

# Efecto del sulfato de cobre en el daño pulmonar inducido por la exposición crónica intermitente a ozono

MANUEL J. OYARZÚN G.<sup>1</sup>, SUSAN A. SÁNCHEZ R.<sup>1,a</sup>,  
NELSON DUSSAUBAT D.<sup>1,b</sup>, MARÍA E. MILLER A.<sup>1,c</sup>,  
SERGIO GONZÁLEZ B.<sup>2</sup>

## Effect of copper sulphate on the lung damage induced by chronic intermittent exposure to ozone

**Background:** Ozone exposure could increase lung damage induced by airborne particulate matter. Particulate matter lung toxicity has been attributed to its metallic content. **Aim:** To evaluate the acute effect of intratracheal administration of copper sulfate ( $\text{CuSO}_4$ ) on rat lungs previously damaged by a chronic intermittent ozone exposure. **Material and Methods:** Two-months-old male Sprague-Dawley rats were exposed to 0.5 ppm ozone four h per day, five days a week, during two months.  $\text{CuSO}_4$  was intratracheally instilled 20 h after ozone exposure. Controls breathed filtered air or were instilled with 0.9% NaCl or with  $\text{CuSO}_4$  or were only exposed to ozone. We evaluated lung histopathology.  $\text{F}_2$  isoprostanes were determined in plasma. Cell count, total proteins,  $\gamma$  glutamyl-transpeptidase (GGT) and alkaline phosphatases (AP) were determined in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). **Results:** Ozone increased total cell count, macrophages, proteins and AP in BALF ( $p < 0.05$ ), and induced pulmonary neutrophil inflammation.  $\text{CuSO}_4$  plus air increased plasma  $\text{F}_2$  isoprostane levels and total cell count, neutrophils and proteins in BALF ( $p < 0.05$ ). Histopathology showed foamy macrophages. Ozone plus  $\text{CuSO}_4$  exposed animals showed a neutrophil inflammatory lung response and an increase in total cell count, proteins, GGT and AP in BALF ( $p < 0.05$ ). Foamy and pigmented alveolar macrophages were detected in all lungs of these animals ( $p < 0.001$ ). **Conclusions:** Intratracheal instillation of a single dose of  $\text{CuSO}_4$  in rats previously subjected to a chronic and intermittent exposure to ozone induces a neutrophil pulmonary inflammatory response and cytoplasmic damage in macrophages.

(Rev Med Chile 2017; 145: 9-16)

**Key words:** F2-Isoprostanes; Lung Injury; Macrophages, Alveolar; Ozone; Particulate Matter.

<sup>1</sup>Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

<sup>a</sup>Magíster en Ciencias Médicas, Mención Fisiopatología.

<sup>b</sup>Médico Veterinario.

<sup>c</sup>Químico-Farmacéutico.

Estudio financiado por proyecto FONDECYT 1061085 Aprobación por el Comité de Bioética de Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Protocolo CBA N° 0137 FMUCh).

Correspondencia a:  
Manuel Oyarzún G.  
Programa de Fisiopatología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.  
Avda. Salvador 486. Providencia.  
Correo 9 Código postal 7500922, Santiago de Chile.  
Teléfonos: 223419179 - 229770501  
moyarzun@med.uchile.cl

La contaminación atmosférica causa una variedad de efectos deletéreos en la salud de las personas expuestas. Entre los componentes de esta contaminación están el ozono y el material particulado que pueden generar efectos adversos, especialmente en poblaciones susceptibles<sup>1,2</sup>.

El material particulado alcanza sus máximas concentraciones en invierno y el ozono en verano, aunque pueden existir situaciones en que ambos estén aumentados<sup>1</sup>.

De los metales del material particulado con diámetro aerodinámico  $\leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) el cobre es

uno de los que está en mayor proporción. En mediciones realizadas en Santiago de Chile, el cobre y el zinc alcanzan sus valores máximos en invierno, coincidiendo con el aumento de partículas<sup>3</sup>. A su vez, el ozono forma parte del esmog fotoquímico troposférico, generado por la radiación solar, por lo que sus concentraciones más altas se alcanzan en verano.

Investigaciones han mostrado que la instilación intratraqueal de material particulado de filtros de la contaminación atmosférica, por medio de broncoscopia, a voluntarios no fumadores, produce inflamación detectable en el lavado broncoalveolar 24 h post-instilación<sup>4</sup>.

La toxicidad del material particulado ha sido atribuida a su fracción soluble, en la que predominan zinc y cobre. La instilación intratraqueal de igual concentración de distintos metales (4,8  $\mu\text{g}$  de metal en 0,1 mL de agua) a ratas Sprague-Dawley detectó 48 h post-instilación que zinc y cobre inducen aumento de macrófagos alveolares y de leucocitos polimorfonucleares y de la concentración de proteínas en el lavado broncoalveolar, mientras que otros metales como vanadio, níquel, hierro y plomo, no provocaron cambios significativos<sup>5-8</sup>.

