

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO DE LAS PARTÍCULAS FINAS
(PM_{2,5}) Y ULTRAFINAS (PM_{0,1}) DEL AIRE, EN MODELOS DE CÉLULAS
BRONQUIALES SANAS, ASMÁTICAS Y CON EPOC**

Tesis presentada por la Bachiller:

Hinojosa Aramayo, Arian Steffy

para optar por el Título profesional de

Químico Farmacéutico.

Asesora:

Dra. Vera López, Karin

Arequipa – Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARÍA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20170000043441

N° Trámite en Fac. 1717-2017

Fecha 27-09-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: *HINOJOSA ARAMAYO, Arian Steffy*

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE LAS PARTICULAS FINAS (PM_{2.5}) Y ULTRAFINAS (PM_{0.1}) DEL AIRE EN MODELOS DE CELULAS BRONQUIALES SANAS, ASMATICAS Y CON EPOC"

DICTAMINADORES: 1) *Dr. Jaime Cárdenas García* 2) *Mgter. Julitza Paredes Fuentes*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas :

(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha *19/10/2018*

ASESOR: *Dra. Karín Vera López*

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación de asesor del presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, y verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

Firma

Fecha *29/11/2020*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) *Dr. Jaime Cárdenas García*

3) *Mgter. Julitza Paredes Fuentes*

2) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar*

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

Firma

(Devolver antes de 15 días hábiles)

Fecha *23 abril 2021*

JURADOS: Presidente *Dr. Jaime Cárdenas García*
Vocal *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar*
Secretario *Mag. Julitza Paredes Fuentes*

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha:

Hora:

Local: C- 402 (SUM)

DECANO

DEDICATORIA

A Dios, por guiar mis pasos en todo aspecto de mi vida.

A mis padres Amparo y Edgardo, por ser pilares fundamentales en cada paso que doy, a quienes admiro por ser ejemplo de disciplina, optimismo y dedicación; y agradezco por sus consejos, valores, educación, por cada gesto de amor y orgullo.

A mis hermanos Grace y Mauricio, por su amistad, apoyo y amor infinito.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres, por su apoyo y motivación en todos los aspectos de mi vida.

Gracias al Dr. Guillaume Garcon y a mi compañero de tesis Jules Sotty por su paciencia, dedicación, motivación, aliento y amistad no solo durante mi estancia en Francia si no también después de ello.

Gracias a la Universidad de Lille 2 – Francia por acogerme y darme la oportunidad de aprender.

Gracias a la Dra. Karin Vera, por aceptar ser mi asesora, por su paciencia y apoyo en la realización de este proyecto.

Gracias a las personas que de una manera u otra han sido claves en mi vida, por motivarme y enseñarme a crecer profesional y personalmente.

RESUMEN

La contaminación del medio ambiente en los últimos años ha cobrado gran importancia ya que representa un problema en Salud Pública en el mundo, sin distinción entre los países desarrollados y en vías de desarrollo. Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de cada nueve personas a nivel mundial, muere a causa de la contaminación atmosférica, convirtiéndose en uno de los principales riesgos de la salud en la actualidad. Las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$) se encuentran en el aire que respiramos, si las concentraciones de estas partículas exceden los límites permisibles, podrían generar o exacerbar patologías del tracto respiratorio como el asma o la Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC).

En el presente estudio realizado en el Laboratorio de Impacto del Entorno químico en la Salud humana (IMPECS) de la Universidad de Lille 2– Francia, se logró obtener la cantidad necesaria de células epiteliales bronquiales sanas, con EPOC y con asma luego del cultivo celular primario, así mismo, se logró caracterizar las células epiteliales bronquiales. Se confirmó la caracterización identificando proteínas características de dichas células como: MUC5 y b-tubulina con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, luego se expusieron los tres tipos de células epiteliales bronquiales a las partículas $PM_{2,5}$ o $PM_{0,1}$ de acuerdo a dos protocolos según tiempo de exposición a los dos tipos de partículas, el primer protocolo fue por 6 horas y el segundo protocolo por 54 horas. Posteriormente se midió la expresión de citocinas proinflamatorias como TGF α , GMCSF, GRO, IL13, IL1b, IL2, IL6, IL8, MCP1, RANTES y TNF α en el medio extracelular con ayuda del kit Milliplex® MAP Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel - HCYTOMAG-60K (Merck Millipore, Massachussets). Según los resultados obtenidos se puede concluir que las partículas finas y ultrafinas afectan enfermedades como asma y EPOC.

Con este estudio *In Vitro* se quiere demostrar la importancia que tiene el análisis y monitoreo de la calidad del aire y su relación directa con enfermedades respiratorias, cabe mencionar que este estudio fue realizado en la ciudad de Lille, Francia y servirá como antecedente para iniciar estudios preliminares en nuestra ciudad, ya que Arequipa presenta una de las atmosferas más contaminadas por el incremento del parque automotor en los últimos años.

Palabras claves: Material Particulado, Partículas Finas, Partículas Ultrafinas, Citocinas.

ABSTRACT

The pollution of the environment in recent years has gained great importance for its consequences at the level of soil, water and air. Air pollution represents a problem in Public Health in our country and in the world, without distinction between developed and developing countries. According to WHO reports, one in nine people worldwide dies from air pollution, currently being one of the main health risks in the world. The fine and ultrafine particles ($PM_{2.5}$ and $PM_{0.1}$), are components of the air we breathe, which if found in concentrations that exceed the permissible limits could generate or exacerbate pathologies of the respiratory tract such as asthma or Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

In the present study carried out at the Laboratory for the Impact of the Chemical Environment on Human Health (IMPECS) of the University of Lille 2 - France, it was possible to obtain the necessary amount of healthy bronchial epithelial cells, with COPD and asthma after cell culture. Likewise, it was possible to characterize the bronchial epithelial cells. The characterization was confirmed by identifying characteristic proteins of said cells such as: MUC5 and b-tubulin with the indirect immunofluorescence technique, then the three types of bronchial epithelial cells were exposed to $PM_{2.5}$ or $PM_{0.1}$ particles according to two protocols according to exposure time to the two types of particles, the first protocol was for 6 hours and the second protocol for 54 hours. Subsequently, the expression of pro-inflammatory cytokines such as TGF α , GMCSF, GRO, IL13, IL1b, IL2, IL6, IL8, MCP1, RANTES and TNF α was measured in the extracellular medium with the help of the Milliplex® MAP Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel - HCYTOMAG kit. -60K (Merck Millipore, Massachusetts). According to the results obtained, it can be concluded that fine and ultrafine particles affect diseases such as asthma and COPD.

With this In Vitro study we want to demonstrate the importance of the analysis and monitoring of air quality and its direct relationship with respiratory diseases, it is worth mentioning that this study was carried out in the city of Lille, France and will serve as a background to start studies preliminary tests in our city, since Arequipa has one of the most polluted atmospheres due to the increase in the number of vehicles in recent years.

Keywords: Particulate Material, Fine Particles, Ultrafine Particles, Cytokines.

INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire representa un importante riesgo medioambiental para la salud, tanto en los países desarrollados o en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), una de cada nueve personas en todo el mundo muere a causa de la contaminación atmosférica, siendo actualmente uno de los principales riesgos de la salud en el mundo ⁽¹⁾.

Según estimaciones realizadas por la OMS en el año 2012, la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 3 millones de defunciones prematuras; esta mortalidad se debe a la exposición de las partículas de 10 micrones de diámetro (PM_{10}) o menos ($PM_{2,5}$ y $PM_{0,1}$), ya que pueden causar cardiopatías, neumopatías y cáncer ⁽¹⁾.

El aire puede estar contaminado con una amplia variedad de partículas de índole muy diversa, como polvo, polen, hollín, humo y pequeñas gotas. Muchas de las cuales pueden ser perjudiciales para la salud, sobre todo las partículas de tamaño muy reducido como el material particulado de 10 micrones (PM_{10}), 2,5 micrones ($PM_{2,5}$) y 0,1 micrones ($PM_{0,1}$) que pueden penetrar en los pulmones. Existe una estrecha relación cuantitativa entre la exposición a altas concentraciones de dichas partículas (PM_{10} y $PM_{2,5}$) y el aumento de la mortalidad o morbilidad diaria y a largo plazo ⁽²⁾.

El material particulado (PM), forma parte de los denominados contaminantes criterios considerados como de mayor impacto en la salud humana, razón por la cual, cada país establece normas de calidad del aire para proteger la salud pública de sus ciudadanos. Además, estas normas son un componente importante de las políticas nacionales de gestión de riesgo y ambientales. Las normas nacionales varían en función del enfoque con el fin de equilibrar los riesgos para salud, la viabilidad tecnológica, aspectos económicos y otros factores de diversa índole, que a su vez dependerán, entre otras cosas, del nivel de desarrollo y la capacidad nacional en relación con la gestión de la calidad del aire ⁽³⁾.

La contaminación del aire en el Perú es un tema que adquiere importancia desde la creciente industrialización, los gases tóxicos emanados principalmente por el tugurizado, el crecimiento del parque automotor y su escasa renovación, también por el uso de combustibles fósiles, afectando la flora, fauna y ecosistemas ⁽⁴⁾.

El adulto medio respira más de 15 m^3 de aire cada día y aunque los contaminantes del aire son a menudo invisibles, sus efectos en la salud pueden ser graves, especialmente en los pulmones, corazón y otros órganos sistémicos, así como en el desarrollo del feto ⁽⁴⁾.

Según estimaciones de la OMS en el año 2004, hay unos 235 millones de personas que padecen asma, 64 millones que sufren enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC) en el mundo, y muchos millones de personas más que sufren rinitis alérgica y otras enfermedades respiratorias crónicas (ERC) que a menudo no llegan a diagnosticarse ⁽⁵⁾. Las enfermedades respiratorias se encuentran en el octavo puesto de las causas de mortalidad en el Perú (OMS, 2014) ⁽⁶⁾. Más del 90% de fallecidos por EPOC y más del 80% de muertes por asma tienen lugar en países de ingresos bajos y medios-bajos ⁽⁶⁾.

Tanto la OMS como el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) han resaltado la contaminación del aire ambiental como una de las áreas focales estratégicas para combatir las causas fundamentales de mortalidad y morbilidad a nivel mundial ⁽⁷⁾.

Los países latinoamericanos con mayor cantidad de muertes atribuidas a la contaminación ambiental son: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, México, Perú, Uruguay y Venezuela (2004 - 2008) ⁽⁸⁾.

Como manifiesta la Asociación Estadounidense del Pulmón (*American Lung Association*) “la contaminación del aire por ozono y partículas es la más extendida y entre las más peligrosas” ⁽⁸⁾.

En el 2011, de 16 ciudades de diferentes países latinoamericanos en los cuales se midieron las concentraciones de partículas gruesas PM_{10} , todas excedieron los valores determinados en las Guías de Calidad del Aire (GCA) anual de la OMS de $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y 9 de ellas excedieron el estándar anual de la Unión Europea (UE) de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$. La mayoría está dentro del rango de 30 a $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, estando por encima de los valores establecidos por la OMS para cada país, siendo México el que mostro valores más elevados, con una concentración de $85,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} y Puerto Rico el de valores más bajos con una concentración de $24,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM_{10} . El Perú se ubica en el puesto 11 con una concentración de PM_{10} de $62,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En cuanto a las partículas finas ($\text{PM}_{2,5}$), 10 excedieron las GCA anual de la OMS ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y el estándar de la USEPA (United States Environmental Protection Agency) ($15 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y 8 de ellas sobrepasaron el estándar anual de la UE ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$), siendo Colombia el más elevado con

una concentración de $35,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y Puerto Rico el más bajo con $5,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Perú se encuentra en la posición 9 con una concentración de $31,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ⁽⁹⁾.

En el año 2012 a nivel mundial murieron 172392 personas a causa del asma y 1193590 personas por EPOC, en América 5581 personas por asma y 39980 personas por EPOC y en Europa, 10047 personas por asma y 40636 personas por EPOC (OMS). Estas cifras están en aumento, en el 2015 se estima que murieron a causa de la EPOC cerca de 3 millones de personas en todo el mundo, la principal causa es la exposición al humo del tabaco (fumadores activos y pasivos). Otros factores de riesgo son la exposición al aire contaminado, tanto de interiores como de exteriores, así como al polvo y el humo en el lugar de trabajo ⁽⁹⁾.

Según un estudio realizado entre el 2014 y 2015 en Argentina la prevalencia de asma alcanza el 9,5% de la población, es decir 1383621 habitantes y la EPOC es la cuarta causa de muerte según la Organización Mundial de la Salud con un 11,1%. En Bélgica el porcentaje de muertes por enfermedades respiratorias crónicas es del 7% del cual 4,6% son las muertes por EPOC siendo la quinta causa de mortalidad. Bolivia presenta un porcentaje del 3% de mortalidad por enfermedades respiratorias crónicas. Brasil tiene a la EPOC como la octava causa mortalidad con un porcentaje de 44,8%. Chile tiene un porcentaje de 2,9% de muertes por EPOC y es la causa número 10 de muerte en este país. Cuba tiene un porcentaje de 3,2% de muertes por EPOC, siendo la séptima causa de mortalidad. Suecia entre sus causas de mortalidad tiene a la EPOC en sexto lugar con un porcentaje de 3% (OMS, 2012). Perú entre sus causas de muerte tiene a la EPOC como la octava causa de mortalidad con un porcentaje de 2,2% ⁽⁹⁾.

Por lo antes mencionado resulta de suma importancia el análisis de estas partículas en pacientes con asma, EPOC y pacientes sanos.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVOS	15
HIPOTESIS	16
CAPÍTULO I	17
1. Marco Teórico.....	17
1.1 Clasificación del material particulado.....	18
1.2 Propiedades y comportamiento del material particulado	20
1.2.1 Parámetros Farmacocinéticos del material particulado.....	21
1.2.1.1 Depósito del material particulado en el tracto respiratorio.....	21
1.2.1.2 Retención y limpieza de partículas	23
1.3 Composición del material particulado:.....	24
1.4 Fuentes del material particulado:.....	25
1.4 Estándares de la calidad del aire	27
1.7 Epitelio bronquial.....	30
1.7.1 Histología y fisiología del epitelio bronquial.....	30
1.7.2 Bronconeumopatías crónicas	31
1.7.2.1 Asma	32
1.7.2.2 EPOC.....	34
1.8 Cultivo celular:	34
1.8.1 Tipos de cultivos celulares y características	35
1.10 Viabilidad celular.....	36
1.10.1 Tipos de ensayos de viabilidad celular.....	37
1.10.1.1 Ensayos de reducción de tetrazolio	37
1.10.1.2 Ensayo de marcador de viabilidad de proteasa.....	37
1.10.1.3 Ensayo de ATP.....	38
1.10.1.4 Azul de Tripán	38
1.11 Inmunofluorescencia	39
1.11.1 Aplicaciones	39
1.12 Citocinas proinflamatorias.....	40
1.12.1 GM-CSF:	40
1.12.2 Interleucina 6 (IL-6):.....	40

1.12.3 RANTES (CCL5):	40
1.12.4 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α):	41
1.12.5 TGF α :.....	42
1.12.6 Interleucina beta 1 (IL-1 β):	42
1.12.7 Interleucina 8 (IL-8):.....	43
CAPÍTULO II.....	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.1 Materiales	45
2.1.1 Muestras y/o unidades biológicas	45
2.1.2 Medios de cultivo.....	45
2.1.3 Anticuerpos	45
2.1.4 Material de laboratorio.....	45
2.1.5 Reactivos	46
2.1.6 Equipos e instrumentación.....	46
2.1 Métodos.....	47
2.2.1 Ubicación geográfica del estudio.....	47
2.2.2 Cultivo celular	47
2.2.3 Caracterización celular (marcaje con inmunofluorescencia).....	50
2.2.4 Exposición de partículas	51
2.2.5 Dosaje de citocinas en el medio de cultivo.....	52
CAPÍTULO III.....	56
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
3.1 Conteo y Viabilidad Celular.....	56
3.2 Cultivo de Células Primarias Epiteliales Bronquiales	56
3.2.1 Etapa de multiplicación celular.....	56
3.2.2 Etapa de Diferenciación Celular.....	57
3.3 Caracterización celular por inmunofluorescencia directa	58
3.4 Exposición de las células a las Partículas Finas (PM _{2,5}) y Partículas Ultrafinas (PM _{0,1})	61
3.5 Dosaje de citocinas	63
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
ANEXO 1	79
ANEXO 2	81
ANEXO 3	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución del número de partículas en función del diámetro (modificado de EPA,1996).	18
Figura 2: Representación de los diferentes efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud. Traducida y adaptada de Andrews et al, 1985 ⁽²⁴⁾	20
Figura 3 : Áreas afectadas según tamaño del material particulado (Dockery, 2009).	21
Figura 4: Mecanismos de deposición de partículas en el tracto respiratorio ⁽³⁰⁾	22
Figura 5: Pared bronquial ⁽⁴⁴⁾	30
Figura 6: Proceso de diferenciación celular. (Elaboración propia).....	49
Figura 7: Partículas ultrafinas (PM _{0,1}) y partículas finas (PM _{2,5}) en solución salina.	51
Figura 8: Plan de placas para la exposición a las partículas finas y ultrafinas. (Elaboración propia)	52
Figura 9: Diluciones de la citocina estándar	54
Figura 10: A: Células epiteliales bronquiales sanas, B: Células epiteliales bronquiales con asma, C: Células epiteliales bronquiales con EPOC (X2000)	57
Figura 11: Formación del tapiz celular en los subpocillo en interfaz aire-liquido.....	58
Figura 12: Epitelio bronquial en interfase aire-liquido (dia 7)	58
Figura 13: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) A: DAPI (azul), β-tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) 40X. B: DAPI (azul), β-tubulina (rojo), citoqueratina (rojo) MUC-5AC (verde) 20X C: Citoqueratina (rojo) DAPI (azul), MUC5AC (verde) 40X.....	59
Figura 14: Marcaje de β-tubulina para la detección de las células ciliadas (roja).	60
Figura 15: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma). A: DAPI (azul), β-tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) B: β-tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) C: MUC-5AC (verde).....	60
Figura 16: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) A: β-tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) B: MUC-5AC (verde) C: MUC-5AC (verde)	60
Figura 17: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) X1000	61
Figura 18: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) X1000	61
Figura 19: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) X1000.....	62
Figura 20: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) X1000	62
Figura 21: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) X1000	62
Figura 22: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) X1000.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Estándares de Calidad Ambiental aprobada en el año 2017 en el Perú ⁽⁴¹⁾	28
Tabla 2 : Reconstitución de la citocina humana estándar	54
Tabla 3 : Diluciones de la citocina estándar	54
Tabla 4 : Conteo celular.....	56
Tabla 5: Resumen de la estadística realizada a las células epiteliales bronquiales sanas, con EPOC y con asma. Test Kruskal Wallis (Anexo 2)	64



LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AMP:	Péptidos antimicrobianos
CEB:	Células Epiteliales Bronquiales
COV:	Compuestos Orgánicos Volátiles
COX2:	Ciclo oxigenasa 2
DAMP:	Patrones Moleculares Asociados a Daño celular
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHBE:	Células Epiteliales Bronquiales Humanas Enfermas
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Crónico Obstructiva
ERC:	Enfermedades Respiratorias Crónicas
ERO:	Especies reactivas del oxígeno
GCA:	Guías de Calidad del Aire
HAP:	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
IMPECS:	Impacto del entorno químico en la salud humana
NFKB:	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHBE:	Células Epiteliales Bronquiales Humanas Normales
PAMP:	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PM:	Material Particulado (Particulate Matter)
PNUMA:	Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PRR:	Receptores de Reconocimiento de Patrones

TEER: Resistencia eléctrica transepitelial / transendotelial

TLR: Receptores tipo Toll

USEPA: United States Environmental Protection Agency



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos citotóxicos de las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$) en modelos de células bronquiales humanas sanas, asmáticas y con EPOC.

OBJETIVOS ESPECIFICIOS

1. Cultivar células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE), células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) y células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC).
2. Diferenciar las células epiteliales bronquiales con un cultivo en interfase aire-liquido, identificando las proteínas Tubulina y MUC-5AC, empleando la técnica de inmunofluorescencia con microscopía confocal.
3. Exponer las células epiteliales bronquiales humanas a partículas finas ($PM_{2,5}$) y partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$), utilizando dos protocolos según tiempo de exposición.
4. Dosar las citocinas proinflamatorias IL1b, IL6, IL8, IL13, GMCSF, MCP1, RANTES, TGF α y TNF α en células epiteliales bronquiales humanas sanas, con asma y EPOC.

HIPÓTESIS

Dado que no existe información relacionada acerca del daño provocado por las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$) presentes en la contaminación ambiental en las células epiteliales bronquiales humanas. Es probable que estas partículas provoquen un efecto tóxico extracelular en las células epiteliales bronquiales, alterando la viabilidad, diferenciación celular, secreción de citocinas proinflamatorias, provocando y exacerbando enfermedades respiratorias como el asma y enfermedad pulmonar crónico obstructiva (EPOC).

CAPÍTULO I

1. Marco Teórico

Desde el descubrimiento del fuego el hombre ha contaminado la atmósfera con gases perniciosos y polvo. Cuando se empezó a utilizar el carbón como combustible en el siglo XIX por la industria, las grandes concentraciones humanas en las áreas urbanas y la aparición del motor de explosión, ha empeorado el problema año tras año ⁽¹⁰⁾.

La contaminación del aire está definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una “contaminación del medio ambiente interior o exterior por un agente químico, físico o biológico que modifica las características naturales de la atmosfera” ⁽¹⁰⁾.

La presencia del material particulado en el ambiente está asociada con el incremento del riesgo de muerte por causas cardiopulmonares en muestras de adultos y además está asociado a compuestos con conocida actividad genotóxica, mutagénica o carcinogénica ^(11,12).

El material particulado está definido como, un conjunto de partículas sólidas y/o líquidas (a excepción del agua pura) presentes en suspensión en la atmósfera, tales como el hollín de Diesel, polvo de vías, el polvo de la agricultura y las partículas resultantes de procesos productivos. Además, uno de los contaminantes atmosféricos más estudiados en el mundo, en los últimos años un número importante de estudios realizados en distintas ciudades ha encontrado que, aún por debajo de los niveles de calidad del aire considerados como seguros, los incrementos de los niveles de la contaminación atmosférica se asocian con efectos nocivos sobre la salud, por lo cual, aumenta la preocupación sobre los posibles riesgos de estas partículas para los que no existe una evaluación satisfactoria ⁽¹³⁻¹⁶⁾.

Estas partículas en suspensión son una compleja mezcla de productos químicos y/o elementos biológicos, como metales, sales, materiales carbonosos, orgánicos volátiles, compuestos volátiles (COV), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y endotoxinas, que pueden interactuar entre sí formando otros compuestos. Además, poseen un amplio rango de propiedades morfológicas, físicas, químicas y termodinámicas. Según la normatividad colombiana, el MP no sedimenta en períodos cortos, sino que permanece suspendido en el aire debido a su tamaño y densidad ^(17,18).

1.1 Clasificación del material particulado

Para la identificación y control del material particulado (MP) ha sido clasificado según su diámetro aerodinámico (tamaño), que corresponde al diámetro de una esfera uniforme en unidad de densidad, que alcanza la misma velocidad terminal de asentamiento que la partícula de interés y que está determinado por la forma y densidad de la partícula, característica de la cual depende la intensidad de sus impactos ⁽¹⁹⁾.

Las métricas comúnmente utilizadas para clasificar el material particulado son: partículas menores a 10 micrones conocidas como partículas gruesas (MP₁₀) y partículas menores a 2,5 micrones, conocidas como partículas finas (MP_{2.5}). Estas partículas pueden variar su tamaño y composición a través de varios procesos como el vapor de condensación, la evaporación, la coagulación a través de las colisiones del movimiento browniano por la hidrodinámica y fuerzas gravitacionales o eléctricas (Figura 1). El MP es emitido a la atmósfera producto de diferentes actividades, tanto naturales como antropogénicas ^(20,21).

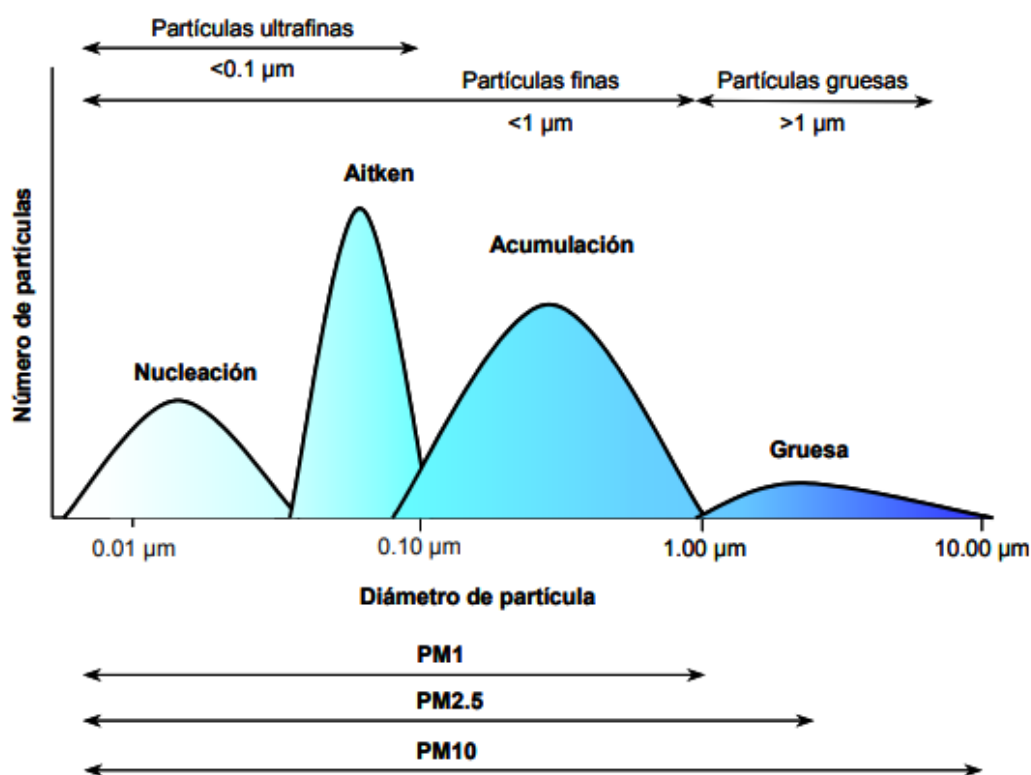


Figura 1: Distribución del número de partículas en función del diámetro (modificado de EPA,1996).

Según su origen, se clasifican en partículas primarias, que son emitidas directamente al aire del ambiente y partículas secundarias, las cuales son formadas en la atmósfera por transformaciones de las emisiones gaseosas como los óxidos de azufre, nitrógeno y compuestos orgánicos volátiles ⁽²²⁾.

Parte de estos gases se condensan en partículas bajo la influencia de la foto oxidación catalizada por los rayos UV y el ozono. Este modo de transformación secundario es una fuente importante de Partículas Finas ($PM_{2,5}$) y especialmente de Partículas Ultrafinas ($PM_{0,1}$) ⁽²²⁾.

Un reciente análisis europeo ha encontrado que algunos elementos que provienen directamente de fuentes de combustión como Ni, V y S se encuentran preferentemente en las partículas finas, mientras que los elementos Si, Fe y Cu son más importantes en partículas gruesas ⁽²³⁾. Otro estudio realizado en Beirut en el año 2012, mostró que las partículas ultrafinas locales se enriquecían más en iones solubles inorgánicos, carbono total y oligoelementos que la fracción fina. Por lo tanto, la composición química de la fracción fina no se correlaciona necesariamente con la de la fracción ultrafina ⁽²³⁾.

Para el material particulado existen un sinnúmero de estudios epidemiológicos que muestran incremento de mortalidad y morbilidad (admisiones hospitalarias, síntomas respiratorios, disminución de la función pulmonar, etc.).

En la década de 1980, los primeros estudios de deposición y limpieza respiratoria de partículas han demostrado que las partículas de aire inhalables fueron aquellas con un diámetro aerodinámico menor a $10\ \mu m$ (PM_{10}), desde este punto de vista, las partículas que mayor interés tienen son las partículas con diámetros menores a $10\ \mu m$ ya que son fácilmente respirables y pueden penetrar en los pulmones ⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Además, algunos investigadores han divulgado que la emisión de contaminantes de origen vehicular constituye una de las causas más relevantes en el deterioro de la calidad del aire, contaminan con monóxido de carbono, dióxido de azufre, ozono y partículas suspendidas de plomo, lo que afecta la composición química de la atmósfera a nivel local y regional ⁽²⁷⁾.

Los efectos relacionados con la exposición a la contaminación atmosférica son diversos. Los más estudiados son aquellos que se producen a corto plazo, es decir en el periodo de unos

pocos días, habitualmente menos de una semana después de la exposición. Estos efectos mantienen una gradación tanto en la gravedad de sus consecuencias como en la población a riesgo afectada. (figura 2)

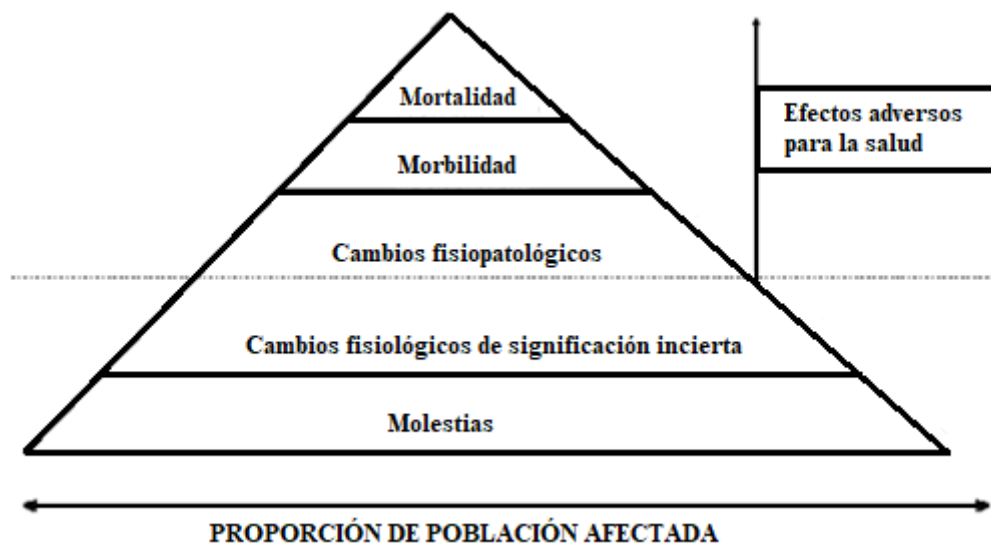


Figura 2: Representación de los diferentes efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud. Traducida y adaptada de Andrews et al, 1985 ⁽²⁴⁾.

