de las células. Por otra parte el DAG, activa a la proteína cinasa C, y activa a PI3K e IKK, para activar a NF-kB, Tanto las MAPK, Calcio y NF-kB, regulan la actividad celular y mitogénica. Por otra parte, el peroxovanadato, es similar al fosfato. El cual puede encender a EGFR y comenzar con toda la cascada de señalización. Sin embargo, se sabe que el vanadio enciende o activa a MAPK o podría activar a NF-kB, mediante la fosforilación de PKC. Cualquier vía utilizada por el vanadio, con o sin EGFR, conlleva a la fosforilación de proteínas relacionadas con el cambio de fenotipo a células de Clara mucoproducidas.

Es importante reconocer el papel que mantiene la proteína CC10 de las células de Clara, ya que es un potente inhibidor de la fosfolipasa A₂ y la fosfolipasa C (PLC), las cuales pueden regular una serie de reacciones inflamatorias (Mantile et al., 1993; Shijubo et al., 1997) que afectan a los

pulmones. Interesantemente, nuestros resultados muestran, que la mayor presencia de CC10 se encontró en el grupo expuesto a vanadio inhalado por 12 semanas (Figura 17, 18 y 19), en contraste, el porcentaje de células doble positivas (AB/PAS+) disminuye a las 12 semanas (Figura 20 y 21).

Es un hecho que la proteína CC10 estaría inhibiendo a la PLC, esto a su vez al DAG y Ca^{2+} intracelular, por lo que la producción de mucinas en las células de Clara estaría a la baja en nuestro modelo. Sin embargo, este evento solo perjudica el transporte vesicular y no la producción de sustancias para exportar como el moco producido. En nuestros resultados, se observa una disminución en el número de células de Clara mucoproductoras a las 12 semanas de exposición a vanadio inhalado, sin embargo, no sabemos si esta repercusión es a nivel del transporte vesicular.

Biológicamente, los animales tienen glándulas submucosa pero, están restringidas en la cavidad nasal y tráquea, pero, en vías aéreas bajas como los bronquiolos, carecen de glándulas, esta función estaría compensándola la célula de Clara mucoproductora, en respuesta a algún tipo de daño o exposición a la que el organismo estuviera expuesto (Davis y Dickey., 2008)

Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, la proteína CC10 exhibe efectos antiinflamatorios por la inhibición de la fosfolipasa A y C (Mantile et al., 1993; Shijubo et al., 1997), que están sumamente ligados a modelos alérgicos y enfermedades inflamatorias en respuesta a ovoalbúmina. CC10 puede modular directamente la respuesta a citocinas, específicamente de células Th2 (Hung et al., 2004). Aunque IL-13 solo, no afecta la expresión de CC10 en el epitelio de las vías aéreas, se sugiere que puede ocurrir por mecanismos indirectos relacionados con EGFR.

En contraste con modelos alérgicos crónicos, la inflamación aguda inducida por instilación de lipopolisacáridos (LPS) en ratas, disminuye la presencia de CC10 en células epiteliales de los bronquiolos, y también disminuye la proteína

CC10 en BALF (Lavado de fluido bronquiolo-alveolar), y aumenta en suero (Arsalane et al., 2000). La presencia en el plasma sanguíneo de CC10 se ha mostrado en humanos expuestos a LPS (Michel et al., 2005). Los cambios en la proteína CC10 son un indicador de la integridad de la barrera epitelial, aunque puede ser detectada o monitoreada en sangre y en fluidos de los pulmones, como el lavado bronquiolo-alveolar (Bolton et al., 2008).

La inhalación de vanadio aumenta de manera significativa los niveles de la proteína CC10, en las células de Clara del epitelio bronquiolar, como se observan en nuestras imágenes, la densitometría y con una correlación lineal $r^2=0.9909$ entre el tiempo de exposición y la presencia de la proteína CC10 (Figura 17,18 y 19), por lo que en nuestro modelo de inhalación de vanadio aumenta la proteína CC10, además de ser usado como biomarcador de exposición.

En todos los casos en los que la proteína CC10 aumenta su concentración o presencia, permite modelar la respuesta inmune dentro del pulmón. Además, el aumento en la síntesis podría estar relacionado con la diferenciación *de Novo* por parte de las células de Clara en el epitelio bronquiolar (Figura 27), y junto con cambios morfológicos, como aumento del Retículo Endoplásmico Liso, podrían ayudar en el proceso de detoxificación (Elia et la., 1999).

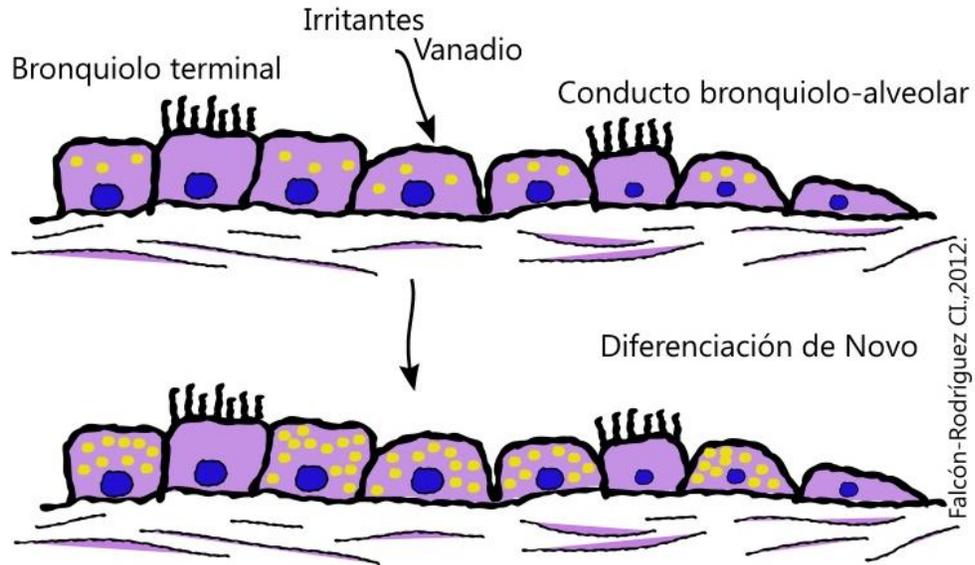


Figura 27. Proteína CC10 como biomarcador de exposición. La exposición de vanadio o algunos irritantes, aumenta la presencia de proteína dentro de las células de clara del bronquiolo.

La diferenciación de CC a células mucoproductoras, resulta en cambios histopatológicos. Aunque las características moleculares y funcionales de la célula de Clara con metaplasia mucoide están sujetas a funciones de células mucosas comunes, incluyendo la expresión de genes asociados con la producción de proteínas apicales, tal es el caso de CC10 comparado con cambios globales en el fenotipo durante la metaplasia mucoide, en la cual un tipo celular muestra diferentes estructuras, función y amplios cambios en la expresión de genes, en comparación con células normales presentes en el epitelio. Por otra parte, la disminución de las células de Clara mucoide a través del tiempo, es un evento que no tiene explicación hasta estos momentos. No se sabe si, una misma célula con fenotipo de célula de Clara (CC) que se transformo a célula de Clara mucoproductora o una variante (CCv), se revierta, tal es el caso de la metaplasia, o si la célula muera por apoptosis, y la “stem cell” diera origen a células de Clara nuevamente (Figura 10) (Evans et al.,2004).

También, lo que observamos en nuestro modelo, es que, las células de Clara mucoproductoras se ubican en los bronquiolos terminales y unión

bronquiolo-alveolar. Esto nos sugiere que, son variantes de célula de Clara (vCC) resistentes a Naftaleno, como lo han demostrado estudios anteriores. También, proliferan después del daño. Además, en la unión bronquiolo-alveolar existirían células “Stem cells”, que estarían auto renovando las células del epitelio bronquiolar (Figura 9).

