
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**


**Evaluación de la alteración de las proteínas de la unión
estrecha en la línea celular pulmonar A549 en cocultivo con
células monocíticas THP1 por la exposición al compuesto
acetato de vitamina E**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A):

Jesus Javier Delgado Reyna

Matrícula: 2183071698

ASESORES


Asesor interno: Dr. Javier
Aldeco Ramírez


Asesora externa: Dra. Yazmín
Debray García

MARCO INSTITUCIONAL DEL PROYECTO

El proyecto se realizó en el departamento de Investigación en Toxicología y Medicina ambiental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), organismo descentralizado de la Administración Pública Federal, con personalidad jurídica y patrimonio propios, agrupado en el Sector Salud. La institución tiene por objeto principal en el campo de padecimientos del aparato respiratorio, la investigación científica, la formación y capacitación de recursos humanos calificados y la prestación de servicios de atención médica de alta especialidad, cuyo ámbito de competencia es todo el territorio nacional. La misión del INER es mejorar la salud respiratoria de los individuos y las comunidades a través de la investigación, la formación de recursos humanos y la atención médica especializada. Su visión es ser la entidad nacional normativa en salud respiratoria y el principal sitio de enseñanza, investigación, promoción y atención de alta especialidad, con competitividad nacional e internacional (INER, s.f.). Dicho servicio social se realizó del 15 de Enero al 16 Julio del 2023, los días de lunes a viernes, con un horario de 12:00 a 18:00 horas cumpliendo con seis horas de servicio social por día.

RESUMEN

En septiembre del 2019, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los EE. UU. alertó sobre un importante número de casos de enfermedad pulmonar asociada al uso de cigarrillo electrónico (e-cigarette or vaping associated lung injury, por sus siglas en inglés: EVALI), el cual es un síndrome de insuficiencia respiratoria aguda caracterizado por inflamación alveolar monocítica y neutrofílica. La frecuencia y uso del cigarrillo electrónico ha aumentado entre los adolescentes y adultos jóvenes en los últimos años. El acetato de vitamina E (VEA) es utilizado como producto espesante para la elaboración de líquidos de vapeo que contienen tetrahidrocanabinol (por sus siglas en inglés: THC) y algunos que contienen nicotina. Hasta el momento, es la principal sustancia asociada al EVALI y se ha encontrado en el lavado bronquio-alveolar de pacientes que usan cigarrillos electrónicos. Por ello, es importante evaluar las alteraciones que pudieran existir en las proteínas de la unión estrecha en el cocultivo de células monocíticas (THP-1) y de células humanas de epitelio alveolar basal (A549) ante la VEA; siendo estas últimas células las responsables de la difusión de sustancias a través de los alveolos de pulmón. La células A549 en cocultivo con THP-1 se expusieron a diferentes concentraciones de VEA durante 24 horas y se midió su viabilidad por el método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), se determinó una IC 50 y se seleccionó la concentración que no afectó la viabilidad en un 20% o superior. Se

realizaron exposiciones del cocultivo a 0.002% de VEA por 24 horas y se extrajo la proteína del cultivo para evaluar los marcadores de interés. Se determinaron los cambios presentes en la expresión de las proteínas de la unión estrecha Claudina 1, 2, 4 y Ocludina, por el método de Western Blot. Finalmente se midieron los niveles de Malonaldehído (MDA) y la actividad enzimática por los ensayos de Mieloperoxidasa (MPO), Gamma Glutamil Transferasa (GGT) y Glutathion S-transferasa (GST) en el sobrenadante del medio de cultivo. Los resultados mostraron que la exposición a la VEA indujo un aumento en la expresión de Ocludina y disminución de Claudina 1, sin cambios significativos en Claudina 2 y 4. En los ensayos de actividad enzimática se observó un incremento estadísticamente significativo de GST y MPO y una disminución de GGT. No hubo cambios en MDA. Los datos indican que la VEA puede metabolizarse por GST, genera estrés oxidante e induce la actividad antioxidante de la MPO, pero no genera daño a lípidos. El estrés oxidante podría participar en la modulación de la expresión de las proteínas de la unión estrecha.

Palabras Clave: Acetato de vitamina E, Vapeo, vitamina E, THP-1, A549.

INTRODUCCIÓN

En México, cada año mueren más de 63 mil personas por enfermedades relacionadas al tabaquismo. Los productos tradicionales de tabaco no son la única forma de adicción ni de suministro de nicotina. Desde hace algunos años, se ha observado un crecimiento en la venta de productos novedosos, tales como Sistemas Electrónicos de Administración de Nicotina, Sistemas Similares sin Nicotina, Sistemas Alternativos de Consumo de Nicotina, conocidos como cigarrillos electrónicos (e-cigs) y dispositivos vaporizadores con usos similares o productos de tabaco calentado (PTC) respectivamente, los cuales son una forma de suministro de nicotina. El impacto real de los e-cigs y los PTC en la salud de usuarios y su impacto general en la salud pública sigue en estudio. Sin embargo, se ha observado en diversos estudios que la exposición a estos dispositivos altera la función de la mitocondria, lo que puede contribuir a la inflamación de las vías respiratorias, la remodelación de las vías respiratorias y el cáncer de pulmón, además de dañar la salud de quienes lo consumen (Cofepris, 2023). Según una encuesta de la Comisión Nacional contra las Adicciones en el 2022, de la población mexicana de entre 12 a 65 años de edad, 975 mil personas utilizan vapeadores y 5 millones, lo han utilizado por lo menos una vez.