1.2 Propiedades y comportamiento del material particulado

Las propiedades toxicocinéticas y toxicodinámicas de los contaminantes en partículas inhaladas están determinadas principalmente por sus características fisicoquímicas, que a su vez están influenciadas por el medio ambiente y la estacionalidad.

Entre los parámetros más importantes del material particulado está la distribución granulométrica en aerosol, ya que determina la capacidad de penetración de partículas en el tracto respiratorio y la superficie disponible para entrar en contacto con los tejidos (superficie específica). Como resultado, la fracción fina ($PM_{2.5}$) y particularmente ultrafina ($PM_{0.1}$) difunden más profundo en el árbol respiratorio y son más persistentes en él (figura 3) ⁽²⁸⁾.

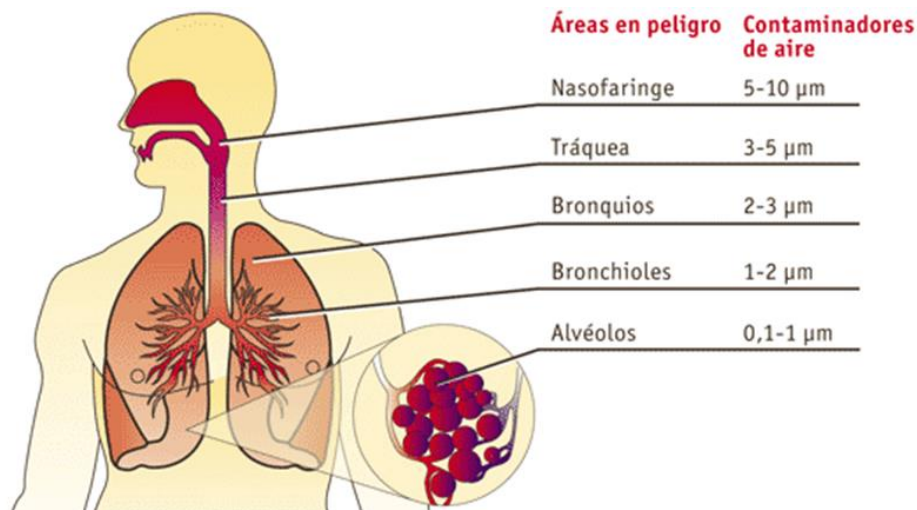


Figura 3 : Áreas afectadas según tamaño del material particulado (Dockery, 2009).

1.2.1 Parámetros Farmacocinéticos del material particulado

1.2.1.1 Depósito del material particulado en el tracto respiratorio

La deposición de partículas en el tracto respiratorio se estudió *in vitro* mediante modelado físico e *in vivo*. La fracción retenida y la región de deposición de contaminantes particulados en el sistema respiratorio están condicionadas por tres familias principales de parámetros:⁽²⁹⁾

1. El comportamiento aerodinámico y fisicoquímico de los aerosoles, que está relacionado con sus características intrínsecas: densidad, carga, granulometría, forma, naturaleza química superficial, carácter hidrofílico / hidrofóbico.
2. La estructura geométrica del tracto respiratorio objetivo.
3. Las características del ciclo respiratorio, incluida la frecuencia del ciclo, el caudal y la turbulencia resultante del flujo de aire ⁽³⁰⁾.

Existen cinco mecanismos mediante los cuales las partículas pueden adsorberse en las paredes del tracto respiratorio ⁽³⁰⁾. (Figura 4)

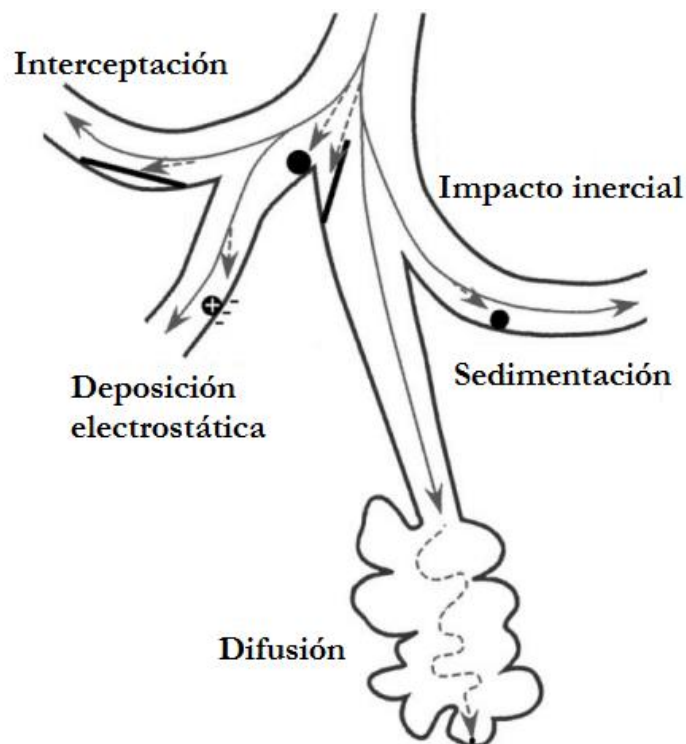


Figura 4: Mecanismos de deposición de partículas en el tracto respiratorio ⁽³⁰⁾.

1. Sedimentación, para las partículas más densas, sometida a la gravedad. Las partículas de más de 1 μm pueden depositarse por sedimentación ⁽³⁰⁾.
2. La impactación inercial ocurre cuando una partícula se desvía con un cambio de dirección del flujo de aire y entra en contacto con una pared del árbol respiratorio ⁽³⁰⁾. La probabilidad de impacto aumenta con el tamaño de partícula, la densidad y la duración del ciclo respiratorio. Esta ley física se usa en particular para recolectar partículas del tamaño y densidad deseados usando filtros de impacto ⁽³⁰⁾.
3. La difusión se rige por el movimiento browniano. La proporción del depósito total por difusión disminuye con el tamaño de las partículas. Se vuelve insignificante para partículas de más de 1 μm . Este es el mecanismo de deposición más importante para partículas ultrafinas ⁽³⁰⁾.
4. La interceptación, cuando un borde de la partícula entra en contacto con los tejidos, es particularmente el caso de las partículas alargadas y fibrosas ⁽³⁰⁾.

5. La deposición electrostática para partículas cargadas se considera despreciable porque los aerosoles de partículas generalmente tienen una distribución de carga neutra ⁽³⁰⁾.

El estudio de los mecanismos de deposición de partículas en las vías respiratorias permitió realizar modelos *in silico*, para predecir la región de deposición en las vías respiratorias. Por ejemplo, la deposición en el tracto respiratorio inferior (regiones traqueobronquial y alveolar) es mayor para $PM_{0,1}$ que para $PM_{2,5}$. El diámetro de partícula para el cual la deposición parece óptima en estas regiones está entre 1 nm y 100 nm. Por debajo de 1 nm, las partículas están más sujetas al movimiento browniano y penetran menos en el tracto respiratorio. Más allá de 100 nm, la probabilidad de impacto o intercepción es tal que las partículas se depositan principalmente en la región nasofaríngea ⁽³¹⁾.

Al medir la diferencia en la concentración de partículas entre el aire inhalado y el aire exhalado, los estudios en humanos han demostrado que la fracción de PM depositada en sujetos con EPOC era más alta que en sujetos sanos. Este fenómeno puede deberse a un aumento en el tiempo de tránsito de las partículas en las vías respiratorias (ciclo de respiración más prolongado), disminución de la velocidad de exhalación o alteraciones del flujo de aire debido a la obstrucción bronquial ^(31,32).

1.2.1.2 Retención y limpieza de partículas

Después de su deposición en el tracto respiratorio, las partículas solubles interactúan rápidamente con los tejidos y tienen vida más corta. Esta fracción soluble se elimina rápidamente, sin embargo, los compuestos de estas partículas se pueden distribuir sistémicamente en el cuerpo ^(33,34).

En el caso de las partículas insolubles, su eliminación depende de la región de deposición en el tracto respiratorio. Las partículas más finas, que migran a mayor profundidad, no pueden ser eliminadas por la limpieza mucociliar, ya que no es efectiva en la región broncoalveolar. En este nivel, la eliminación es proporcionada por fagocitosis a través de macrófagos alveolares, un mecanismo mucho más lento. Las partículas pueden persistir durante meses y acumularse ^(33,34). La acumulación de partículas ultrafinas en los alvéolos pulmonares, en particular las partículas altamente carbonosas, afecta la actividad fagocítica de los macrófagos por saturación. Las partículas ultrafinas no fagocíticas permanecen en las vías

respiratorias y alteran el aclaramiento alveolar de sustancias inorgánicas y microorganismos (33,34).

La contaminación del aire con partículas podría por lo tanto ser responsable de una disminución de la inmunidad del tracto respiratorio mediante la inhibición de la fagocitosis. En pacientes con bronconeumopatías crónicas, la efectividad del aclaramiento de partículas disminuye. De hecho, la remodelación e hipersecreción bronquial, características del asma y la EPOC, afectan la integridad y la actividad de la alfombra mucociliar (33,34).

1.3 Composición del material particulado:

La composición química de los aerosoles es un determinante de los parámetros farmacocinéticos de las partículas (su comportamiento en el cuerpo). Entonces es necesario saber si contienen compuestos orgánicos y/o inorgánicos, si son solubles las partículas en fluidos biológicos o en el moco que cubre el epitelio y como es que se metabolizan (3,35).

Todo depende de la composición química del material particulado inhalado. Esto influye en la biodisponibilidad de los contaminantes, su biopersistencia, su internalización por las células, su translocación vascular (distribución sistémica). Además, su composición determina la toxicidad intrínseca del material particulado a través de la presencia de sustancias irritantes, alérgenos, carcinógenos u otros tóxicos. Las micro partículas en las zonas urbanas puede contener hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), compuestos orgánicos volátiles o VOCs (benceno, metano), compuestos inorgánicos de origen natural (Ca, Na, Mg, etc.), otros compuestos inorgánicos derivados de las actividades humanas, especialmente elementos metálicos traza (Fe, Al, Pb, Mn, etc.) y sulfatada o derivados nitrosos (3,35).

Según el Departamento de Protección Ambiental de Hong Kong (HKEPD), el escape de los vehículos diésel es la principal causa del alto nivel de material particulado (MP) en las zonas urbanas. Los principales elementos encontrados por la quema de combustibles fósiles, transformación de metales e incineración de residuos son el Pb, Cd, Zn, Cu, Ni, V, Sb. Los diferentes elementos presentes en las muestras del material particulado pueden estar asociados con materia mineral, aerosol marino, compuestos de azufre, compuestos de nitrógeno y compuestos de carbono (11).

Los compuestos presentes en el aire interactúan entre sí, creando sinergias o antagonismos; cambian de estado, aglomeran, sedimentan, adsorben otras moléculas en su superficie. Es así que se ha vuelto esencial para la comunidad científica caracterizar las partículas tomadas antes de realizar los estudios toxicológicos, a fin de vincular las características fisicoquímicas de los contaminantes con su toxicidad ⁽³⁶⁾. Se ha sugerido que el poder tóxico de las partículas en los ambientes urbanos procedería de su alta composición en partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$). Así, aunque gravimétricamente su concentración no sea muy alta, estas partículas podrían provocar una exacerbación de los problemas respiratorios. Muchas propiedades de las partículas pueden influir de manera importante en su comportamiento en el aire y sus efectos sobre el ambiente y la salud ⁽³⁶⁾.

Entonces, conocer la composición química del material particulado, tiene relevancia no solo desde el punto de vista de la química de la atmósfera, sino también sobre la calidad del aire que se respira en las ciudades ⁽³⁶⁾.

El análisis fisicoquímico realizado en un estudio en Francia de partículas tomadas de la misma área urbana-industrial de la ciudad de Dunkerque (lugar de donde se recolectaron las partículas para este estudio) reveló la presencia de compuestos aromáticos derivados del benceno, dioxinas o HAP y la presencia de Metales de transición con un alto contenido de Zn, Al, Fe y Mn y trazas de Ni, Pb, As y V en las partículas. La composición de las partículas finas ($PM_{2,5}$) y las partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$) parecen similares, pero la fracción fina tiene una mayor concentración de compuestos aromáticos ⁽³⁶⁾.

1.4 Fuentes del material particulado:

Las principales fuentes emisoras de contaminantes pueden ser clasificadas según sus características en: fuentes fijas, móviles y fugitivas ⁽³⁷⁾.

Las fuentes fijas, consideran las emisiones generadas por la quema de combustibles producto de actividades industriales y residenciales, ya sea para la generación de energía, calor o vapor y otros procesos industriales, como por ejemplo la fundición del cobre. También incluyen las emisiones generadas por la quema de otros combustibles como la biomasa, asociada a la calefacción de viviendas ⁽³⁷⁾.

Las fuentes móviles, corresponden a las emisiones provenientes de los gases de escape, desgaste de frenos y neumáticos, de distintos tipos de transporte como: automóviles, camiones, buses y motocicletas ⁽³⁸⁾.

Las fuentes fugitivas, consisten en emisiones que no son canalizadas por ductos, chimeneas u otros sistemas hacia el exterior, si no, las emisiones provenientes de calles pavimentadas y sin pavimentar, así como de la construcción, demolición, entre otras. El material particulado asociado a este tipo de fuentes corresponde principalmente a partículas gruesas, siendo prácticamente el 90% mayores a 2,5 micrómetros (μm). Las emisiones fugitivas también tienen un origen natural, debido a la suspensión de tierra o erosión de rocas por acción del viento. Sus tasas de emisión dependen fuertemente de parámetros meteorológicos como la velocidad del viento, humedad ambiental y precipitaciones ⁽³⁸⁾.

Por las razones mencionadas anteriormente, la contribución relativa de cada una de las fuentes sigue siendo complicada de medir. Las partículas atmosféricas son de diversos orígenes y su composición química es muy variable según la ubicación geográfica que tengan ⁽³⁸⁾.

De hecho, la composición química del aire es específica de cada ciudad. En las zonas urbanas, por ejemplo, la contaminación particulada proviene principalmente del tráfico de automóviles (incluidas las emisiones de los motores diésel), las emisiones industriales o agrícolas y la calefacción residencial ⁽³⁸⁾.

También hay fuentes naturales, tales como la espuma del mar cargada de sales, que influyen en la composición química del aire en las ciudades costeras, erosión de las rocas, incendios forestales y erupciones volcánicas, así como el polen, restos vegetales y otros elementos orgánicos ⁽³⁸⁾.

Investigaciones recientes relacionadas con el material particulado (MP) se han realizado en todo el mundo. en Italia (2005), España (2006), Beijing (2008), Suecia (2002), China (2006) y Estados Unidos (2009), entre otras. En ellas demuestran la presencia de MP en la atmósfera por causas naturales y antropogénicas, manifestando además la necesidad de adelantar estudios detallados relacionados con los efectos causados por la presencia de este contaminante, con el fin de implementar estrategias para el control de este ⁽³⁸⁾.

1.4 Estándares de la calidad del aire

Como manifiesta la Asociación Estadounidense del Pulmón (American Lung Association) “la contaminación del aire por ozono y partículas es la más extendida y entre las más peligrosas”. Un reporte conjunto del PNUMA y la OMS afirma que “niveles elevados de partículas finas ($PM_{2,5}$) en el aire del ambiente están asociados con incrementos en la mortalidad prematura diaria y de largo plazo, debido a enfermedades cardiopulmonares, infecciones respiratorias agudas y cánceres ⁽³⁹⁾.”

Los estándares de la calidad del aire son fijados por cada país para proteger la salud pública de sus ciudadanos y están frecuentemente incorporados en la legislación ⁽³⁹⁾.

El numeral 22 del artículo 2 de la Constitución Política del Perú establece que, toda persona tiene derecho a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de su vida ⁽³⁹⁾.

El numeral 31.1 del artículo 31 de la Ley, define al Estándar de Calidad Ambiental (ECA) como la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo, en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente; asimismo, el numeral 31.2 del artículo 31 de la Ley, establece que el ECA es obligatorio en el diseño de las normas legales y las políticas públicas y es un referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental ⁽³⁹⁾. (Tabla 1)

A partir de abril de 1999, se implementa el Programa de Vigilancia de la Calidad del Aire (PNVCA), a fin de evaluar permanentemente la contaminación atmosférica de la ciudad de Lima y Callao, a través de 5 estaciones fijas de monitoreo de calidad del aire ⁽⁴⁰⁾.

Tabla 1: Estándares de Calidad Ambiental aprobada en el año 2017 en el Perú ⁽⁴¹⁾

Parámetros	Periodo	Valor ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)	Criterios de evaluación	Método de análisis
Dióxido de Azufre (SO ₂)	24 horas	250	NE más de 7 veces al año	Fluorescencia ultravioleta (Método automático)
Dióxido de Nitrógeno (NO ₃)	1 hora	200	NE más de 24 veces al año	Quimioluminiscencia (Método automático)
	Anual	100	Media aritmética anual	
Material Particulado con diámetro menor a 2,5 micras (PM _{2,5})	24 horas	50	NE más de 7 veces al año	Separación inercial/filtración (Gravimetría)
	Anual	25	Media aritmética anual	
Material Particulado con diámetro menor a 10 micras (PM ₁₀)	24 horas	100	NE más de 7 veces al año	Separación inercial/filtración (Gravimetría)
	Anual	50	Media aritmética anual	
Monóxido de Carbono (CO)	1 hora	30000	NE más de 1 vez al año	Infrarrojo no dispersivo (NDIR) (Método automático)
	8 horas	10000	Media aritmética móvil	
Ozono (O ₃)	8 horas	100	Máxima media diaria NE más de 24 veces al año	Fotometría de absorción ultravioleta (Método automático)
Plomo (Pb) en PM ₁₀	Mensual	1,5	NE más de 4 veces al año	Método para PM ₁₀ (Espectrofotometría de absorción atómica)
	Anual	0,5	Media aritmética de los valores mensuales	
Sulfuro de Hidrogeno (H ₂ S)	24 horas	150	Media aritmética	Fluorescencia ultravioleta (Método automático)

NE: No Exceder

En el 2011, de 16 ciudades de diferentes países latinoamericanos en los que se midieron las concentraciones de partículas gruesas (PM_{10}), todas excedieron las Guías de Calidad del Aire (GCA) anual de la OMS de $20 \mu\text{m}/\text{m}^3$ y 9 de ellas excedieron el estándar anual de la Unión Europea (UE) de $40 \mu\text{m}/\text{m}^3$. México es el país más elevado presentando una concentración de $85,9 \mu\text{m}/\text{m}^3$ de PM_{10} y Puerto Rico el más bajo con una concentración de $24,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ de PM_{10} . El Perú se ubica en el onceavo lugar con una concentración de PM_{10} de $62,2 \mu\text{m}/\text{m}^3$ ⁽⁴¹⁾.

En el año 2012 en el mundo murieron 172392 personas a causa del asma y 1193590 personas por Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC), en América 5581 personas por asma y 39980 personas por EPOC y en Europa 10047 personas por asma y 40636 personas por EPOC (OMS). Perú entre sus causas de muerte tuvo a la EPOC como la octava causa de mortalidad con un porcentaje de 2,2% (OMS, 2012). En cuanto a las partículas finas ($PM_{2,5}$), 10 ciudades excedieron las GCA anual de la OMS ($10 \mu\text{m}/\text{m}^3$) y el estándar de la USEPA (United States Environmental Protection Agency) ($15 \mu\text{m}/\text{m}^3$) y 8 de ellas sobrepasaron el estándar anual de la UE ($25 \mu\text{m}/\text{m}^3$), Colombia presenta una concentración de $35,1 \mu\text{m}/\text{m}^3$ y es la más elevada, Puerto Rico el más bajo con $5,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$. Perú se encuentra en la novena posición con una concentración de $31,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ ⁽⁴¹⁾.

Estas cifras están en aumento, en el 2015 se estima que murieron a causa de EPOC cerca de 3 millones de personas en todo el mundo y la principal causa fue la exposición al humo del tabaco (fumadores activos y pasivos). Otros factores de riesgo son la exposición al aire contaminado, tanto de interiores como de exteriores, así como al polvo y el humo en el lugar de trabajo ⁽⁴²⁾.

En el año 2016 Lima estuvo dentro de las 5 ciudades más contaminadas de América latina (OMS 2016) reportando $88 \mu\text{m}/\text{m}^3$ de PM_{10} (partículas gruesas) (Figura 5 y 6) ⁽⁴¹⁾.

En 2018, la OMS estimó que más de 600000 niños menores de 15 años mueren a causa de enfermedades asociadas a la mala calidad del aire ⁽⁴³⁾.

Los problemas de la calidad del aire en el Perú se deben principalmente a las emisiones del transporte urbano (se estima que contribuye entre un 70% y 80% de la contaminación atmosférica). Las fuentes fijas más importantes que generan contaminación del aire son las actividades minero-metalúrgicas (principalmente fundiciones) y las fábricas pesqueras, que

coincidentalmente, son las dos actividades económicas más importantes que desarrolla el país (41).

1.6 Impactos Toxicológicos

Los efectos toxicológicos de la contaminación por aeropartículas se han demostrado a nivel de la población, a través de estudios epidemiológicos y de todo el cuerpo, mediante pruebas toxicológicas *in vitro* e *in vivo*. Los estudios epidemiológicos han demostrado asociaciones significativas entre la concentración ambiental de partículas gruesas (PM₁₀) y los ingresos hospitalarios por asma respiratoria (asma, EPOC, bronquitis), cardiovascular o cerebrovascular (41).

1.7 Epitelio bronquial.

1.7.1 Histología y fisiología del epitelio bronquial

Las vías respiratorias están revestidas con una membrana mucosa ciliada para filtrar, humedecer y regular la temperatura del aire inspirado. El epitelio de la vía aérea es un epitelio pseudoestratificado compuesto de células basales, células ciliadas cuyos cilios se mueven continuamente hacia la faringe, y células caliciformes secretoras de moco (figura 5) (44).

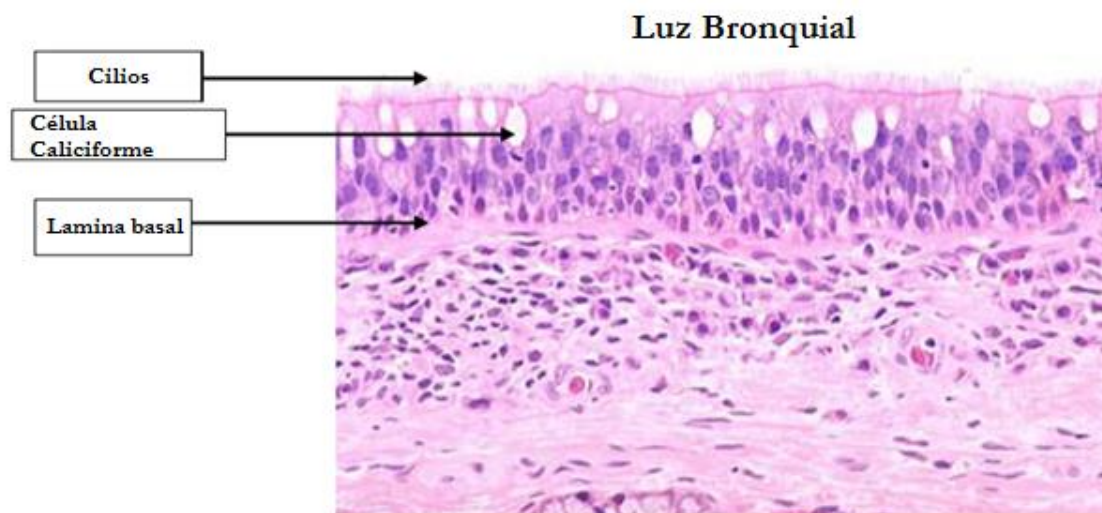


Figura 5: Pared bronquial (44)

La combinación de estos diferentes tipos de células permite el establecimiento de un sistema de purificación rápidamente efectivo en los niveles nasofaríngeo y traqueobronquial, las sustancias inhaladas y depositadas en los bronquios quedan atrapadas en el moco y luego son excretadas por la limpieza mucociliar ⁽⁴⁴⁾.

La estructura histológica del epitelio evoluciona progresivamente a través del tracto respiratorio. El epitelio es más grueso y rico en células ciliadas en las vías respiratorias superiores y se adelgaza progresivamente hacia los alvéolos para proporcionar una superficie de intercambio óptima. En este nivel, la limpieza mucociliar ya no es eficaz, el tratamiento alveolar se asegura solamente por los macrófagos, que son la última defensa de las vías respiratorias ⁽⁴⁴⁾.

Desde el punto de vista de una sección frontal, el epitelio que recubre la submucosa (espacio intersticial) tiene macrófagos, mastocitos y células dendríticas residentes ⁽⁴⁴⁾.

El epitelio bronquial constituye la primera línea de defensa contra los ataques del tracto respiratorio. Sus uniones estrechas le dan una barrera física, mientras que la elevación mucociliar ayuda a evacuar el material atrapado en la mucosidad ⁽⁴⁴⁾.

Las células epiteliales desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria. Los receptores de la familia PRR (receptores de reconocimiento de patrones) expresan en su superficie y en el citoplasma, incluyendo receptores tipo Toll (TLR), lo que les permite reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociado a daño celular (DAMP) ⁽⁴⁴⁾.

En respuesta a estos estímulos, células epiteliales y células dendríticas (células centinela) inician y dirigen la respuesta inflamatoria mediante la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP), especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores proinflamatorios (citocinas y mediadores de lípidos) ⁽⁴⁴⁾.

1.7.2 Bronconeumopatías crónicas

Debido a su alta prevalencia, la mortalidad asociada y los costos generados, las enfermedades respiratorias crónicas como el asma y la Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC), son un importante problema de salud pública del siglo XXI y se

caracterizan por la inflamación crónica de las vías respiratorias, influenciada por factores ambientales ⁽⁴⁵⁾.

Las citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF) juegan un papel importante en la inflamación de las vías respiratorias, especialmente a través de la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B), que induce la expresión de múltiples genes inflamatorios, factor que aumenta en el esputo de personas con asma o EPOC ⁽⁴⁵⁾.

Las bronconeumopatías crónicas inducen cambios estructurales en el epitelio que pueden conducir a la pérdida de la integridad de la barrera celular y ciertas alteraciones funcionales. La remodelación bronquial tiene lugar a través del uso crónico de mecanismos de regeneración epitelial ⁽⁴⁶⁾. Los elementos de la remodelación de las vías respiratorias que se describen en el asma y la EPOC son la hiperplasia de las células secretoras (células caliciformes) y glándulas submucosas, el engrosamiento de la membrana basal, y la hiperplasia de células basales ⁽⁴⁶⁾. Sin embargo, estos elementos se asocian de manera diferente con los diferentes síntomas del asma y la EPOC. A pesar de algunas similitudes observadas a nivel sintomático, las causas y los mecanismos inflamatorios en el origen de estas dos patologías son diferentes ⁽⁴⁶⁾.

1.7.2.1 Asma

El asma es una enfermedad crónica que afecta las vías aéreas de los pulmones. Las vías aéreas son las vías respiratorias que llevan el aire hacia adentro y hacia afuera de sus pulmones. Cuando uno tiene asma, las vías aéreas se inflaman. Dicha inflamación hace que las vías aéreas generen unas secreciones pegajosas denominadas mucosidad. El asma también hace que los músculos dentro y alrededor de sus vías aéreas se endurezcan o estrechen demasiado. Esta inflamación, mucosidad y músculos endurecidos pueden hacer que las vías aéreas se estrechen más de lo normal y sea muy difícil para usted llevar el aire dentro y fuera de sus pulmones ⁽⁴⁷⁾.

El asma se puede heredar o transmitir de padres a hijos a través de los genes; también se puede tener asma a pesar que no haya casos de asma en la familia. Si usted tiene asma, las vías aéreas son más sensibles de lo normal. Estas se pueden irritar y endurecer muy

fácilmente a raíz de una variedad de elementos denominados “disparadores”. Algunos ejemplos de “disparadores” son:

- a) Alergias: Si tiene alergias, también es más probable que tenga asma. Este tipo de asma en general comienza en los niños, pero puede ocurrir en los adultos también. Los alérgicos comunes (cosas que causan alergias) son el polen de las plantas, los árboles y el césped, el moho, excrementos de cucarachas, la caspa de perros y gatos y ácaros del polvo. Esto puede causar estornudos, sibilancia, picazón en los ojos y moqueo nasal. Si los pulmones están muy irritados, los alérgicos pueden causar un ataque de asma.
- b) Infecciones respiratorias: La sinusitis o las infecciones pulmonares frecuentes también pueden causar asma ⁽⁴⁷⁾. Las infecciones pueden provocar episodios de sibilancia o falta de aire más prolongados que las alergias. De hecho, los virus respiratorios son la causa más común de ataques de asma lo bastante graves como para que tenga que faltar a la escuela o al trabajo. Los irritantes que también pueden causar asma son: el humo de los tubos de escape de coches, autobuses, camiones, etc. Químicos como aerosoles de jardín, el moho y el polvo, olores fuertes provenientes de la pintura, perfumes, colonias, aerosol para el cabello, desodorantes y productos de limpieza, el humo de tabaco de cigarrillos, pipas o cigarrillos, cambios en la temperatura o el clima, el estrés o el ejercicio, medicamentos, incluidos la aspirina y betabloqueantes (medicamentos para el corazón o la presión arterial), sulfitos presentes en alimentos como frutos secos, vino y cerveza ⁽⁴⁷⁾.

Los síntomas más comunes del asma son falta de aire, sibilancia, opresión en el pecho y tos. Habrá días en los que tenga todos los síntomas y otros en los que no tenga ninguno. Cuando tenga síntomas de asma, puede sentir como si respirara a través de una pajilla. También puede escuchar una sibilancia (silbido o chirrido) de pecho, presión en el pecho o una sensación de opresión en el pecho. Un “ataque de asma” describe síntomas muy graves ⁽⁴⁷⁾.

Durante un ataque de asma, usted puede respirar con tanta rapidez que se le puede dificultar el habla. La tos, la sibilancia y la opresión en el pecho mientras el aire intenta pasar a través de sus vías aéreas estrechas. Además, es posible que tosa, en general por la noche o temprano en la mañana. Otros síntomas del asma pueden ser dolor de pecho pueden causarle ansiedad o miedo. Esto podría causarle incluso mayor dificultad para respirar. Si bien es extraño, los niveles

bajos de oxígeno en la sangre pueden hacer que las yemas de los dedos y los labios se vuelvan violetas o grises. Si usted cree que está sufriendo un ataque de asma grave, debe ir inmediatamente a la sala de emergencias ⁽⁴⁷⁾.

1.7.2.2 EPOC

La bronquitis crónica es una enfermedad caracterizada por una creciente inflamación y mucosidad (flema o esputo) en las vías respiratorias (vías aéreas). Hay obstrucción de las vías aéreas en la bronquitis crónica porque la inflamación y la mucosidad adicional hacen que el interior de las vías respiratorias sea más pequeño de lo normal. El diagnóstico de bronquitis crónica se realiza en función de los síntomas de una tos que produce mucosidad o flema la mayoría de los días, durante tres meses, dos años o más (después de haber descartado otras causas para la tos) ⁽⁴⁸⁾.