Lo que es claro, es que los irritantes y en este caso el vanadio, aumentan los niveles de CC10, el cual estaría modulando la respuesta inmune, además de que podría estar implicada en la diferenciación de las células de Clara a Células de Clara mucoproducidas. El mecanismo por el cual, esta población se convierte a mucoproducidas es un poco complejo, debido a los pocos estudios que han tratado de dilucidar este evento. Es claro que el vanadio interactúa con muchas proteínas, sin embargo, las vías concretas que activa el vanadio y como mencionamos anteriormente, Raf y MAPK, que juegan un papel importante en la vida celular, así como en su diferenciación.

12.2 Pulmón, vanadio y Citocromo P450

En los últimos años se han realizado estudios sobre la actividad o la cantidad de proteína de citocromo P450 y la relevancia que tienen en sistemas vivos o *in vitro*. Todos los artículos sobre citocromos están realizados en hígado, ya que es el órgano que contiene alta cantidad de CYP 450. Existen pocos artículos relacionados a este tema, pulmón y metales.

Tanto el CYP1A1 y el CYP1B1, exhiben alta especificidad para ser activados con dioxinas o hidrocarburos aromáticos. Su forma de activación está mediada por el receptor de hidrocarburos aromático (AhR), que se encuentra en el citoplasma de la célula. Además, contiene dos HSP90, que interactúa con una co-chaperona p23 y una proteína inmunofilina XAP2 o AIP. Una vez que el ligando se une con AhR, este migra al núcleo, en donde se une al translocador del receptor de hidrocarburos aromáticos (ARNT), formando un heterodímero, que interactúa con secuencias reguladoras consenso, tal como los elementos de Respuesta a

Xenobioticos (XRE), para producir CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 (Figura 28) (Vrzal et al., 2004; Ioannides., 2008; Androutsopoulos et al., 2009).

Usualmente, las moléculas planas, son las que se unen fielmente al AhR, y activan la cascada para producir CYP1A1 (Denison y Nagy., 2003), sin embargo, los metales no muestran esta conformación, aun así, pueden aumentar o disminuir la actividad o cantidad de la proteína o algunas familias son utilizadas para el marcaje de poblaciones de Célula de Clara.

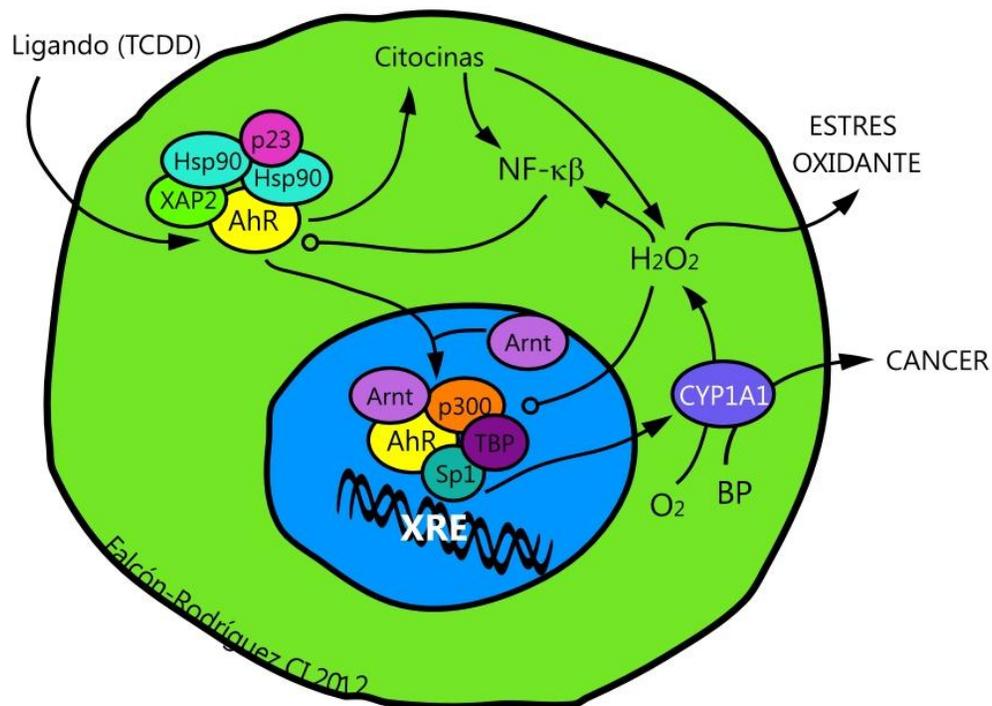


Figura 28. Ruta de activación del CYP1A1 en respuesta a dioxinas. Representa el modelo básico de eventos moleculares, cuando el ligando se une con el receptor, se disocian las demás proteínas. Forma el heterodímero AhR-ARNT, para migrar al núcleo. En el núcleo, se inicia la transcripción de genes, con la interacción de factores de transcripción tal como Sp1 y co-activadores como p300 y p/CIP, el cual eventualmente dirige a la unión de TBP (Proteína de unión a TATA box, y subsecuente reclutamiento de RNA polimerasa II. Así produce CYP1A1.

Como mencionamos anteriormente, las “Stem cells” en bronquiolos, y que también son positivas para CC10, muestran un fenotipo diferente que les confiere

cierta protección; además, tienen una característica particular, no contienen CYP2F2, por lo cual no metabolizan al naftaleno y no se observan efectos tóxicos en estas células.

Sin embargo, en nuestro experimento realizado con cortes seriados y observados al microscopio confocal, para las tres proteínas, CC10, CYP1A1 y CYP1B1, no hay diferencias que demuestren poblaciones en las células de Clara, con lo anterior se evidenció que todas las células de Clara CC10+, también son positivas para CYP1A1 y CYP1B1, por lo que, descartamos a estas dos isoformas de CYP450 como marcador poblacional (Figura 22 y 23). Por otro lado, la presencia de la marca en la inmunohistoquímica, dió como resultado el aumento a tiempos corto (exposición subaguda) y el decremento de CYP1A1, en tiempos largos de exposición (exposición crónica).

Existen pocos estudios relacionados con metales y citocromo P450, sin embargo el CYP mas usado es el CYP1A1 y en algunos casos CYP1B1, sin que tenga mayor implicación biológica, como el primero.

Todos los metales son originados por dos fuentes, la natural o la antropogénica. El primer reporte de un metal y CYP fue realizado por Falkner et al., (1993) utilizando cobayos, se les administro una inyección subcutánea de arsenito de sodio (75 mmmol/kg). Lo que observaron es que, la exposición de arsenito inhibe la actividad de CYP1A1 en todos los tejidos, pero en pulmón ha sido poco estudiado. Sin embargo, la actividad aumenta después del tratamiento con arsenito en pulmón tratado con b-naftoflavona (b-NF), otro inductor de CYP1A1, también en cobayos, mientras que la actividad disminuye en riñón e hígado de estos mismo animales.

Otro metal importante es el mercurio (Hg^{2+}), ya que es un contaminante marino. Vakharia et al., (2001), realizaron el primer experimento sobre mercurio y CYP, mostrando que es un potente inhibidor de la actividad del CYP1A2, en hepatocitos humanos aislados. En otros experimentos en los mismos hepatocitos

de humano se indujo la actividad de CYP1A1, con PAH, pero se inhibió ésta con el tratamiento de mercurio. Pero, en especies acuáticas, el mercurio incrementa los niveles de proteínas en células de glándula rectal de tiburón (Ke et al., 2002; Anwar-Mohamed et al., 2009), sin embargo, en hígado de lubina, el mercurio disminuye la inducción del CYP1A1, tratado con b-NF, (Oliveira et al., 2004; Anwar-Mohamed et al., 2009).