El material particulado aumenta el daño pulmonar centroacinar inducido por ozono. El aumento de fagocitos por exposición al material particulado puede aumentar la actividad celular en las zonas con lesión primaria por ozono, amplificando la inflamación. En ciertas condiciones coexisten en el aire ambiental elevadas concentraciones de ozono y partículas que contienen metales<sup>9</sup>. Al evaluar la respuesta aguda de ratas a la inhalación de material particulado y ozono, se detectó una posible interferencia en los mecanismos de defensa y aumento de agentes vasoconstrictores pulmonares<sup>10,11</sup>. La exposición a estos dos contaminantes aumenta la labilidad celular de los bronquiolos y del parénquima<sup>9</sup>, y produce aumento de neutrófilos, de proteínas totales y de la deshidrogenasa láctica<sup>12</sup>. Otro estudio detectó daño y regeneración de células epiteliales que fue mayor en las áreas periductales y aumento de polimorfonucleares y macrófagos<sup>13</sup>; Bosson y cols. demostraron aumento de neutrófilos y macrófagos en el lavado broncoalveolar luego de exposición conjunta a partículas derivadas del diesel y ozono<sup>14</sup>.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto agudo de la administración intratraqueal de sul-

fato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) sobre el pulmón de rata dañado previamente por la exposición crónica intermitente a ozono.

## Material y Métodos

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad (peso  $x 280 \pm 20$  g DS), que desde su nacimiento respiraron aire filtrado para  $\text{PM}_{10}$ . Éstas fueron expuestas a ozono 0,5 ppm durante 4 h, 5 días a la semana por 2 meses, dentro de sus jaulas con agua y alimento "ad libitum" en una cámara de vidrio de 0,96  $\text{m}^3$ . El ozono fue generado por un equipo Ozocav modelo ZT 21 (Interozone, Chile) y su concentración en la cámara se midió continuamente con un analizador Termo Electron Corporation Environmental Instruments Modelo 49i (Franklin, Massachusetts, USA). Se midió temperatura y humedad relativa cada 30 min y el absorbente de  $\text{CO}_2$  de la cámara se renovó periódicamente.

Veinte horas después de finalizada la exposición crónica a ozono, las ratas se instilaron por punción intratraqueal bajo anestesia (ketamina 10 mg/kg im más atropina 0,04 mg/kg im y lidocaína subcutánea) con  $\text{CuSO}_4$  2,5  $\mu\text{g}$  /100 g de peso disuelta en 0,5 ml de NaCl al 0,9% por 250 g de peso corporal, preparado en forma estéril usando filtros de 0,22 mm<sup>15</sup>.

Los protocolos experimentales fueron los siguientes:

- Serie aire (n = 7): sometida a los mismos procedimientos de las series experimentales sin exposición a ozono ni instilación intratraqueal.
- Serie aire + NaCl (n = 6): respiró aire filtrado para  $\text{PM}_{10}$  e instilada con NaCl 0,9%.
- Serie  $\text{CuSO}_4$  (n = 7): respiró aire filtrado e instilada con  $\text{CuSO}_4$ .
- Serie ozono + NaCl (n = 7): expuesta a ozono 0,5 ppm durante 4 h, 5 días/semana por 2 meses e instilada 20 h después con NaCl 0,9%.
- Serie ozono (n = 7): expuesta a ozono 0,5 ppm durante 4 h, 5 días/semana por 2 meses.
- Serie ozono +  $\text{CuSO}_4$  (n = 7): expuesta a ozono 0,5 ppm durante 4 h, 5 días/semana por 2 meses e instilada con  $\text{CuSO}_4$ .

Las ratas fueron anestesiadas (ketamina 10 mg/kg im más atropina 0,04 mg/kg im) siendo eutanasiadas por exanguinación, puncionando la

aorta abdominal, 24 h después de la instilación intratraqueal de CuSO<sub>4</sub>. Los pulmones fueron extraídos, pesados y degasificados en cámara de vacío (-100 mmHg). En el pulmón izquierdo se efectuó estudio histopatológico y en el derecho lavado broncoalveolar (LBA). Este lavado se efectuó a través de una cánula en el bronquio fuente derecho, inyectando NaCl al 0,9% a 4°C hasta alcanzar la capacidad pulmonar total. El lavado se repitió 4 veces, recuperándose en todas las series aproximadamente el 85% del volumen inyectado. La mezcla de los 4 lavados se centrifugó (102 g por 10 min a 4°C) y en el sobrenadante se determinó proteínas totales<sup>16</sup>, fosfatasa alcalina<sup>17</sup> y  $\gamma$  glutamil- transpeptidasa (GGT)<sup>18</sup>. El recuento total de células del LBA se realizó en cámara de Neubauer y el recuento diferencial en frotis del *pellet* fijado en metanol y teñido con Giemsa<sup>19</sup>. En una muestra de plasma se determinó F<sub>2</sub> isoprostano<sup>20</sup>.