Los vapeadores, también conocidos como cigarros electrónicos o productos de tabaco calentado, contienen e-líquido con derivados químicos como la nicotina, el diacetilo, propilenglicol, la glicerina vegetal, el benceno y metales pesados como el

níquel, el estaño y el plomo, partículas ultrafinas, saborizantes, colorantes, entre otros, los cuales afectan principalmente el aparato respiratorio, incrementando el riesgo de desgarre, ruptura y pérdida de la estructura del tejido pulmonar, así como tumores en los pulmones (Boletín UNAM-DGCS-427, 2022).

El daño pulmonar asociado al uso de cigarrillos electrónicos o productos de vapeo (EVALI por sus siglas en inglés) es un síndrome de insuficiencia respiratoria aguda caracterizado por inflamación alveolar monocítica y neutrofílica. Las pruebas epidemiológicas y clínicas sugieren un papel del acetato de vitamina E (VEA por sus siglas en inglés) en el desarrollo del EVALI, aunque sigue sin estar claro si está tiene toxicidad pulmonar directa (Matsumoto *et al.* 2020). En Estados Unidos de América ha llegado al nivel de epidemia con miles de afectados y decenas de muertes. Todos los pacientes han presentado disnea progresiva, náusea, vómito, dolor abdominal y fiebre; y se han diagnosticado con neumonía lipoidea ya que en los lavados broncoalveolares se presentan gotas lipídicas dentro de los macrófagos, generando una lesión pulmonar local que impide o dificulta el intercambio gaseoso. Se sugiere que la presencia de las gotas lipídicas en los macrófagos es provocada por la VEA en las soluciones utilizadas en el vapeo. Debido a las manifestaciones clínicas, se han comenzado a evaluar los efectos a nivel celular provocados por los compuestos de los e-líquidos (líquidos de cigarrillos electrónicos).

Aunque existen regulaciones en nuestro país, el uso del cigarrillo electrónico es cada vez más frecuente y no se conoce el mecanismo de la lesión pulmonar asociada para realizar su debido reporte epidemiológico. La fisiopatología de esta enfermedad no se ha esclarecido debido a los numerosos compuestos que se añaden a los cigarrillos, pero particularmente relevantes son los diluyentes como la VEA que se añade cuando se usa tetrahidrocannabinol (Malagón *et al.* 2021).

Los compuestos formados durante el calentamiento de los líquidos de vapeo pueden entrar en contacto con la membrana alveolo capilar en el pulmón y traspasarla. La comunicación intercelular es fundamental para la regulación de varios procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, apoptosis y tumorigénesis. El transporte transepitelial ocurre a través de dos vías que son la transcelular y la paracelular. La vía transcelular se da a través de la célula y depende de la presencia de bombas, canales y transportadores transmembranales localizados en el lado apical y basolateral de la célula. El transporte paracelular ocurre de forma pasiva como resultado de la difusión, mediada por gradientes eléctricos y osmóticos, creados por mecanismos celulares y se lleva a cabo en el espacio entre célula y célula. Es decir, se regula por proteínas de la unión estrecha, las uniones adherentes, los desmosomas, hemidesmosomas y las uniones comunicantes (Salvo-Romero *et al.* 2015).

La unión estrecha celular se encuentra conformada por más de 40 diferentes moléculas, entre las que se encuentran: proteínas citosólicas que pueden servir

como proteínas estructurales o de anclaje, como las zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3); proteínas de regulación del tráfico vesicular involucradas en la señalización y la polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica y proteínas transmembranales, como las claudinas, ocludina y las moléculas de adhesión a la unión (JAM). Las claudinas juegan un papel en el mantenimiento de las funciones de barrera y, se ha relacionado con la permeabilidad y la polaridad celular de los epitelios; además se ha reportado que la alteración de claudinas está asociada en el desarrollo de procesos oncológicos (Niessen, 2007).

El patrón de expresión de las claudinas es específico de cada tejido, lo que contribuye, junto con el perfil de interacciones entre dichas proteínas, a las funciones especializadas en los tejidos epiteliales y endoteliales. Siendo las células de epitelio alveolar responsables de la difusión de sustancias a través de los alveolos de pulmón es importante evaluar las alteraciones que pudieran existir en las proteínas de la unión estrecha presentes. Además, en este proyecto se decidió trabajar con el cocultivo de células THP-1 células monocíticas y A549 células humanas de epitelio alveolar basal simulando una condición del epitelio alveolar y la respuesta de protección por las células del sistema inmune.

Dicha investigación se realizará con el objetivo de obtener evidencia científica para demostrar el daño y posible mecanismo que puede generar el uso de los cigarrillos electrónicos, así como concientizar a la población de los riesgos que conlleva el uso de vapeadores y el daño que estos pueden causar. Las actividades antes mencionadas están estrechamente relacionadas con la misión de la Licenciatura en Biología que es formar biólogos cuyas habilidades, competencias y conocimientos les permitan participar en problemas relacionados con los procesos biológicos fundamentales que rigen las interrelaciones de los seres vivos y su medio ambiente, enfatizando el proceso salud-enfermedad.