Además, utilizando cultivos primarios de hepatocitos y expuestos a Cd^{2+} , la actividad del CYP1A1 disminuyó. Sin embargo, utilizando ratas macho. Se les administro una sola dosis de Cadmio intraperitoneal ($3.58 \text{ mg CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O/kg}$) 72 horas antes de sacrificarlos. La actividad testicular del CYP1A1 disminuye significativamente (Iskan et la., 2002), pero en hígado aumenta la actividad (Anwar-Mohamed et al., 2009). Por otra parte a los animales, administrados con una sola dosis intraperitoneal de Níquel ($59.5 \text{ mg NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O/kg}$) 16 horas antes de sacrificarlos, disminuye la actividad del CYP1A1 (Iskan et la., 2002). Así mismo, combinaron los metales, los animales recibieron la inyección de níquel 56 horas después de inyectarlos con cadmio, 16 horas más tarde. El resultado fue la inhibición del CYP1A1, similar al modelo de cadmio solo (Iskan et la., 2002). Lo mismo ocurre con la administración de Plomo (Pb^{2+}) en línea celular HepG2 o Hepa1c1c7 o en cultivo primario de hepatocitos de humano ((Anwar-Mohamed et al., 2009). En peces antártico (*T. bernacchii*), cuya co-exposición fue con BaP y Cadmio y cobre, se observo la disminución de la actividad CYP1A1 de hígado, pero, este efecto no se observo con la co-exposición de níquel, mercurio y plomo (Benedetti et al., 2007).

Por otra parte, existe muy poca información disponible sobre vanadio y la función o expresión del CYP1A1. (Anwar-Mohamed et al., 2008), utilizando la línea celular Hepa1c1c7, tratadas con metavanadato de amonio (NH_4VO_3) a diferentes concentraciones (25–250 mM), en presencia de TCDD (1nM). Los resultados mostraron que el RNAm del CYP1a1, utilizando PCR de tiempo real, aumenta cuando las células se tratan con TCDD, pero cuando se usa la mezcla, disminuye a partir de la concentración de 25 mM hasta la de 250 mM de vanadio.

Para corroborar si la observación de la inhibición mediante la inducción de RNAm, se realizó la prueba de actividad CYP1A1, en Hepa1c1c7, tratadas 24 horas con incremento de concentraciones de vanadio, en presencia de TCDD. Los resultados mostraron que el TCDD solo causa el aumento (20 a 35 veces), respecto del control. Además, usando la mezcla Vanadio (25, 50, 100 y 250 mM)+TCDD (1nM). Aun con la inducción del CYP1A1 con el TCDD, el vanadio disminuye la actividad de CYP1A1 conforme aumenta su concentración.

Nuestros resultados evidencian por medio de la inmunohistoquímica, realizada para CYP1B1, que la marca en el ápice de las células de Clara de los bronquiolos, aumentó a partir de las 4 semanas y se mantuvo hasta las 12 semanas de exposición a vanadio inhalado (Figura 15 y 16). Sin embargo, el resultado para el CYP1A1 fue diferente, además de tener mayor presencia de proteína en comparación con CYP1B1. Se observa a partir de las 4 y 6 semanas de exposición el aumento significativo, pero, a las 12 semanas, la presencia de la proteína disminuye en comparación con el grupo control (Figura 13 y 14).

En el caso de nuestros resultados para la prueba de actividad para CYP1A1 (EROD), mostró que a las 4 semanas de exposición a vanadio, la actividad aumenta en comparación con el control. Pero, a las 6 semanas, comienza a disminuir a las 12 semanas, esta disminución es significativa respecto al control (Figura 24). Mismo resultados que concuerda con la inmunohistoquímica realizada en bronquiolos pulmonares para CYP1A1 (Figura 15 y 16). Este resultado indica que a mayor capacidad de acumular vanadio en el pulmón, disminuye la presencia y actividad para CYP1A1.

Anwar-Mohamed et al., (2008) realizaron varios experimentos, para dilucidar el mecanismo por el cual el vanadio inhibe la actividad del CYP1A1. La primera pregunta fue, si el cambio observado era AhR dependiente de ligando. Las Células Hepa1c1c7, fueran transfectadas con el gen de luciferasa del translocador a XRE. Lo que observaron fue, que el TCDD solo, es capaz de causar de manera significativa la actividad de luciferasa. Sin embargo, el

tratamiento de vanadio+TCDD, disminuye significativamente la actividad de luciferasa con respecto al tratamiento de TCDD solo. Por otra parte, se reportó que el vanadio solo, no induce el complejo AhR/ARNT/XRE, comparando con el tratamiento de TCDD solo, que sí induce a este complejo. Además, el vanadio no inhibe la transformación inducida de TCDD del complejo AhR/ARNT/XRE. El vanadio no altera la estructura del AhR. También reportaron que la vida media del RNAm del CYP1A1 no se altera, indicando que la disminución de este CYP, no es consecuencia de su degradación. Por otro lado, la vida media de la proteína no se altera con el tratamiento de vanadio, por lo que no existen cambios post-transcripcionales. Por lo que concluyen en sus resultados que el vanadio inhibe el proceso de traslocación del AhR.

También se ha reportado que los metales pesados afectan el grupo hemo de los CYP's, a través de la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (Korashy and El-Kadi, 2005; Elbekai and El-Kadi, 2007). HO-1, es una enzima de 32 kDa. Su función es catalizar la conversión del grupo hemo a bilis o biliverdina, el cual juega un papel importante en la protección de células en contra del daño oxidante, tal como los radicales libres (Marilena., 1997).

La línea celular Hepa 1c1c7, tratada con arsénico (As^{3+}), mostró el aumento del RNAm de HO-1 (Elbekai y El-Kadi., 2005). Desde los primeros estudios por Falkner et al., (1993), se sospecho que la inhibición de la actividad de CYP1A1 tenía relación con la degradación de su contenido hemo a través de la inducción de HO-1. Esta disminución en la actividad del CYP1A1 coincide con el incremento en el RNAm de HO-1 (Elbekai y El-Kadi., 2005). En contraste, el cadmio incrementa la estabilidad de la proteína, y disminuye la inducción del ligando (TCDD) con el AhR, lo mismo concuerda con el aumento el RNAm de HO-1. La inhibición ocurre por estímulo del incremento del RNAm OH-1 (Vakhari et al., 2001).

(Anwar-Mohamed et al (2008). Realizaron experimentos para tratar de observar si la exposición al vanadio tenía alguna implicación sobre HO-1. Trataron

a hepa1c1c7 con 50mM de vanadio y mezcla de TCDD 1nM. Los resultados probaron que el TCDD no afecta al RNAm de OH-1. Para la co-exposición vanadio+TCDD, no se alteró significativamente el RNAm OH-1. También fue medido el contenido total del grupo hemo en hepa1c1c7 después del tratamiento de 24 horas con 50mM y 1nM de TCDD. Los resultados mostraron que esta concentración es capaz de disminuir el total de hemo celular. También reportaron que la ecto-ATPasa, aumenta en las células tratadas con TCDD, pero, con la mezcla, disminuye significativamente. Ecto-ATPasa, es una enzima responsable de la conversión de ATP y ADP a AMP, necesario para llevar a cabo el desplazamiento de AhR (Anwar-Mohamed et al., 2008). Además, se ha reportado que la translocación de AhR al núcleo es ATP-dependiente (Wang and Safe, 1994).