Existen muchos factores que causan la EPOC, aunque la causa más común es el humo de cigarrillo. Los factores ambientales y la genética también pueden causar esta enfermedad. Por ejemplo, la exposición prolongada a ciertos polvos en el trabajo, químicos y aire contaminado en ambientes cerrados y abiertos puede contribuir a la EPOC ⁽⁴⁸⁾.

La sospecha debe establecerse en todo paciente mayor de 35 años, sobre todo expuesto a tabaco, que presente tos, expectoración crónica, bronquitis de repetición, disnea de esfuerzo de larga evolución o sibilancias. Para la confirmación es imprescindible la espirometría, que demostrará obstrucción en las vías aéreas no reversible ($FEV1/FVC < 70\%$ tras administración de al menos 2 inhalaciones de un broncodilatador de corta duración). A veces puede ser difícil separar la EPOC del asma, (pacientes fumadores con asma de larga evolución que podrían presentar obstrucción crónica al flujo aéreo) ⁽⁴⁸⁾.

1.8 Cultivo celular:

El cultivo celular es una técnica de remoción de células animales o vegetales para su crecimiento en un entorno artificial favorable para su desarrollo. Cada tipo de célula posee diferentes condiciones de cultivo, teniendo en cuenta que el entorno artificial debe realizarse en un recipiente con un sustrato o medio que suministre los nutrientes esenciales (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos, y minerales), hormonas, gases (O_2 , CO_2), factores de

crecimiento y un entorno fisicoquímico adecuado (temperatura, pH, presión osmótica, entre otros) ⁽⁵⁰⁾.

El cultivo celular es de gran importancia en el entorno científico ya que proporciona un excelente modelo de sistema para poder estudiar la fisiología y la bioquímica de las células *in vitro*, también los efectos de las drogas experimentales, compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos. La principal ventaja de esta técnica es brindar la reproducción de los resultados ⁽⁵⁰⁾.

1.8.1 Tipos de cultivos celulares y características

a) Cultivos primarios:

Los cultivos primarios derivan directamente de tejidos y cultivos animales normales extirpados, ya sea como un cultivo de explante o después de la disociación en una sola suspensión celular mediante digestión enzimática ⁽⁴⁹⁾.

Dichos cultivos son inicialmente heterogéneos, pero luego son dominados por fibroblastos. La preparación de cultivos primarios requiere mucho trabajo y se pueden mantener *in vitro* solo por un período de tiempo limitado. Durante su vida útil relativamente limitada, las células primarias generalmente conservan muchas de las características diferenciadas de la célula *in vivo* ⁽⁴⁹⁾.

Los cultivos primarios, por definición, no se han pasado, tan pronto como se pasan, se convierten en una línea celular y ya no son primarios. Las células “primarias”; que se obtienen de la mayoría de los proveedores son, de hecho, líneas celulares de paso bajo ⁽⁴⁹⁾.

b) Cultivos continuos:

Los cultivos continuos se componen de un único tipo de célula que puede propagarse en serie en el cultivo, ya sea para un número limitado de divisiones celulares (aproximadamente treinta) o de otro modo indefinidamente. Las líneas celulares de una vida finita son usualmente diploides y mantienen cierto grado de diferenciación. El hecho de que tales líneas celulares se desarrollen después de aproximadamente treinta ciclos de división significa que es esencial establecer un sistema de bancos maestros y trabajadores para mantener dichas líneas durante largos períodos ⁽⁴⁹⁾.

Las líneas celulares continuas que pueden propagarse indefinidamente generalmente tienen esta capacidad porque se han transformado en células tumorales. Las líneas celulares tumorales a menudo se derivan de tumores clínicos reales, pero la transformación también puede inducirse mediante oncogenes virales o por tratamientos químicos. Las líneas celulares transformadas presentan la ventaja de una disponibilidad casi ilimitada, pero la desventaja de haber conservado muy poco de las características *in vivo* originales ⁽⁴⁹⁾.

1.9 Cultivo primario de células epiteliales bronquiales (NHBE)

Las células epiteliales bronquiales (NHBE) se aíslan del revestimiento epitelial de las vías aéreas por encima de la bifurcación de los pulmones. Las NHBE son adecuadas para estudios de interfaz aire-líquido y están garantizadas para la diferenciación marcada por la formación de cilios, la producción de mucina y los niveles de resistencia eléctrica transepitelial / transendotelial (TEER) ⁽⁵¹⁾.

Todas las células epiteliales bronquiales humanas criopreservadas están garantizadas mediante 15 duplicaciones de población. Las células dan negativo para micoplasma, bacterias, levadura y hongos. VIH-1, hepatitis B y hepatitis C, no se detectan para todos los donantes y / o lotes de células ⁽⁵¹⁾.

1.10 Viabilidad celular

Los ensayos basados en células a menudo se usan para seleccionar colecciones de compuestos para determinar si las moléculas de prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos que eventualmente conducen a la muerte celular. Los ensayos basados en células también se usan ampliamente para medir la unión al receptor y una variedad de eventos de transducción de señales que pueden involucrar la expresión de informadores genéticos, el tráfico de componentes celulares o el monitoreo de la función de los orgánulos. Independientemente del tipo de ensayo basado en células que se utilice, es importante saber cuántas células viables quedan al final del experimento ⁽⁵²⁾.

Existe una variedad de métodos de ensayo que se pueden usar para estimar el número de células eucarióticas viables.

1.10.1 Tipos de ensayos de viabilidad celular

1.10.1.1 Ensayos de reducción de tetrazolio

Se han utilizado diversos compuestos de tetrazolio para detectar células viables. Los compuestos más comúnmente usados incluyen: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se dividen en dos categorías básicas: 1) MTT que está cargada positivamente y penetra fácilmente en las células eucariotas viables y 2) aquellas como MTS, XTT y WST-1 que tienen carga negativa y no penetran fácilmente en las células. La última clase (MTS, XTT, WST-1) se usa típicamente con un aceptor de electrones intermedio que puede transferir electrones desde el citoplasma o la membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio al producto de formazán coloreado ⁽⁵²⁾.

1.10.1.2 Ensayo de marcador de viabilidad de proteasa

Se ha demostrado que la medición de una actividad proteasa conservada y constitutiva dentro de las células vivas sirve como un marcador de la viabilidad celular. Un sustrato de proteasa fluorogénica permeable a las células (glicilfenilalanil-aminofluorocumarina; GF-AFC) se ha desarrollado recientemente para detectar selectivamente la actividad de la proteasa que se restringe a las células viables. El sustrato de GF-AFC puede penetrar en las células vivas donde la actividad de la aminopeptidasa citoplásmica elimina los aminoácidos de gl y phe para liberar aminofluorocumarina (AFC) y generar una señal fluorescente proporcional al número de células viables. Tan pronto como las células mueren, esta actividad de proteasa desaparece rápidamente, por lo que esta actividad de proteasa es un marcador selectivo de la población de células viables ⁽⁵²⁾.

Este enfoque de ensayo está disponible como un producto comercial de Promega Corporation. Los componentes del producto incluyen: GF-AFC 100 mM en DMSO y un tampón de ensayo para la dilución del sustrato. Se ha demostrado que la señal generada a partir del enfoque del ensayo de proteasa se correlaciona bien con otros métodos establecidos para determinar la viabilidad celular, como un ensayo de ATP. Una de las ventajas del sustrato GF-AFC es que es relativamente no tóxico para las células en cultivo ⁽⁵²⁾.

1.10.1.3 Ensayo de ATP

La medición de ATP utilizando luciferasa de luciérnaga es el método más comúnmente aplicado para estimar el número de células viables en aplicaciones HTS. Datos de varios ejemplos de HTS los ensayos que utilizan ensayos ATP están disponibles públicamente en Pubchem. El ATP ha sido ampliamente aceptado como un marcador válido de células viables. Cuando las células pierden la integridad de la membrana, pierden la capacidad de sintetizar ATP y ATPasas endógenas agotan rápidamente cualquier ATP restante del citoplasma. Aunque la luciferasa se ha utilizado para medir el ATP durante décadas, los avances recientes en el diseño de ensayos han dado como resultado un protocolo homogéneo de adición de un solo reactivo que produce una señal luminiscente que brilla durante horas. El avance tecnológico más significativo se realizó bajo la dirección de Keith Wood en Promega Corporation, donde se utilizó la evolución dirigida para seleccionar moléculas estables y generar versiones mejoradas de luciferasa. La versión estable de luciferasa fue la tecnología habilitadora que condujo al desarrollo de ensayos robustos para HTS que pueden soportar condiciones de lisis de células severas y son más resistentes a los inhibidores de luciferasa que se encuentran en bibliotecas de moléculas pequeñas ⁽⁵²⁾.

1.10.1.4 Azul de Tripán

El azul de tripano, azul de tripán o azul tripán es un colorante azoico que se utiliza para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla y ya que este compuesto es una molécula grande y de carga aniónica, la membrana no permite su paso, por el contrario, si la célula está muerta, por lo tanto, la membrana celular estará desintegrada por lo cual el colorante azul de tripán podrá ingresar sin problemas a la célula. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio (típicamente, empleando una cámara de Neubauer para contarlas). Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión ⁽⁵³⁾.

1.11 Inmunofluorescencia

La tinción de inmunofluorescencia (IF) es una técnica ampliamente utilizada en la investigación biológica y el diagnóstico clínico. IF utiliza anticuerpos marcados con fluorescencia para detectar antígenos específicos. Seguido de imágenes, es una técnica muy directa, ya que realmente puedes ver algo. Aunque es una herramienta bien establecida, deben considerarse múltiples factores y deben tomarse varios pasos de optimización para garantizar una tinción exitosa ⁽⁵⁴⁾.

La inmunofluorescencia, es decir, la tinción de células con anticuerpos y otros ligandos específicos marcados directa o indirectamente con colorantes fluorescentes, ofrece la fascinante posibilidad de caracterizar células individuales de acuerdo con la expresión de proteínas particulares o moléculas de polisacáridos, específicas para etapas de activación o diferenciación definidas. En este punto, algunas consideraciones básicas apuntan a comprender qué parámetros son importantes y cómo La especificidad y la sensibilidad de la tinción de inmunofluorescencia se pueden optimizar. De los tres pasos en el análisis de inmunofluorescencia - tinción, medición, y evaluación de datos - el primero, a saber, la preparación de células y tinción es probablemente el más importante y propenso a errores y por lo tanto recibe la mayor atención ⁽⁵⁴⁾.

1.11.1 Aplicaciones

La inmunofluorescencia permite a los investigadores evaluar si las células en una muestra particular expresan el antígeno en cuestión. En los casos en que se encuentra una señal inmunopositiva, la inmunofluorescencia también permite a los investigadores determinar qué compartimentos subcelulares están expresando el antígeno. Esta técnica se puede usar en líneas celulares cultivadas, secciones de tejido o células individuales ⁽⁵⁴⁾.

La inmunofluorescencia se puede usar para analizar la distribución de proteínas, glicanos y pequeñas moléculas biológicas y no biológicas. Se ha utilizado ampliamente en la investigación biológica y en el rendimiento de la investigación médica y se convierte en uno de los métodos más importantes y efectivos ⁽⁵⁴⁾.

1.12 Citocinas proinflamatorias

1.12.1 GM-CSF: Los factores estimulantes de colonias constituyen una familia de glicoproteínas que modulan la hematopoyesis y controlan la supervivencia, proliferación, diferenciación y capacidad funcional de los progenitores hematopoyéticos, con actividades frecuentemente superpuestas. Son, además, reguladores importantes de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular ⁽⁵⁵⁾ ⁽⁵⁶⁾.

1.12.2 Interleucina 6 (IL-6): Las citocinas son moléculas de comunicación intercelular producidas por una gran variedad de tipos celulares. Sus acciones pueden ser autocrinas, paracrinas y endocrinas. Su misión es mediar muchas de las funciones de las células encargadas de la inmunidad innata y adquirida. Están involucradas en el desarrollo, crecimiento y activación de las células del sistema inmunológico y en la ejecución de la respuesta inflamatoria. Sus concentraciones son muy altas en sitios con inflamación activa ⁽⁵⁷⁾.

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales, entre otras. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citocinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Asimismo, sus principales objetivos o dianas celulares son los linfocitos T y B, las células epiteliales, los monocitos/macrófagos y los hepatocitos.

Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. En la actualidad se la reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda; también posee efectos antiinflamatorios al ejercer un control parcial sobre la producción de IL-1 y TNF- α . A diferencia de la IL-1 y el TNF- α , que poseen acciones proinflamatorias, los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble ⁽⁵⁷⁾.

1.12.3 RANTES (CCL5): La quimiocina (de patrón C-C) ligando 5 (CCL5), también conocida como RANTES, es una citoquina quimiotáctica o quimiocina. Es altamente

atrayente de las células T, los eosinófilos y los basófilos; actúa en el receptor CCR5 acoplado a la proteína G para realizar su acción efectora. CCR5/RANTES actúa como un regulador de la respuesta inmunológica y dirige las células inmunológicas hacia la zona de inflamación (58).

En las enfermedades alérgicas, CCL5/RANTES aparece en niveles elevados junto con otras citocinas en las muestras de pacientes infectados donde se cree que tiene un rol en el reclutamiento de células T y eosinófilos. La producción de esta quimiocina durante las infecciones virales se cree que está relacionada con la exacerbación de las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias. En los eosinófilos no solo induce la quimiotaxis, sino que también induce la activación celular mediante la elevación de los niveles de Ca^{+2} , junto con la regulación positiva de las moléculas de adhesión, estallido respiratorio y la de granulación (58).

Los macrófagos son probablemente las fuentes de quimioatrayentes específicos de células en pacientes con asma. RANTES, (CCL5), MIP-1 α y (CCL3) son quimiotácticos para macrófagos, eosinófilos y basófilos. MCP-1 y (CCL1) son quimiotácticos para macrófagos y basófilos. IL-8 y (CXCL8) son quimiotácticos para neutrófilos, basófilos y, en menor medida, eosinófilos (58).

1.12.4 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α): TNF- α es una citoquina importante en la respuesta inmune innata que proporciona una defensa inmediata del huésped contra los organismos invasores antes de la activación del sistema inmune adaptativo. Se produce principalmente por macrófagos en respuesta a la activación de moléculas de reconocimiento de patrones unidos a la membrana, que detectan productos comunes de la superficie celular bacteriana como polisacáridos, carbohidratos y lipopolisacáridos (59).

TNF- α induce la liberación de histamina de los mastocitos humanos directamente y participa en un bucle autocrino positivo que potencia la secreción de citocinas de los mastocitos humanos (59).

Por lo tanto, es posible que el TNF- α esté involucrado en la interacción mastocitos / músculo liso y que esto sea particularmente importante en el desarrollo de la hipersensibilidad de las vías respiratorias (59).

El Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT- α) es una citoquina proinflamatoria y de defensa del huésped, cuya producción exagerada lleva a enfermedades inflamatorias crónicas. El FNT- α fue nombrado así por su habilidad para destruir células tumorales y causar necrosis hemorrágica en tumores en ratones. Es producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección ⁽⁵⁹⁾.

El factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) es un regulador clave de la inflamación y un agente crucial en la formación del granuloma. Como tal, una regulación anormal de la función del FNT- α juega un rol importante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas e infecciones ⁽⁵⁹⁾.

1.12.5 TGF α : TGF- α es un polipéptido de 5700 Da que es parcialmente homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es producido por varios tumores sólidos asociados con la hipercalcemia de malignidad y puede estimular la reabsorción ósea osteoclástica en cultivos de órganos murinos ⁽⁶⁰⁾.

Los efectos de TGF- α están mediados por el receptor de EGF y son independientes de la síntesis de prostaglandinas ⁽⁶⁰⁾.

Como su nombre lo indica, el TGF- α es producido por células transformadas, células embrionarias y células tumorales. EGF y TGF- α son potentes estimuladores de la migración y proliferación celular ⁽⁶⁰⁾.

1.12.6 Interleucina beta 1 (IL-1 β): La interleucina-1 β es una citocina proinflamatoria que modula la neurotransmisión neurotóxica y prolonga las convulsiones inducidas por kainato al mejorar la neurotransmisión glutamatérgica ⁽⁶¹⁾.

Tanto TNF- α como IL-1 β pueden inducir la producción de IL-8 a partir de una variedad de células, incluyendo células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y células epiteliales ⁽⁶¹⁾.

Las IL1 β actúan en células T, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, donde pueden inducir proteínas proinflamatorias, hematopoyesis, la diferenciación a células TH17, entre otros ⁽⁶²⁾.

La IL-1 β ha sido bien caracterizada como una importante citoquina proinflamatoria que desempeña funciones pleiotrópicas en la defensa del huésped al inducir inflamación aguda y crónica a través de la activación de los sistemas inmunitarios innatos y adquiridos ⁽⁶²⁾ ⁽⁶³⁾.

Como factor activador de linfocitos, IL-1 α e IL1 β potencian la activación de las células B, lo que lleva a la producción de IgE. Se demostró que la IL-1 es importante para la expansión de las células T y las células B específicas del antígeno a través de la inducción de co-moléculas estimulantes como el CD154 y CD134 (OX40) en la superficie de las células T. IL-1 α y IL-1 β pueden mejorar la producción de IFN- γ dependiente de IL-12 por las células Th1. IL-1 puede estar involucrada en la diferenciación y / o activación de células Th2. La IL-1 también está involucrada en el desarrollo de células Th17 independientes de IL-6-14 y aumenta la producción de IL-17 dependiente de IL-23 por parte de las células Th17. Estas observaciones sugieren que la IL-1 contribuye al desarrollo de enfermedades mediadas por células T, como trastornos alérgicos y autoinmunes, al promover la activación de las células T y las células B ⁽⁶³⁾.

1.12.7 Interleucina 8 (IL-8): La IL-8 es una citoquina proinflamatoria que media principalmente la activación y migración de neutrófilos al tejido objetivo desde la sangre periférica. Esta quimiocina pertenece a la familia de las CXC, es considerada como un factor autocrino, producido por progenitores hematopoyéticos normales, células sanguíneas maduras y células leucémicas, que además promueve la supervivencia y proliferación celular en respuesta a otras citocinas hematopoyéticas, las IL-8 funcionan como una quimioatrayente activando así a los neutrófilos. La actividad celular de IL8 está mediada por dos receptores, el receptor 1 de IL8 (CXCR1) y el receptor 2 de IL8 (CXCR2) ⁽⁶⁴⁾.

El término quimiocina; se refiere a la capacidad de ciertas citocinas para actuar como quimioatrayentes, que dirigen el movimiento de los leucocitos a los sitios de infección e inflamación (quimiotaxis). La IL-8 es la principal quimioatrayente en el ser humano específicamente para los neutrófilos, y parece desempeñar un papel importante en el reclutamiento de neutrófilos en los pulmones en pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo inducido por sepsis ⁽⁶⁵⁾.

Altas concentraciones de IL8 han sido encontradas en el fluido de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con asma y EPOC. Además, diversos estudios en ratones knockout han sugerido que CXCR2 es un mediador importante de la migración de neutrófilos en humanos con exacerbaciones de EPOC, encontrando así que la intensidad de la expresión del ARNm de CXCR2 se correlaciona significativamente de manera positiva con el aumento de CXCR2 ⁽⁶⁴⁾.

La IL-8 también produce una movilización inmediata de granulocitos maduros. Recientemente, se demostró que las células polimorfonucleares sirven como reguladoras clave de la IL-8, debido a que inducen la movilización de células progenitoras hematopoyéticas, cuando la capacidad de movilización de IL-8 se redujo severamente en ratones neutropénicos, pero reapareció cuando se realizó la reconstitución de neutrófilos ⁽⁶⁵⁾.

Estudios recientes discuten el posible rol del epitelio bronquial como un participante activo en la respuesta inflamatoria en asma y en EPOC. Debido a que, tejidos aislados de pacientes con asma demostraron producir y liberar de manera espontánea cantidades más elevadas de IL6, IL8 y GMCSF (factor estimulante de colonias de macrófagos), que los controles sanos. Además, diversos estudios demuestran que existe liberación de IL8 por células del epitelio bronquial luego de la estimulación con IL-1 β , TNF α o elastasa ⁽⁶⁶⁾.

IL8 es una citoquina importante por ser resistente a tratamientos desnaturalizantes, como la oxidación o la hidrólisis además de permanecer de manera activa en los tejidos por largos periodos ⁽⁶⁶⁾.

Recientemente se demostró que los neutrófilos tenían la capacidad de desacoplar las células epiteliales de la base de la membrana, un proceso muy común en el asma. Además, se han encontrado correlaciones entre el porcentaje de neutrófilos en fluido de lavado bronco alveolar (LBA) y la hiperreactividad de las vías respiratorias ⁽⁶⁶⁾.

Otra citocina inflamatoria importante es el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que se libera de los macrófagos alveolares estimulados. El nivel de TNF- α también está elevado en BAL en esputo de pacientes con asma y EPOC ⁽⁶⁴⁾.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Muestras y/o unidades biológicas

- NHBE (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente sano.
- DHBE – Asma (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente asmático.
- DHBE – EPOC (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC.

2.1.2 Medios de cultivo

- Medio de cultivo LHC-9 (medio definido, Life Technologie, California, USA)
- Medio de cultivo B-ALI™ growth medium (Lonza, Suiza)
- Medio B-ALI™ diferenciación (Lonza, Suiza)

2.1.3 Anticuerpos

- Citoqueratina (monoclonal anti-citoqueratina Pan, Aldrich® Sigma) (diluido 1: 100a)
- β -tubulina (monoclonal anti- β -tubulina-FITC, Sigma Aldrich®) (diluido 1: 25a)
- Proteína MUC-5AC

2.1.4 Material de laboratorio

- Pipetas serológicas (2,5, 5 y 10 ml)
- Puntas para micropipetas
- Tubos de centrifuga (15 y 50 ml)
- Cámara de Neubauer
- Placas de cultivo celular con 6 y 96 pocillos
- Laminillas cubreobjetos cuadrados
- Microtubos (1,5 y 2 ml)
- Filtro para botellas (tamaño de poro de 0,22 μ m)
- Láminas portaobjetos
- Placa de fondo plano con 96 pocillos
- Raspadores de células

2.1.5 Reactivos

- Agua destilada
- Agua ultrapura
- Suero fetal bovino,
- SFB (Cultilab, España)
- Tampón fosfato salino, PBS (Gibco, USA)
- Albumina de suero bovino, BSA (Sigma-Aldrich, USA)

2.1.6 Equipos e instrumentación

- Cabina de seguridad biológica (*Bio Vanguard Class II Type A2*)
- Centrifugadora
- Incubadora de CO₂
- Autoclave
- Refrigerador
- Balanza analítica Microscopio invertido de fluorescencia
- Espectrofotómetro para microplacas Sonicador de vástago *Freezer -80 °C*
- Transiluminador
- Agitador de vaivén
- Sistema de purificación de agua Ultrapura MilliQ
- Termociclador
- Pipetas automáticas - Micropipetas de: 0,1-2,5, 0.5-10, 2-20, 10-100, 20-200 y 100-1000 µL

Otros

- Guantes descartables de nitrilo
- Mascarilla
- Hielo

2.1 Métodos

2.2.1 Ubicación geográfica del estudio

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Impacto del entorno químico en la salud humana (IMPECS) de la Universidad de Lille 2– Francia.

2.2.2 Cultivo celular

Se utilizaron modelos de células primarias comerciales provenientes de 3 tipos de epitelios bronquiales humanos:

- Células epiteliales bronquiales de paciente sano. Lonza, Suiza (NHBE)
- Células epiteliales bronquiales de paciente asmático. Lonza, Suiza (DHBE – Asma)
- Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC. Lonza, Suiza (DHBE – EPOC)

Descongelamiento y preparación de las células NHBE, DHBE-Asma, DHBE – EPOC para cultivo celular

Las células epiteliales bronquiales fueron compradas del laboratorio Lonza, Suiza y criopreservadas en nitrógeno líquido a -196°C en el laboratorio de Impacto del entorno químico en la salud humana (IMPECS) Lille, Francia. Estas fueron descongeladas empleando baño maría a 37°C por 5 minutos. En una cámara de flujo laminar en condiciones estériles se tomaron las células epiteliales bronquiales de paciente sano, con asma y con EPOC y fueron depositadas por separado en un tubo falcon de 15 mL y se añadió 10 mL de medio de cultivo LHC-9 (medio definido, Life Technologie, California, USA).

Las células se centrifugaron por 5 minutos a una velocidad de 1000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1mL de medio completo. Las muestras quedaron preparadas para iniciar el cultivo celular.

Conteo y viabilidad celular

Se evaluó el conteo y viabilidad celular empleando el equipo Condesa C10227 contador de células automatizado (Invitrogen), el cual funciona a temperatura entre $10\text{--}35^{\circ}\text{C}$ y humedad

relativa máxima de 20 a 80%. Este equipo viene con unas láminas propias en sobres individuales desechables y evitan la contaminación cruzada entre varias líneas celulares.

Se tomaron 10uL de células y se añadieron en un tubo eppendorf donde fueron mezcladas con 10uL de Azul de Tripán, posteriormente con ayuda de una micropipeta se tomaron 10uL de la mezcla, se añadieron a la lámina desechable y se dejó incubar por 20 segundos. Las lecturas encontradas indican el conteo celular y el porcentaje de viabilidad por mL.

Acondicionamiento y cultivo celular

El cultivo celular se realizó en dos etapas:

1. Etapa de multiplicación celular

Para una mejor adherencia celular a los frascos de cultivo, se prepararon 10mL de colágeno al 1% con PBS, luego se añadieron 3mL a cada frasco de cultivo de 25cm² (Cell Bind Corning) y se llevó a una incubadora a una temperatura de 37°C por 45 minutos para que polimerice.

En cada frasco de cultivo con colágeno se cultivaron 700000 células epiteliales bronquiales de paciente sano, con asma y con EPOC, luego se añadieron 10mL de medio de cultivo LHC-9 complementado previamente con penicilina/estreptomicina al 1% (antibiótico) y anfotericina al 1% (antifúngico). Los frascos de cultivo fueron llevados a condiciones de 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C y alta humedad. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas y una vez alcanzada la confluencia al 90% fueron disociadas empleando tripsina (Life Technologie).

Para disociar las células, se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron los frascos con PBS para eliminar las células muertas, seguidamente se añadió tripsina 1x en PBS, se colocó el frasco a 37 °C durante aproximadamente 2 a 3 minutos, en seguida se observó a contraluz si las células fueron despegadas y se ayudó con pequeños golpes en los laterales del frasco.

Posteriormente para inhibir la acción de la tripsina se utilizaron 12mL de medio de cultivo LHC-9, luego se tomó la mezcla, la cual fue transferida a un tubo falcon y llevada a centrifugación a 1100 rpm por 5 minutos, decantamos el sobrenadante y conservamos el sedimento celular.

Luego, se añadieron 5mL de medio de cultivo LHC-9 al tubo falcon para realizar el conteo celular, para ello se tomaron 10uL de la mezcla previamente homogenizada y se mezclaron con 10uL de azul de tripán, posteriormente se tomaron 10uL de dicha mezcla, se añadieron en una lámina y se dejó incubar por 20 segundos para realizar le conteo. Se contaron 3 millones de células epiteliales bronquiales sanas, con asma y con EPOC empleando el equipo Condesa C10227 contador de células automatizado (Invitrogen) y se volvieron a cultivar en 4 frascos de 75cm² 750000 células en cada uno.

El último paso de la fase de multiplicación corresponde al conteo y pase de las células a placas de cultivo de 6 pocillos (inserciones de cultivo celular BD Flacon™). Los insertos también fueron recubiertos con colágeno para una mejor adherencia.

Las células fueron despegadas siguiendo el protocolo con tripsina antes mencionado y con la ayuda del equipo Condesa C10227 se contaron 2100000 células en cada frasco.

2. Etapa de diferenciación celular

Luego de contar las células, se colocaron 100000 células en cada subpocillo de 3,8cm² de área, el cual contiene en la base una membrana porosa de 0,4um (BD Falcon™ Cell Culture inserts for Companion), seguidamente se añadió 2mL medio de cultivo B-ALI™ growth medium (Lonza) en cada pocillo y 1ml en cada subpocillo. El medio fue cambiado cada 48 horas hasta conseguir el 80% de confluencia en los insertos.

Después de la confluencia completa de las células cultivadas en el subpocillo, el medio de crecimiento medio B-ALI se elimina y es reemplazado por el medio de cultivo de diferenciación B-ALI™ añadido solo en los pocillos para que las células, las cuales se encuentran solo en el subpocillo permanezcan expuestas directamente al aire (interfase aire/liquido). (Figura 6)

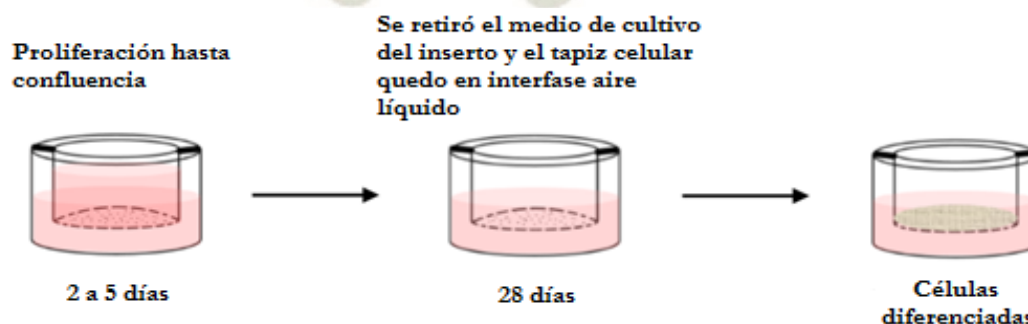


Figura 6: Proceso de diferenciación celular. (Elaboración propia)

Este nuevo medio de cultivo fue cambiado cada dos días durante 28 días, hasta obtener 8 millones de células por cada tipo de células epiteliales bronquiales, las cuales fueron contabilizadas empleando el equipo Condesa C10227 contador de células automatizado (Invitrogen).

Esta técnica permite exponer el polo apical de las células al aire para generar las condiciones fisiológicas de las vías respiratorias. Al nutrirse por el polo basal, las células se diferenciarán en células ciliadas, células caliciformes y células basales, y así constituir un epitelio bronquial pseudo estratificado.

2.2.3 Caracterización celular (marcaje con inmunofluorescencia directa)

Las células bronquiales se fijaron en los pocillos de las placas mediante incubación con paraformaldehído 1% en buffer fosfato salino (PBS), se calentaron a 37°C durante 3 minutos. Una vez fijadas, las células se almacenaron en PBS a -4°C.

Seguidamente la membrana porosa de los subpocillo que contenían a las células bronquiales fueron extraídas mecánicamente, y fueron colocadas en láminas porta objetos.

Para llevar a cabo el marcaje del anticuerpo, las células se permeabilizaron primero con 0,2% de Tritón X-100 diluido en PBS.