Antecedentes del proyecto

Los e-cigs son dispositivos que funcionan con pilas y aerosolizan mezclas líquidas de propilenglicol (PG), glicerina vegetal (VG), aromas y nicotina. Históricamente, en 2007, los dispositivos e-cig entraron en el mercado estadounidense y se emplearon como una estrategia para ayudar a dejar de fumar (Zhu *et al.* 2014). Desde entonces, se ha producido una expansión masiva de numerosos tipos de dispositivos e-cig y formulaciones de e-líquidos. Además, se han añadido varios sabores, como frutas, cremas, canela y mentol, al e-líquido, lo que atrae al mercado juvenil (Ma *et al.* 2022). En 2019 se admitieron en los hospitales pacientes con lesiones pulmonares asociadas al uso de cigarrillos electrónicos (EVALI) (CDC archives, 2019). En 2020, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) informaron de 2.807 casos de pacientes hospitalizados con EVALI, que se cobró la vida de 68 pacientes en Estados Unidos (CDC archives,

2019). Según la Encuesta Nacional sobre el Tabaco en los Jóvenes (NYTS), más de 2 millones de jóvenes estadounidenses declararon haber consumido cigarrillos electrónicos en 2021, y más del 85% de ellos declararon haber consumido cigarrillos electrónicos de vapeo (CDC archives2, 2023). Además, los datos más recientes de la encuesta NYTS de 2022 revelaron que los cigarrillos electrónicos son el producto del tabaco más consumido por los adolescentes desde el 2014 (CDC archives3, 2023).

Según el informe de una investigación inicial de salud pública realizada por los funcionarios del Departamento de Salud Pública de Nueva York, donde se identificaron 34 casos de esta enfermedad, se encontraron altos niveles de VEA en muestras de cannabis obtenidas de casi todos los pacientes (New York State Department of Health announces update on investigation into vaping-associated pulmonary illnesses, 2019). Como parte de esta investigación, la FDA analizó 12 muestras de e-líquidos con nicotina y 18 productos de THC y encontró la presencia de VEA en 10 de los 18 productos de THC. Desde entonces, los CDC han llevado a cabo una investigación para determinar el riesgo del cigarrillo electrónico o el EVALI. Los investigadores analizaron muestras de 51 casos de EVALI de 16 estados y un grupo de comparación de muestras de 99 personas sanas para VEA, aceites vegetales, aceite de triglicéridos de cadena media, aceite de coco, destilados de petróleo, terpenos diluyentes y otros productos. Se identificó VEA en muestras de líquido de lavado broncoalveolar (BAL) de 48 de los 51 pacientes con EVALI, pero no en el líquido de BAL del grupo de comparación saludable (CDC archives, 2019).

Un estudio publicado en el *New England Journal of Medicine* reportó la presencia de VEA en muestras recolectadas de 48 de 51 pacientes EVALI en 16 estados, lo cual proporciona otra evidencia que relaciona el compuesto con la aparición de lesiones pulmonares (Blount *et al.* 2020)

Las células epiteliales de las vías respiratorias se encuentran en la interfaz del medio interno y externo y actúan como la primera barrera contra las partículas inhaladas, toxinas y virus (Linfield *et al.* 2021, Gao & Rezaee, 2022). Estudios anteriores han demostrado que la exposición al humo de los cigarrillos convencionales altera la integridad del epitelio de las vías respiratorias, disminuyendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y aumentando la permeabilidad. Un estudio investigó el efecto del vapor del e-cig que contiene nicotina en la permeabilidad de las vías respiratorias (Crotty *et al.* 2018). Otros dos estudios midieron la TEER y la permeabilidad tras la exposición a PG:VG o Creme Brûlée flavor, obteniendo una reducción en la TEER, que se asoció con una mayor permeabilidad de los solutos transepiteliales, pero no investigaron el papel de la nicotina (Muthumalage *et al.* 2019, Woodall *et al.* 2020). Cabe destacar que ninguno de estos estudios investigó los efectos de los cigarrillos electrónicos en los complejos de unión apical, un factor crucial que regula la formación y el

mantenimiento de la barrera epitelial, además del poco conocimiento sobre el impacto de la exposición a los cigarrillos electrónicos en la integridad de las células epiteliales de las vías respiratorias.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Determinar la alteración de las proteínas de la unión estrecha en el cocultivo de células A549 y THP-1 por la exposición al compuesto acetato de vitamina E.

Objetivos particulares:

- Exponer el cocultivo de las células A549 y THP-1 al compuesto acetato de vitamina E.
- Cuantificar y determinar la expresión de proteínas de la unión estrecha Claudina 1, Claudina 2, Claudina 3 y ocludina por Western Blot.

METODOLOGÍA Y DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS

Se descongelaron células A549 y THP-1 y se sembraron en cajas P100 y en botellas para células en suspensión, respectivamente. Se mantuvieron en la incubadora bajo las condiciones óptimas (37°C y una atmósfera con CO₂ al 5%) hasta obtener el número de células necesarias, realizando las propagaciones respectivas.