Para el estudio histopatológico se insufló el pulmón con presión de 25 cm de H<sub>2</sub>O en vías aéreas<sup>21</sup>, fijándolo con formalina al 10% tamponada y se hicieron tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. El estudio fue realizado por el patólogo (SGB), sin conocer el tratamiento recibido por cada espécimen. El grado de inflamación fue evaluado con puntaje de 0 a 4 (0: ausente, 1: leve, 2: moderada, 3: intensa y 4: muy intensa)<sup>22</sup>. La presencia de macrófagos se evaluó con puntaje de 0 a 3 (0: ausente, 1: escasa, 2: moderada y 3: abundante). El grado de fibrosis se evaluó con la tinción tricrómica de Masson utilizando un puntaje de 0 a 3 (0: ausente, 1: escasa, 2: moderada y 3: intensa)<sup>22</sup>.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas se analizaron usando ANOVA y la prueba

de Newman-Keuls. Los puntajes histopatológicos fueron analizados utilizando las pruebas de Kruskal-Wallis y de Dunnet. La frecuencia de bronconeumonía, macrófagos vacuolados y pigmentados se comparó con el test exacto de Fisher. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

### Análisis del lavado broncoalveolar (LBA)

El recuento total de células del LBA, expresado en número de células por mL o por 100 g de peso corporal, mostró aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de células totales en las series [ozono + CuSO<sub>4</sub>], [aire + CuSO<sub>4</sub>] y en la serie ozono comparado con las series controles. No hubo diferencia significativa entre las series [ozono + CuSO<sub>4</sub>], [aire + CuSO<sub>4</sub>] u ozono (Tabla 1).

En el recuento diferencial de células predominaron los macrófagos (52,9 a 58,4%), tanto en las series control como en las expuestas a ozono, en tanto que en las series con CuSO<sub>4</sub> expuestas a aire u ozono predominaron los neutrófilos (49,4 a 56%) (Tabla 1).

Las proteínas totales del LBA aumentaron significativamente en las mismas series en que hubo un aumento significativo de las células totales: [ozono + CuSO<sub>4</sub>], [aire + CuSO<sub>4</sub>] y ozono (Tabla 2).

La actividad de la  $\gamma$  glutamil-transpeptidasa (GGT) aumentó significativamente solo en las series instiladas con CuSO<sub>4</sub> (Tabla 2).

La actividad de fosfatasa alcalina en el LBA aumentó significativamente en las series ozono

**Tabla 1. Recuento total y diferencial de células en el lavado broncoalveolar luego de la exposición crónica intermitente a 0,5 ppm O<sub>3</sub> seguida de instilación endotraqueal de sulfato cúprico**

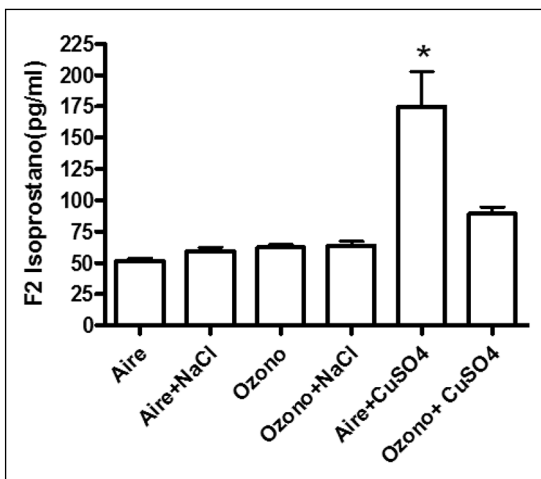
Células	Aire (n = 7)	Aire + NaCl (n = 6)	O <sub>3</sub> (n = 7)	O <sub>3</sub> + NaCl (n = 7)	Aire+CuSO <sub>4</sub> (n = 7)	O <sub>3</sub> + CuSO <sub>4</sub> (n = 7)
Céls 10 <sup>4</sup> /ml	23,4 ± 2,75	18,6 ± 2,3	33,4 ± 3,5*	24,6 ± 3,1	33,4 ± 8,4*	36,9 ± 7,3*
Céls 10 <sup>4</sup> /100 g	210,7 ± 30,3	160 ± 22,4	297,5 ± 39*	234,6 ± 35,4	320,8 ± 72,9*	333,9 ± 72,2*
Macrófagos %	52,9 ± 21	55,8 ± 13,6	54 ± 18,2	58,4 ± 5,7	43,6 ± 18,3	46,7 ± 13,2
Neutrófilos %	44,7 ± 22,2	35,8 ± 17,5	45 ± 18	41,6 ± 5,7	56 ± 18,6	49,4 ± 16,2
Linfocitos %	2,4 ± 3,0	8,3 ± 12,7	3,7 ± 5,4	0-0	0,4 ± 0,5	3,9 ± 4