En nuestro modelo de inhalación de vanadio y como lo mencionamos anteriormente, se observa el aumento en presencia (Figura 13 y 14) y en actividad para CYP1A1, a las 4 semanas de exposición a vanadio inhalado (Figura 24). Claramente, el vanadio no demuestra una estructura química plana, por lo que el aumento observado en el experimento anterior sugiere una vía de activación independiente del ligando de receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR).

Es conocido que el AhR, es capaz de ser activado y translocado dentro del núcleo vía ligando dependiente (De pascale et al., 2009) (Figura 28). También se ha reportado que el complejo AhR-ARNT es fosforilado (Chen et al., 1996). En estudios *in vitro*, se evidenció que la inhibición de PKC, mediante GU109203X, Gö 6983 y Gö 6976, bloquean la actividad de esta proteína en concentraciones independientes de las necesarias para inhibir la inducción de CYP1A1 por TCDD (De pascale et al., 2009). Por otro lado, la inhibición de PCK, inhibe la unión del dímero AhR-ARNT al DNA, suprimiendo el gen CYP1A1 (Puga et al., 2009).

Por otra parte, trabajando con la línea celular Cos-7, a la que se le administraron 40mg de SB203580, un potente inhibidor de MAPK (P38), el

resultado fue la retención del AhR en el citoplasma. La administración del inhibidor de MAPK (P38) y con previa inducción con TCDD, se observa que suprime el RNAm del CYP1A1 (Shibazaki et al., 2004). Usando los inhibidores de MAPK (P38) SB203580 y SB202190, también se observó que la inducción del CYP1A1 mediante TCDD en células Hepa-1 y HEPG2 se suprime (Puga et al., 2009).

Se ha reportado que los componentes del vanadio activan a las MAPK, (P38, JNK y ERK). JNKs y P38, mediante señales en respuesta a citocinas y estrés ambiental, mientras que ERK activa a factores de crecimiento como PDGF y el EGF. La activación de ERK-1/2 estimula varios tipos celulares, que requieren activación secuencial de RAS RAF y MAPK (Figura 26) (Wang y Bonner., 2000; Wang et al., 2003). Sin duda, el AhR es activado por la unión a su ligando, pero, la naturaleza del mecanismo de activación de AhR, sugiere que es capaz de ser translocado al núcleo en ausencia de ligando (Shibazaki et al., 2004).

Probablemente, en nuestro modelo, de vanadio inhalado, el vanadio esté asumiendo la activación de las MAPK. Por lo que, en ausencia de ligando, el receptor sería fosforilado y se formaría el dímero AhR-ARNT, uniéndose a los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE). Por otro lado, se ha visto que la ruta que siguen los metales, es capaz de encender a dos co-activadores, tal como CBP y P300, necesarios para activar el gen de CYP1A1. En general los metales activan diferentes vías, pero el vanadio, es capaz de activar varias (Figura 29).

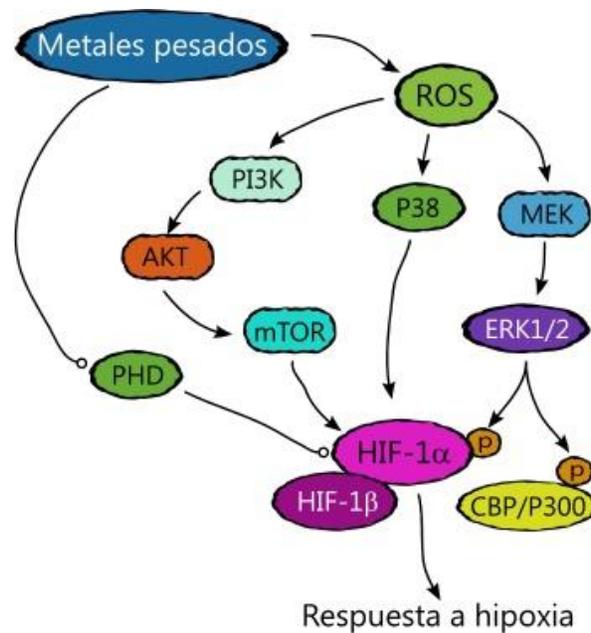


Figura 29. Diferentes metales, activan diferentes proteínas, sin embargo, el vanadio activa a todas las rutas. ERK 1/2, activa a dos co-activadores importantes, que son necesarios para activar la transcripción de CYP1A1. También el vanadio es capaz de activar MAPK (P38), este a su vez, activa al Factor de hipoxia 1a (HIF-1a). Modificado de Galanis et al., 2009.

También se ha visto que el vanadio genera ROS, las cuales causan la activación y expresión de HIF-1a (Galanis et al., 2009). Recientes estudios han demostrado que ARNT es idéntico a HIF-1b. ARNT/HIF-1b son capaces de dimerizar con HIF-1a y unirse a elementos de respuesta a hipoxia y modular la expresión de genes que regulan el oxígeno (Zhang y Walker., 2007). Se ha observado, que la combinación de ambos tratamientos, hipoxia y xenobióticos; AhR y HIF-1a pueden competir por el reclutamiento de ARNT (Carriere et al., 1998).

(Zhang y Walker., 2007) concluyeron que la hipoxia reduce la expresión basal del RNAm de CYP1A1, se estableció que la hipoxia inhibe la inducción de CYP1A1 AhR dependiente de ligando exógenos. El efecto de la hipoxia sobre la expresión basal del CYP1A1 ha sido reportado en algunos estudios. La hipoxia reduce los niveles de RNAm de CYP1A1 en hepatocitos, pero, lo induce en MCF-1 y en Caco-2 (enterocitos) (Carriere et al., 1998). En modelos *in vivo*, la hipoxia

reduce la expresión de CYP1A1. En conejos expuestos a 10% de O₂ por 24 horas, muestran una reducción en la actividad del CYP1A1, proteína y RNAm (Fradette et al., 2007). Este estudio demuestra que la hipoxia reduce la expresión constitutiva de CYP1A1 en endotelio pulmonar, tanto *in vivo* como *in vitro* (Zhang y Walker., 2007).

Es notable que la exposición a oxígeno, también llamada hiperoxia es capaz de inducir CYP1A1 en endotelio pulmonar *in vivo*, además, otros estudios han mostrado que la inducción protege al pulmón de la hiperoxia. También se sabe que este aumento requiere mecanismos relacionados con AhR para incrementar el CYP1A1, en hígado y pulmón (Moorthy et al., 2000; Jinag et al., 2004).

Tratamiento en ratones silvestres con inhibidor de CYP o en ratones nKO para AhR a hiperoxia, resulta en el aumento significativo de daño por hiperoxia, este resultado, demuestra que la hipoxia reduce la expresión de CYP1A1, y sugiere que AhR puede jugar un papel importante en la regulación a cambios en oxígeno por regulación de CYP1A1 en pulmón (Zhang y Walker., 2007).

El tratamiento de CoCl₂ sobre CYP1A puede ser explicado con las bases de la estabilidad de HIF-1a, resultando en la disminución del heterodímero AhR-ARNT y la reducción de CYP1A1/1A2 (Chan et al 1999)

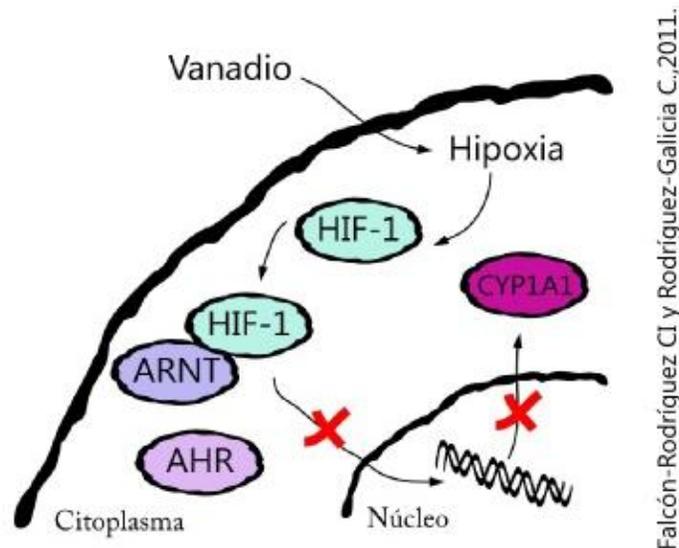
Se ha observado que el AhR inhibe la interacción del heterodímero HIF1a-ARNT con elementos de respuesta a hipoxia. HIF-1a inhibe el heterodímero AHR-ARNT. Esto se probó, porque el bNF induce la inhibición del complejo HIF1a-ARNT (Chan et al 1999).