Se tiñeron las células con azul de tripano para hacer el conteo celular. Se sembraron las células A549 a una confluencia de 45,000 células por centímetro cuadrado y se incubaron por 24 hrs para que se formara una monocapa. Al día siguiente, se adicionaron las células THP-1 en una proporción 2:1 respecto a las A549 y se añadió el tratamiento (VEA) a diferentes concentraciones por 24 hrs para determinar la concentración adecuada para la explosión del cocultivo mediante el método de viabilidad de MTT. Con los resultados se construyó una IC50 en donde se determinó la concentración a la cual las células comenzaban a sufrir daño, y se empezaba a observar una disminución de estas la cual fue del 80%, obteniendo una concentración de 0.002%.

Posteriormente se realizó nuevamente el proceso de siembra celular pero con la exposición del cocultivo al tratamiento a la concentración elegida durante 24 hrs. Pasadas las 24 hrs de exposición al tratamiento, se recolectó el sobrenadante y se

realizó el lisado de las células para la obtención de proteínas. Se realizaron tres exposiciones independientes y para cada una de ellas, la condición control consistió en células sin tratamiento, sólo medio de exposición.

La cuantificación de proteínas de los cocultivos en el lisado de las células se determinó por el método de Lowry en microplaca (National Academy of Sciences, n.d.). Dicho método colorimétrico sirve para medir con un alto nivel de sensibilidad y mediante dos reacciones químicas, la cantidad de proteína y fosfato inorgánico en una solución. La primera reacción (reacción de Biuret) consiste en la reducción del ion cobre (II) en condiciones alcalinas, formando un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico (complejos cuproprotéicos). De esta manera, la segunda reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles, reducen el reactivo de Folin a un complejo de color azul y posteriormente las muestras se leen a 590 nm. Para dicho método se utiliza una curva standard de albumina sérica bovina (1 mg/ml).

El Western Blot se realizó con una concentración de 10µg de proteína para determinar las proteínas de la unión estrecha Claudina 1, Claudina 2, Claudina 4 y ocludina. Este método implica el uso de electroforesis en gel de acrilamida del 15% con el fin de separar las proteínas por su peso y tamaño, posteriormente se transfieren del gel a la superficie de una membrana de PVDF, la cual posteriormente se expone a un anticuerpo primario específico para la proteína que se pretende estudiar. A continuación, la unión del anticuerpo se detecta con el uso de un anticuerpo secundario y su expresión se analiza semicuantitativamente con el programa Image J (Mahmood & Yang, 2012; Western blot, n.d.).

La determinación de la actividad enzimática de MPO (Mieloperoxidasa, modificado de Suzuki *et al* 1983), MDA (Malondialdehído, Esterbauer *et al.* 1991) GST (Glutación S-transferasa, modificado de Habing *et al* 1974) y GGT (Gamma-glutamyl transferasa, Scund, 1976) se realizaron con los sobrenadantes de los cocultivos por el método de microplaca y por triplicado para cada muestra.

Para finalizar se efectuó el análisis estadístico de los cambios en la expresión de cada una de las proteínas evaluadas en las líneas celulares. Dicho análisis estadístico dependió del comportamiento paramétrico o no paramétrico de los datos y la comparación de grupos. Se usó el programa Graph Pad prism para analizar los datos obtenidos y para graficar los resultados se utilizó una t student con los promedios \pm desviación estándar (DE) de tres ensayos independientes por triplicado con los valores obtenidos.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Objetivo general: Determinar la alteración de las proteínas de la unión estrecha en el cocultivo de células A549 y THP-1 por la exposición al compuesto acetato de vitamina E.

Se determinó la expresión de las proteínas de la unión estrecha de las células pulmonares Claudina 1, 2, 4 y ocludina por la exposición al compuesto VEA por el método de Western Blot y la comparación contra la condición control.

Objetivos particulares:

1._Exponer el cocultivo de las células A549 y THP-1 al compuesto acetato de vitamina E.

Se expuso el cocultivo logrando hacer tres experimentos independientes, con su respectivo control (condición control).

2._Cuantificar y determinar la expresión de proteínas de la unión estrecha Claudina 1, Claudina 2, Claudina 3 y ocludina por Western Blot.

Se cuantificaron las proteínas en el lisado de las células de los cocultivos para posteriormente determinar la expresión de las mismas con el método de Western Blot.

Finalmente se compararon las dos condiciones (Control y expuesta a VEA) del cocultivo con un análisis estadístico con el fin de determinar diferencias en la expresión de las proteínas

RESULTADOS

Se expuso el cocultivo de células A549 y THP-1 al compuesto VEA durante 24 horas a diferentes concentraciones para determinar la concentración que no dañara las células en más del 80% mediante el método de viabilidad de MTT. Adicionalmente se expuso cada línea celular a la VEA para observar su comportamiento individual (Fig. 1A).