\* $p < 0,05$  ANOVA y Newman Keuls. Cada cifra es la media aritmética ± su DS. Céls: células. O<sub>3</sub> = ozono. CuSO<sub>4</sub> = sulfato cúprico.

**Tabla 2. Proteínas totales y actividades de gama glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina en el lavado broncoalveolar post-exposición crónica intermitente a 0,5 ppm de ozono e instilación endotraqueal de sulfato cúprico**

	Aire (n = 7)	Aire + NaCl (n = 6)	O <sub>3</sub> (n = 7)	O <sub>3</sub> + NaCl (n = 7)	Aire + CuSO <sub>4</sub> (n = 7)	O <sub>3</sub> + CuSO <sub>4</sub> (n = 7)
Proteínas totales mg/100 g	1,44 ± 0,25	1,3 ± 0,22	1,83 ± 0,4*	1,60 ± 0,17	1,73 ± 0,13*	1,83 ± 0,24*
GGT mU/100 g	0,34 ± 0,1	0,52 ± 0,11	0,52 ± 0,07	0,57 ± 0,14	0,65 ± 0,18*	0,75 ± 0,22*
Fosfatasa alcalina mU/100 g	0,53 ± 0,09	0,70 ± 0,12	0,78 ± 0,13*	0,63 ± 0,11	0,57 ± 0,11	0,81 ± 0,12*

\*p < 0,05 ANOVA y Newman Keuls. Cada cifra es la media aritmética ± su DS. GGT: γ glutamil- transpeptidasa; O<sub>3</sub>: ozono; CuSO<sub>4</sub>: sulfato cúprico.



**Figura 1.** Concentraciones plasmáticas de F<sub>2</sub> Isoprostano. Resultados expresados como media aritmética ± DS. \*p < 0,05 al comparar la serie [Aire + CuSO<sub>4</sub>] versus cada una de las otras 5 series (ANOVA y prueba de Newman Keuls). Cada columna representa una serie de 7 determinaciones, excepto en el caso de la serie aire filtrado + instilación de 0,9% de NaCl en que se realizaron 6 determinaciones de F<sub>2</sub> Isoprostano.

y [ozono + CuSO<sub>4</sub>] en relación a los controles (Tabla 2).

La concentración plasmática de F<sub>2</sub> isoprostano fue casi 3 veces mayor en la serie expuesta a aire filtrado e instilada con CuSO<sub>4</sub> en comparación a las series controles, incluyendo la serie previamente expuesta a ozono (Figura 1). Este aumento del F<sub>2</sub> Isoprostano fue significativo comparado con todas las otras series (p < 0,05).