A continuación, para evitar uniones inespecíficas se bloquearon los antígenos con los anticuerpos primarios empleando una solución proteica concentrada de PBS 3% y solución estándar de albumina (BSA) 0,05% y se incubaron por 1 hora a 37°C, luego se realizó el procedimiento de lavado de membranas las cuales contenían a las células bronquiales enjuagándolas tres veces durante 5 minutos con PBS.

Seguidamente se incubaron las células durante 30 minutos con los anticuerpos monoclonales conjugados a fluoróforos de diferentes colores, rojo (monoclonal anti-citoqueratina Pan, Aldrich® Sigma, conejo) el cual detecta a la citoqueratina (proteína del citoesqueleto) y b-tubulina (ratón) para detectar células ciliadas. De color verde se detecta la proteína MUC-5AC (conejo) para marcar las células productoras de mucus. Por último, a fin de observar la fluorescencia roja y verde, las células fueron puestas en un medio que contiene reactivo Slow Fade oro Antifade con DAPI, Molecular Probes (DAPI).

Los anticuerpos utilizados están dirigidos a:

- Citoqueratina (monoclonal anti-citoqueratina Pan, Aldrich® Sigma) (diluido 1: 100a) para la caracterización de las células epiteliales.
- La β -tubulina (monoclonal anti- β -tubulina-FITC, Sigma Aldrich®), (diluido 1: 25a) para la detección de las células ciliadas. (citoesqueleto)
- La proteína MUC-5AC para marcar las células productoras de mucus.

2.2.4 Exposición de partículas

Las partículas finas ($PM_{2,5}$) y las partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$) fueron recolectadas por el equipo SAGE (Ciencias Atmosféricas e Ingeniería Ambiental) del Institut Télécom Lille-Douai. El sitio de muestreo se acordó previamente y se realizó al nivel de la costa de Dunkerque, precisamente al nivel de una zona industrial al norte de la ciudad de Grand Synthe. Este sitio fue elegido porque representa todas las características de un sitio urbano-industrial (Figura 7).



Figura 7: Partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$) y partículas finas ($PM_{2,5}$) en solución salina.

Después de 28 días de diferenciación en Interfase Aire Líquido (IAL), las células se expusieron de acuerdo a 2 protocolos: primer protocolo con una dosis única de partículas finas ($PM_{2,5}$) y partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$) durante 6 horas (exposición aguda) y segundo protocolo con 3 dosis de partículas finas ($PM_{2,5}$) y partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$), cada 24 horas durante 6 horas (exposiciones repetidas).

Una dosis de exposición corresponde a $5 \mu\text{g}$ de partículas por cm^2 del tapiz celular. Cualquiera que sea el protocolo, para cada exposición, las suspensiones de partículas fueron

de 500 µl de medio de cultivo de diferenciación B-ALI suplementado con 2% de fungizona, esta suspensión fue depositada gota a gota sobre el tapiz celular, después de un tiempo de contacto de 6 horas como ya se mencionó, se retiró la suspensión.

Se utilizaron nueve placas de seis pocillos con subpocillo, tres placas para cada condición de células bronquiales (sanas, con EPOC y con asma), una placa para cada tipo de partículas (partículas finas y partículas ultrafinas) y una placa para los controles negativos, a los cuales solo se les añadió una solución buffer (HBSS) (Figura 8).

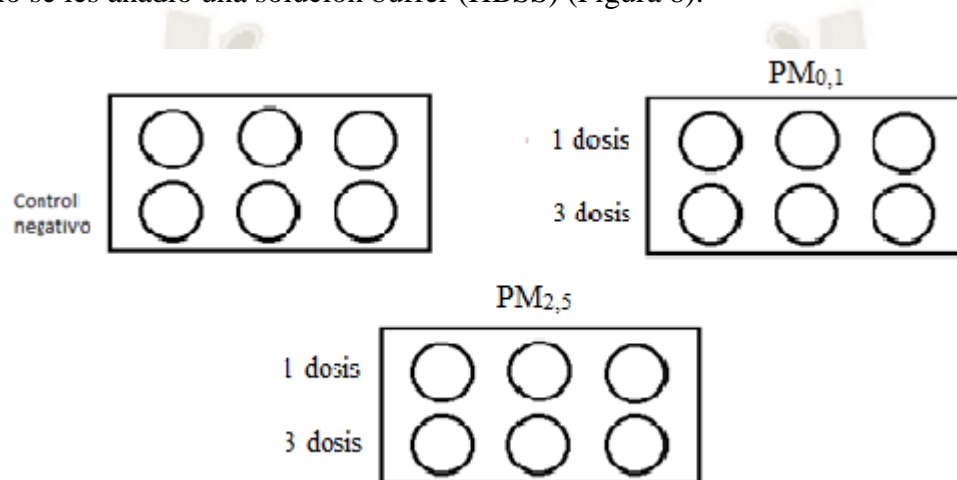


Figura 8: Plan de placas para la exposición a las partículas finas y ultrafinas. (Elaboración propia)

La elección de la dosis de exposición se basó en los resultados de las pruebas de citotoxicidad realizada previamente por el laboratorio IMPECS para obtener la DL₁₀. Este valor corresponde a la dosis letal para el 10% de las células, la cual se utilizó como dosis de exposición. Se utilizó el kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (USA).

2.2.5 Dosaje de citocinas en el medio de cultivo

Finalizada la exposición a las partículas finas y ultrafinas, se recuperaron los medios de cultivo de los pocillos para cuantificar las citocinas secretadas.

Las citocinas cuantificadas fueron: GM-CSF, Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), RANTES (CCL5), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), TGF α , Interleucina beta 1 (IL-1 β) y MCP-1 (CCL2).

Se analizaron las muestras (medio de cultivo) utilizando el kit Milliplex® MAP Human Cytokine/Chemiokine Magnetic Bead Panel - HCYTOMAG-60K (Merck Millipore,

Massachussets), el principio de esta prueba se basa en la tecnología MILLIPLEX MAP®, esta tecnología es multiparamétrica y posibilita el análisis simultáneo de hasta 100 analitos distintos de una misma muestra en un solo pocillo. Ello supone una elevada productividad, reduciendo drásticamente el tiempo requerido, el volumen de muestra necesario y los costos.

El principio de este análisis es similar a un inmunoensayo tipo sándwich (ELISA). Los anticuerpos dirigidos contra las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento diana están unidos covalentemente a microesferas teñidas internamente acopladas a un complejo de estreptavidina/ficoeritrina que produce fluorescencia. Las microesferas reaccionan con las biomoléculas diana que estén presentes en la muestra.

El kit Milliplex® MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel incluye:

1. Protocolo
2. Tampón de lavado 10x
3. Cóctel de detección de anticuerpos (contiene múltiples anticuerpos)
4. Placa de 96 pocillos
5. Sellador de placa
6. Solución de matriz sérica
7. Tampón de ensayo
8. Perlas magnéticas en solución + diluyente
9. Estreptavidina/ficoeritrina (material fluorescente)
10. Solución estándar
11. Solución control

Para la preparación de los reactivos del kit; se sonicaron las perlas magnéticas durante 30 segundos y se agitó un minuto antes de usar. Seguidamente se reconstituyeron los viales de control de calidad 1 y 2 con 250 μ L de agua desionizada y se mezcló invirtiendo el vial varias veces y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos y se transfirió a los tubos de microcentrífuga.

Se homogenizó el tampón de lavado y se diluyó 60mL en 540mL de agua desionizada (almacenamiento de 2°C a 8°C).

Luego se reconstituyo la citocina humana estándar con 250µL de agua desionizada, se agito durante 10 segundos, se dejó reposar durante 5 minutos y se transfirió a un tubo de microcentrífuga (concentración: 10000 µg/mL) (Tabla 2).

Tabla 2 : Reconstitución de la citocina humana estándar

Concentración estándar (pg/mL)	Volumen de agua desionizada	Volumen del estándar
10000	250 µL	0

A continuación, se prepararon las diluciones de la citocina estándar en tubos de microcentrífuga (Tabla 3) (Figura 9).

Tabla 3 : Diluciones de la citocina estándar

Concentración estándar (pg/mL)	Volumen de tampón de ensayo	Volumen del estándar
2000	200 µL	50 µL de 10000 pg/mL
400	200 µL	50 µL de 2000 pg/mL
80	200 µL	50 µL de 400 pg/mL
16	200 µL	50 µL de 80 pg/mL
3.2	200 µL	50 µL de 16 pg/mL

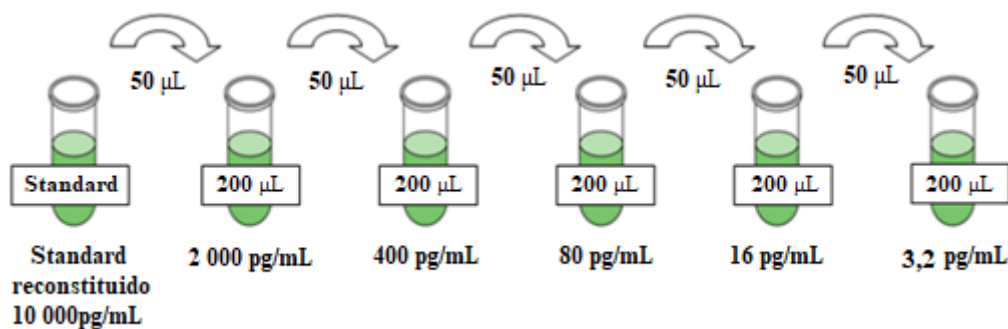


Figura 9: Diluciones de la citocina estándar

Se agregaron 200 μL del tampón de lavado a cada pocillo, se cubrió la placa y se colocó en un agitador de placas durante 10 minutos. Se retiró el tampón de lavado y se dejó escurrir sobre un papel absorbente.

Posteriormente se añadieron 25 μL de las diluciones, 25 μL del tampón de ensayo como blanco, 25 μL del control 1 y control 2, por duplicado. Para los pocillos de las muestras se añadieron 25 μL de tampón de ensayo y 25 μL de cada muestra.

Se homogenizó la solución que contiene a las perlas magnéticas y se agregaron 25 μL en cada pocillo. Se cubrió la placa con un sellador de placa y papel aluminio y se dejó incubar durante la noche a 4°C en un agitador de placa.

Al día siguiente se retiró suavemente el contenido de los pocillos y se enjuago la placa dos veces: se dejó la placa sobre la base magnética para que las perlas magnéticas sedimenten, se vació la placa y se agregaron 200 μL de tampón de lavado en cada pocillo. Posteriormente se agito la placa y se dejó durante un minuto en la base magnética, finalmente se vació el contenido. Se agregaron 25 μL de anticuerpo de detección a cada pocillo previamente calentado a temperatura ambiente, se cubrió la placa y se envolvió con papel aluminio y se puso en el agitador de placas durante 30 minutos y enjuagar dos veces de la misma forma ya descrita.

La lectura de fluorescencia se realizó con el sistema Luminex MAGPIX® (Merck Millipore, Massachussets). Un instrumento basado en citometría de flujo que permite cuantificar la intensidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en la superficie de las microesferas. Lleva incorporados dos láseres y un sistema óptico para la detección de dichas reacciones.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Conteo y Viabilidad Celular

Luego del descongelamiento de cada tipo de células epiteliales bronquiales se procedió a realizar el conteo y viabilidad celular, los resultados obtenidos fueron 8×10^5 células/mL y 90% de viabilidad en las células epiteliales bronquiales sanas, con asma y con EPOC, siendo resultados óptimos para realizar los ensayos posteriores del presente estudio. Estos resultados se determinaron empleando el método del azul de tripán, con la ayuda del contador celular, Condesa C10227 (INVITROGEN). Las mediciones fueron realizadas por triplicado obteniéndose un promedio de estas lecturas (Tabla 4). La cantidad de células obtenida nos sirvieron para iniciar la etapa de multiplicación celular en frascos de cultivo de 25cm^2 .

Tabla 4 : Conteo celular

TIPOS DE CÉLULAS	CONTEO 1	CONTEO 2	CONTEO 3	PROMEDIO
NHBE	800200	800100	800150	8×10^5 células/mL
DHBE – Asma	800200	800150	800150	8×10^5 células/mL
DHBE – EPOC	800100	800100	800140	8×10^5 células/mL

3.2 Cultivo de Células Primarias Epiteliales Bronquiales

3.2.1 Etapa de multiplicación celular

Se logró acondicionar con éxito los cultivos celulares primarios de células epiteliales bronquiales humanas, estos fueron las siguientes:

- NHBE (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente sano.
- DHBE – Asma (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente asmático.
- DHBE – EPOC (Lonza, Suiza): Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC.

En frascos de 25cm^2 de superficie, fueron sembradas 8×10^5 células epiteliales/mL, estas células crecieron con éxito en medio celular LHC-9 suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibiótico y antimicótico. Durante la etapa de los ensayos para acondicionar las células, no se presentó contaminación celular por bacterias u hongos, lo que indica que se trabajó respetando las buenas prácticas de esterilidad y técnicas de cultivo celular. La morfología de las células proliferantes fue típicamente de células en forma alargada, de tamaño pequeño-mediano, teniendo la característica de adherencia, brillantes como se observa en la figura N°10.

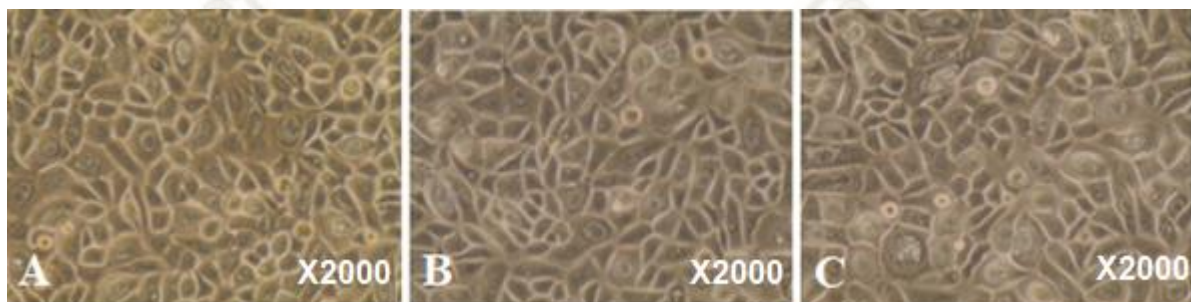


Figura 10: A: Células epiteliales bronquiales sanas, B: Células epiteliales bronquiales con asma, C: Células epiteliales bronquiales con EPOC (X2000)

Dichas células presentaron un crecimiento rápido, lo que nos llevó a repartir las células en un frasco de área de superficie mayor (75cm^2), luego de cinco días con el medio LHC-9. Se realizaron cambios de medio celular cada 48 horas para evitar la muerte celular.

3.2.2 Etapa de Diferenciación Celular

Esta etapa se inició luego de siete días de incubación de las células primarias epiteliales bronquiales en los frascos de cultivo de 75cm^2 a 37°C y 5% CO_2 (etapa de multiplicación), las células fueron disociadas y sembradas en placas de 6 pocillos con sub pocillos. Las células crecieron adecuadamente como se muestra en la figura N°11 y 12, en el medio de cultivo de diferenciación celular B-ALI (Lonza); este medio de cultivo tiene suplementos que son necesarios para la diferenciación en interfaz aire-líquido de las células epiteliales bronquiales. Las células no presentaron contaminación bacteriana ni fúngica.

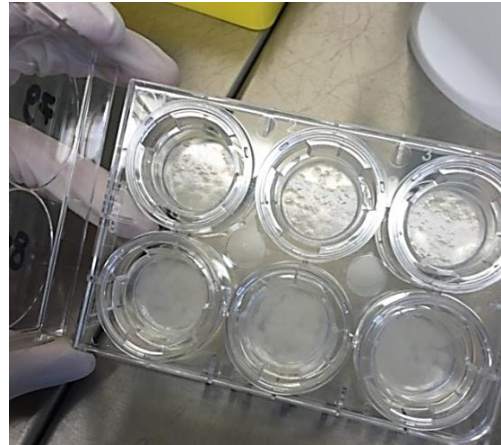


Figura 11: Formación del tapiz celular en los subpocillo en interfaz aire-liquido.



Figura 12: Epitelio bronquial en interfase aire-liquido (dia 7)

Los factores de crecimiento usados para suplementar los medios de cultivo forman un amplio grupo de moléculas polipeptídicas cuyo peso molecular oscila entre 1000 y 40000 D. Sus efectos fisiológicos “*in vivo*” están relacionados con la estimulación del crecimiento embrionario y fetal durante el desarrollo, la regulación de los procesos de proliferación-diferenciación de tejidos que regeneran continuamente y finalmente la estimulación de los procesos de reparación tisular.

3.3 Caracterización celular por inmunofluorescencia directa

La lectura de la fluorescencia se observó en la plataforma de imágenes celulares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lille 2, empleando microscopía Confocal. Se

logró la fijación de las células en los pocillos, la permeabilización de la membrana celular y la inmunodetección con anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos.

El medio de cultivo empleado (B-ALI Bronchial Air Liquid Interface BulletKit) mediante el uso de un modelo de interfaz aire-líquido y un Single Quots Kit que contiene ácido retinoico, nos permitió la diferenciación completa de las células epiteliales bronquiales. El ácido retinoico es un derivado de la vitamina A que se sabe que posee potentes propiedades promotoras de la diferenciación celular. Además, algunos estudios muestran que las células diferenciadas con ácido retinoico son menos vulnerables que las células indiferenciadas a la muerte celular mediada por toxinas (Jane Kovalevich y Dianne Langford, 2016). Este medio de cultivo permite la diferenciación expresada por la formación de un epitelio polarizado con buena función de barrera (resistencia transepitelial), fenotipo secretor (secreción de mucina) y ciliogénesis.

Es así que en el presente estudio se detectó la citoqueratina, proteína que forma el citoesqueleto, la β -tubulina para la detección de las células ciliadas (fluorescencia roja), la proteína MUC-5AC, proteína de las células productoras de mucus (fluorescencia verde).

Para observar el núcleo celular, las células fueron puestas en un medio que contiene reactivo Slow Fade oro Antifade con DAPI (fluorescencia azul) como se observa en las figuras N° 13, 14, 15 y 16 lo que determinó la diferenciación de las células bronquiales humanas.

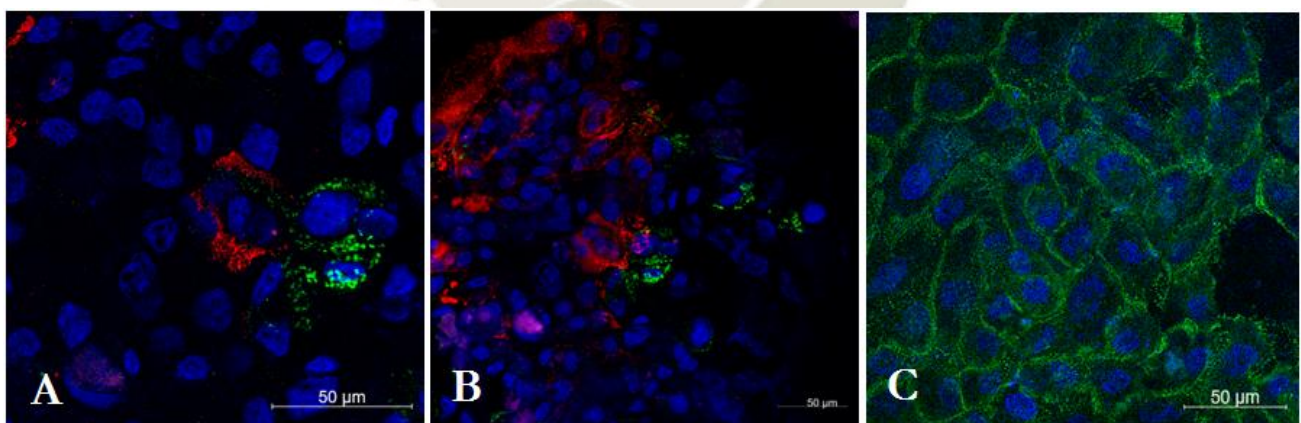


Figura 13: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) A: DAPI (azul), β -tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) 40X. B: DAPI (azul), β -tubulina (rojo), citoqueratina (rojo) MUC-5AC (verde) 20X C: Citoqueratina (rojo) DAPI (azul), MUC5AC (verde) 40X

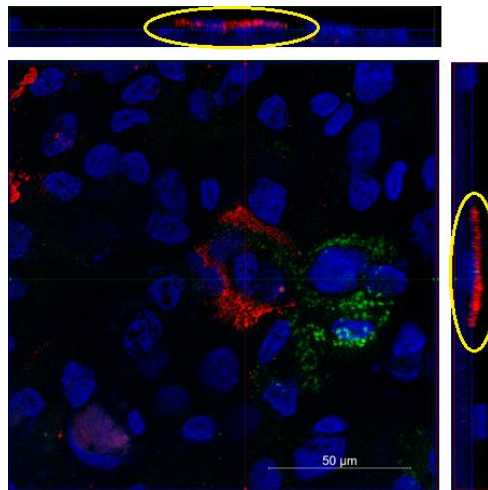


Figura 14: Marcaje de β -tubulina para la detección de las células ciliadas (rojo).

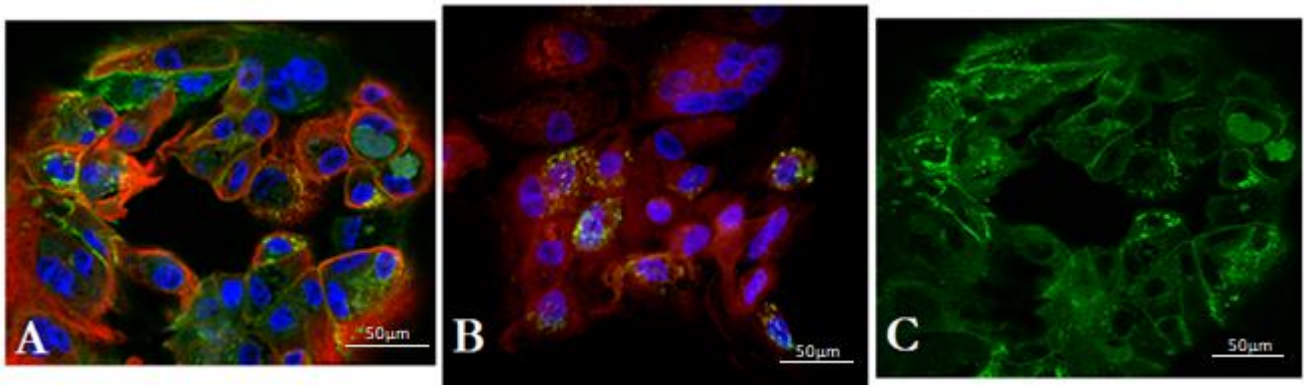


Figura 15: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma). A: *DAPI* (azul), β -tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) B: β -tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) C: MUC-5AC (verde)

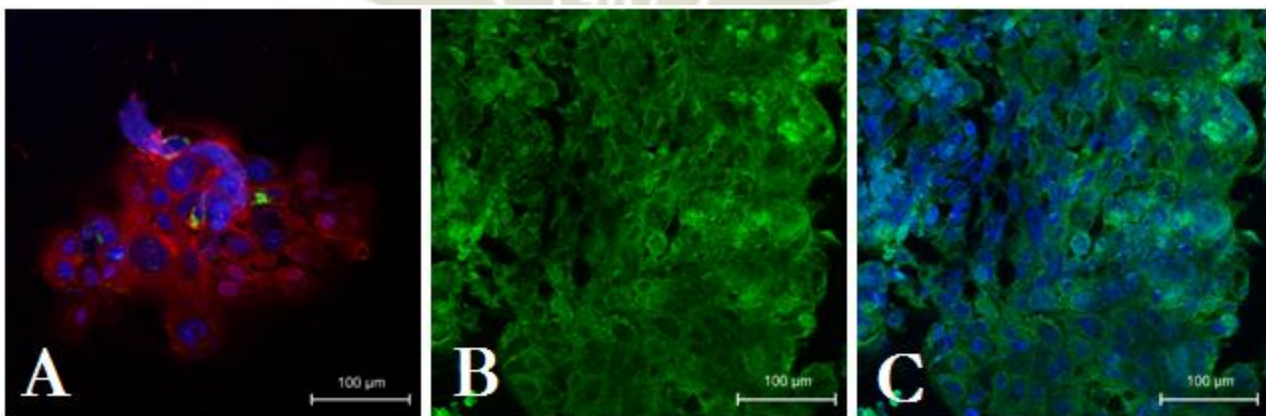


Figura 16: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) A: β -tubulina (rojo), citoqueratina (rojo), MUC-5AC (verde) B: MUC-5AC (verde) C: MUC-5AC (verde)

3.4 Exposición de las células a las Partículas Finas (PM_{2,5}) y Partículas Ultrafinas (PM_{0,1})

La exposición de partículas finas (PM_{2,5}) y partículas ultrafinas (PM_{0,1}) a las células epiteliales bronquiales de las tres condiciones mencionadas anteriormente, luego de 28 días en incubación a 37°C y 5% de CO₂ en interfase aire-líquido en medio de cultivo de diferenciación B-ALI suplementado con 2% de fungizona, no presentaron contaminación por agentes patógenos en el medio, ni se tuvo complicaciones con los protocolos de exposición.

En las figuras 17, 18 y 19 (exposición de partículas finas) y 20, 21 y 22 (exposición a partículas ultrafinas) puede observarse la sedimentación de las partículas.

Exposición de partículas finas (PM_{2,5})



Figura 17: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) X1000

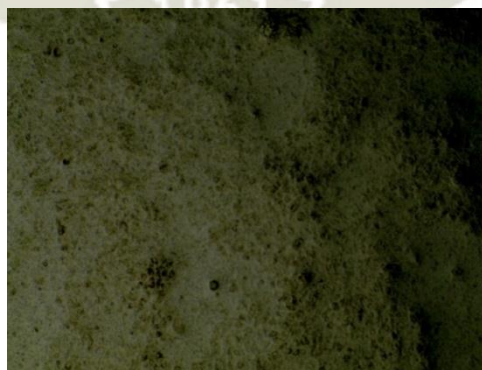


Figura 18: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) X1000

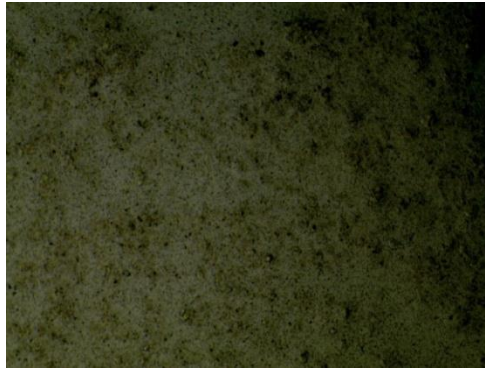


Figura 19: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) X1000

Exposición a partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$)



Figura 20: Células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE) X1000



Figura 21: Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) X1000

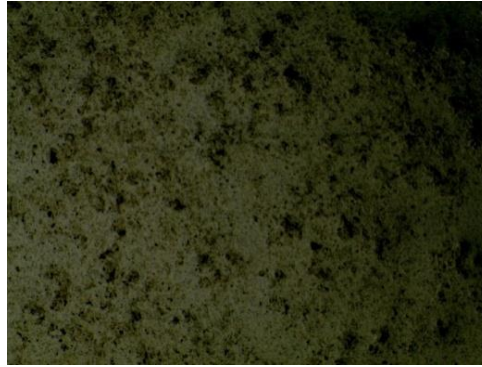


Figura 22: Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) X1000

Estudiar los efectos en la salud causados por la contaminación atmosférica es complejo. La exacerbación de las bronconeumopatías crónicas es un proceso progresivo y acumulativo. Por razones económicas y prácticas, resulta imposible reproducir condiciones reales para generar inflamación crónica.

Se ha buscado estudiar la expresión de las citocinas proinflamatorias a causa de la exposición de estas partículas, los mecanismos fisiológicos desregulados por la exposición a las mismas y hacer suposiciones sobre los efectos toxicológicos a largo plazo.

3.5 Dosaje de citocinas

Se dosaron las citocinas proinflamatorias $TGF\alpha$, GMCSF, GRO, IL-13, IL-1b, IL2, IL-6, IL8, MCP1, RANTES, y $TNF\alpha$ en el medio de cultivo luego de la exposición de las células epiteliales bronquiales a las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$). En este ensayo se encontró diferencia en las concentraciones de citocinas en los tres tipos de células (ASMA, EPOC y SANO).

Las citoquinas son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, en el orden de picogramos, mediante su unión con receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la célula de origen o en otros tipos celulares, que no poseen homología secuencial entre sí ⁽⁶⁵⁾.

Los resultados obtenidos nos muestran que la exposición repetida (54h) tiene mayor efecto en la secreción de citocinas que la exposición aguda (6h).

El método estadístico utilizado fue el de Kruskal Wallis (método no paramétrico) para muestras no normales (Nivel de significancia = 0,05).

En la siguiente tabla se muestra un resumen de los resultados de la estadística, donde se observa al valor p y si este es o no estadísticamente significativo.

Tabla 5: Resumen de la estadística realizada a las células epiteliales bronquiales sanas, con EPOC y con asma. Test Kruskal Wallis (Anexo 2)

CITOCINA	CONTROL (p)	SIG	PM _{2,5}				PM _{0,1}			
			1 DIA (p)	SIG	3 DIAS (p)	SIG	1 DIA (p)	SIG	3 DIAS (p)	SIG
TGFa	0,06	no	0,06	no	0,03	si	0,39	no	0,03	si
GMCSF	0,03	si	0,06	no	0,03	si	0,05	no	0,03	si
GRO	0,05	no	0,15	no	0,02	si	0,12	no	0,03	si
IL13	1,00	no	0,02	si	0,02	si	105,00	no	0,02	no
IL1b	0,02	si	0,02	si	0,02	si	0,03	si	0,02	si
IL2	1,00	no	1,00	no	1,00	no	1,00	no	1,00	no
IL6	0,03	si	0,03	si	27,00	si	0,03	si	0,03	si
IL8	0,04	si	0,67	no	0,20	no	0,08	no	0,05	no
MCP1	0,03	si	0,03	si	0,04	si	0,04	si	0,03	si
RANTES	0,16	no	0,06	no	0,03	si	0,03	si	0,03	si
TNFa	0,03	si	0,03	si	0,03	si	0,10	no	0,04	si

La tabla 5 nos muestra si los valores p de cada citocina son o no similares significativamente en los tres tipos de células epiteliales bronquiales (sanas, con EPOC y con asma), en el control negativo y en los dos tamaños de partículas (PM_{2,5} y PM_{0,1}) con 1 y 3 días de exposición.

Como se puede observar en el control negativo las citocinas TGFa, GRO, IL13, IL2 y RANTES muestran un valor $p > 0,05$, es decir no son estadísticamente significativas, por lo tanto, son similares. En cambio, las citocinas GMCSF, IL1b, IL6, IL8, MCP1 y TNFa tienen un valor $p < 0,05$, por lo tanto, son diferentes. En las células epiteliales bronquiales con asma se puede observar una mayor secreción de las citocinas GMCSF, IL8, MCP1 y TNFa. En las células epiteliales bronquiales con EPOC la citocina IL6 fue la de mayor expresión.