En la Figura 1A se observa la gráfica de la viabilidad celular que presentaron las células A549 (color azul), las células THP-1 (color rojo) y su cocultivo (color morado) expuestos a diferentes porcentajes del tratamiento con VEA. Se observa que a mayor concentración del tratamiento se presenta una menor viabilidad celular. Con los resultados anteriores, se construyó una curva de viabilidad para conocer la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) y determinar la concentración adecuada para exponer a las células, a la cual se tenga un porcentaje de viabilidad entre 80 y 90. La Figura 1B presenta las curvas sigmoideas de viabilidad para cada

cultivo analizado, expresados como el porcentaje del control y el $-\text{Log}$ de los porcentajes de VEA empleados. Se aprecia que el cocultivo tiene un comportamiento intermedio al de las células independientes y que las células THP-1 son más resistentes al compuesto. Se indica mediante una línea punteada el corte al 80% para la determinación de la concentración para la exposición. La concentración elegida fue de 0.002% de VEA. La figura 1C presentan los valores de la IC_{50} y pIC_{50} ($-\text{Log IC}_{50}$) obtenidos mediante la graficación de las curvas. Los resultados muestran que no hay diferencia en la potencia de la VEA para afectar la viabilidad en las distintas líneas celulares.

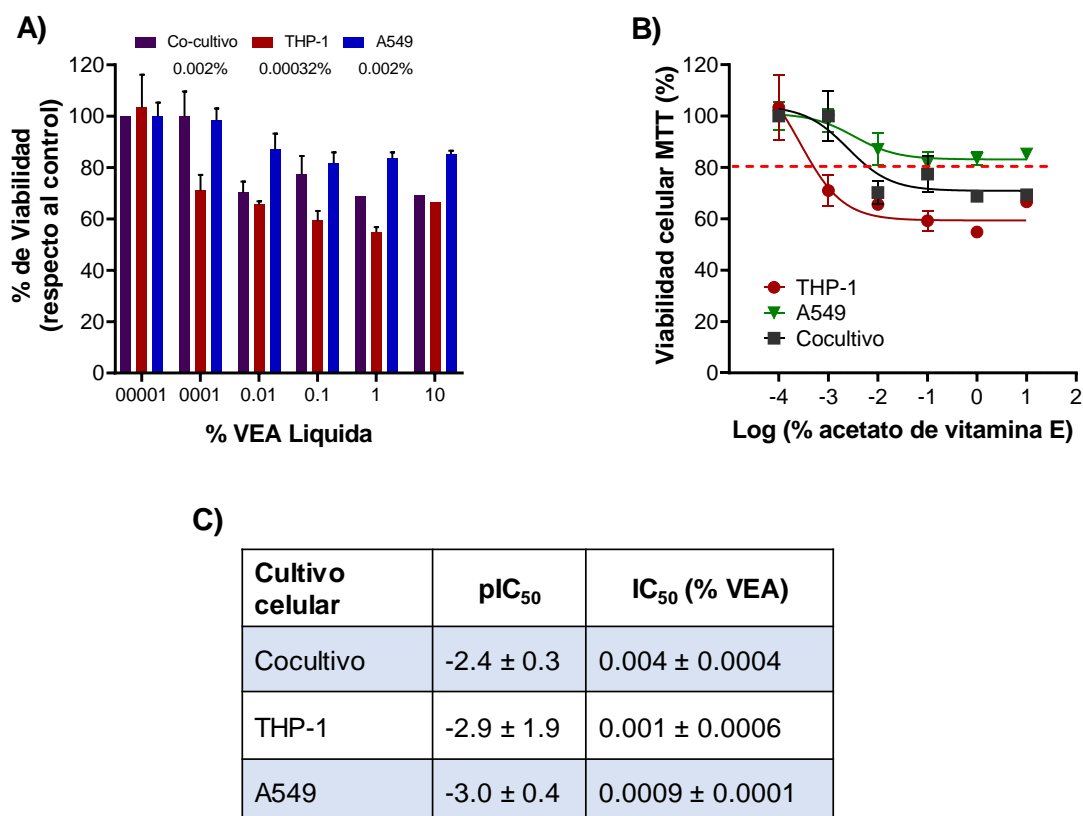


Figura 1. Efecto sobre la viabilidad celular mediante MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio. A) Viabilidad celular media, B) Curva de inhibición representativa con ajuste a un sitio, C) Tabla de valores de IC_{50} , pIC_{50} ($-\text{Log IC}_{50}$). Diferencias no estadísticas entre pIC_{50} en co-cultivo, THP-1 y A549. Los valores son medias \pm DE de tres ensayos por triplicado. El análisis estadístico se realizó con Anova y la prueba de Tukey. Posteriormente, se determinó la expresión de las proteínas de la unión estrecha Claudina 1, Claudina 2, Claudina 4 y ocludina por el método de Western Blot. Luego se efectuó el análisis estadístico de los cambios en la expresión de cada una de las proteínas evaluadas en el cocultivo con ayuda del programa Graph Pad prism para analizar, graficar y presentar los resultados obtenidos (Fig. 2).