También se ha demostrado que el estrés oxidante facilita la degradación ARNT en los proteosomas. Aunque también participan degradando a AhR. En un estudio realizado por Choi et al., (2008), utilizaron células MCF-7 y células Hep3B, tratadas con un pro-oxidante curcumina; un colorante. Luego agregaron NAC

(antioxidante) y concluyeron que el antioxidante recupera el AhR, ARNT y la expresión de CYP1A1. Por otra parte, el H₂O₂ inhibe la expresión de AhR/ARNT aun tratado con TCDD.

Se ha reportado en humanos expuestos durante tres semanas a sulfato de vanadil por la vía oral. Este estudio evidenció la disminución en el hematocrito y modificaciones en la hemoglobina (Zaporowska y Slotwinska, 1996). En nuestro grupo de trabajo se encontró que los ratones expuestos a 8 semanas a vanadio, presentaron anemia normocítica con disminución en hemoglobina y hematocrito (número de glóbulos rojos), lo que estaría llevando a un evento de hipoxemia a partir de las 8 semanas. La disminución en hemoglobina y concentraciones del hematocrito por acción de la inhalación de vanadio está estrechamente ligado a la generación de ROS (Gonzales-Villalba et al., 2009).

En nuestros resultados y mencionados anteriormente, observamos la baja de actividad y presencia de CYP1A1 (Figura 13, 14 y 24), a partir de las 6 semanas comienza a disminuir y a 12 semanas de exposición a vanadio inhalado, la actividad y presencia es baja, respecto al control, por lo que pensaríamos que, estaría llevando a cabo el aumento de HIF-1a, a su vez secuestraría a ARNT y el AhR, estaría quedándose solo en el citoplasma, por lo que se observa la disminución de CYP1A1, tanto en actividad, como en presencia en la inmunohistoquímica (Figura 30).



Falcón-Rodríguez CI y Rodríguez-Galicia C., 2011.

Figura 30. Posible mecanismo de inhibición de CYP1A1. La inhalación de vanadio produce disminución en el hematocrito y la hemoglobina, lo que produce un evento hipóxico, a su vez aumenta el HIF-1 y la formación del heterodímero HIF-1-ARNT, lo que inhibe la producción de CYP1A1.

Pocos estudios se han realizado con vanadio, pulmón y CYP1A1, pero la tendencia en comparación con otros metales es a inhibir la actividad de este citocromo. Probablemente el efecto de inhibición de la actividad de CYP1A1, esté siendo modulado por la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) (Falkner et al., 1993). Se requiere aclarar el mecanismo por el cual el vanadio está inhibiendo al CYP1A1 en pulmón y estudiar qué sucedería en otros órganos.

Sea cual sea la vía de inhibición, como se mencionó anteriormente, el papel en la inhibición del CYP1A1, en relación con la activación de dioxinas o hidrocarburos aromáticos es de gran importancia, ya que estarían modulando la bioactivación de dichos compuestos. Benedetti et al (2007), sugiere que el estrés oxidante puede modular indirectamente la eficiencia de biotransformación del CYP 450. En general, los metales en el ambiente tienen un efecto de disminución en los diferentes niveles de enzimas que catalizan la bioactivación. Consecuentemente, los metales pueden disminuir el potencial carcinogénico de los PAH (Kaminsky., 2003; Kaminsky., 2006; Ioannides, 2008). Y en nuestro modelo de inhalación de vanadio también disminuye.

13 CONCLUSIONES

Nuestro modelo de inhalación de vanadio, muestra la generación de dos poblaciones de célula de Clara, localizadas en la unión bronquiolo-alveolar y bronquiolo terminal. Concluimos que el vanadio como irritante en bronquios pulmonares es capaz de diversificar a dos tipos celulares de clara, una célula de Clara positiva exclusivamente a CC10 y otra población positiva a CC10 y a la tinción para sustancia mucoide, por lo que es una célula mucoprodutora. También es capaz de incrementar la proteína CC10 en las células de Clara, y puede ser usado como biomarcador de daño o exposición a metales. Por otro lado, el vanadio es capaz de inducir a CYP1A1, en ausencia de ligando después de la exposición a este metal y en tiempos cortos. Sin embargo, falta mucho por estudiar a estas poblaciones como: el mecanismo de acción por el cual comienzan a producir moco y si una misma célula es capaz de regresar a su fenotipo inicial o muere por apoptosis. Por otro lado, los metales y el CYP1A1, su implicación en pulmón, es un tema de estudio reciente. Es necesario que se lleven a cabo estudios profundos sobre CYP y vanadio, en pulmón y otros órganos. La implicación que tiene los metales, especial el vanadio sobre la inhibición de los CYP y su mecanismo de acción, sin duda, esta tesis es un primer acercamiento sobre estos temas.

14 ANEXO

14.1 Inmunohistoquímica

Una vez obtenidos los cortes:

1. Desparafinar en xilol (30 lavados)
2. Deshidratación en alcoholes graduales (96°, 70°, 60, 50°) 30 lavados en cada uno.
3. Lavado en agua corriente, 30 lavados
4. Recuperación antigénica (De Clere) 2ml y 38 de agua destilada. 3 minutos a 15 Psi de presión. Dejar enfriar.
5. Bloqueo Peroxidasa (peróxido al 3% 5 min).
6. Lavados con PBS, 2 lavados de 2 min.
7. Anticuerpo primario incubación 5-15 min a temperatura ambiente
8. Lavados con PBS. 2 lavados de 2 min.
9. Anticuerpo secundario incubación 15-30 min a 37°C
10. Lavados con PBS. 2 lavados de 2 min.
11. HRP incubación 15-30 min a 37°C.
12. Revelar con diamino-benzidina.
13. Contra tinción con hematoxilina (núcleos azules).

14.2 Inmunofluorescencia

Una vez obtenidos los cortes:

1. Desparafinar toda la noche en la estufa a 37°C.
2. Desparafinar en xilol 2 horas.
3. Deshidratación en alcohol absoluto (96°) 25 minutos
4. Deshidratación en alcohol 50° 25 minutos.
5. Lavado con agua 30 lavados.
6. Recuperación antigénica (Declere), 3 minutos a 15 Psi de presión. Dejar enfriar.
7. Bloqueo con PBS-albumina al 1%. 1 hora
8. Incubación del anticuerpo primario, 5-15 minutos
9. Lavado de PBS-tween 0.25%, 2 lavados de 2 minutos.
10. Incubación del anticuerpo secundario, 5-15 minutos
11. Lavado de PBS-tween 0.25%, 2 lavados de 2 minutos.
12. Contra tinción de núcleos con DAPI, 30 segundos.

13. Lavado de PBS-tween 0.25%, 2 lavados de 2 minutos.
14. Montaje con medio Fluka.
15. Observación al microscopio confocal.