Para el caso de las partículas finas (PM_{2,5}) con exposición de un día, las citocinas TGFa, GMCSF, GRO, IL2, IL8 y RANTES muestran un valor $p > 0,05$, es decir son similares. En cambio, las citocinas IL13, IL1b, IL6, MCP1 y TNFa tienen un valor $p < 0,05$, por lo tanto,

son diferentes. En las células epiteliales bronquiales con asma las citocinas MCP1 y TNFa muestran mayor concentración y en las células epiteliales bronquiales con EPOC muestra a las citocinas IL13 e IL6 con mayor concentración. Para el protocolo de exposición de tres días, muestran un valor de $p > 0,05$ para las citocinas IL2 y IL8, las cuales son similares. En cambio, las citocinas TGFa, GMCSF, GRO, IL13, IL1b, IL6, MCP1, RANTES y TNFa tienen un valor $p < 0,05$, por lo tanto, son diferentes. Podemos observar que en las células epiteliales bronquiales con asma las citocinas TGFa, GMCSF, GRO, MCP1, y TNFa muestran mayor concentración. Por otro lado, en las células epiteliales bronquiales con EPOC se observa a las citocinas IL13, IL6 y RANTES con mayor concentración.

Para el caso de las partículas ultrafinas ($PM_{0,1}$) con exposición de un día, las citocinas TGFa, GMCSF, GRO, IL13, IL2, IL8 y TNFa muestran un valor $p > 0,05$, es decir son similares significativamente. En cambio, las citocinas IL1b, IL6, MCP1 y RANTES tienen un valor $p < 0,05$, por lo tanto, son diferentes. En las células epiteliales bronquiales con asma la citocina MCP1 muestra mayor concentración y en las células epiteliales bronquiales con EPOC se observan a las citocinas IL6 y RANTES con mayor concentración. En cuanto al protocolo exposición de tres días, las citocinas IL13, IL2 y IL8 muestran un valor $p > 0,05$, es decir son similares. En cambio, las citocinas TGFa, GMCSF, GRO, IL1b, IL6, MCP1, RANTES y TNFa tienen un valor $p < 0,05$, por lo tanto, son diferentes. En las células epiteliales bronquiales con asma las citocinas TGFa, GMCSF, MCP1, y TNFa muestran mayor concentración y en las células epiteliales bronquiales con EPOC las citocinas GRO, IL13, IL6 y RANTES se observaron con mayor concentración.

Datos más detallados de la estadística se pueden encontrar en el Anexo 2.

La exacerbación del asma y de la Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC) a causa de la contaminación del aire puede ser bastante perjudicial.

La exacerbación del asma es mediada por la hiperreactividad bronquial (causada por ejemplo por metales pesados) y la presencia de sustancias alergénicas (polen o humo) en las partículas finas y ultrafinas⁽⁶⁷⁾, mientras que la EPOC podría ser exacerbada por una reacción a los compuestos irritantes del material particulado (PM) como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), compuestos orgánicos volátiles (VOC), etc., sustancias que se encuentran en el humo del cigarrillo (Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.

UU en el 2010) ⁽⁶⁸⁾. Neffen H y colaboradores en un estudio han reportado que sujetos asmáticos luego de una exposición por solo 30 minutos a NO₂ en concentraciones moderadas reaccionan con una mayor secreción de moco e hiperreactividad bronquial ante una posterior exposición a SO₂ ⁽⁶⁹⁾.

Estos compuestos (metales pesados, polen, PAH, VOC, NO₂ y SO₂) forman parte de las partículas finas y ultrafinas como se mencionó en el marco teórico (Ver la sección 1.1 y 1.2).

Cabe resaltar que estas partículas recolectadas fueron caracterizadas químicamente por el laboratorio de Impacto del Medio Ambiente en la Salud (IMPECS) antes de exponerlas a las células epiteliales bronquiales. (Ver anexo 3)

Los metales unidos a las partículas finas (PM_{2,5}) están asociados a la activación de trayectos metabólicos para las respuestas oxidante y proinflamatoria (citocinas). Las reacciones de oxidación producen radicales libres que generan reacciones en cadena que dañan las células. Por lo general, la respuesta antioxidante antecede la respuesta inflamatoria. La inflamación es una reacción adaptativa generada por diferentes causas y es una característica de condiciones respiratorias como el asma y la EPOC ⁽⁶⁵⁾.

Los resultados obtenidos en un estudio realizado en la escuela de salud pública de México muestran una asociación positiva entre la exposición a partículas finas (PM_{2,5}) y el incremento en FeNO (óxido nítrico exhalado) como respuesta inflamatoria en adolescentes asmáticos y no asmáticos ⁽⁶⁹⁾.

En un estudio realizado en Puerto Rico por Rosa I. Rodríguez-Cotto, PhD. encontraron que las células expuestas a partículas (PM_{2,5} y PM₁₀), mostraron un aumento en las citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8) ⁽⁷⁰⁾. En el presente estudio, estas citocinas se pueden observar en mayor secreción por las células epiteliales bronquiales con EPOC en la exposición a las partículas finas (PM_{2,5}) y ultrafinas (PM_{0,1}).

Según Keller AC, Rodríguez D, Russo M. y Samuelsen M, Nygaard UC, Lovik M. los gases como ozono (O₃), óxidos de nitrógeno (NO_x), dióxido de azufre (SO₂) y partículas de tamaño inferior a 10 micras, al liberar radicales libres en las células epiteliales o en los macrófagos alveolares inducen la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor

estimulante de colonias de granulocitos y mastocitos (GM-CSF) e interleucina 8 (IL-8)⁽⁷¹⁾. En el presente estudio, las células epiteliales bronquiales con asma secretaron estas citocinas (TNF- α , GM-CSF y IL-8) en mayor cantidad que las células epiteliales bronquiales con asma y sanas.

Un estudio realizado por Le Bellego F, Plante S, Chakir J, Hamid Q, Ludwig MS. indicó que para el caso de la IL8 y el RANTES se observó que los receptores de los hidrocarburos aromáticos unidos a sus ligandos llevan al aumento de estas citocinas por medio de la MAP (mitogen-activated protein) cinasa p38, que es un importante mediador en las señales que intervienen en la regulación positiva del factor de transcripción nuclear kappa (NF- κ B) y el factor de transcripción AP-1, mediadores moleculares en el proceso inflamatorio⁽⁷⁰⁾. En este estudio la citocina RANTES fue mayormente secretada por las células epiteliales bronquiales con EPOC, seguidas por las células epiteliales bronquiales con asma en la exposición a los dos tipos de partículas.

Además del daño causado por los compuestos químicos del material particulado, el tamaño de estas, como se menciona en el marco teórico (ver sección 1.1), determina la capacidad de penetración en el tracto respiratorio y es así que, la fracción fina (PM_{2.5}) y particularmente ultrafina (PM_{0.1}) difunden más profundo en el árbol respiratorio y son más persistentes en él. Específicamente las partículas ultrafinas al migrar a mayor profundidad del árbol respiratorio no pueden ser eliminadas por la limpieza mucociliar, ya que no es efectiva en la región broncoalveolar. En este nivel, la eliminación es proporcionada por fagocitosis a través de macrófagos alveolares, un mecanismo mucho más lento, lo que puede generar una acumulación de partículas ultrafinas en los alvéolos pulmonares, en particular las partículas altamente carbonosas afectan la actividad fagocítica de los macrófagos por saturación. Las partículas ultrafinas no fagocíticas permanecen en las vías respiratorias y alteran el aclaramiento alveolar. Por lo tanto, las personas con bronconeumopatías crónicas como el asma y la EPOC se ven más afectadas por la exposición a las partículas finas y ultrafinas disminuyendo así, la efectividad del aclaramiento de estas partículas, así mismo, la hipersecreción bronquial, características del asma y la EPOC, afectan la integridad y la actividad de la alfombra mucociliar. (Ver la sección 1.2.1.1 y 1.2.1.2)

Los resultados obtenidos nos muestran una exacerbación del asma y de la Enfermedad Pulmonar Crónica Obstructiva (EPOC) mostrando una alta secreción de las citocinas proinflamatorias estudiadas en el presente proyecto a causa de la exposición a las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$) recolectadas.

Finalmente es importante establecer metodologías de vigilancia médica y epidemiológica, así como mejorar la calidad del aire con el fin de reducir el riesgo de adquisición de patologías respiratorias y disminuir la exacerbación de estas por exposición a las partículas finas ($PM_{2,5}$) y ultrafinas ($PM_{0,1}$).



CONCLUSIONES

1. Las condiciones empleadas en el estudio permitieron cultivar en forma adecuada las células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE), las células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) y las Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC), llegando a tener 8×10^5 células/mL y 90% de viabilidad, a 37°C y 5% CO_2 .
2. El cultivo en interfase aire líquido y el medio de cultivo B-ALI diferenciación, mostró ser adecuado para diferenciar las células epiteliales bronquiales de paciente sano (NHBE), las Células epiteliales bronquiales de paciente asmático (DHBE – Asma) y las Células epiteliales bronquiales de paciente con EPOC (DHBE – EPOC) para ello se identificaron proteínas propias de dichas células como la citoqueratina, proteína que forma el citoesqueleto, la proteína MUC-5AC, proteína de la células productoras de mucus (verde) y tubulina para las células ciliadas con la técnica de inmunofluorescencia con microscopia confocal.
3. Se logró cumplir con los dos protocolos de exposición (54h y 6h) de las células epiteliales bronquiales sanas, con asma y con EPOC a las partículas finas ($\text{PM}_{2,5}$) y partículas ultrafinas ($\text{PM}_{0,1}$) recolectadas de la contaminación atmosférica.
4. Se lograron dosar las citocinas pro-inflamatorias con el kit MilliPlex. Para la estadística se trabajó con un nivel de significancia de 0,05 ($p = 0,05$), donde las citocinas estadísticamente significativas bajo la exposición a las partículas finas fueron: IL1b, IL6, MCP1 y RANTES en 1 día de exposición y TGFa, GMCSF, GRO, IL1b, IL6, MCP1, RANTES y TNFa en 3 días de exposición. Bajo la exposición a las partículas ultrafinas las citocinas estadísticamente significativas fueron: IL13, IL1b, IL6, MCP1 y TNFa en 1 día de exposición y TGFa, GMCSF, GRO, IL13, IL1b, IL6, MCP1, RANTES y TNFa en 3 días concluyendo que la mayoría de citocinas dosadas se expresan de manera distinta entre cada tipo de células epiteliales bronquiales (sanas, con asma y con EPOC) y que a mayor tiempo son más afectadas dichas células, elevando la secreción de citocinas proinflamatorias, lo que lleva a

desregular ciertos mecanismos fisiológicos como la limpieza mucociliar (fagocitosis), el ciclo de respiración y aclaramiento alveolar, disminuyendo así la inmunidad del tracto respiratorio.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Latina A. La Calidad del Aire en Producido por el Clean Air Institute. 2012.
2. Consenso Científico sobre la Contaminación del Aire Partículas en suspensión [Internet]. [cited 2019 Sep 8]. Available from: <https://www.greenfacts.org/es/particulas-suspension-pm/>
3. OMS | Guías de calidad del aire de la OMS, relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. 2005;
4. INFORME NACIONAL DE LA CALIDAD DEL AIRE 2013-2014 [Internet]. [cited 2019 Sep 8]. Available from: www.minam.gob.pe
5. OMS | Enfermedades respiratorias crónicas. WHO. 2016;
6. Ministerio de Salud - MINSA | Gobierno del Perú [Internet]. [cited 2019 Sep 17]. Available from: <https://www.gob.pe/minsa/>
7. Nambu A, Nakae S. IL-1 and allergy. Vol. 59, Allergology International. Japanese Society of Allergology; 2010. p. 125–35.
8. Calidad del aire ambiente (exterior) y salud [Internet]. [cited 2019 Sep 8]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
9. Plaza-Ortega V, Valencia-Rojas MP, Figueroa-Casas A. Relative integrated anthropization index (INRA) application in a high mountain ecosystem. Rev Luna Azul. 2017;44:80–93.
10. OMS | Información básica sobre la contaminación atmosférica urbana. WHO. 2014;
11. DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE MATERIAL PARTICULADO: PARTÍCULAS SUSPENDIDAS TOTALES Y FRACCIÓN RESPIRABLE PM 10 *.
12. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Apr 25]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/luaz/n34/n34a12.pdf>
13. Martínez Dallos ID, Pinilla Agudelo GA. ÍNDICE DE ESTADO LIMNOLÓGICO

- FLUVIAL PARA LOS RÍOS DE LA CUENCA ALTA DEL RÍO CHICAMOCHA, BOYACÁ-COLOMBIA. Luna Azul. 2018 Jan 1;(46):125–44.
14. Perrone MR, Turnone A, Buccolieri A, Buccolieri G. Particulate matter characterization at a coastal site in south-eastern Italy. *J Environ Monit*. 2006 Jan;8(1):183–90.
 15. Torno Lougedo S. Emisiones de material particulado en el almacenamiento de minerales a la intemperie. Biblioteca de la Universidad de Oviedo; 2008.
 16. DIAGNOSIS AND CONTROL OF PARTICULATE MATTER: TOTAL SUSPENDED PARTICLES PM10 BREATHABLE FRACTION [Internet]. [cited 2020 Apr 25]. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742012000100012
 17. Marcela Marín Gutiérrez G. Determinación de la concentración de Cr, Cd y Pb contenidos en material particulado (PM10) en los colegios San José y Cofraternidad de San Fernando y su relación con las fuentes de emisión presentes en cada zona [Internet]. [cited 2020 Apr 25]. Available from: <https://ciencia.lasalle.edu.co/>
 18. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Apr 25]. Available from: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=2146&context=ing_ambiental_sanitaria
 19. : Material particulado atmosférico :: Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio :: Junta de Andalucía [Internet]. [cited 2020 Apr 25]. Available from: http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=bd9a6b23d642c310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=e339a862d17d4310VgnVCM2000000624e50aRCRD&l r=lang_es&vgnsecondoid=5b1d6b23d642c310VgnVCM2000000624e50a____¶m1=3
 20. US EPA O. Particulate Matter (PM) Basics.
 21. Particulate Matter (PM) Conceptos básicos | Contaminación de partículas (PM) | EPA de EE. UU. [Internet]. [cited 2020 Apr 26]. Available from: <https://www.epa.gov/pm->

- pollution/particulate-matter-pm-basics
22. Los contaminantes atmosféricos - Enciclopedia Medioambiental [Internet]. [cited 2020 Apr 26]. Available from: https://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/atmosfera/los-contaminantes-atmosfericos.asp
 23. Rojano R, Arregoces H, Restrepo G. Composición elemental y fuentes de origen de partículas respirables (PM10) y Partículas Suspendidas Totales (PST) en el Área Urbana de la Ciudad de Riohacha, Colombia. Inf Tecnol [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 28];25(6):3–12. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642014000600002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 24. Oyarzún M. Contaminación aérea y sus efectos en la salud*.
 25. Cuerpo EL, Directores H, Capítulo D, David A, Wagner GR. APARATO RESPIRATORIO.
 26. Entre R, Contaminación LA, Aire D, La Y, De S. INVESTIGACIÓN FACULTAD DE INGENIERÍA GEOGRÁFICA, AMBIENTAL Y ECOTURISMO.
 27. Sánchez Etxaniz J, Raso SM. Crisis asmática.
 28. Palacios Peña L. Estudio del efecto directo de los aerosoles atmosféricos sobre Europa Otros autores: Rocío Baró (Universidad de Murcia); Pedro Jiménez-Guerrero (Universidad de Murcia) [Internet]. [cited 2020 Jun 28]. Available from: www.conama2014.org
 29. Angulo LC, Huertas JI, Restrepo GM. Characterization of total suspended particles (TSP) and inhalable particulate matter (PM10) generated in open pit coal mining areas. Inf Tecnol [Internet]. 2011 [cited 2020 Jun 28];22(4):23–34. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000400004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 30. Fernández Tena A, Casan Clarà P. Depósito pulmonar de partículas inhaladas [Internet]. Vol. 48, Archivos de Bronconeumología. Elsevier; 2012 [cited 2020 Jun 28]. p. 240–6. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/es-deposito->

- pulmonar-particulas-inhaladas-articulo-S0300289612000646
31. Olmeda B, Martínez-Calle M, Pérez-Gil J. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Ann Anat.* 2017 Jan 1;209:78–92.
 32. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) - Trastornos del pulmón y las vías respiratorias - Manual MSD versión para público general [Internet]. [cited 2020 Jun 29]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/hogar/trastornos-del-pulmón-y-las-vías-respiratorias/enfermedad-pulmonar-obstructiva-crónica-epoc/enfermedad-pulmonar-obstructiva-crónica-epoc>
 33. Fernández Tena A, Casan Clarà P. Depósito pulmonar de partículas inhaladas [Internet]. Vol. 48, *Archivos de Bronconeumología*. Elsevier; 2012 [cited 2020 Jun 29]. p. 240–6. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/es-deposito-pulmonar-particulas-inhaladas-articulo-S0300289612000646>
 34. Newhouse M, Sanchis J, Bienenstock J. Lung Defense Mechanisms. Vol. 295, *New England Journal of Medicine*. 1976. p. 990–8.
 35. Material particulado PM10/PM2,5 | Portal Web del Ayuntamiento de Valladolid [Internet]. [cited 2020 Jun 29]. Available from: <https://www.valladolid.es/es/rccava/contaminantes/material-particulado-pm10-pm2-5>
 36. Efectos de la contaminación atmosférica sobre la salud: una introducción [Internet]. [cited 2020 Jul 1]. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57271999000200002
 37. Préndez M, Corvalán RM, Cisternas M. Estudio preliminar del material particulado de fuentes estacionarias: Aplicación al sistema de compensación de emisiones en la region metropolitana, Chile. *Inf Tecnol* [Internet]. 2007 [cited 2020 Jul 1];18(2):93–103. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642007000200015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 38. Conceptos de calidad del aire – PPDA [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from:

- <https://ppda.mma.gob.cl/conceptos-de-calidad-del-aire/>
39. Estándares de calidad ambiental | Dirección General de Calidad Ambiental [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: <http://www.minam.gob.pe/calidadambiental/estandares-de-calidad-ambiental/>
 40. Programa Nacional de Vigilancia Sanitaria de Calidad del Aire | DIGESA [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: http://www.digesa.minsa.gob.pe/DEPA/aire_lc/lima_callao.asp
 41. DS Estándares Nacionales de Calidad ambiental [Internet]. [cited 2020 Jul 5]. Available from: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/04/Proyecto-de-DS-ECA-AIRE.pdf>
 42. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [Internet]. [cited 2020 Aug 25]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
 43. Calidad del aire: un problema urgente para América Latina y el Caribe - CODS [Internet]. [cited 2020 Aug 25]. Available from: <https://cods.uniandes.edu.co/calidad-del-aire-un-problema-urgente-para-america-latina-y-el-caribe/#entry-content>
 44. Sistema respiratorio | Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical [Internet]. [cited 2020 Aug 25]. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1506§ionid=98183423>
 45. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [Internet]. [cited 2020 Aug 27]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
 46. Asma [Internet]. [cited 2020 Aug 28]. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462009000100002
 47. Bilitski MS, Wenzel S, Cathy ;, Bsn V, Ae-C RN, Fahy B, et al. American Thoracic Society SERIE DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Autores: Examinadores

- [Internet]. [cited 2020 Aug 28]. Available from: www.thoracic.org
48. American Thoracic Society SERIE DE INFORMACIÓN AL PACIENTE www.thoracic.org ¿Qué es la bronquitis crónica? VÍA AÉREA NORMAL VÍA AÉREA CON BRONQUITIS [Internet]. [cited 2020 Aug 28]. Available from: <http://www.thoracic.org/>
 49. Ethier CR, Read AT, Chan D. Biomechanics of Schlemm's canal endothelial cells: influence on F-actin architecture. *Biophys J.* 2004;87(4):2828–37.
 50. Nohra Elsy Beltrán Vargas D, Claudia Haydée González de la Rosa D. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES E INGENIERÍA DE TEJIDOS Elaborado por. 2016.
 51. Células epiteliales bronquiales NHBE con ácido retinoico criopreservadas - LONZA - REPRESENTADAS [Internet]. [cited 2020 Aug 29]. Available from: <https://www.cultek.com/representadas/lonza/c-lulas-epiteliales-bronquiales-nhbe-con-cido-retinoico-criopreservadas.html>
 52. Garg S, Huifu H, Kaul SC, Wadhwa R. Integration of conventional cell viability assays for reliable and reproducible read-outs: Experimental evidence. *BMC Res Notes* [Internet]. 2018 Jun 22 [cited 2020 Aug 29];11(1):403. Available from: <https://bmresnotes.biomedcentral.com/articles/10,1186/s13104-018-3512-5>
 53. azul tripán | Real Academia de Ingeniería [Internet]. [cited 2020 Aug 29]. Available from: <http://diccionario.raing.es/es/lema/azul-tripán>
 54. Radbruch A. Immunofluorescence: Basic Considerations. In: *Flow Cytometry and Cell Sorting* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2000 [cited 2020 Aug 29]. p. 38–52. Available from: https://link.springer.com/chapter/10,1007/978-3-662-04129-1_3
 55. NEUTRÓFILOS, GRANULOCITOS Y MONOCITOS GM-CSF, ALERGÍA [Internet]. [cited 2020 Aug 30]. Available from: <https://encolombia.com/medicina/revistas-medicas/alergia/vol-101/alergiavol10-001rev-factor2/>
 56. gm-csf [Neurocirugía Contemporánea] [Internet]. [cited 2020 Aug 30]. Available from: <http://neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=gm-csf>

57. Saavedra Ramírez PG, María Vásquez Duque G, Alonso González Naranjo L. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. Vol. 24, IATREIA. 2011.
58. Ransohoff RM. Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology [Internet]. Vol. 31, Immunity. 2009 [cited 2020 Aug 30]. p. 711–21. Available from: [http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613\(09\)00422-1](http://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(09)00422-1)
59. Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. TNF- α in asthma [Internet]. Vol. 7, Current Opinion in Pharmacology. Curr Opin Pharmacol; 2007 [cited 2020 Aug 30]. p. 279–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17475560/>
60. Stern PH, Krieger NS, Nissenson RA, Williams RD, Winkler ME, Derynck R, et al. Human transforming growth factor-alpha stimulates bone resorption in vitro. J Clin Invest [Internet]. 1985 Nov 1 [cited 2020 Aug 30];76(5):2016–9. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC424268>
61. De Bioteconología D, María A., Alonso S. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.
62. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases [Internet]. Vol. 138, Journal of Allergy and Clinical Immunology. Mosby Inc.; 2016 [cited 2020 Aug 30]. p. 984–1010. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27577879/>
63. Nambu A, Nakae S. IL-1 and allergy [Internet]. Vol. 59, Allergology International. Japanese Society of Allergology; 2010 [cited 2020 Aug 30]. p. 125–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20414049/>
64. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH, Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF- α polymorphisms and airway disease. J Hum Genet. 2006 Mar;51(3):196–203.
65. Index. In: Pediatric Critical Care [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2020 Aug 30]. p. 1693–740. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323073073101314>

66. Silva O. R, Montes JF, García-Valero J, Olloquequi J. Cellular effectors of the inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Rev Med Chil [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2020 Aug 30];143(9):1162–71. Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872015000900009&lng=es&nrm=iso&tlng=es



ANEXO 1

Células epiteliales bronquiales Sanas

		CONCENTRACION DE CITOCINAS (pg/mL)										
		TGFa	GMCSF	GRO	IL13	IL1b	IL2	IL6	IL8	MCP1	RANTES	TNFa
CONTROL NEGATIVO		35,55	285,81	5270,00	<2,98↓	13,67	<2,87↓	203,86	14325,00	204,32	8,05	21,90
		57,82	444,24	8987,00	<2,98↓	30,75	<2,87↓	337,96	15467,00	398,27	9,03	40,42
		36,26	264,33	6351,00	<2,98↓	26,92	<2,87↓	186,48	13404,00	308,16	5,60	27,79
PM2,5	3 DIAS	66,99	491,36	9579,00	<2,98↓	20,84	<2,87↓	269,01	16644,00	907,51	7,56	62,26
		60,83	397,68	6327,00	<2,98↓	21,80	<2,87↓	239,25	15494,00	705,13	5,12	59,36
		57,03	461,64	5922,00	<2,98↓	39,42	<2,87↓	226,60	15070,00	584,72	7,80	49,54
	1 DIA	39,96	273,56	7594,00	<2,98↓	22,35	<2,87↓	243,87	12626,00	298,65	8,05	26,05
		43,13	325,48	5503,00	<2,98↓	27,00	<2,87↓	209,20	14388,00	309,98	8,54	25,63
		34,88	261,23	5543,00	<2,98↓	28,75	<2,87↓	195,80	13066,00	223,51	6,58	22,84
PM0,1	3 DIAS	57,43	384,93	8139,00	<2,98↓	16,85	<2,87↓	277,13	16615,00	267,16	6,58	41,71
		32,50	197,51	2727,00	<2,98↓	15,17	<2,87↓	109,07	9643,00	167,65	5,12	15,82
		46,11	290,83	4378,00	<2,98↓	23,60	<2,87↓	184,24	11602,00	336,41	4,64	29,64
	1 DIA	19,17	122,30	2771,00	<2,98↓	11,13	<2,87↓	86,95	8270,00	145,78	4,16	11,02
		30,00	207,12	6952,00	<2,98↓	17,71	<2,87↓	157,24	14390,00	258,34	7,56	24,94
		27,57	228,04	4632,00	<2,98↓	27,00	<2,87↓	170,53	11771,00	266,38	6,09	17,49

Células epiteliales bronquiales con Asma

		CONCENTRACION DE CITOCINAS (pg/mL)										
		TGFa	GMCSF	GRO	IL13	IL1b	IL2	IL6	IL8	MCP1	RANTES	TNFa
CONTROL NEGATIVO		37,91	504,72	8085,00	<2,98↓	3,45	<2,87↓	36,64	14827,00	2131,00	10,00	66,02
		43,54	487,17	9179,00	<2,98↓	3,80	<2,87↓	33,22	15697,00	1393,00	10,97	78,28
		47,64	677,08	>9917↑	<2,98↓	4,23	<2,87↓	39,92	17656,00	1876,00	10,49	76,40
PM2,5	3 DIAS	102,33	1185,00	>9917↑	<2,98↓	10,09	<2,87↓	96,00	15619,00	1901,00	10,49	139,37
		101,15	1188,00	>9917↑	<2,98↓	13,62	<2,87↓	75,68	17617,00	1794,00	10,00	139,09
		100,99	1166,00	>9917↑	<2,98↓	10,18	<2,87↓	93,62	16553,00	2140,00	8,05	127,60
	1 DIA	52,13	475,42	>9917↑	<2,98↓	3,71	<2,87↓	35,60	15521,00	2416,00	9,51	87,86
		26,89	197,22	4707,00	<2,98↓	1,86	<2,87↓	14,72	11504,00	802,86	4,64	38,39
		53,93	470,43	>9917↑	<2,98↓	4,50	<2,87↓	35,77	16477,00	1965,00	11,93	87,06
PM0,1	3 DIAS	103,45	1543,00	>9917↑	<2,98↓	9,40	<2,87↓	103,03	15738,00	1946,00	8,05	152,45
		70,04	1139,00	>9917↑	<2,98↓	7,22	<2,87↓	69,59	16625,00	1598,00	6,58	113,89
		97,71	1244,00	9341,00	<2,98↓	11,25	<2,87↓	100,07	15501,00	2311,00	8,05	144,05
	1 DIA	39,73	422,00	>9917↑	<2,98↓	4,67	<2,87↓	33,79	17536,00	2172,00	11,93	75,39
		36,39	358,58	5013,00	<2,98↓	3,45	<2,87↓	24,73	15156,00	1420,00	9,03	67,88
		14,50	125,50	1122,00	<2,98↓	<1,85↓	<2,87↓	19,91	9368,00	642,27	<2,95↓	24,57

Células epiteliales bronquiales con EPOC

		CONCENTRACION DE CITOCINAS (pg/mL)										
		TGFa	GMCSF	GRO	IL13	IL1b	IL2	IL6	IL8	MCP1	RANTES	TNFa
CONTROL		10,09	6,60	>9917↑	<2,98↓	<1,85↓	<2,87↓	613,01	11100,00	109,92	8,05	4,04
		9,65	6,82	>9917↑	<2,98↓	<1,85↓	<2,87↓	591,18	11742,00	157,60	10,97	3,92
		8,16	3,86	>9917↑	<2,98↓	<1,85↓	<2,87↓	692,06	10095,00	96,42	8,05	3,37
PM2,5	3 DIAS	17,32	29,01	>9917↑	4,28	<2,87↓	<2,87↓	809,59	16375,00	637,49	19,81	17,13
		18,31	18,80	>9917↑	3,44	<1,85↓	<2,87↓	1328,00	12988,00	516,20	17,55	17,38
		14,38	14,07	>9917↑	3,34	<1,85↓	<2,87↓	982,83	13839,00	475,28	12,41	9,88
	1 DIA	14,11	10,20	>9917↑	5,44	<1,85↓	<2,87↓	934,33	13999,00	326,16	15,24	7,71
		23,97	15,17	>9917↑	5,83	<1,85↓	<2,87↓	2395,00	14002,00	475,74	18,23	17,63
		14,08	10,87	>9917↑	4,09	<1,85↓	<2,87↓	1428,00	13228,00	356,12	15,71	8,40
PM0,1	3 DIAS	28,02	77,32	>9917↑	4,28	<1,85↓	<2,87↓	1026,00	19160,00	482,43	29,19	30,24
		29,41	90,76	>9917↑	5,64	<1,85↓	<2,87↓	2507,00	>19407↑	801,76	41,91	60,36
		23,87	52,83	>9917↑	3,34	<1,85↓	<2,87↓	1856,00	17098,00	556,42	30,81	47,93
	1 DIA	18,55	36,85	>9917↑	3,90	<1,85↓	<2,87↓	880,17	18552,00	367,89	45,86	15,93
		28,90	45,08	>9917↑	6,42	<1,85↓	<2,87↓	1792,00	18409,00	685,73	78,78	23,83
		12,75	20,89	>9917↑	<2,98↓	<1,85↓	<2,87↓	639,74	16694,00	291,37	32,01	8,04