En la figura 2A se observa la gráfica de la expresión de Claudina 1 una proteína con selectividad aniónica que forma de manera predominante barreras catiónicas y en la cual podemos observar una disminución significativa respecto al control, lo que nos puede sugerir que las proteínas están dejando pasar moléculas catiónicas y por tanto el epitelio se está haciendo más permeable

En la figura 2B se observa la gráfica de la expresión de Claudina 2 una proteína con selectividad catiónica que forma de manera predominante poros catiónicos y en la cual podemos observar una disminución significativa respecto al control, lo que nos puede sugerir que el epitelio se está volviendo menos permeable dejando pasar menos moléculas

En la figura 2C se observa la gráfica de la expresión de Claudina 4 una proteína con selectividad aniónica que tiene el potencial de formar poros aniónicos o barreras catiónicas y en la cual podemos observar un aumento significativo respecto al control, lo que nos puede sugerir que el epitelio se está haciendo más permeable

En la figura 2D se observa la gráfica de la expresión de Ocludina una proteína que juega un papel importante en la formación y regulación de la barrera de permeabilidad y en la cual podemos observar un aumento significativo respecto al control, lo que nos puede sugerir se está intentado compensar el daño hecho por el tratamiento.

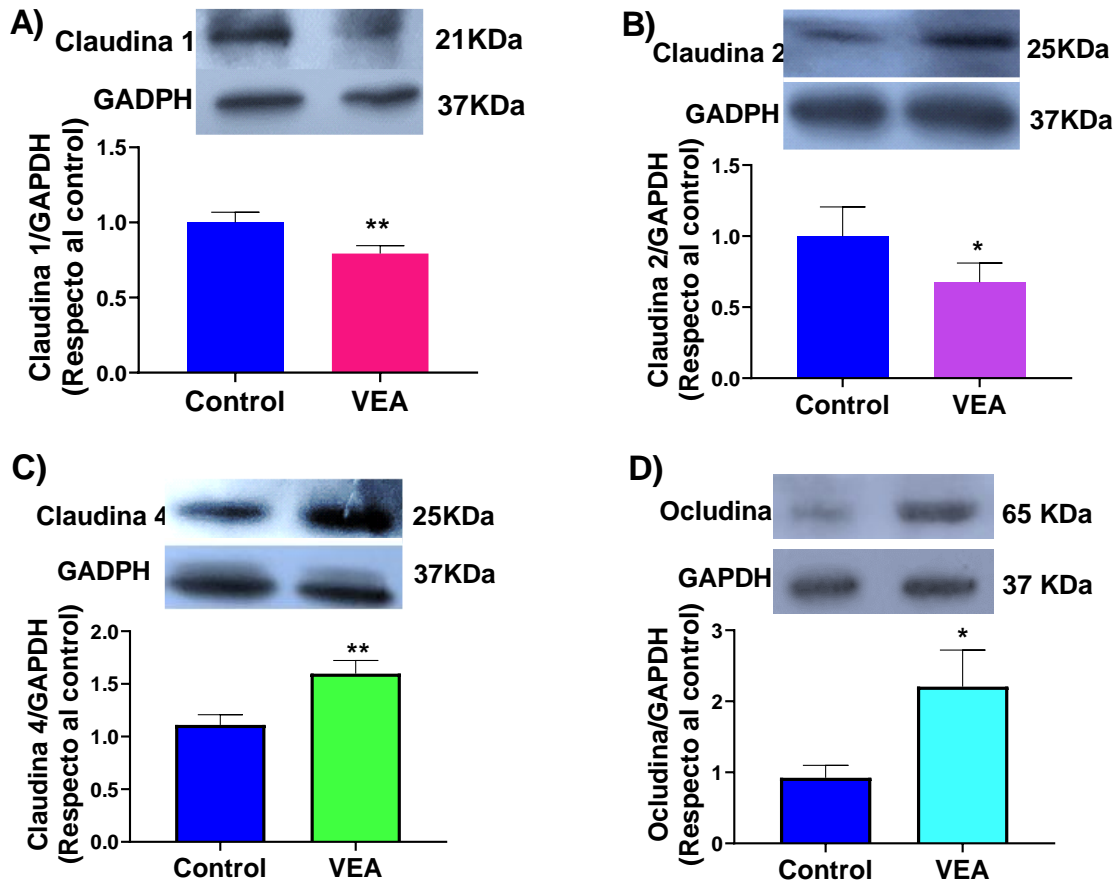


Figura 2. Efecto sobre las proteínas de la unión estrecha en las células de cocultivo. A) Claudina 1. B) Claudina 2. C) Claudina 3. D) Occludina. Los valores son promedios \pm DE de tres ensayos independientes por triplicado. El análisis estadístico se realizó con t student. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$

Adicionalmente se hicieron pruebas de estrés oxidante en los sobrenadantes de los cocultivos para ver si el compuesto VEA a esta concentración estaba generando un daño oxidativo.

En la figura 3 se observa la gráfica de las pruebas de estrés oxidante hechas en los sobrenadantes de los cocultivos.

En la figura 3A se observa la gráfica de los niveles de MDA, un producto de la lipoperoxidación e indicador de generación de ROS, en la que podemos observar que no se encuentran diferencias significativas con respecto al control y lo que sugiere que no se está teniendo daño a lípidos por la exposición de VEA.

En la figura 3B se observa la gráfica de la actividad de GST una enzima detoxificante de xenobioticos y en la que podemos observar una disminución significativa con respecto al control, lo que sugiere que la VEA se está eliminando

lentamente y se está teniendo una permanencia por más tiempo de esta y posiblemente una acumulación de la misma.