14.3 Obtención de la fracción celular S-9

1. Sacrificio de los animales por dislocación cervical.
2. Extracción de los pulmones.
3. Enjuagar con KCL 0.15M (solución estéril).
4. Transferir a solución KCL 0.15% (3ml/g de peso del pulmón).
5. Homogenizar con Potter-Elvehjem 4°C.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 9000g
7. Recuperación del sobrenadante (fracción S-9).
8. Almacenar en tubos estériles a -80°C.

14.4 Fracción microsomal

1. Centrifugar la fracción S-9 previamente descongelada a 100, 000 g durante 1 hora, a 4°C. Resuspender con el homogeneizador manual de cristal esmerilado.
2. Recentrifugar a 100,000 g durante 1 hora a 4°C.
3. Recuperar el botón, agregar amortiguador de fosfato de potasio 0.1M (pH7.4), 1.0mM EDTA, 0.1 mM DTT, 20% (v/v) de glicerol, 4°C (volumen inicial/3).
4. Congelar en hielo seco y almacenar a -80°C.
5. La cuantificación de proteína total se determinó por el método de Bradford ((Bradford., 1976).

14.5 Actividad EROD

La cuantificación de la proteína CYP1A1, se utilizó la reacción EROD. Utilizando la etoxiresorrufina. Se realizó la curva de calibración como resorufina utilizando las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 pmol/ml.

La reacción se llevo a cabo en una celda para fluorómetro la cual contenía:

Amortiguador Tris-base 50mM y MgCl₂ 25mM a pH7.6

- Buffer (920ml)

- Muestra (50ml)
- Sustrato disuelto en DMSO (20ml)
- NADPH disuelto en amortiguador(10ml)
- Total 2ml.

Todo se incubo a 37°C por 3 minutos

La cinética del producto de la resorrufina se evaluó en intervalos de 10 segundos, cumpliendo un total de 150 segundos.

15 BIBLIOGRAFIA

- Andrew Angelina S., Warren Amy J, Barchowsky Aaron, Temple Kaili A., Klei Linda. Soucy Nicole V, O'Hara Kimberley A., and Hamilton Joshua W. (2003) Genomic and Proteomic Profiling of Responses to Toxic Metals in Human Lung Cells. *Environ Health Perspect* 111:825-838.
- Androutsopoulos V., Tsatsakis AM., Spandidos DA. (2009). Cytochrome P450 CYP1A1: Wider roles in cancer progression and prevention. *BMC cancer*. 9:187-204.
- Anwar-Mohamed A., Elbekai RH., El-Kadi AOS. (2009). Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Drug. Metab. Toxicol.* 5:501-521.
- Anwar-Mohamed A., El-Kadi Ayman OS. (2008). Down-Regulation of the Carcinogen-Metabolizing Enzyme Cytochrome P450 1a1 by Vanadium. *DMD* 36:1819-1827.
- Arsalane K., Broecaert F., Knoop B., Wiedig M., Toubeau G., Bernard A. (2000). Clara cell specific (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1624-1630.
- Barry R. Stripp, Patricia L. Sawaya, Dona S. Luse S, Kathryn A. Wikenheiser, Susan E. Wert, Jacquelyn A. Huffman, David L. Lattier, Gurmukh Singh, Sikandar L. Katyal, and Jeffrey A. Whitsett. (1992). Cis-Acting Elements That Confer Lung Epithelial Cell Expression of the CCl0 Gene. *The journal of biological chemistry*. 267:14703-14712.
- Benedetti M., Martuccio G., Fattorini D., Canapa A., Barucca M., Nigro M., Regoli F. (2007) Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicol* 85:167-175.
- Bradford M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
- Boers JE., Amberge AW., Frederik BJM. (1999). Number and proliferation of Clara in normal human airways epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 159:585-591.
- Bolton SJ., Pinnion K., Marshall CV., Wilson E., Barker JE., Oreffo V., Foster ML. (2008) Changes in Clara Cell 10 kDa Protein (CC10)-positive Cell Distribution in Acute Lung Injury Following Repeated Lipopolysaccharide Challenge in the Rat. *Toxicologic Pathology*, 36:440-448.
- 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* 278, L209-16.
- Bonner James (2007). Lung fibrotic response to particles exposure. *Toxicologic pathology*. 35:148-153..
- Brody AR., Hook GE., Cameron GS., Jetten AM., Butterick CJ., Nettesheim P. (1987). The differentiation capacity of Clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Lab Invest*. 57:219-29.
- Cadenas E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann Rev Biochem*. 58:79-110.
- Carriere V., Rodolose A., Lacasa M., Le cambier D., Zweibaum A., Rousset M. (1998). Hypoxia and CYP1A1 induction-dependent regulation of proteins involved in glucose utilization in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 274:1101-1108.

- Castell JV., Donato M. Teresa, María José Gómez-Lechón. (2005). Metabolism and bioactivation of toxicans in the lung. The in vitro cellular approach. *Experimental and toxicologic pathology*. 57:189-204.
- Chan Wk., Yao G., Gu YZ., Bradfiled CA. (1999). Crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J. Biol Chem*, 274:1215-12123.
- Choi H., Chun Y., Shin YJ., Ye SY., Kim MS., Park JW. (2008). Curcumin attenuates cytochrome P450 induction in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by ROS-dependently degrading AhR and ARNT. (*Cancer Sci* 2008; 99: 2518-2524
- Churg A., Brauer M., Avila-Casado MC., Fortoul TI., y Wright Joanne. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. (2003). *Environ health perspect*. 111:714-718.
- Crans DC., Smee JJ., Gaidamauskas E., Yang LQ. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem Rev*. 104:849-902.
- Cui D., Naftel JP., Daley WD., Lynch JC., Haines DH., Yang G., Fratkin JD. (2011). *Histología con correlaciones funcionales y Clínicas*. Barcelona, España. Lippincott Williams & Wilkins.
- Davis, R. J. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Devel* 42, 459-67.
- Davis CW y Dickey BF. (2008). Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annu rev Physiol*. 70:487-512.
- Denison MS y Nagy SR. (2003). Activation of the arylhydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:309-34
- De Pascale C., Domenicotti C., Nitti M., Marengo B., Catalano M., Scanarotti C., Sanguineti R., Siri M., Ledda S., Penco S., Bassi A. (2009). Modulation of CYP1A1 by PKC inhibitors and TPA pre-treatments in MHC1C1 rat hepatoma cells exposed to 3-methylcholanthrene. *The open toxicology journal*. 3:47-57.
- Dill JA., Kyeonghee ML., Mellinger KH., Bates DJ., Burka LT., Roycroft JH. (2004). Lung deposition and clearance of inhaled vanadium pentoxide in chronically exposed F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicological science*. 6-18.
- Elia J., Aoki A., Maldonado CA. (2000). Response of bronchiolar Clara cells induced by a domestic insecticide. Analysis of CC10 kDa protein content. *Histochem cell biol*. 113:125-133
- Elbekai RH, El-Kadi AO. (2005). The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free Radic Biol Med*. 39: 1499 -1511.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. (2007). Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicol Lett*. 172:106-19.
- Evans Christopher M., Williams Olatunji W, Tuvim Michael J., Rupesh Nigam., George P. Mixides, Blackburn Michael R., DeMayo Francesco J., Burns Alan R. Smith Charlotte., Reynolds Susan D., Stripp Barry R., and Dickey Burton F. (2004). Mucin is produced by Clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. Vol. 31, pp. 382-394.