ANEXO 2

Control negativo

Tabla N°1
Pruebas de Normalidad

Pruebas de normalidad ^{b, c, d, e, f, g, h, i}							
	Tipo Paciente	Shapiro-Wilk					
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TGFa	Paciente Sano	,375	3	.	,774	3	,054
	Paciente ASMA	,208	3	.	,992	3	,827
	Paciente EPOC	,302	3	.	,910	3	,419
GMCSF	Paciente Sano	,346	3	.	,838	3	,209
	Paciente ASMA	,355	3	.	,819	3	,160
	Paciente EPOC	,361	3	.	,805	3	,127
GRO	Paciente Sano	,274	3	.	,945	3	,547
	Paciente ASMA	,218	3	.	,988	3	,787
IL1b	Paciente Sano	,304	3	.	,908	3	,411
	Paciente ASMA	,194	3	.	,997	3	,887
IL6	Paciente Sano	,347	3	.	,835	3	,201
	Paciente ASMA	,176	3	.	1,000	3	,977
	Paciente EPOC	,307	3	.	,903	3	,396
IL8	Paciente Sano	,195	3	.	,996	3	,882
	Paciente ASMA	,266	3	.	,953	3	,582
	Paciente EPOC	,225	3	.	,984	3	,758
MCP1	Paciente Sano	,185	3	.	,998	3	,922
	Paciente ASMA	,247	3	.	,969	3	,663
	Paciente EPOC	,305	3	.	,906	3	,404
RANTES	Paciente Sano	,276	3	.	,942	3	,537
	Paciente ASMA	,176	3	.	1,000	3	,989
	Paciente EPOC	,385	3	.	,750	3	,000
TNFa	Paciente Sano	,261	3	.	,958	3	,604
	Paciente ASMA	,333	3	.	,862	3	,273
	Paciente EPOC	,323	3	.	,879	3	,322

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. GRO es constante cuando tipopaciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

c. IL13 es constante cuando tipopaciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

d. IL13 es constante cuando tipopaciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

e. IL13 es constante cuando tipopaciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

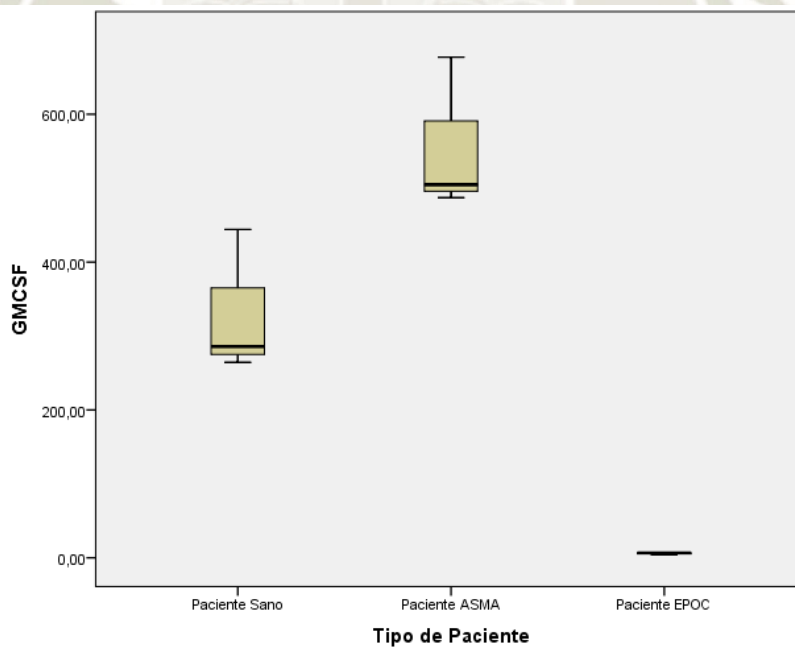
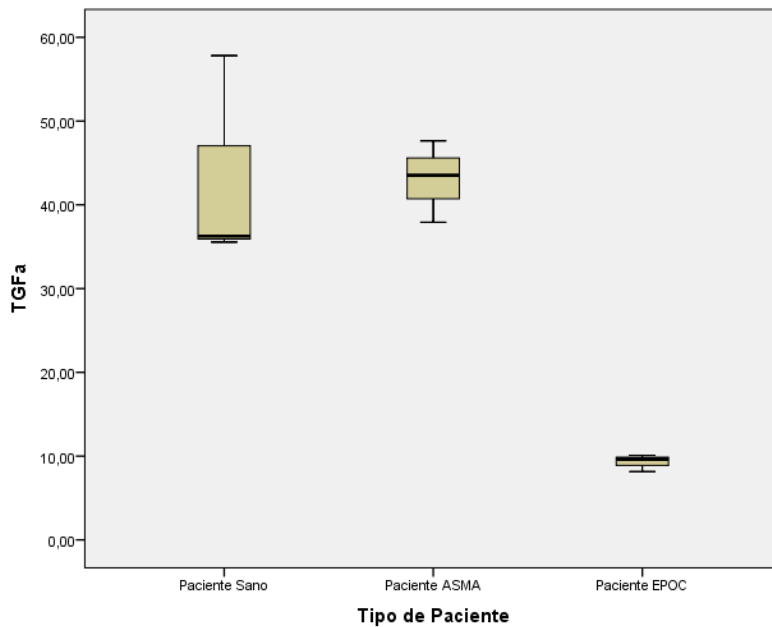
f. IL1b es constante cuando tipopaciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

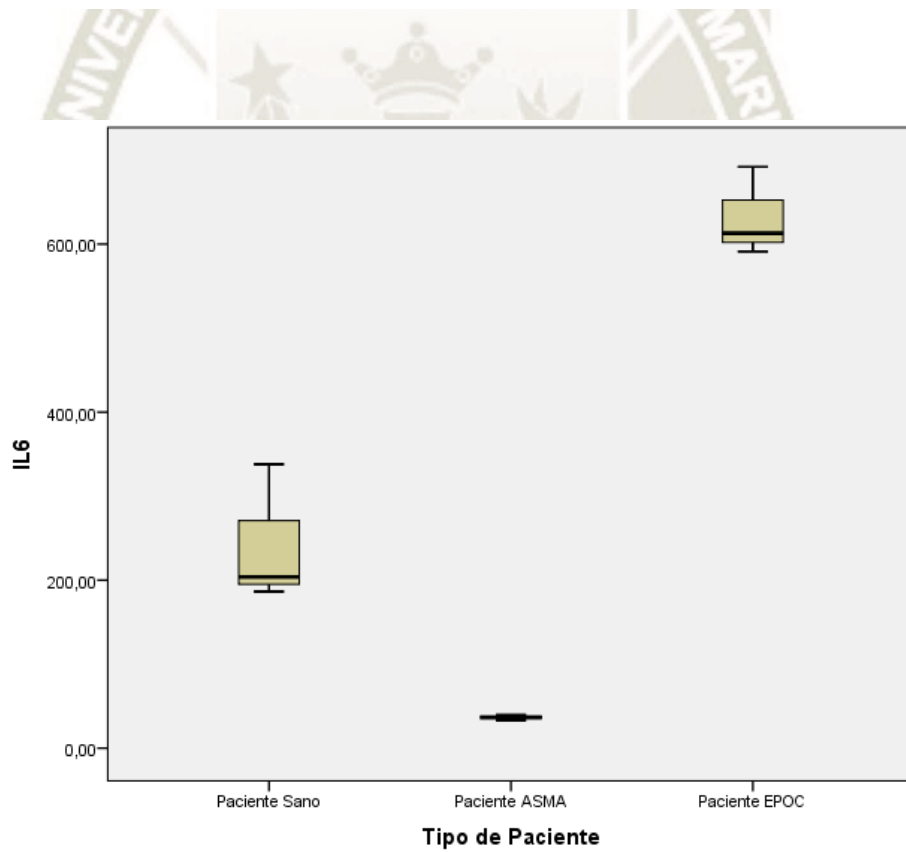
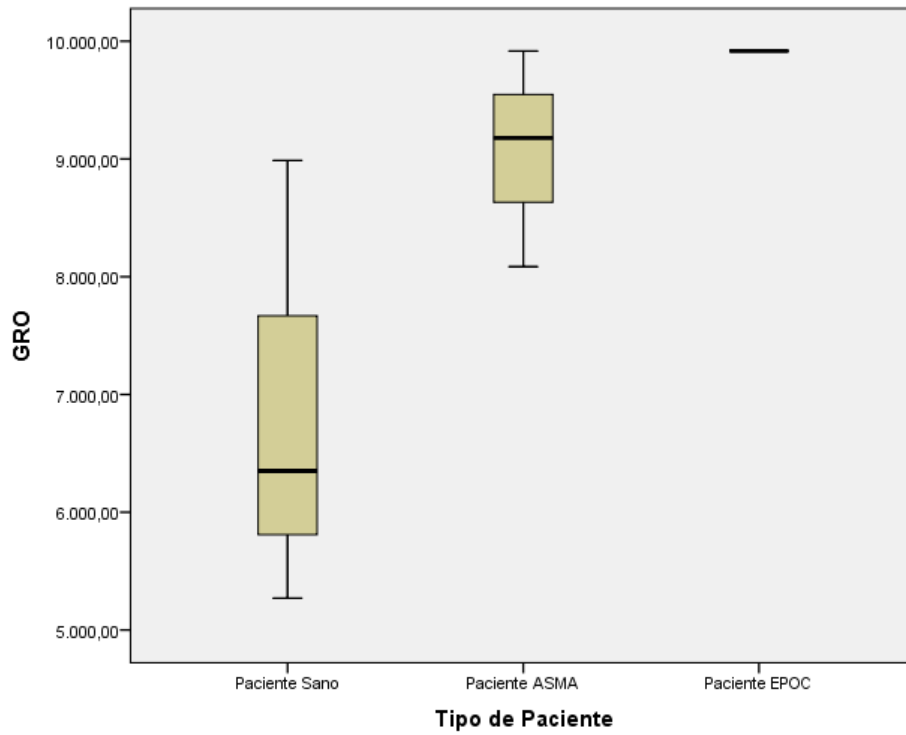
g. IL2 es constante cuando tipopaciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

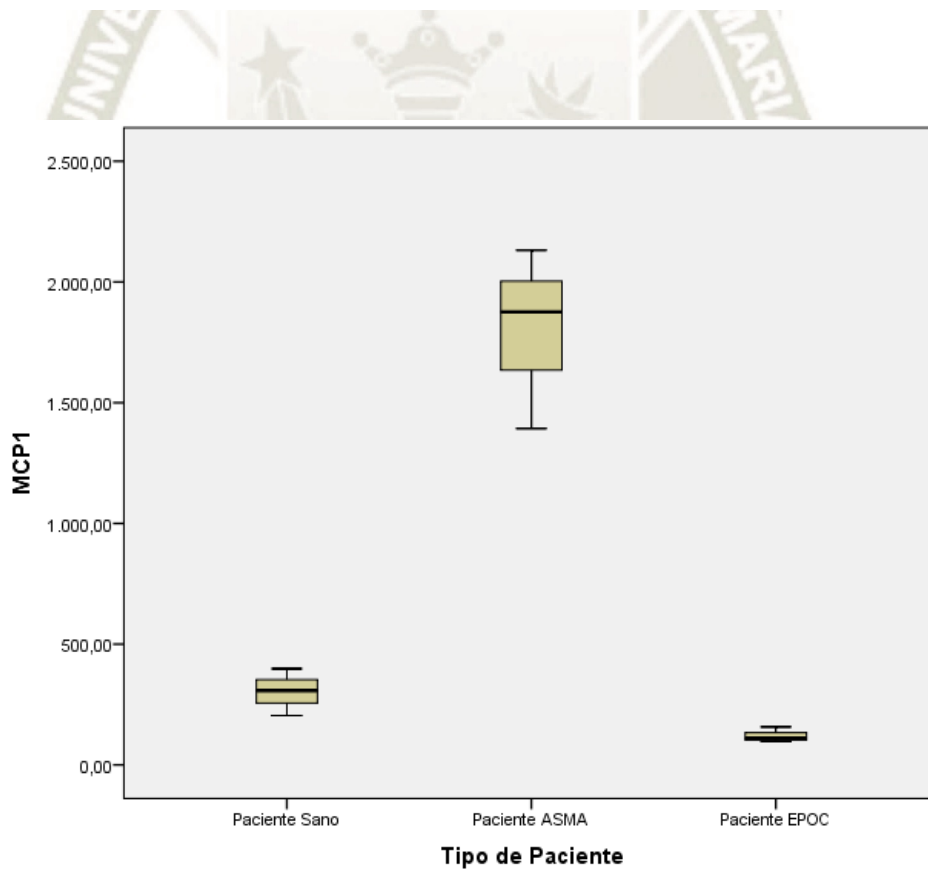
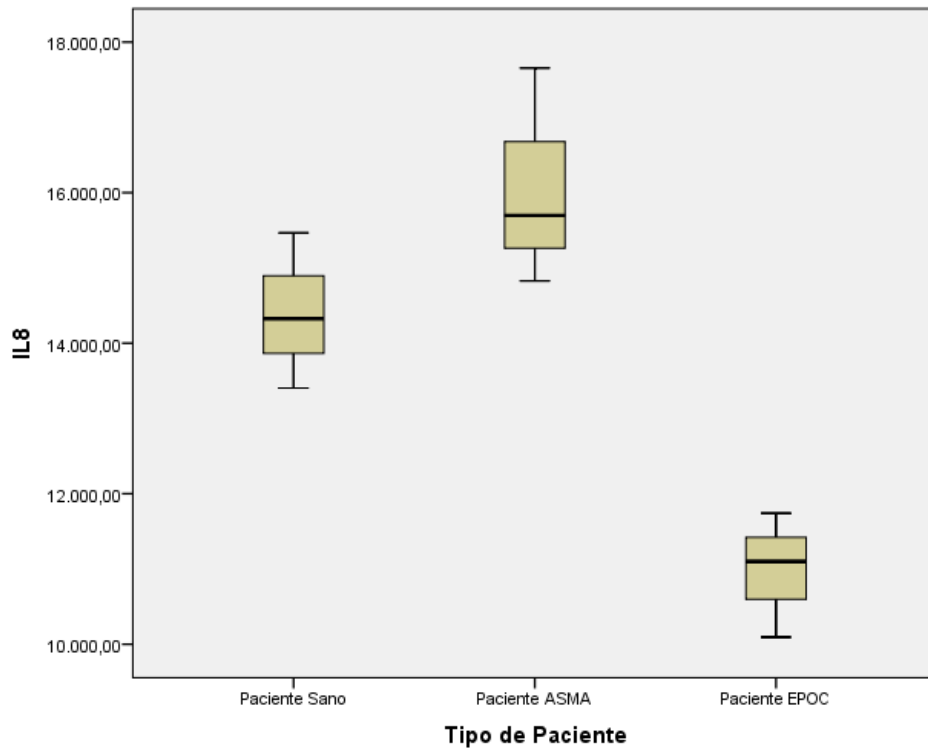
h. IL2 es constante cuando tipopaciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

i. IL2 es constante cuando tipopaciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

Gráficos de Normalidad







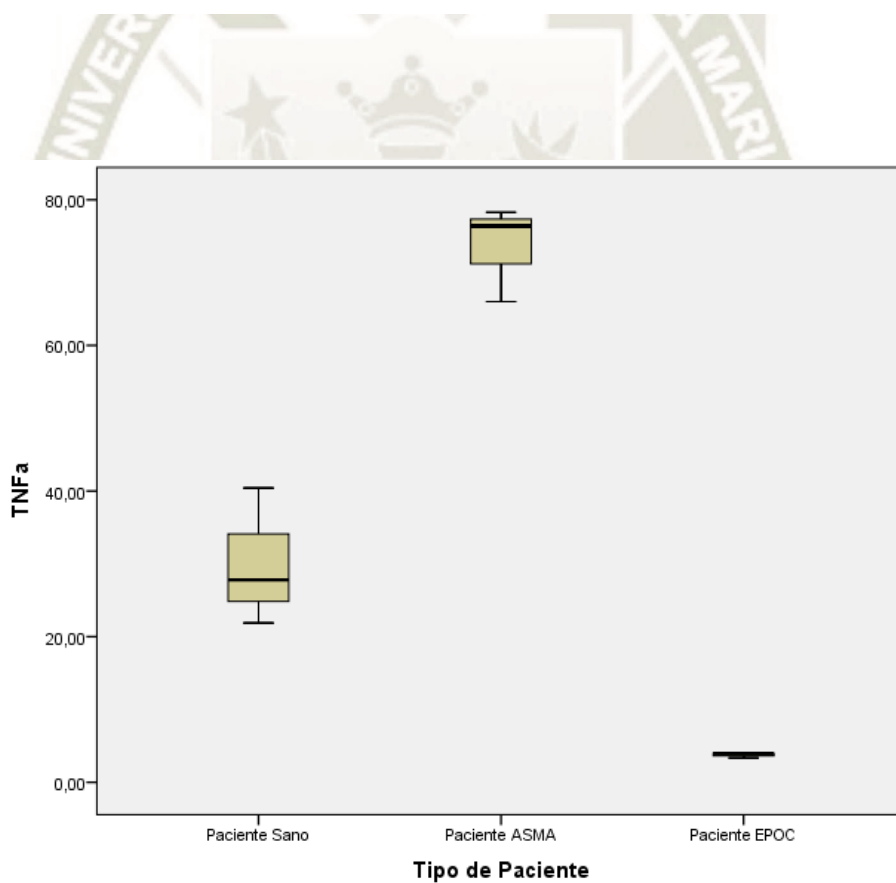
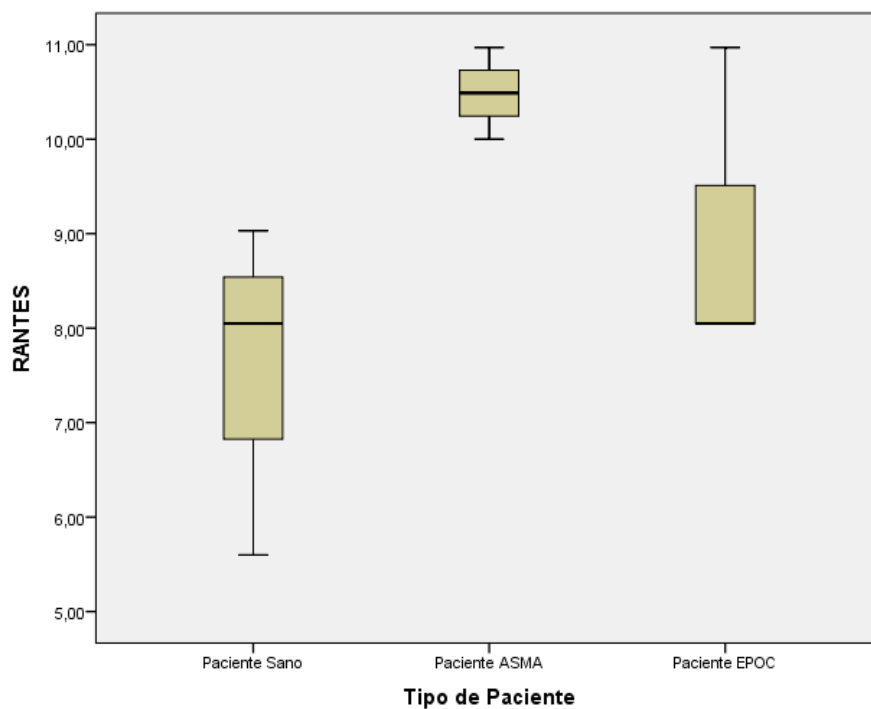


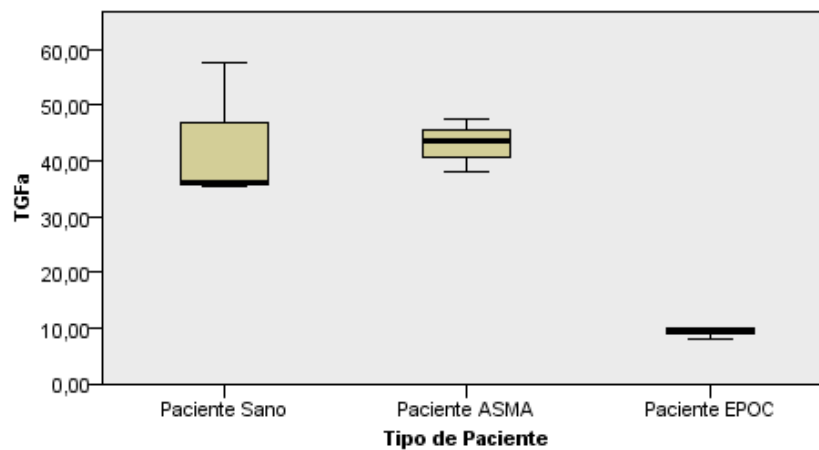
Tabla N°2

Estadístico de Kruskal Wallis para muestras independientes

1. Citocina TGFa

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TGFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	61,000	Retener la hipótesis nula.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,600
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,061

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

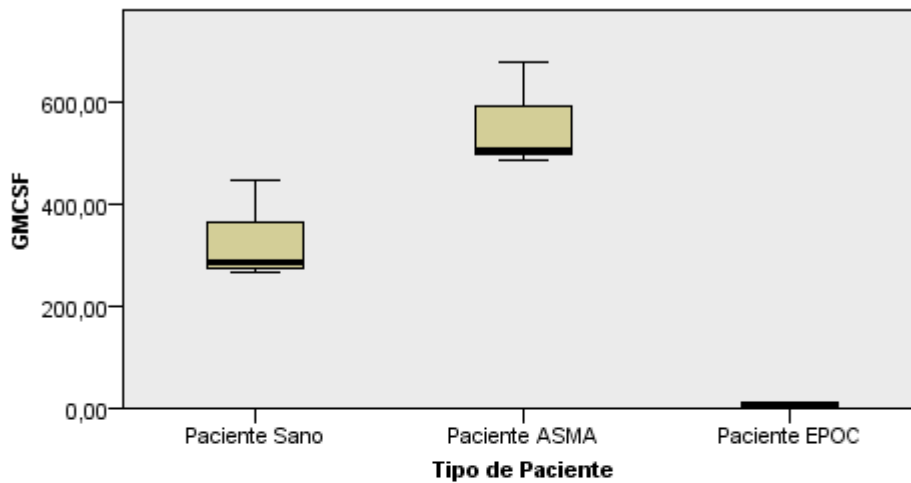
2. Citocina GMCSF

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GMCSF es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

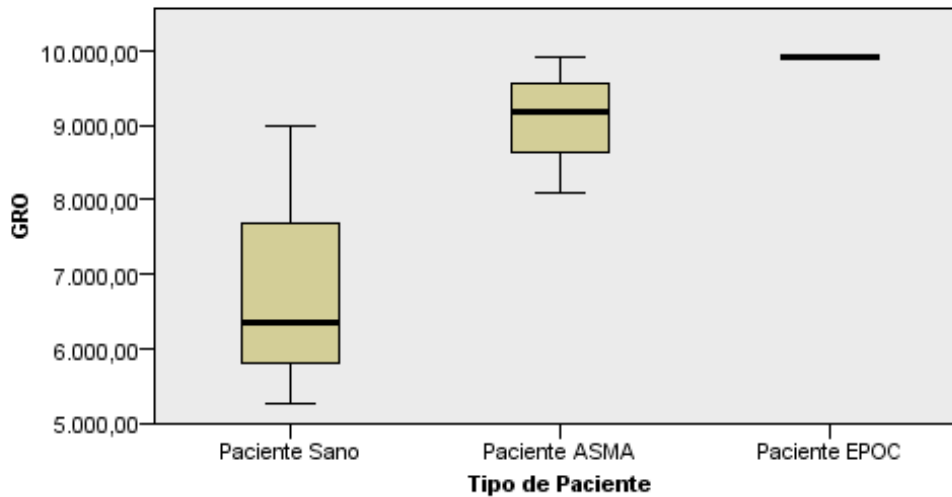
3. Citocina GRO

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GRO es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	54,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,842
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,054

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

4. Citocina IL13

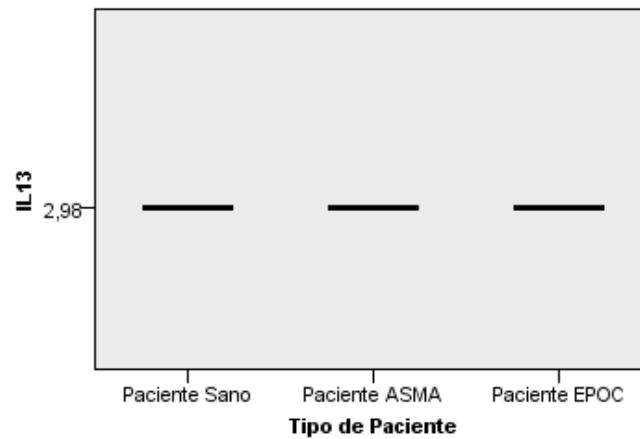
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL13 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1.000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

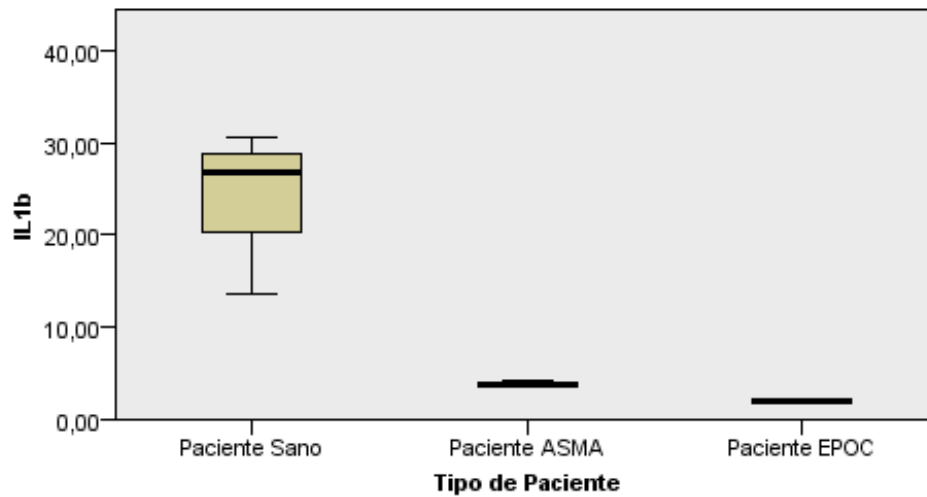
5. Citocina IL1b

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL1b es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	24,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,448
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,024

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

6. Citocina IL2

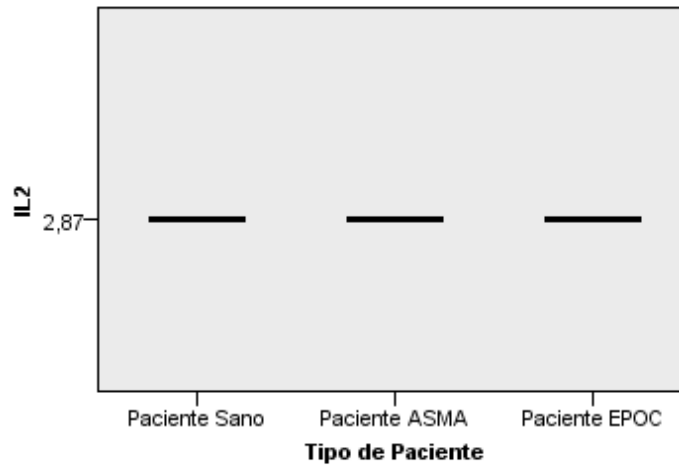
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL2 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1.000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

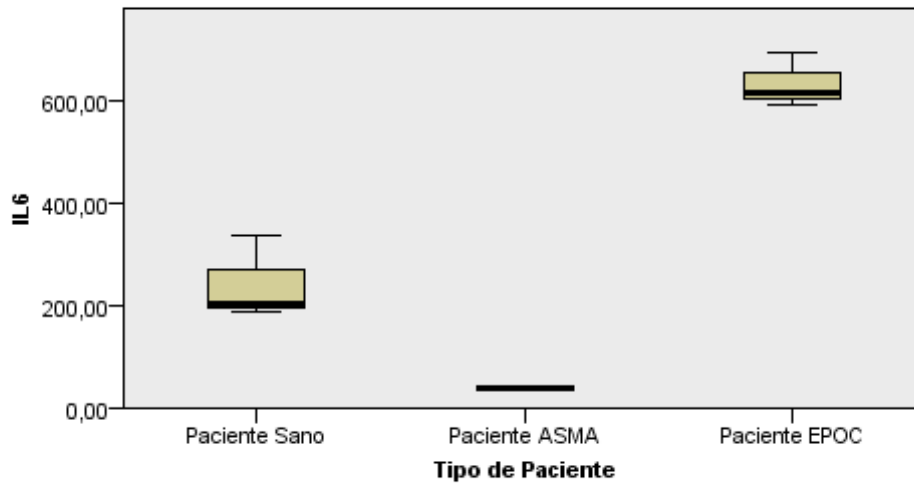
7. Citocina IL6

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL6 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

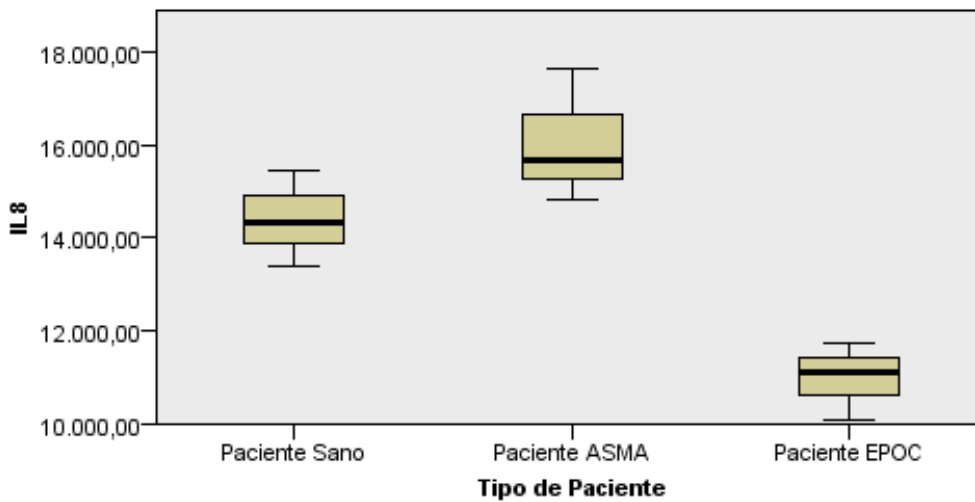
8. Citocina IL8

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL8 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	39,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,489
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,039

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

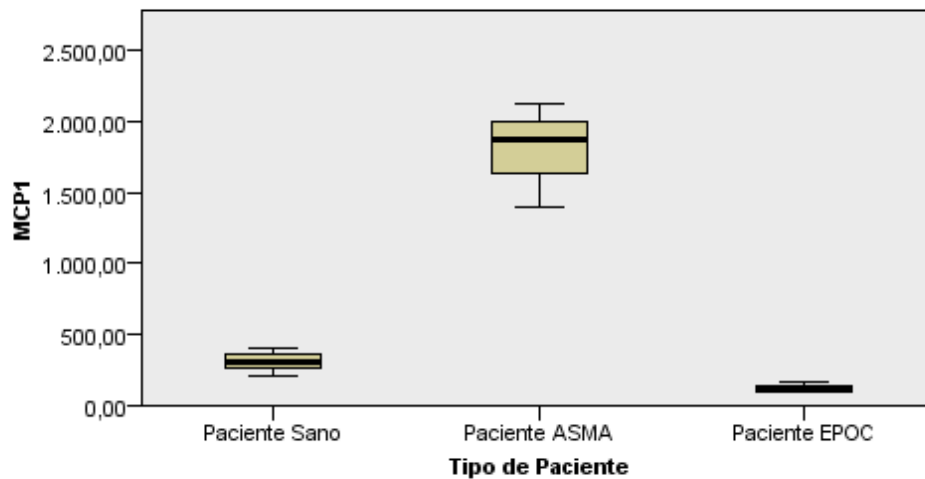
9. Citocina MCP1

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de MCP1 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