En la figura 3C se observa la gráfica de los niveles de MPO una enzima catalizadora de la liberación del ácido hipocloroso, una especie oxidante que se ocupa para la eliminación de xenobioticos por parte de los monocitos y neutrófilos ante una inflamación/estrés oxidante y en la que podemos observar una disminución significativa con respecto al control, lo que sugiere que la VEA puede estar actuando o simulando como una enzima antioxidante y por eso observamos una disminución de esta

En la figura 3D se observa la gráfica de la actividad de GGT una enzima que favorece la formación de la GSH (gamma-glutamil-cisteinil-glicina) un antioxidante, en la que podemos observar una disminución significativa con respecto al control lo que sugiere que la VEA puede estar actuando o simulando como un antioxidante y por eso observamos una disminución de esta como posible mecanismo de compensación.

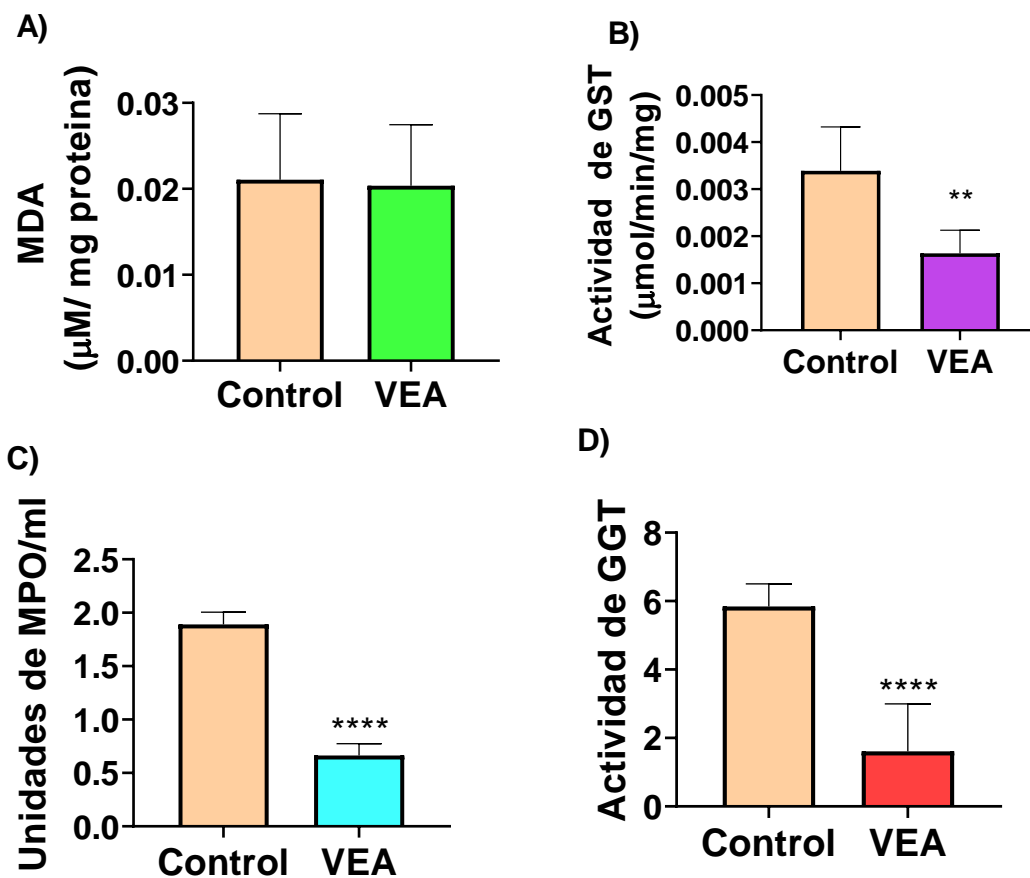


Figura 3. Efecto sobre el estrés oxidante en el sobrenadante del cocultivo celular.

A) Niveles de malondialdehído (MDA). B) Actividad de la Glutation-S-Transferasa (GST). C) Niveles de mieloperoxidasa (MPO). D) Actividad de la gamma-glutamyl transferasa (GGT). Los valores son la media \pm DE de tres ensayos independientes por triplicado y ajustados por proteína. El análisis estadístico se realizó con t student. **P \leq 0,01; ****P \leq 0,001

CONCLUSIONES

- El cocultivo tiene un comportamiento de viabilidad intermedio que los cultivos individuales después del tratamiento con VEA.
- Las proteínas de la unión estrecha (Claudina 1, 2, 4 y ocludina) tienen un comportamiento diferencial que se asocia a su función y mecanismos compensatorios.
- Los efectos del estrés oxidante son evidentes en el sobrenadante de los cocultivos disminuyendo los niveles de MPO y las actividades de GST y GGT. Los datos sugieren que la VEA líquida aparentemente tiene un papel protector a la concentración utilizada.