#### Estudio histopatológico

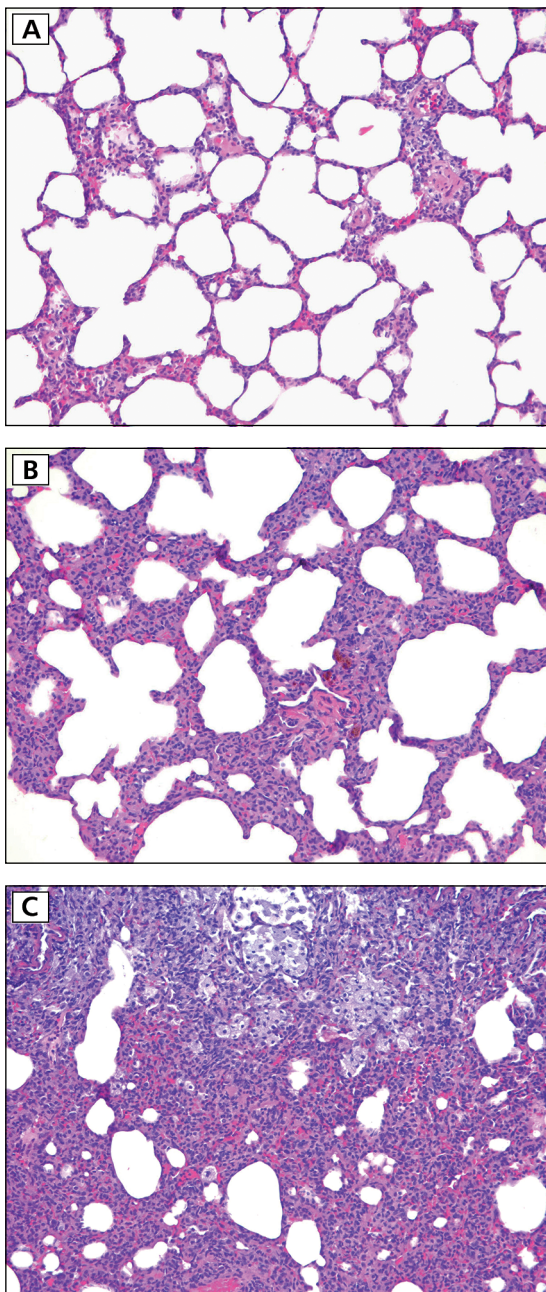
El pulmón mostró inflamación neutrofílica en todas las series expuestas a ozono y/o CuSO<sub>4</sub>. Además, se encontró bronconeumonía focal en 23,8% de las ratas expuestas a ozono con o sin instilación intratraqueal de NaCl o de CuSO<sub>4</sub> (p < 0,05) (Tabla 3). Trece de las 14 ratas (92,8%) que recibieron CuSO<sub>4</sub>, ya sea respirando aire filtrado u ozono, mostraron macrófagos vacuolados (Tabla 3 y Figura 2) (p < 0,001). Todas las ratas expuestas a [ozono + CuSO<sub>4</sub>] presentaron macrófagos con pigmentación citoplasmática

**Tabla 3. Estudio histopatológico pulmonar post-exposición crónica intermitente a 0,5 ppm de ozono seguida de instilación endotraqueal de sulfato cúprico**

Series	Inflamación	Macrófagos	Otros hallazgos
Aire filtrado (n = 7)	0	0,14 1/7	
NaCl (n = 6)	0	1 6/6	
Ozono (n = 7)	1,14 3/7(PMN)	0	BNM: 3/7
CuSO <sub>4</sub> (n = 7)	0,28 1/7(PMN)	0,86 6/7 (V)	Cristales eosinófilos
Ozono + NaCl (n = 7)	0,43 1/7(PMN)	1,14 7/7	BNM: 1/7
Ozono+CuSO <sub>4</sub> (n = 7)	0,43 1/7(PMN)	1,29 7/7 (V+Pigm)	BNM: 1/7

La primera cifra es la media aritmética del puntaje histopatológico (Inflamación: 0= ausente; 1= leve; 2= moderada). Macrófagos: 0= ausentes; 1= escasos; 2= numerosos). La segunda cifra expresa la frecuencia de detección. PMN: neutrófilos. V= macrófagos vacuolados; Pigm = macrófagos con pigmentación citoplasmática. BNM= focos de bronconeumonía.





**Figura 2.** Histopatología de pulmón de rata. **A.** Expuesta a ozono: tabiques alveolares de espesor conservado con algunos polimorfonucleares neutrófilos intersticiales. HE, 200x. **B.** Expuesta a ozono e instilada vía intratraqueal con sulfato de cobre: tabiques alveolares engrosados con polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos con pigmento visible. HE, 200x. **C.** Expuesta a ozono e instilada vía intratraqueal con sulfato de cobre: tabiques alveolares infiltrados con polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos de citoplasma vacuolado (espumosos). HE, 200x.

(Tabla 3 y Figura 2) ( $p < 0,001$ ). Ningún caso de los grupos analizados mostró fibrosis con la tinción de Masson.

## Discusión

Nuestros resultados confirman que la exposición crónica e intermitente a ozono produce una inflamación pulmonar neutrofílica. La instilación de  $\text{CuSO}_4$  en ratas con pulmón previamente dañado por la exposición a ozono generaría vacuolización y pigmentación citoplasmática de los macrófagos pulmonares, que se agrega a la inflamación neutrofílica. Los resultados, además, sugieren que la exposición a ozono podría aumentar la susceptibilidad a desarrollar bronconeumonía, ya que esta se detectó en 23,8% de las ratas expuestas a ozono con o sin instilación de  $\text{NaCl}$  o de  $\text{CuSO}_4$ .

La exposición a ozono seguida de instilación de  $\text{CuSO}_4$  se asoció a aumento de células, proteínas y  $\gamma$  glutamil transpeptidasa y fosfatasa alcalina en el LBA y generó en 100% de los pulmones macrófagos alveolares vacuolados y con pigmento en el citoplasma.