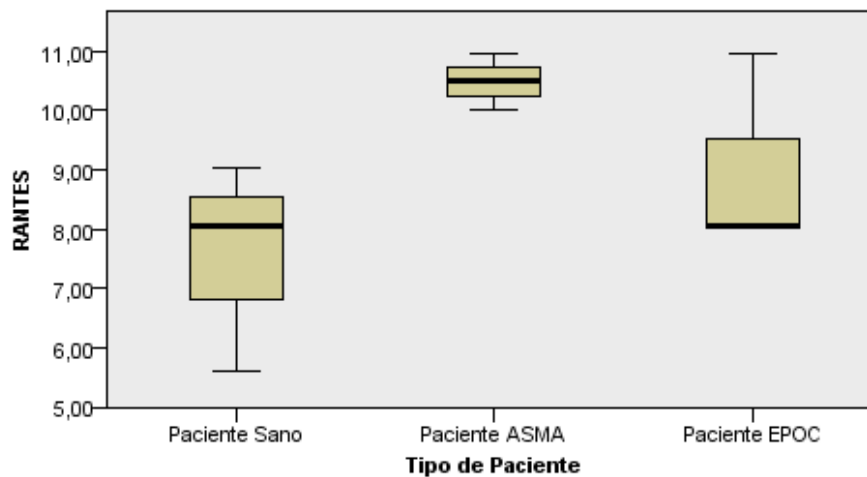
10. Citocina RANTES

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de RANTES es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	162,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	3,641
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,162

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

11. Citocina TNFa

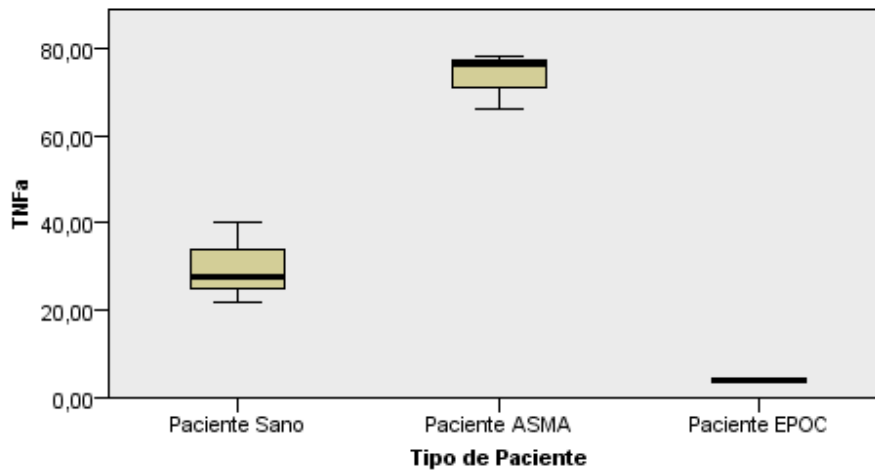
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TNFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Tres días de exposición a las Partículas finas (PM_{2,5}):

Tabla N°1

Pruebas de Normalidad

		Pruebas de normalidad ^{b, c, d, e, f, g, h, i}					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Tipo de Paciente	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TGFa	Paciente Sano	,229	3	.	,982	3	,740
	Paciente ASMA	,346	3	.	,838	3	,209
	Paciente EPOC	,291	3	.	,924	3	,467
GMCSF	Paciente Sano	,261	3	.	,957	3	,603
	Paciente ASMA	,339	3	.	,850	3	,241
	Paciente EPOC	,261	3	.	,957	3	,601
GRO	Paciente Sano	,349	3	.	,832	3	,193
IL13	Paciente EPOC	,350	3	.	,829	3	,185
IL1b	Paciente Sano	,369	3	.	,789	3	,088
	Paciente ASMA	,377	3	.	,769	3	,043
IL6	Paciente Sano	,270	3	.	,949	3	,563
	Paciente ASMA	,346	3	.	,837	3	,205
	Paciente EPOC	,253	3	.	,965	3	,639
IL8	Paciente Sano	,283	3	.	,934	3	,503
	Paciente ASMA	,184	3	.	,999	3	,928
	Paciente EPOC	,292	3	.	,924	3	,466
MCP1	Paciente Sano	,233	3	.	,979	3	,722
	Paciente ASMA	,265	3	.	,954	3	,586
	Paciente EPOC	,291	3	.	,924	3	,468
RANTES	Paciente Sano	,356	3	.	,817	3	,155
	Paciente ASMA	,314	3	.	,893	3	,365
	Paciente EPOC	,267	3	.	,952	3	,578
TNFa	Paciente Sano	,302	3	.	,910	3	,419
	Paciente ASMA	,378	3	.	,768	3	,040
	Paciente EPOC	,375	3	.	,775	3	,056

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. GRO es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

c. GRO es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

d. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

e. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

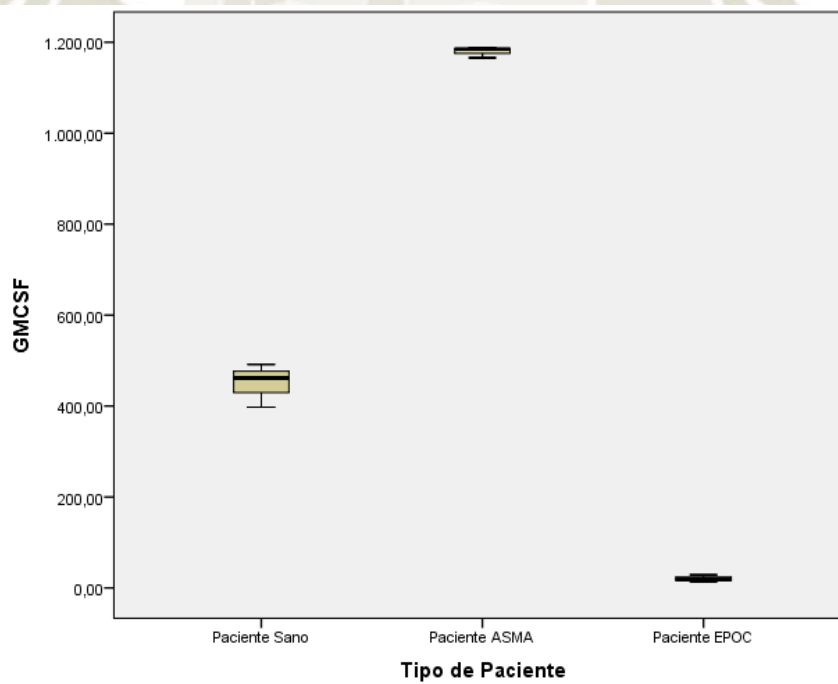
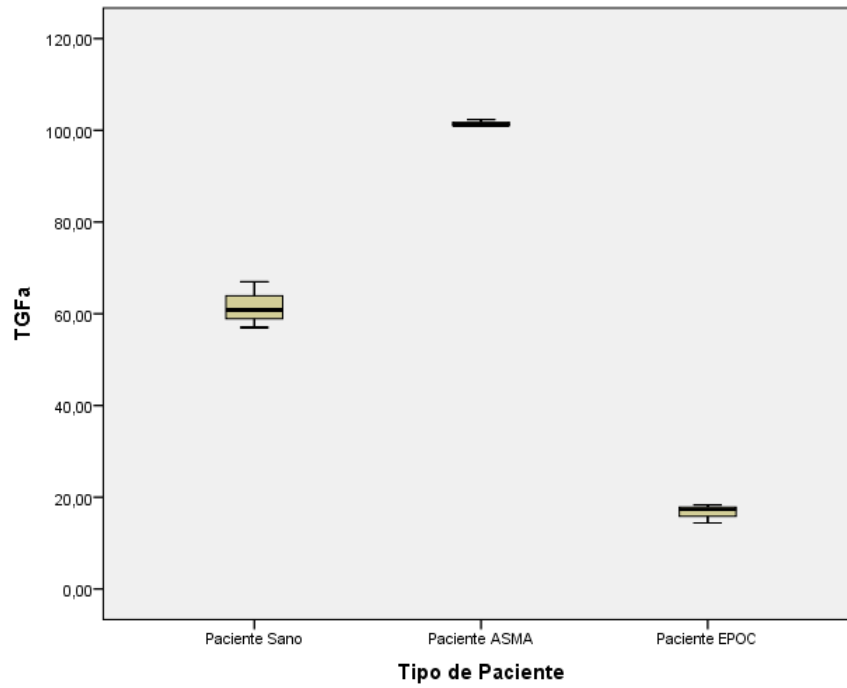
f. IL1b es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

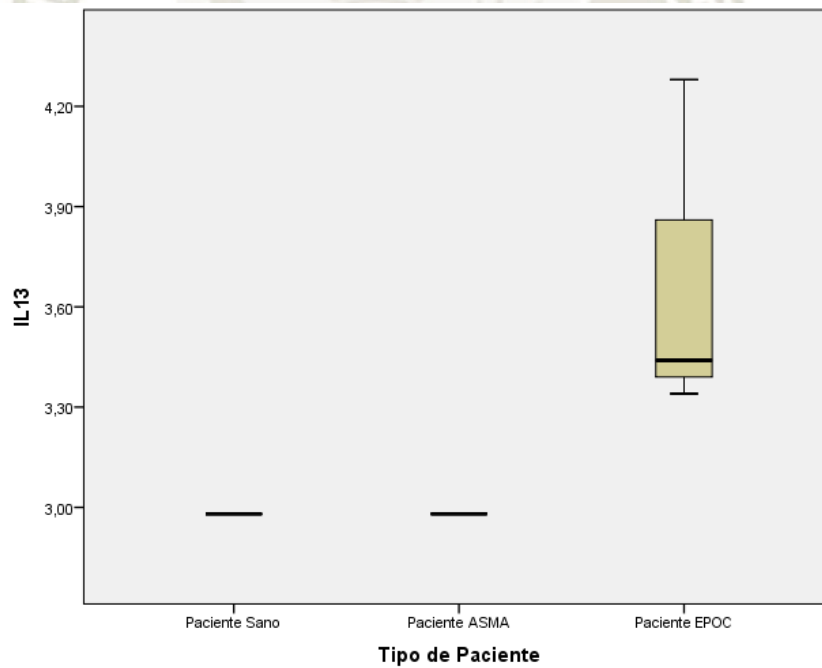
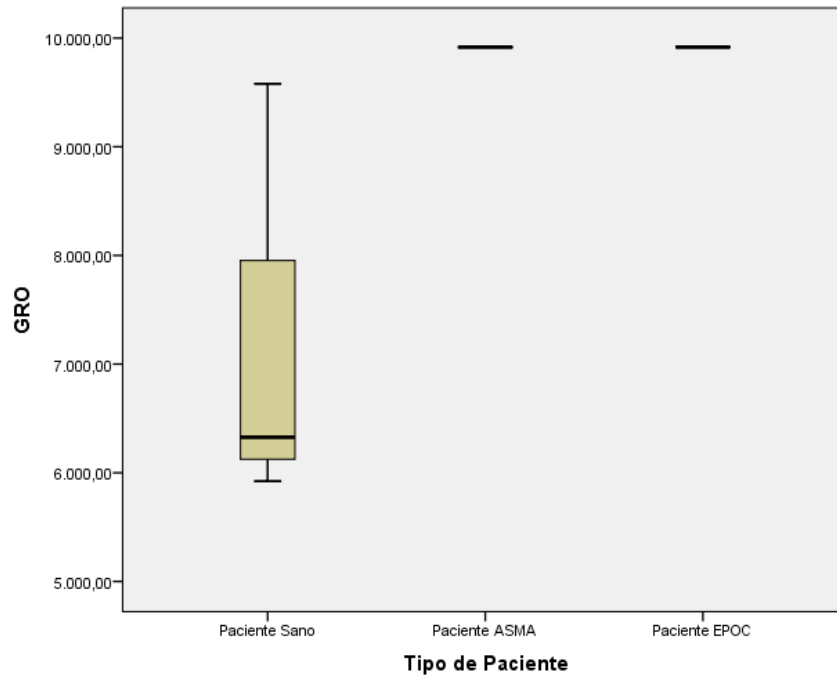
g. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

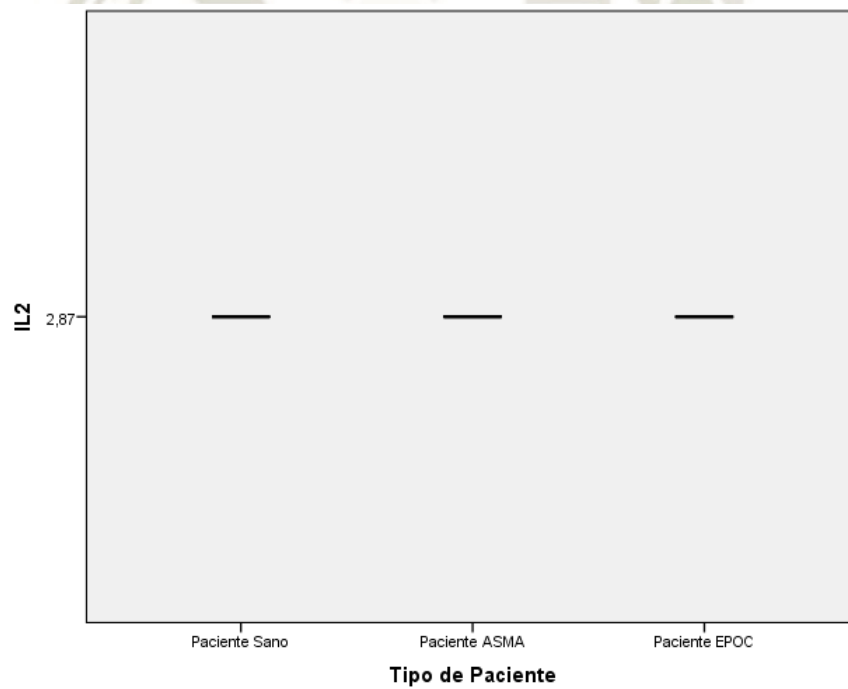
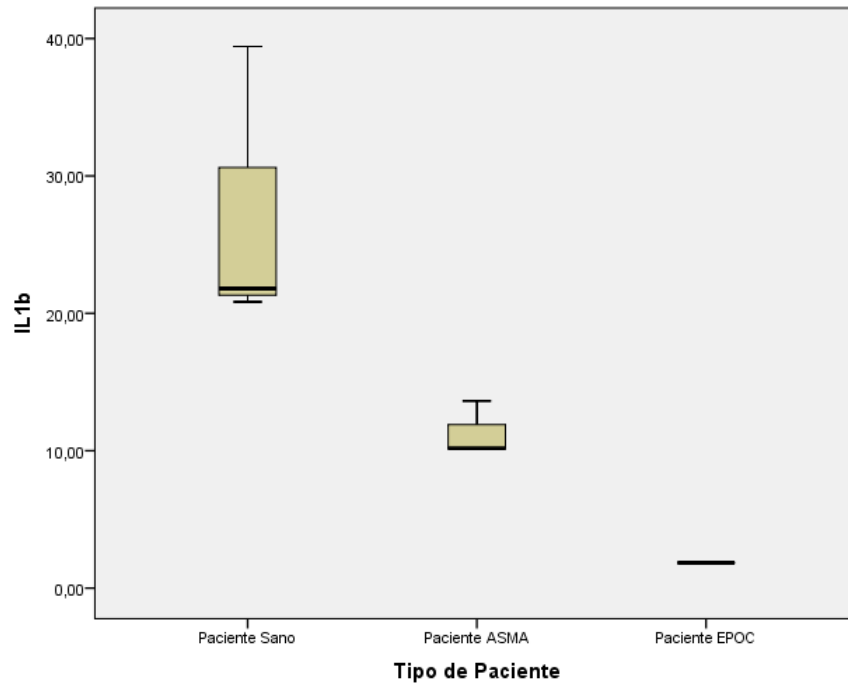
h. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

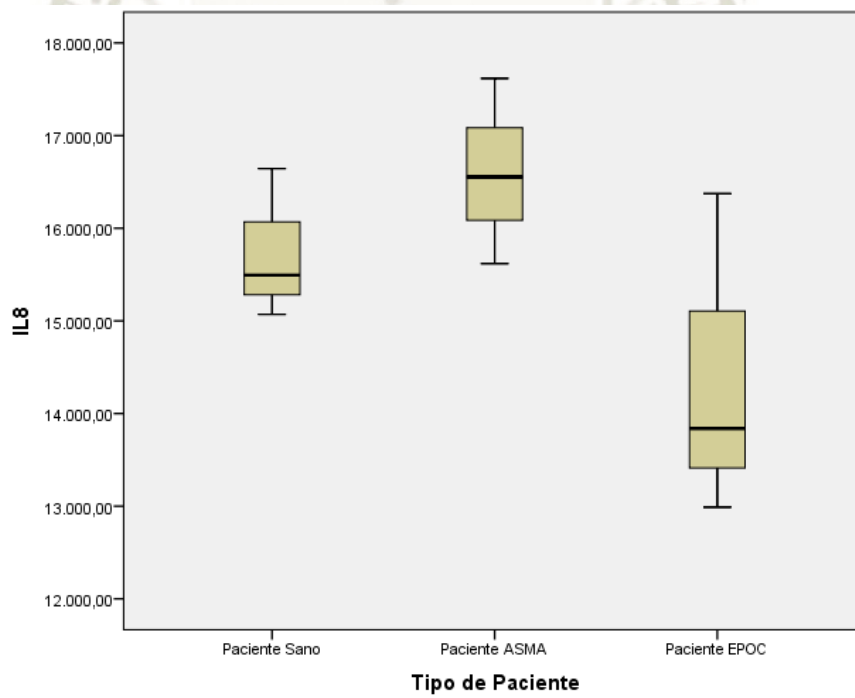
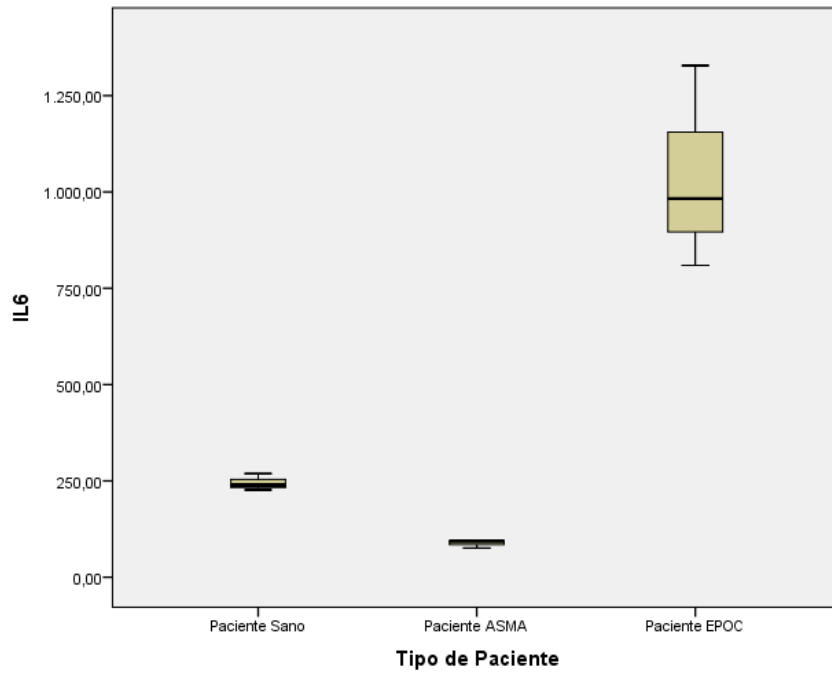
i. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

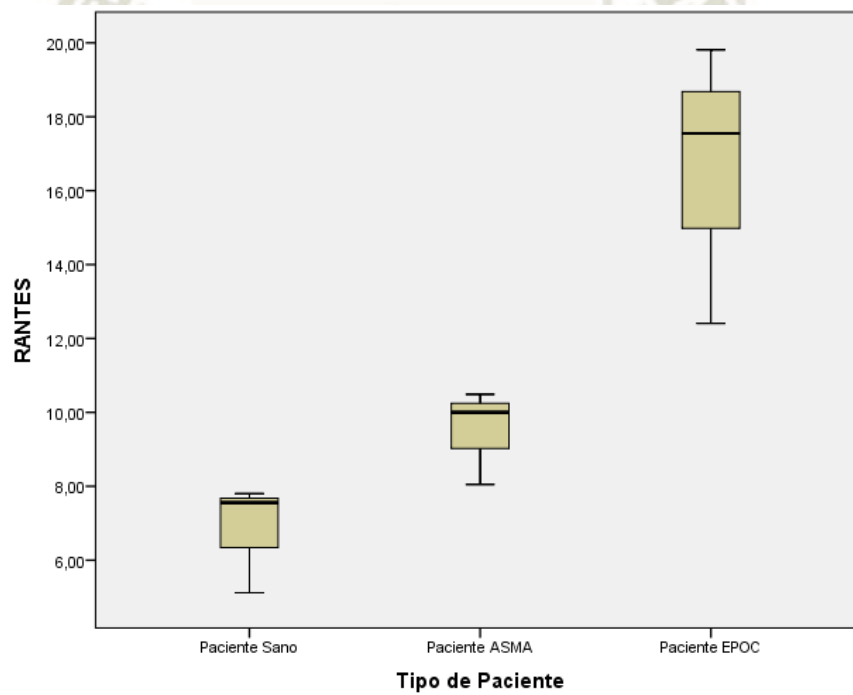
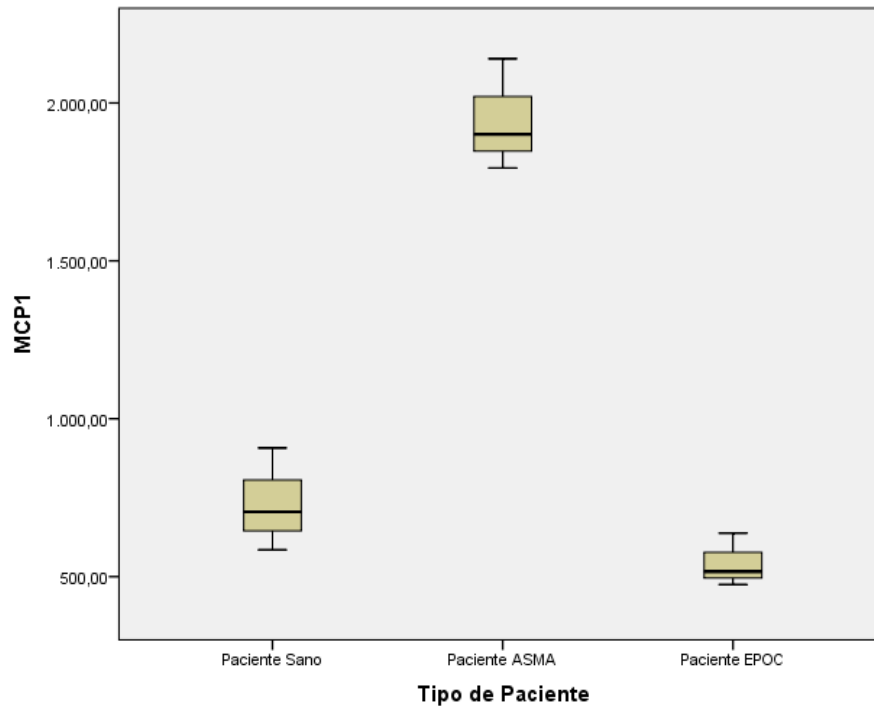
Gráficos de Normalidad











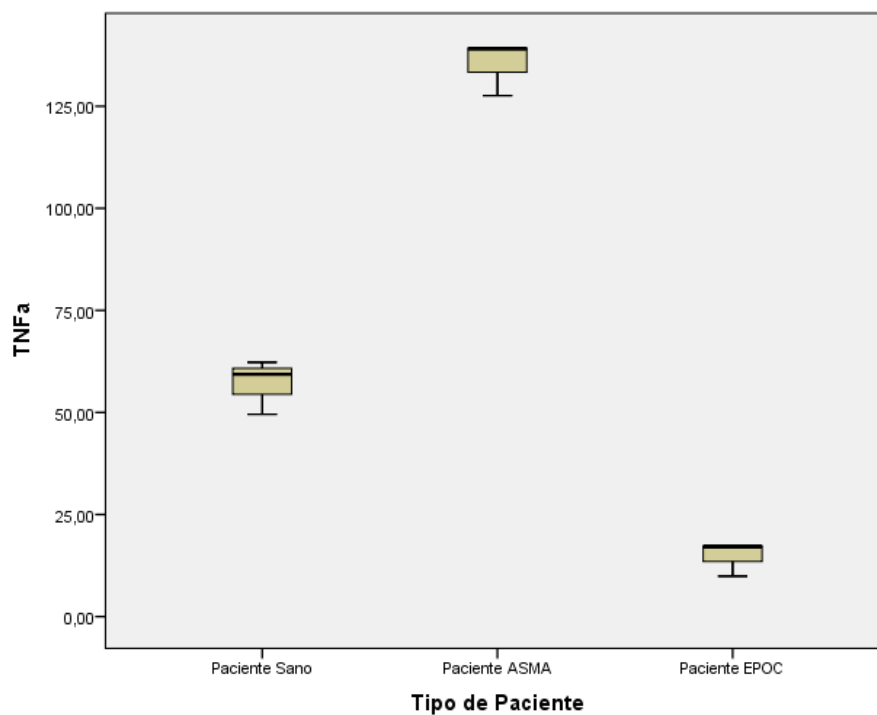


Tabla N°2

Estadístico de Kruskal Wallis para muestras independientes

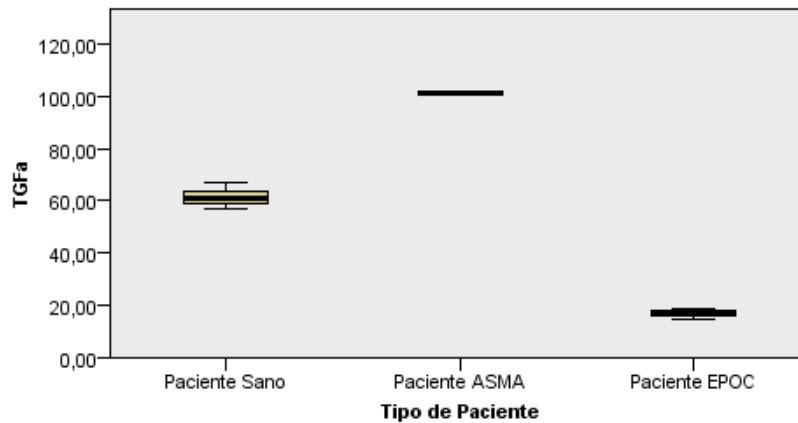
1. Citocina TGFa

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TGFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

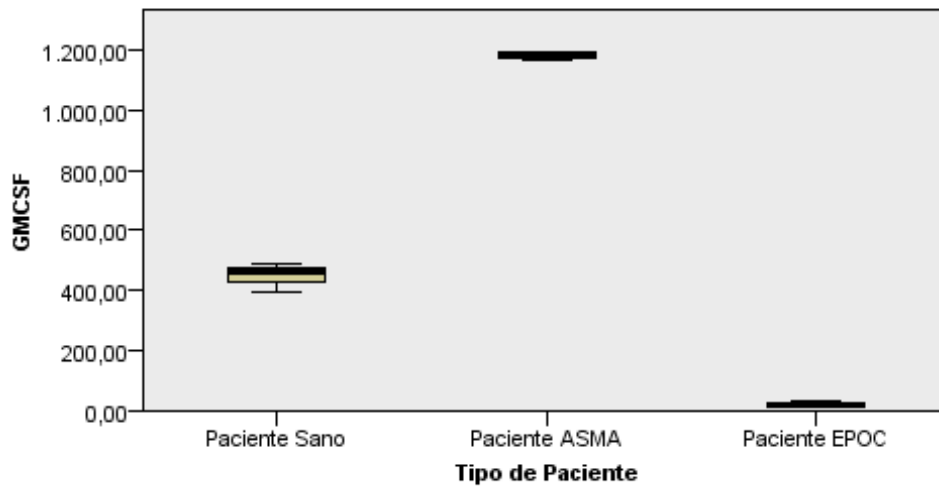
2. Citocina GMCSF

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GMCSF es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

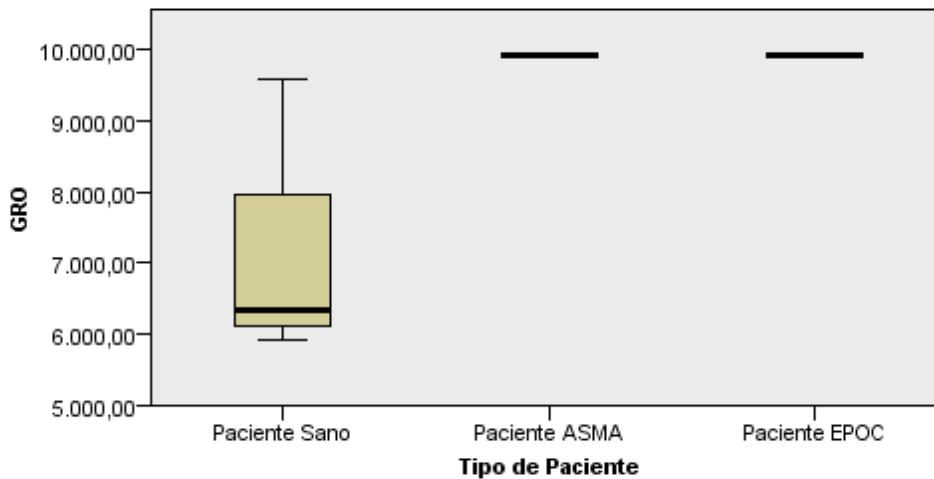
3. Citocina GRO

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GRO es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	22,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,624
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,022