BIBLIOGRAFÍA

- ∞ Blount, B.C., Karwowski, M.P., Shields, P.G., Morel-Espinosa, M., Valentin-Blasini, L., Gardner, M., & Pirkle, J.L. (2020). Vitamin E acetate in bronchoalveolar-lavage fluid associated with EVALI. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 697-705. From: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1916433>
 - ∞ CDC archives. (2019). Outbreak of lung injury associated with the use of electronic cigarette products or vaping. Cdc.gov. From: https://archive.cdc.gov/#/details?url=https://www.cdc.gov/tobacco/basic_informatio_n/e-cigarettes/severe-lung-disease.html
 - ∞ CDC archives. (2023). Burden of cigarette smoking in the U.S. Cdc.gov. From: <https://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/resources/data/cigarette-smoking-in-united-states.html>
 - ∞ CDC archives. (2023). Youth and tobacco use. Cdc.gov. From: https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/youth_data/tobacco_use/
 - ∞ Cofepris. (2023). Vapeadores: lo oculto. *Ciencia Cofepris*. Obtenido de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/793364/Revista_EneroFebrero_2_.pdf
- Crotty A.L.E., Drummond, C.A., Hepokoski, M., Mathew, D., Moshensky, A., Willeford, A., & Breen, E.C. (2018). Chronic inhalation of e-cigarette vapor containing nicotine disrupts airway barrier function and induces systemic

- inflammation and multiorgan fibrosis in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314(6), R834-R847. From: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpregu.00270.2017>
- ∞ Boletín UNAM-DGCS-427. (2022). Vapeadores y cigarros electrónicos, nuevo reto de salud pública. Obtenido de: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022_427.html
 - ∞ Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical Biology and medicine*, 11(1), 81-128. From: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584991901926>
 - ∞ Gao, N., & Rezaee, F. (2022). Airway epithelial cell junctions as targets for pathogens and antimicrobial therapy. *Pharmaceutics*, 14(12), 2619. From: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/12/2619>
 - ∞ INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas). (s.f.). ¿Qué hacemos?. Obtenido de: <https://www.gob.mx/salud%7Ciner/que-hacemos>
 - ∞ Linfield, D. T., Raduka, A., Aghapour, M., & Rezaee, F. (2021). Airway tight junctions as targets of viral infections: tight junctions and viral infections. *Tissue barriers*, 9(2), 1883965. From: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21688370.2021.1883965>
 - ∞ Ma, S., Qiu, Z., Yang, Q., Bridges, J. F., Chen, J., & Shang, C. (2022). Expanding the e-liquid flavor wheel: classification of emerging e-liquid flavors in online vape shops. *International journal of environmental research and public health*, 19(21), 13953. From: <https://www.mdpi.com/1660-4601/19/21/13953>
 - ∞ Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429. From: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>
 - ∞ Malagón-Liceaga, A., Basile-Álvarez, M. R., Shahin-Sabines, Y., & Elizalde-González, J. J. (2021). Manifestaciones pulmonares relacionadas al uso del cigarro electrónico: una revisión de la literatura. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 80(3), 197-203. Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=102480>
 - ∞ Matsumoto, S., Fang, X., Traber, M. G., Jones, K. D., Langelier, C., Hayakawa Serpa, P., ... & Gotts, J. E. (2020). Dose-dependent pulmonary toxicity of aerosolized vitamin E acetate. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 63(6), 748-757. From: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1165/rcmb.2020-0209OC>
 - ∞ Modificado de Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. From: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819420838>
 - ∞ Modificado de Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear

leukocytes. Analytical biochemistry, 132(2), 345-352. From:

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2)

- ∞ Muthumalage, T., Lamb, T., Friedman, M. R., & Rahman, I. (2019). E-cigarette flavored pods induce inflammation, epithelial barrier dysfunction, and DNA damage in lung epithelial cells and monocytes. *Scientific reports*, 9(1), 19035. From: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-51643-6>
- ∞ National Academy of Sciences (NAS). (n.d.). Oliver H Lowry. From: <https://www.nasonline.org/member-directory/deceased-members/53120.html>
- ∞ New York State Department of Health announces update on investigation into vaping-associated pulmonary illnesses. (2019). Health.ny.gov. From: https://www.health.ny.gov/press/releases/2019/2019-09-05_vaping.htm
- ∞ Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *Journal of investigative dermatology*, 127(11), 2525-2532. From: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X15331833>
- ∞ Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 107(11), 686-96. From: https://online.reed.es/Revistas/REED_2015_107_11/Contenido/pdf/vol107num11_en_7.pdf
- ∞ Scund, J. (1976). Método recomendado para la determinación de γ -Glutamyltransferasa. In *Blood Lab. Invest.*, Vol.36.
- ∞ Western blot. (n.d.). Genome.gov. From: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Western-Blot>
- ∞ Woodall, M., Jacob, J., Kalsi, K. K., Schroeder, V., Davis, E., Kenyon, B., ... & Baines, D. L. (2020). E-cigarette constituents propylene glycol and vegetable glycerin decrease glucose uptake and its metabolism in airway epithelial cells in vitro. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 319(6), L957-L967. From: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajplung.00123.2020>
- ∞ Zhu, S. H., Sun, J. Y., Bonnevie, E., Cummins, S. E., Gamst, A., Yin, L., & Lee, M. (2014). Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: implications for product regulation. *Tobacco control*, 23(suppl 3), iii3-iii9. From: https://tobaccocontrol.bmj.com/content/23/suppl_3/iii3.short