- Falcón Rodríguez, Carlos Iván. (2008). Alteraciones morfológicas pulmonares inducidas por la inhalación de vanadio: estudio comparativo en rata y ratón. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Falkner KC., McCallum GP., Cherian MG., Bend JR. (1993). Effects of acute sodium arsenite administration on the pulmonary chemical metabolizing enzymes, cytochrome P-450 monooxygenase, NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase and glutathione S-transferase in guinea pig: comparison with effects in liver and kidney. *Chem Biol Interact* 86:51-68.
- Fanucchi V., Murphy M., Buckppit A., Philpot R., Plopper C. (1997). Pulmonary cytochrome P450 monooxygenase and Clara cell differentiation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 17:302-314.
- Fortoul TI., Saldivar L., Tovar TA., Salazar D., Castilla ME and Olaiz- Fernandez G. (1996). Metal and lung tissue from autopsy cases in Mexico city residents. Comparison between cases from the 1950s and 1980s. *Environ health perspect.* 104:630-636.
- Fortul TI., Mendoza ML., Avila MC., Quan TA., Sladivar OL., Espejel MG., Navarro-Villanueva., Avila-Costa MR., Colin-barenque P., Bizarro P., y Olaiz-Fernandez G. (2002). Vanadium ambient air: Concentration in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in the 1960 and 1990. Autopsies from the sixties and nineties. *Arch environ health* 57:446-449.
- Fotoul TI y Falcón-Rodríguez CI. (2007). Metal and lung). En Fortoul TI. *Metals and implication health*. India: Research signpost.
- Fortoul TI., Rodriguez-Lara V., Falcon-Rodriguez CI., Lopez-Valdez N., Ustarroz-Cano M., Montaña LF. (2009). Traffic related air pollution. En Demoniv S y Bonnet J. *Traffic related air pollution and internal combustion engines*. EUA: Nova publishers Inc.
- Fortoul Teresa y Castell Andres. 2010. *Histología y biología celular*. México. Mc Graw Hill
- Fradette C., Batonga J., Teng S., Piquette-Miller M., Du SP. (2007). Animal models of acute moderate hypoxia are associated with a down-regulation of CYP1A1, 1A2, 2B4, 2C5, and 2C16 and up-regulation of CYP3A6 and P-glycoprotein in liver. *Drug Metabolism and Disposition*. 35:765-771.
- Galanis A., Karapetsas A., Sandaltzopoulos R. (2009). Metal-induced carcinogenesis, oxidative stress and hypoxia signaling. *Mutation Research* 674:31-35.
- Gamer AO., Leibolld K., Deckardt., Kittel B., Kaufmann Wennekes HA and van Ravenzwaay B. (2004). The effects of styrene on lung cells in fame mice and rats. *Food and chemical toxicological*. 42:1655-1667.
- Gavett, S., Madison, S., Stevens, M., and Costa, D. (1999). Residual oil fly ash amplifies allergic cytokines, airway hyperresponsiveness, and inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 1897-904.
- Genser Finn. (2006). *Histologia, sobre bases moleculares*. Argentina: Medica Panamericana.
- Giangreco A., Reynolds SD., Stripp BR. (2002). Terminal Bronchioles Harbor a Unique Airway Stem Cell Population That Localizes to the Bronchoalveolar Duct Junction *Am J Pathol*;161:173-182.
- Gomez-Lechon MJ, Citocromo P450 extrahepatico. (2001). Monografía XIV. Real Academia Nacional de Farmacia. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/522>.
- Gonzalez-Morán MG. (2008) *Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular*. México Editorial AGT.

- Guengerich FP. y Shimada T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4: 391-407.
- Guengerich F Peter. *Cytochromes P450, drugs, and diseases.* (2003). Molecular interventions. Volume 3. 4:194-204.
- Hartwing A., Schwerdtle A. (2002). Interactions by carcinogens metal compounds with DNA repair processes: Toxicological implications. *Toxicol let.* 127:47-45.
- Hong KU., Reynolds SD., Giangreco A., Hurley CM., Stripp BR. (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.*24:671-81.
- Hung CH., Chen LC., Zhang Z., Choudhury B., Lee WL., Plunkett B. (2004). Regulation of Th2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10KDa protein. *J. Allergy clin Immunol.* 114:664_670.
- Inoue M., Sato EF., Nishikawa ;., Park AM., Kira Y., Imada I., Utsumi K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr JMed Chem.* 10:2495-2505.
- Iscan M, Ada AO, Coban T., Kapucuoğlu N., Aydin A., Isimer A. (2002). Combined effects of cadmium and nickel on testicular xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Biol Trace Elem Res* 89:177-190.
- Ioannides C. (2008). *Cytochrome P450: Role in the metabolism and toxicity afo drugs and other xenpbiotics.* RCS publishing. UK.
- Jiang W., Welty SE., Couroucli XI., Barrios R., Kondraganti SR., Muthiah K., Yu L., Avery SE., Moorthy B.(2004). Disruption of the Ah receptor gene alters the susceptibility of mice to oxygen-mediated regulation of pulmonary and hepatic cytochromes P4501A expression and exacerbates hyperoxic lung injury. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 310:512-519.
- Kaminsky, Laurence. (2003) PAH Metal Mixtures-Human in Vitro Mutagenicity Studies. EPA Grant Number:R827180
- Kaminsky L. (2006). The Role of Trace Metals in Cytochrome P4501 Regulation. *Drug Metabolism Reviews.* 38:227-234.
- Kennedy SW y Jones SD. (1994). Similtaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with fluorescence plote reader. *Anal Biochem* 222:217-223.
- Ke Q., Yang Y., Ratner M. Zeind J., Jiang C., Forrest .N., Xiao YF. (2002). Intracellular accumulation of mercury enhances P450 CYP1A1 expression and Cl- currents in cultured shark rectal gland cells. *Life Sci.* 70:2547 -2566.
- Kim S., Shim JJ., Burgel PR., Ueki IF., Dao-Pick T., Cheng-Wei D., Nadel JA. (2002). IL-13-induced Clara cell secretory protein expression in airway epithelium: role of EGFR signaling pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:67-75.
- Korashy HM, El-Kadi AO. (2005). Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol Sci.* 88:39-51.

- Kumar V., Abbas A., Fausto N., Mitchell R. (2008). *Robbins patologia humana*. Barcelona, España.El sevier-Saunders.
- Kustin K., McLeod GC., Gilbert TR., Le Briggs BR. (1983). Vanadium and other metal ions in the physiological ecology of marine organisms. *Structure & Bonding*. 53:139-160.
- Lee CG., Homer RJ., Zhu, Z., Lanone S., Wang X., Koteliensky V., Shipley JM., Gotwals P., Noble P., Chen Q., Senior RM., Elias J. A. (2001). Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta-1. *J Exp Med* 194: 809-813.
- Lewis, RJ. (1997). *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Lin TS., Chang CL., Shen FM. (2004). Whole blood vanadium in Taiwanese college students. *Bull Environ. Contam. Toxicol*. 73:781-786.
- Lodish H., Kaiser CA., Berk A., Krieger M., Matsudaira P., Scott MP. (2005). *Biologia celular y molecular*. Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Paranaamericana.
- Lundgren JD., Rieves RD., Mullol J., Logun C., Shelhamer JH. (1994). The effect of neutrophil proteinase enzymes on the release of mucus from feline and human airway cultures. *Respir Med* 88: 511-518.
- Magdaleno SM, Wang G., Jackson KJ., Ray MK., Welty S., Costa RH., DeMayo FJ. (1997). Interferon- γ regulation of Clara cell gene expression: in vivo and in vitro. *Am j physiol* 272:1142-1151.
- Mantile G., Miele L., Cordella-Miele E., Singh G., Katyal SL., Mukherjee AB. (1993). Human Clara cell 10KDa protein is the counterpart of rabbit uteroglobin. *J Biol Chem*. 268:343-351.
- Marilena G. (1997). New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. *Biochem Mol Med*. 61:136 -142.
- Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Álvarez H., Gutiérrez A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquím. clín. latinoam*. 39. ISSN 1851-6114
- Michel O., Murdoch Y., Bernard A. (2005). Inhaled LPS induces blood release of Clara cell specific protein (CC16) in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 155:1143-1147.
- Moorthy B., Parker KM., Smith CV., Bend JR., Welty SE. (2000). Potentiation of oxygen-induced lung injury in rats by the mechanism-based cytochrome P-450 inhibitor, 1-aminobenzotriazole. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 292:553-560.
- Morris, J.B. & Buckpitt, A.R. (2009). Upper Respiratory Tract Uptake of Naphthalene. *Toxicological Sciences*. 111:383-391.
- Mussali-Galante P y Fortoul TI. (2008). Atmospheric Pollution. En Florian P. Maes. *Environmental research progress*. EUA: Nova science publishers Inc.
- Oliveira M., Santos MA., Pacheco M. (2004). Glutathione protects heavy metal-induced inhibition of hepatic microsomal ethoxyresorufin O-deethylase activity in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicol Environ Saf*. 58:379-385.