Las proteínas totales aumentaron significativamente en el LBA de las series ozono,  $\text{CuSO}_4$  y [ozono +  $\text{CuSO}_4$ ], en comparación a sus controles. Este efecto podría indicar disrupción de la barrera alvéolo-capilar, por lo que la exposición a ozono y/o la instilación de  $\text{CuSO}_4$  podrían aumentar la permeabilidad capilar pulmonar, como parte del proceso inflamatorio. El daño por ozono en macrófagos, células epiteliales y mastocitos también contribuiría al aumento de la permeabilidad alvéolo-capilar y a la acumulación de proteínas plasmáticas en el espacio aéreo o el intersticio<sup>23,24</sup>. Las proteínas aumentaron significativamente en las mismas series en que aumentaron las células totales, sugiriendo un mecanismo en común para ambos efectos.

La actividad de la GGT aumentó significativamente en las series [ozono +  $\text{CuSO}_4$ ] y [aire filtrado +  $\text{CuSO}_4$ ], comparadas con el resto de las series. El aumento de GGT se generó por la instilación de  $\text{CuSO}_4$ , ya que la exposición a ozono no aumentó significativamente la GGT como lo hizo el  $\text{CuSO}_4$ . La GGT del pulmón fue detectada en la superficie externa de la membrana de las células de Clara y en menor grado en los neumocitos tipo II<sup>25</sup>. GGT es considerada indicador de daño

pulmonar por estrés oxidativo, ya que participa en la homeostasis del glutatión<sup>26</sup>.

La fosfatasa alcalina mostró aumento significativo en la serie ozono +  $\text{CuSO}_4$  y en la serie expuesta solo a ozono. El aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina se ha utilizado como índice de daño tisular<sup>27</sup>. Las fuentes más importantes de fosfatasa alcalina en el LBA son los neumocitos tipo II y polimorfonucleares<sup>23</sup>.

Las diferencias en la celularidad del LBA y en los marcadores de aumento de la permeabilidad alvéolo-capilar entre las dos principales series experimentales [ozono] y [ozono+ $\text{CuSO}_4$ ] podrían explicarse porque las ratas fueron eutanasiadas 24 h después de la instilación de  $\text{CuSO}_4$ , es decir, en el período postdaño agudo por  $\text{CuSO}_4$  en que es esperable detectar una inflamación neutrofílica, que podría ser inespecífica.

En la histopatología pulmonar se detectó macrófagos vacuolados en 13 de las 14 ratas de las series instiladas con  $\text{CuSO}_4$  con aire filtrado o expuestas a ozono; estos macrófagos vacuolados son macrófagos que tuvieron gran actividad fagocítica. En las ratas expuestas a ozono +  $\text{CuSO}_4$  los macrófagos presentaron además de vacuolas, pigmento en su citoplasma, lo que implicaría un mayor daño celular. Los macrófagos pigmentados se observan en la bronquiolitis respiratoria o del fumador, en tanto que en la proteinosis alveolar se detectan macrófagos vacuolados y pigmentados<sup>28,29</sup>.

La instilación de  $\text{CuSO}_4$  generó un notable aumento de la concentración de  $\text{F}_2$  isoprostano plasmático (2,97 veces su valor control), que podría explicarse por estrés oxidativo.

El  $\text{F}_2$  isoprostano derivado del ácido araquidónico es producto de la peroxidación de la membrana plasmática. Los isoprostanos son considerados marcadores biológicos de estrés oxidativo, ya que se acumulan en estas condiciones<sup>30</sup>. El  $\text{Cu}^{+2}$  puede producir, por la reacción de Fenton, especies reactivas de oxígeno, que catalizan la formación de radicales hidroxilos a partir de peróxido de hidrógeno<sup>6</sup>. Además, puede participar en la reacción de Haber-Weiss, catalizando la formación de radicales hidroxilos a partir de peróxido de hidrógeno y anión superóxido<sup>31,32</sup>. Estos radicales hidroxilo generan infiltración de leucocitos, activación de NF- $\kappa$ B, que inducen liberación de citoquinas e inflamación de las vías aéreas, que explicaría el aumento de células totales en el LBA<sup>7,33</sup>.

El material particulado generaría estrés oxidativo en el endotelio microvascular pulmonar, siendo NADPH oxidasa la principal enzima que se activa formando especies reactivas del oxígeno, principalmente anión superóxido. Este puede participar en la reacción de Haber-Weiss formando radicales hidroxilo. La formación de especies reactivas del oxígeno podría explicar en parte el aumento de  $\text{F}_2$  isoprostano plasmático, además el PM ultrafino activa a la MAP quinasa (MAPK) por especies reactivas del oxígeno en células endoteliales estimulándose la producción de IL-6<sup>11,34</sup>.

En la serie [Ozono +  $\text{CuSO}_4$ ] no aumentó significativamente el  $\text{F}_2$  isoprostano plasmático, esto sugeriría que en la rata, la exposición intermitente a ozono podría atenuar la respuesta pulmonar no solo a ozono sino también a otros agentes nocivos. La respuesta pulmonar atenuada que presentan las ratas expuestas crónicamente a ozono se denomina "pre-acondicionamiento al estrés oxidativo por ozono". Su mecanismo es desconocido, aunque el aumento de antioxidantes podría ser importante<sup>35</sup>.

La inhalación de oxígeno + ozono por 10 o 15 días produce pre-acondicionamiento al estrés oxidativo por ozono y protege al hígado del daño por isquemia y reperusión, que se ha explicado por aumento de la expresión de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), que probablemente gatillen el pre-acondicionamiento oxidativo por ozono<sup>36-38</sup>. Por otra parte, en simulaciones de shock endotóxico, el ozono protege a la rata disminuyendo TNF- $\alpha$  sanguíneo, esto se explicaría porque los antioxidantes generados por el ozono, administrado antes de la lesión, disminuyen el NF- $\kappa$ B y las citoquinas circulantes<sup>39,40</sup>.

Las implicancias que estos resultados pudiesen tener en la salud humana se refieren a que, en ciertas condiciones, puede coexistir la exposición crónica e intermitente a ozono con episodios agudos de contaminación por material particulado, como por ejemplo en grandes incendios forestales o urbanos que ocurren en verano, o en las explotaciones mineras a gran altura en que la radiación solar aumenta la concentración de ozono troposférico. En tales condiciones el pre-acondicionamiento al estrés oxidativo por una eventual previa exposición intermitente a ozono podría modular el efecto de la exposición aguda a material particulado.

## Referencias

- Oyarzún M. Contaminación atmosférica Urbana: Efectos del material particulado y del ozono sobre el sistema respiratorio. Capítulo del Texto: *Episodios críticos de contaminación atmosférica en la ciudad de Santiago*. Ed: RGE. Morales. Editorial Universitaria. Santiago de Chile. 2006 (págs. 299-318).
- Johanson KA, Balmes JH, Collard HR. Air pollution exposure: a novel environmental risk factor for interstitial lung disease. *Chest* 2015; 147 (4): 1161-7.
- Ministerio del Medio Ambiente, Santiago, Contaminación del aire, Capítulo 1 [24 de julio de 2016]. Disponible en: [http://www.mma.gob.cl/1304/article\\_52016\\_capitulo\\_1.pdf](http://www.mma.gob.cl/1304/article_52016_capitulo_1.pdf). Consultado: 2/08/2016.
- Ghio A, Devlin R. Inflammatory lung injury later bronchial instillation of air pollution particles. *Am J Respir Crit Med* 2001; 164 (4): 704-8.
- Churg A. The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cell. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154 (4 Pt1): 1124-40.
- Prieditis H, Adamson I. Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. *Exp Lung Res* 2002; 28 (7): 563-76.
- Riley M, Boesewetter D, Kim A, Sirvent F. Effect of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. *Toxicology* 2003; 190 (7): 171-84.
- Wu W, Bronberg PA, Samet JM. Zinc ions as effectors of environmental oxidative lung injury. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 57-69.
- Vincent R, Bjarnason SG, Adamson IY, Hedgecock C, Kumarathasan P, Guenette J, et al. Acute pulmonary toxicity of urban particulate matter and ozone. *Am J Pathol* 1997; 151 (6): 1563-70.
- Bouthillier L, Vincent R, Geogan, Adamson IY, Bjarnason S, Stewart M, et al. (1998) Acute effects of inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol* 1998; 153 (6): 1873-84.
- Mo Y, Wan R, Chien S, Tollerud DJ, Zhang Q. Activation of endothelial cells after exposure to ambient ultrafine particles: The role of NADPH oxidase. *Toxicol Applied Pharmacol* 2009; 236 (2): 183-93.
- Madden M, Richards J, Dailey L, Hatch G, Ghio A. Effect of ozone on diesel exhaust particle toxicity in rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 168 (2): 140-8.
- Adamson I, Vincent R, Bjarnason S. Cell Injury and interstitial inflammation in rat lung after inhalation of ozone and urban particulates. *Am J. Respir Cell Mol Biol* 1999; 20 (5): 1067-72.
- Bosson J, Barath S, Pourazar J, Behnding A, Sandstrom T, Blomberg A, et al. Diesel exhaust exposure enhances the ozone-induced airway inflammation in healthy humans. *Eur Respir J* 2008; 31 (6): 1234-40.
- Dussaubat N, Lathrop ME, Oyarzún M, Mendoza R, Capetillo M, Puente J. Daño pulmonar y experimental por bleomicina en ratas. Alteraciones del lavado broncoalveolar e histopatología. *Rev Chil Enferm Respir* 1992; 8 (2): 94-101.
- Lowry OH, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951; 193 (1): 265-75.
- Bessey O, Lowry O, Brock M. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 1946; 164: 321-9.
- Villanueva S, Puente J, Sapag-Hagar M. The action of hormones on the rat uterus and mammary gland  $\gamma$  glutamyltranspeptidase activity. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 1987; 57 (1): 99-105.
- Prophrt EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Eds *Laboratory Methods in histotechnology*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology. 1992, pág 278.
- Pradelles P, Grassi J, Maclouf J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Annal Biochem* 1985; 57(7): 1170-3.
- Escolar-Castellon M, Tejero C, Roche P. Valoración morfológica de pulmones de rata insuflados con líquido fijador a diferentes presiones próximas a la capacidad pulmonar total. *Arch Bronconeumol* 2000; 36 (8): 450-4.
- Oyarzún M, Dussaubat N, González S. Effect of 0,25 ppm ozone exposure on pulmonary damage induced by bleomycin. *Biol Res* 2005; 38 (4): 353-8.
- Bhalla DK, Gupta SK, Reinhart PG, Reinhart PG. Alteration of epithelial integrity, alkaline phosphatase activity, and fibronectin expression in lung of rats exposed to ozone. *J Toxicol Environ Health* 1999; 57(5): 329-43.
- Bromberg PA. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans. *Biochim Biophys Acta* 2016 jul 21. pii: S0304-4165 (16) 30262-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.07.015. [Epub ahead of print].
- Dinsdale D, Green J, Manson M, Lee M. The ultrastructural immunolocalization of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in rat lung: correlation with the histochemical demonstration of enzyme activity. *Histochem* 1992; 24 (3): 144- 52.
- Zhang H, Forman H, Choi J. Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods Enzymol* 2005; 401: 468-83. DOI: 10.1016/S0076-6879 (05)01028-1.