- Plopper CG., Halsebo JE., Berger WJ., Sonstegard KS., Nettesheim P. (1983). Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and extrapulmonary airways of the rabbit. *Exp Lung Res.* 2:79-98.
- Poli G., Leonarduzzi G., Biasi F., Chiarotto E. (2004). Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem.* 11:1136-1182.
- Puga A., Ma C., Marlowe JL. (2009). The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.* 77:713-722.
- Rojas E., Herrera LA., Poirier LA., Ostrosky-Wegman P. (1999) Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res* 443:157-181.
- Rawlins EL., Hogan BLM. (2006). Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many?. *Development* 133:2455-2465.
- Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. (2000). Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156:269-278
- Reynolds Susan D., Paul R. Reynolds, Gloria S. Pryhuber, Jonathan D. Finder, and Barry R. Stripp. (2002). Secretoglobins SCGB3A1 and SCGB3A2 Define Secretory Cell Subsets in Mouse and Human Airways. *Am J Respir Crit Care Med*;166:1498-1509.
- Reynolds SD., Malkinson am. (2010). Clara cell: Progenitor for the bronchiolar epithelium. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 42: 1-4.
- Rodriguez Mercado JJ., Altamirano lozano MA.(2006). Vanadio: Contaminación, metabolismo y genotoxicidad. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22:173-189.
- Rojas Lemus, Marcela. (2009). Comparación por género y por edad de los efectos genotóxicos producidos por la inhalación de pentóxido de vanadio, cloruro de manganeso y su mezcla. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias biológicas. Facultad de medicina UNAM.
- Ronald GC., Randell Scott H., Engelhardt John F., Voynow Judith, and Sunday Mary. (2008) Airway Epithelial Cells. *Proc Am Thorac Soc Vol 5.* 772-777.
- Ross M., kaye G., Paulina W. (2005). *Histología, texto y atlas color con biología celular y molecular.* Argentina: Medica Panamericana.
- Repetto Jimenez M. y Repetto Kuhn G. (2009). *Toxicología Fundamental.* Sevilla. España. Diaz de Santos.
- ShanZW., Rosenberger CL., Yi-Xiao Bao, James MS., Harrod KS. (2003). Clara Cell Secretory Protein Modulates Lung Inflammatory and Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus Infection. *J. Immunol.* 2003;171;1051-1060.
- Shibazaki M., Takeuchi T., Ahmed S., Kikuchi H. HIBAZAKI. (2004). Blockade by SB203580 of Cyp1a1 Induction by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, and the Possible Mechanism Possible Involvement of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Shuttling of Ah Receptor Overexpressed in COS-7 Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1030:275-281.
- Shijubo N., Itoh Y., Yamaguchi T., Shibuya Y., Morita Y., Hirasawa M., Okutani R., Kawai T., Abe S. (1997). Serum and BAL Clara cell 10 kDa protein (CC10) levels and CC10-positive bronchiolar cells are decreased in smokers. *Eur Respir J.* 10:1108-1114.

- Shimizu T., Takahashi Y., Kawaguchi S., Sakakura Y. (1996). Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1412-1418.
- Spengler J y Wilson R. (1996). Emissions, dispersion and concentration of particles. En Wilson R. y Spangler J. *Particles in our air: Concentration and health effects*. . EUA: Harvard university press.
- Stripp BR., y Reynolds SD. (2008). Maintenance and Repair of the Bronchiolar Epithelium. *The Proceedings of the American Thoracic Society* 5:328-333.
- Tortora G. y Derrickson B. (2007). *Principios de anatomía y fisiología*, México: Medica Panamericana.
- Vakharia DD., Liu N., Pause R. (2001). Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 170:93-103.
- Vallejo M., Jauregui-Renaud K., Hermosillo AG., Marquez MF., Cardenas M. (2003). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gaceta Medica de México*. Vol 139. No 1.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ., Telser J. (2004). Role. of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266:37-56.
- Valko M., Morris H., Cronin MTD. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12:1161-1208.
- Van Winkle LS., Buckpitt AR., Nishio S.J, Isaac JM., Plopper CG.(1995). Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *Am J Physiol.* 269:800-818.
- Vanspauwen MJ., Linssen FM., Bruggeman CA., Jacobs JA., Drent M., Bergmans DJ., van Mook W. (2011). Clara cell protein in bronchoalveolar lavage fluid: a predictor of ventilator-associated pneumonia?. *Critical Care.* 15:1-R14.
- Vasallo Jeffrey D., Hicks Sarah M., Born Stephanie L., Daston George P. (2004) Roles for epoxidation and detoxification of coumarin in determining species differences in Clara cell toxicity. *Toxicological sciences.* 82:26-33.
- Vrzal R., Ulrochová J., Dvorak Z. (2004). Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed.* 148:3-10.
- Voynow JA., Fischer BM., Malarkey DE., Burch LH., Wong T., Longphre M., Ho SB., Foster WM. (2004). Neutrophil elastase induces muus cell metaplasia in mouse lung. *Am J Physio Lung Cell Mol Physiol.* 287:293-302.
- Wang X., Safe S. (1994) Development of an in vitro model for investigating the formation of The nuclear Ah receptor complex in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Arch Biochem Biophys* 315:285-292.
- Wang Yi-Zhe y Bonner JC. (2000). Mechanism of extracellular signal-regulated kinase (ERK)-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:590-596.

- Wang YZ, Ingram JL., Walters DM., Rice AB., Santos JH., Van Houten B., Bonner JC. (2003). Free Radic Biol Med. 15;35(8):845-55.
- Yanagihara K., Seki M., Cheng P-W. (2001). Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasia in mouse lung. Am J Respir Cell Mol Biol 24:66-73.
- Ye Qing Masaki, Fujita Hiroshi, Ouchi Ichiro, Inoshima Takashige, Maeyama Kazuyoshi, Kuwano Yasuhiro, Horiuchi Nobuyuki, Hara Yoichi Nakanishi. (2004). Serum CC-10 in Inflammatory Lung Diseases. Respiration;71:505-510.
- Yu D., Walters DM., Zhu L., Pak-Kei L., Chen Y. (2011). Vanadium pentoxide (V2O5) induced mucin production by airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301:31-39.
- Zhang N., Walker MK (2007) Crosstalk Between the Aryl Hydrocarbon Receptor and Hypoxia on the Constitutive Expression of Cytochrome P4501A1 mRNA. Cardiovasc Toxicol. ; 7(4): 282-290.
- Zhang Z., Huang CS., Li JX., Leonard SS., Lanciotti R., Butterworth L., Shi XL. (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. Arch Biochem Biophys. 392:311-320.
- Zaporowska H., Slotwinska M. (1996). Effect of vanadium on rat erythrocytes in vitro. Folia Histochem. Cytobiol., 34:99-100.