27. Henderson R, Scott G, Waide J. Source of alkaline phosphatase activity in epithelial lining fluid of normal and injured F344 rat lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 134 (1): 170-4.
28. Domagala-Kulawik J. BAL in diagnosis of smoking-related interstitial lung disease: Review of literature and analysis of our experience. *Diagn Cytopathol* 2008; 36 (12): 909-15.
29. Barlow PG, Brown DM, Donaldson K, MacCallum J, Stone V. Reduced alveolar macrophage migration induced by acute ambient particle (PM<sub>10</sub>) exposure. *Cell Biol Toxicol* 2008; 24 (3): 243-52.
30. Roberts LJ, Milne GL. Isoprostanes. *J Lipid Res.* 2009; 50 (Suppl): S219-S223. doi:10.1194/jlr.R800037-JLR200.
31. Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med* 20Jul 5; 97: 398-407. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.003. [Epub ahead of print].
32. Richards RS, Roberts TK, McGregor NR, Dunstan RH, Butt HL. The role of erythrocytes in the inactivation of free radicals. *Med Hypotheses* 1998; 50 (5): 363-7.
33. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM 2,5 induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol in vitro* 2013; 27 (6): 1762-70.
34. Bekki K, Ito T, Yoshida Y, He C, Arashidani K, He M, et al. PM 2,5 collected in China causes inflammatory and oxidative stress response in macrophages through the multiple pathways. *Environ Toxicol Pharmacol* 2016; 45: 362-9.
35. Wiester MJ, Tepper JS, Doerfler DL, Costa DL. Ozone adaptation in rat after chronic exposure to a simulated urban profile of ozone. *Fundam. Appl Toxicol* 1995; 24 (1): 42-51.
36. Leon OS, Meneses S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, et al. Ozono oxidativo preconditioning: a protection against celular damage by free radicals. *Mediators Inflamm* 1998; 7 (4): 289-94.
37. Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Meneses S, Martínez-Sánchez G, Re L, et al. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditioning in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res* 2002; 45 (4): 333-9.
38. Ajamieh H, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and celular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver International* 2004; 24 (1): 55-62.
39. Zamora Z, Borrego A, López O, Delgado R, González R, Menéndez S, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF- Release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxemic shock. *Mediators Inflamm* 2005; 1 (1): 16-22.
40. Madej P, Plewka A, Madej J, Nowak M, Plewka D, Franik G, et al. Ozonotherapy in a induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation* 2007; 30 (1-2): 52-8. DOI:10.1007/s10753-007-9021-7.