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

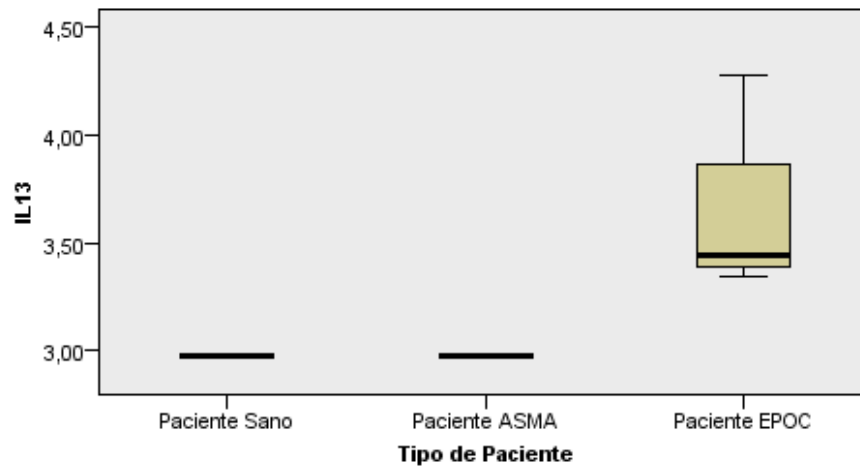
4. Citocina IL13

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL13 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	22,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,624
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,022

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

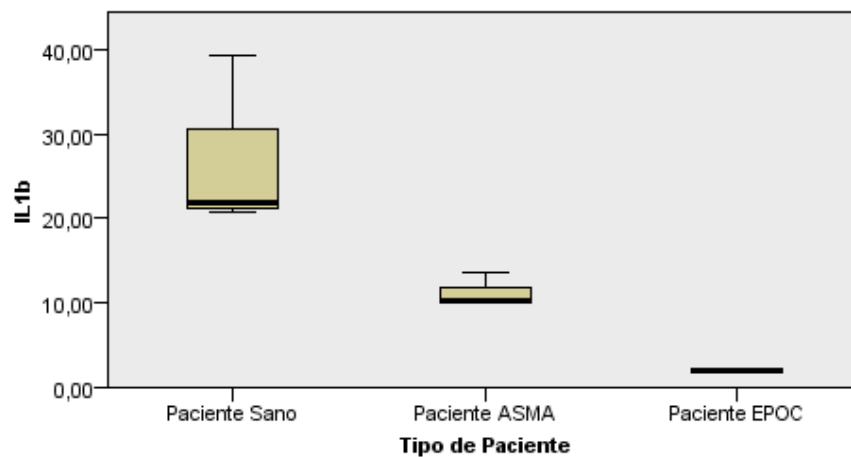
5. Citocina IL1b

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL1b es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	24,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,448
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,024

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

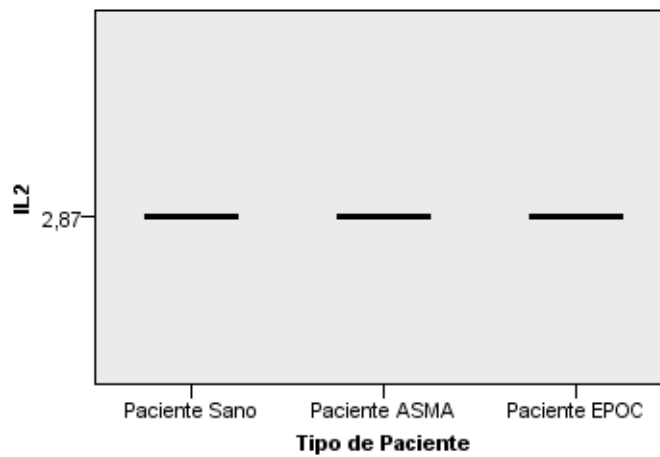
6. Citocina IL2

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL2 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1,000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

7. Citocina IL6

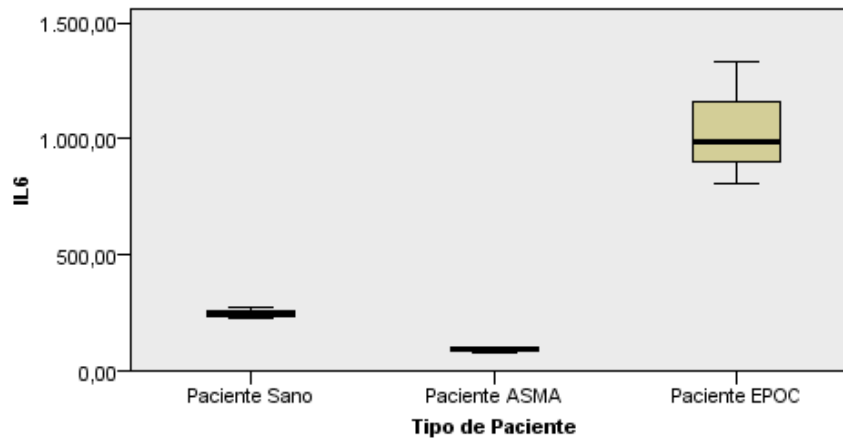
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL6 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

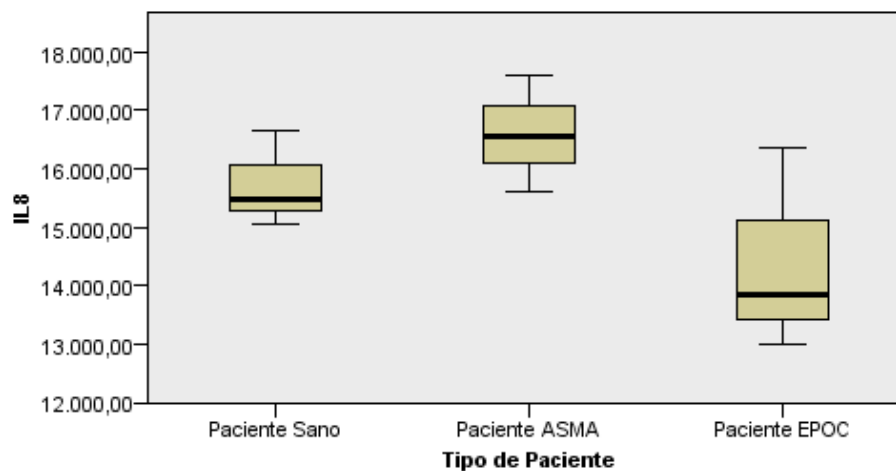
8. Citocina IL8

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL8 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	202,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	3,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,202

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

9. Citocina MCP1

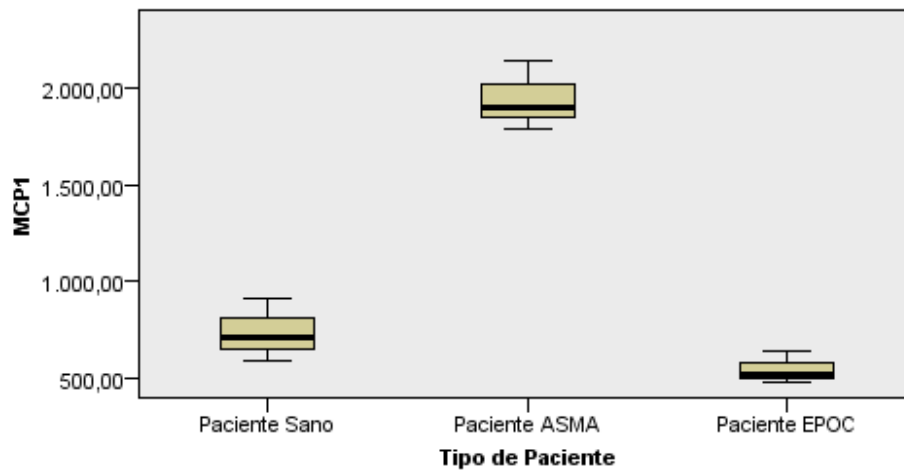
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de MCP1 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	39,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,489
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,039

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

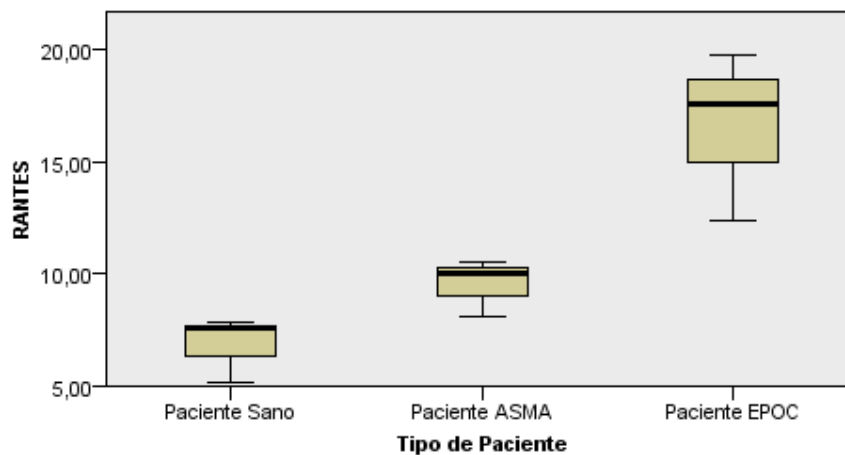
10. Citocina RANTES

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de RANTES es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

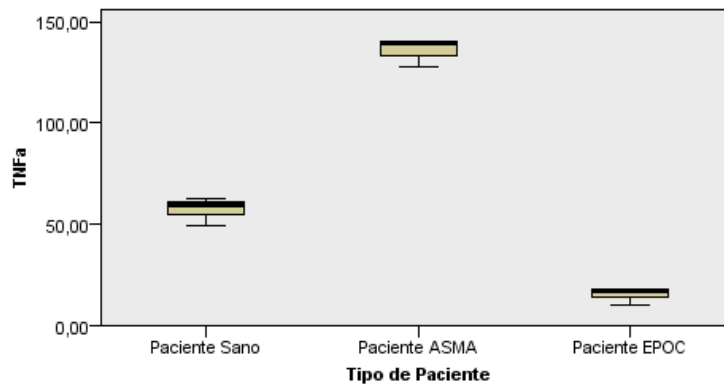
11. Citocina TNFa

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TNFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Un día de exposición a las Partículas finas (PM_{2,5}):

Tabla N°1

Pruebas de Normalidad

Pruebas de normalidad ^{b, c, d, e, f, g, h}							
	Tipo de Paciente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TGFa	Paciente Sano	,227	3	.	,982	3	,746
	Paciente ASMA	,364	3	.	,800	3	,114
	Paciente EPOC	,384	3	.	,752	3	,005
GMCSF	Paciente Sano	,317	3	.	,888	3	,347
	Paciente ASMA	,379	3	.	,763	3	,030
	Paciente EPOC	,340	3	.	,849	3	,238
GRO	Paciente Sano	,379	3	.	,764	3	,032
	Paciente ASMA	,385	3	.	,750	3	,000
IL13	Paciente EPOC	,304	3	.	,908	3	,411
IL1b	Paciente Sano	,282	3	.	,936	3	,511
	Paciente ASMA	,270	3	.	,949	3	,565
IL6	Paciente Sano	,279	3	.	,939	3	,522
	Paciente ASMA	,382	3	.	,756	3	,013
	Paciente EPOC	,251	3	.	,966	3	,647
IL8	Paciente Sano	,292	3	.	,923	3	,463
	Paciente ASMA	,317	3	.	,888	3	,348
	Paciente EPOC	,384	3	.	,753	3	,006
MCP1	Paciente Sano	,341	3	.	,846	3	,231
	Paciente ASMA	,279	3	.	,939	3	,524
	Paciente EPOC	,314	3	.	,893	3	,364
RANTES	Paciente Sano	,292	3	.	,923	3	,463
	Paciente ASMA	,254	3	.	,964	3	,634
	Paciente EPOC	,331	3	.	,865	3	,280
TNFa	Paciente Sano	,341	3	.	,846	3	,230
	Paciente ASMA	,380	3	.	,762	3	,027
	Paciente EPOC	,363	3	.	,802	3	,119

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. GRO es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

c. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

d. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

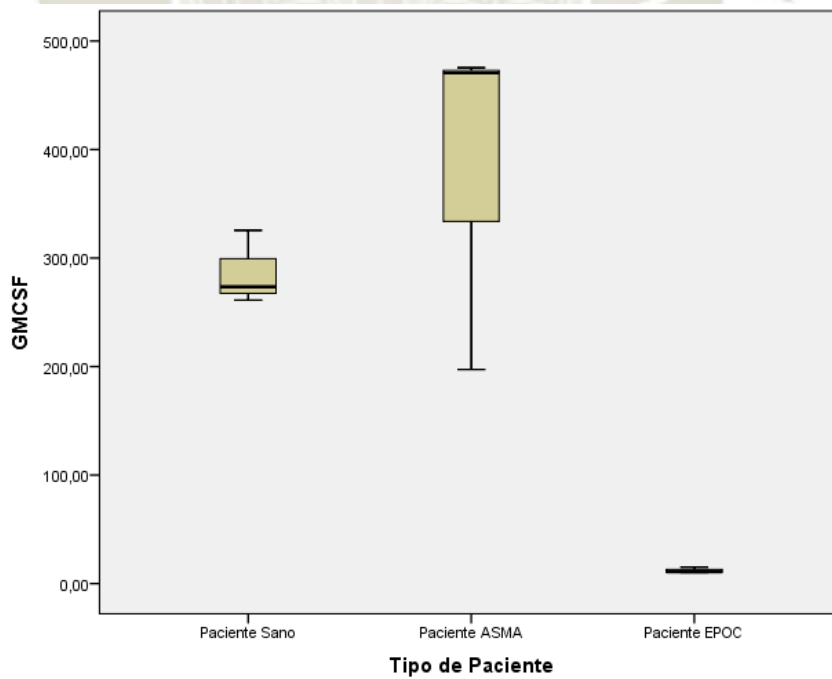
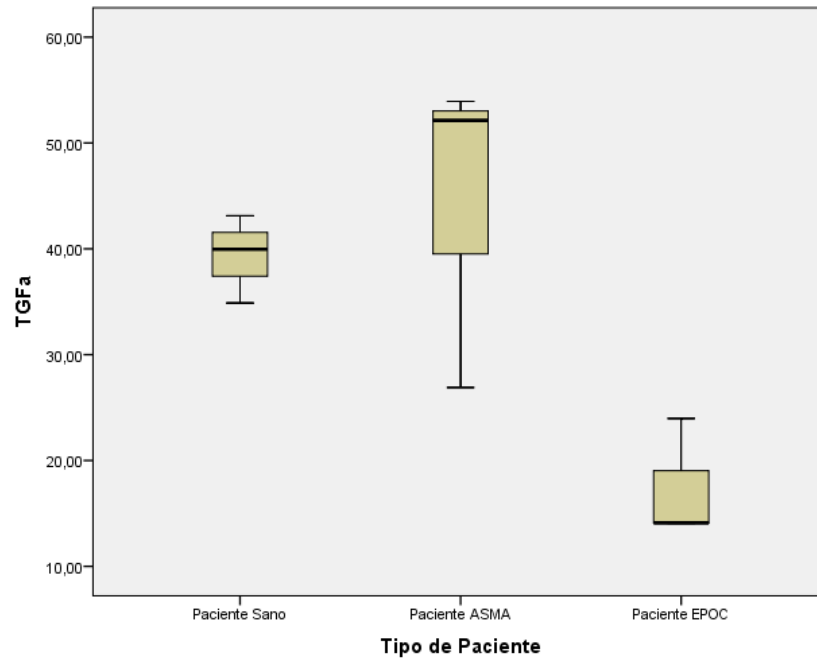
e. IL1b es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

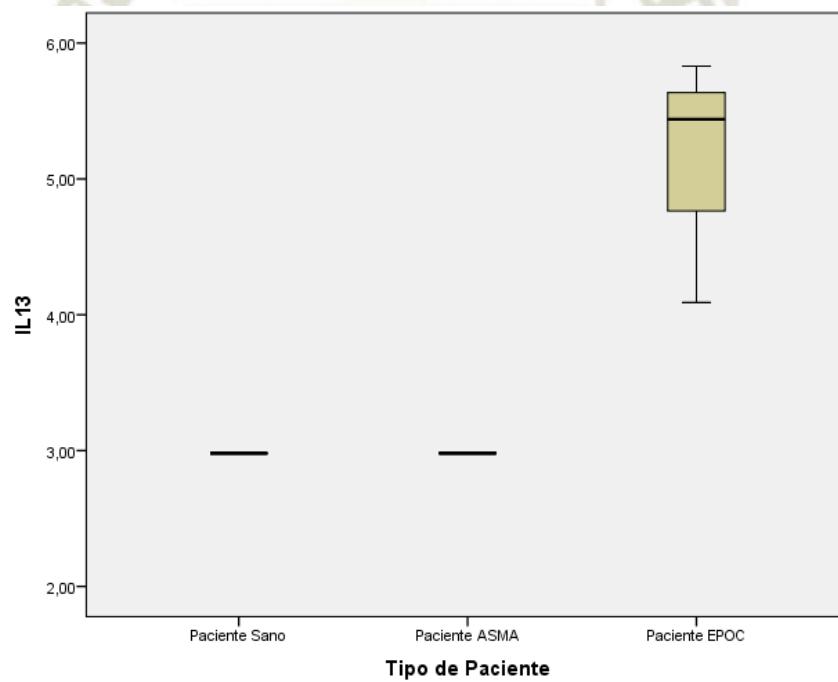
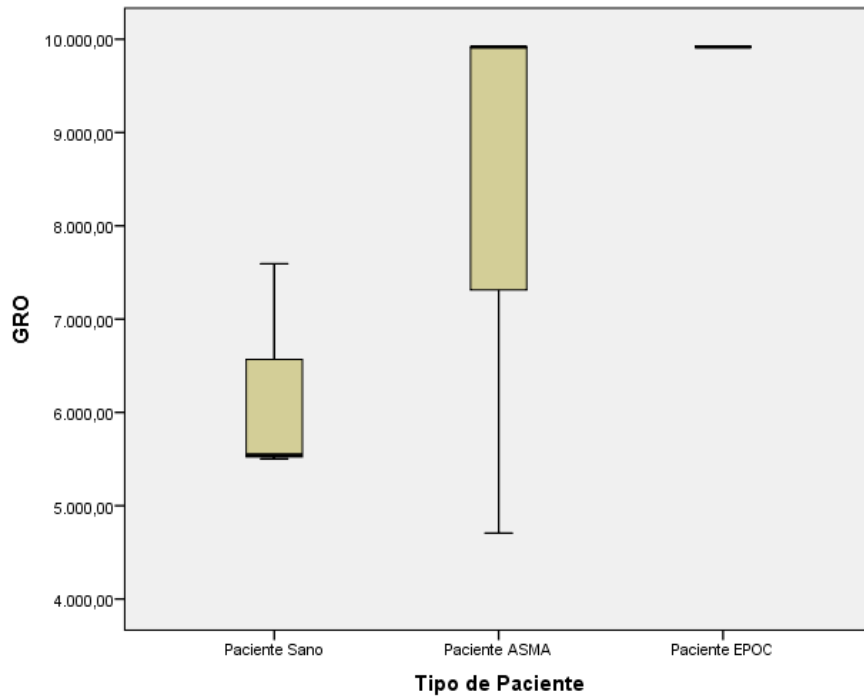
f. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

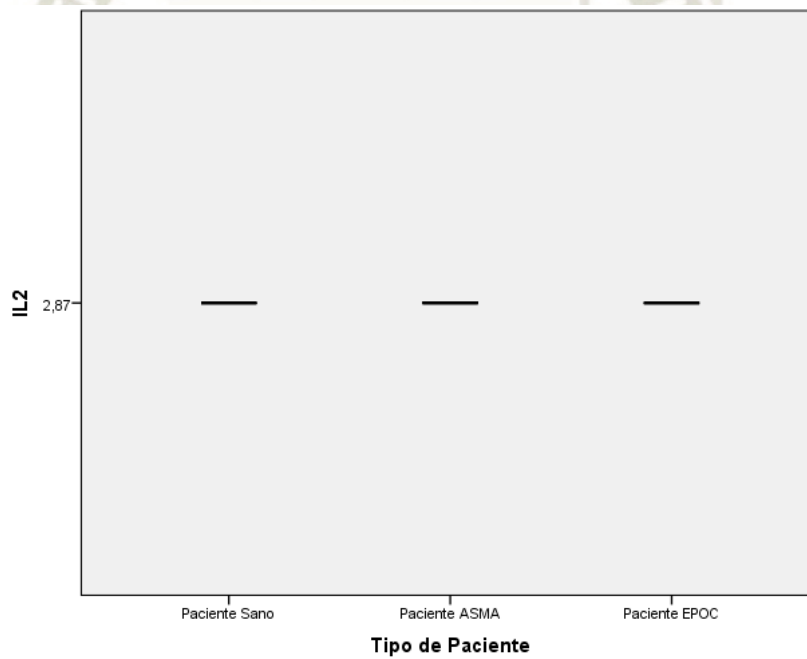
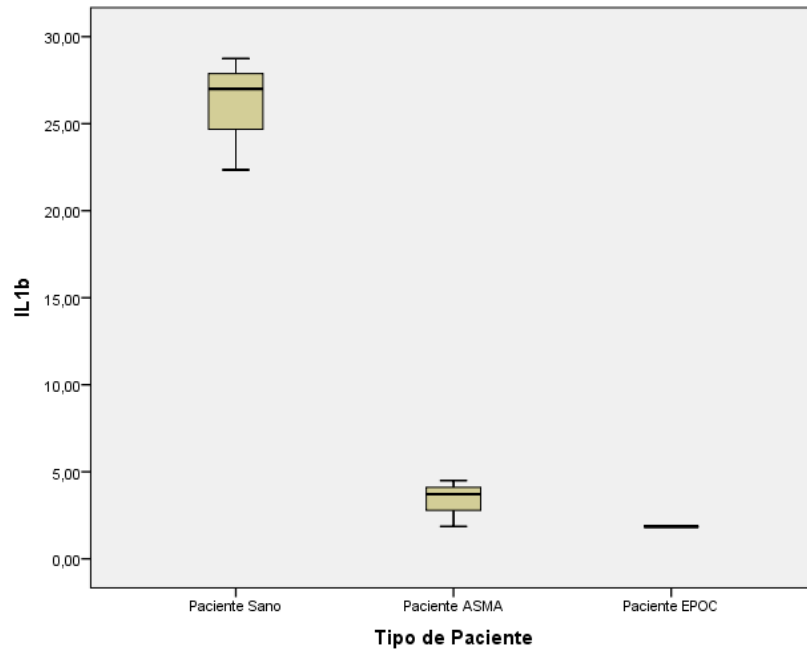
g. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

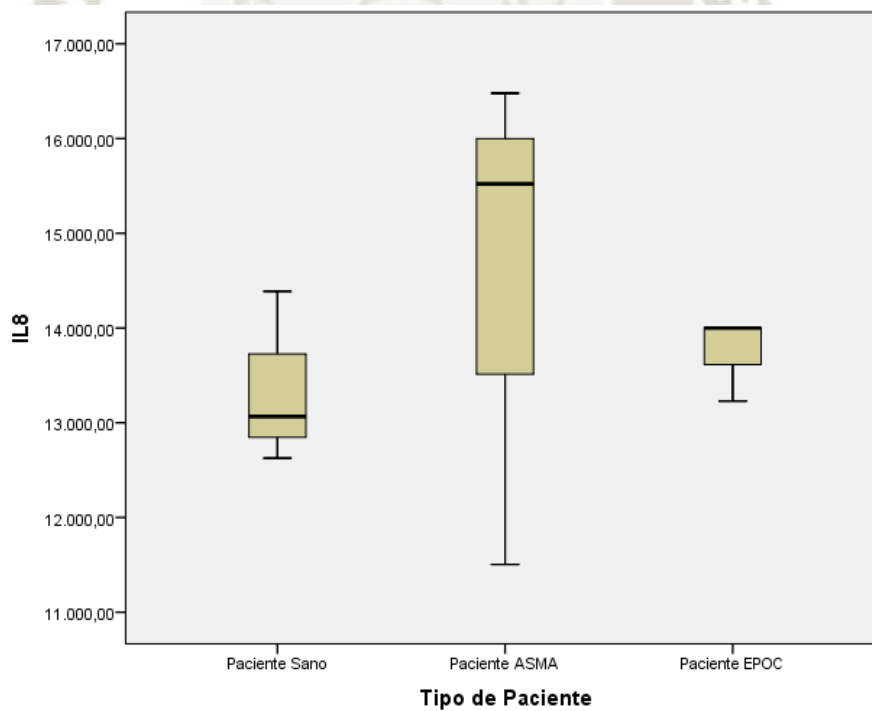
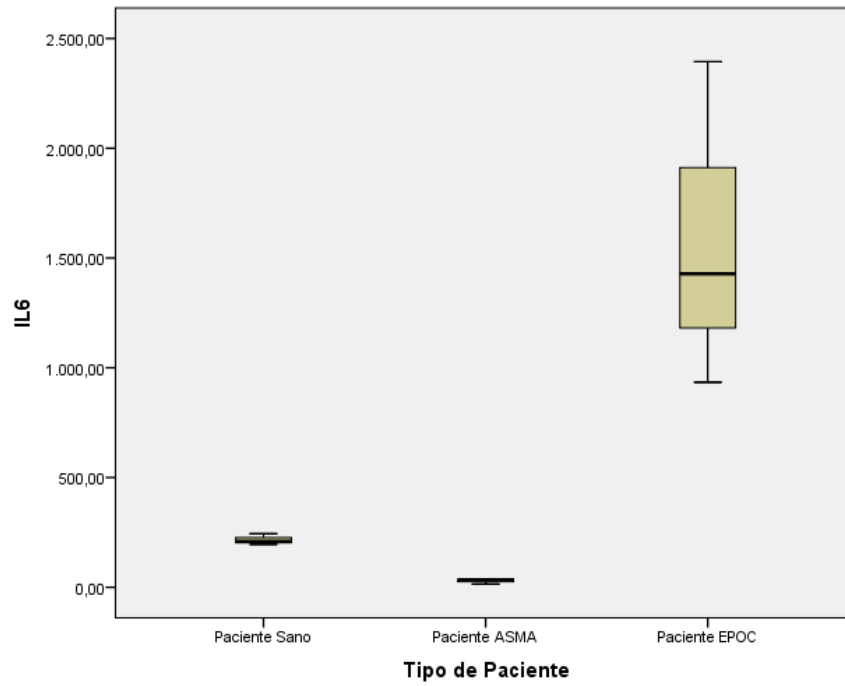
h. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

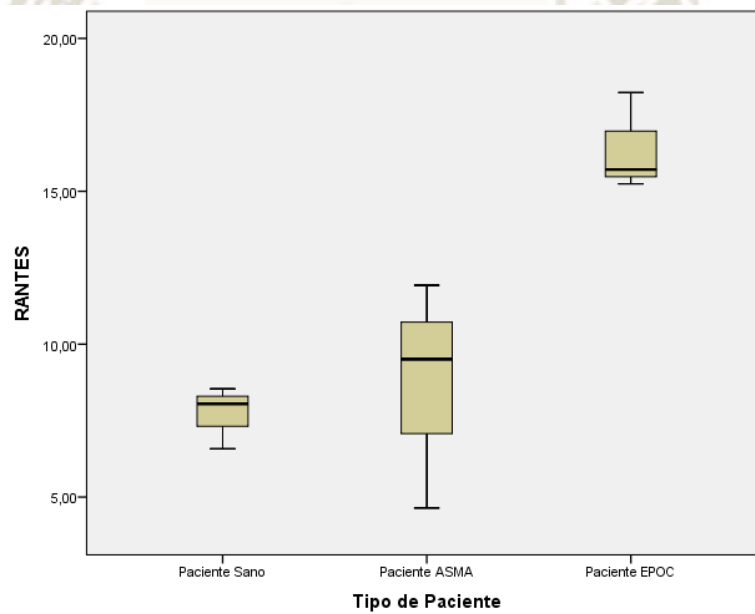
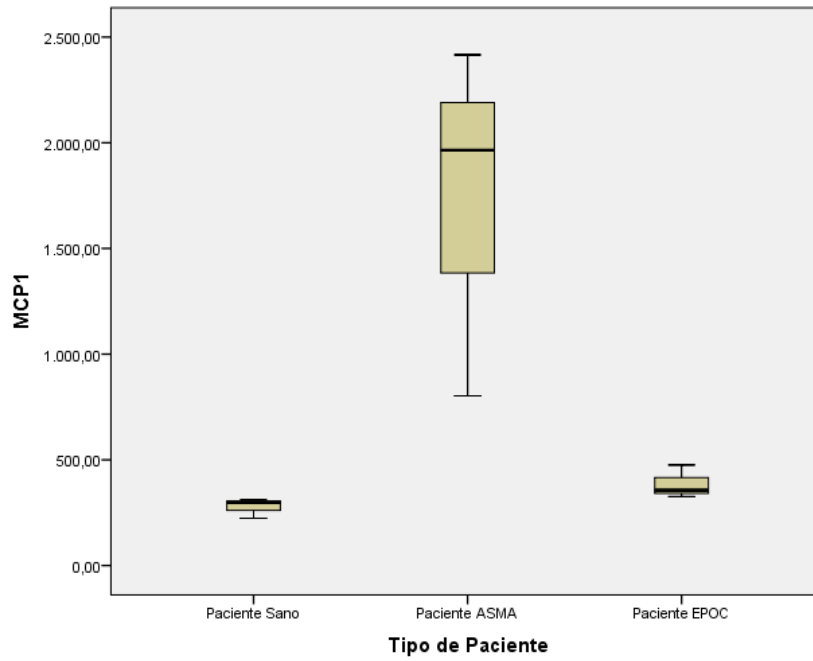
Gráficos de Normalidad











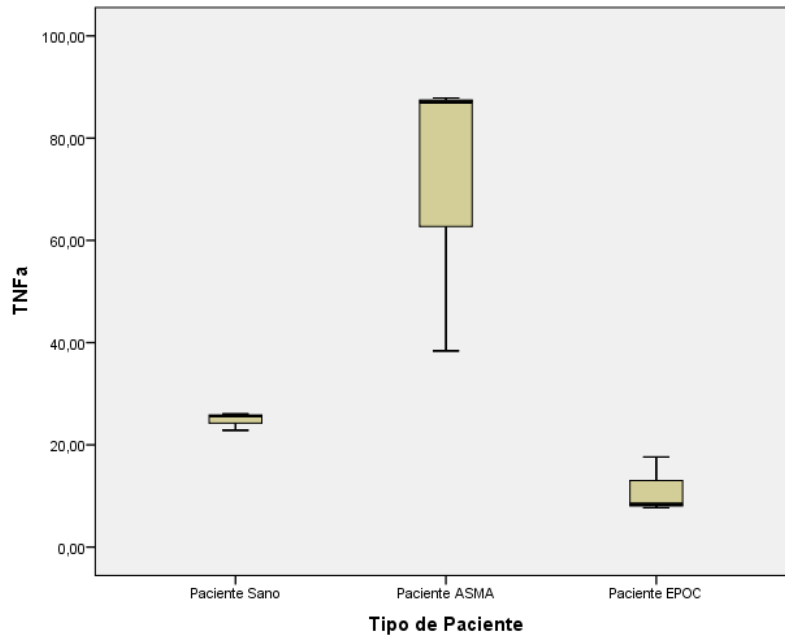


Tabla N°2

Estadístico de Kruskal Wallis para muestras independientes

1. Citocina TGF

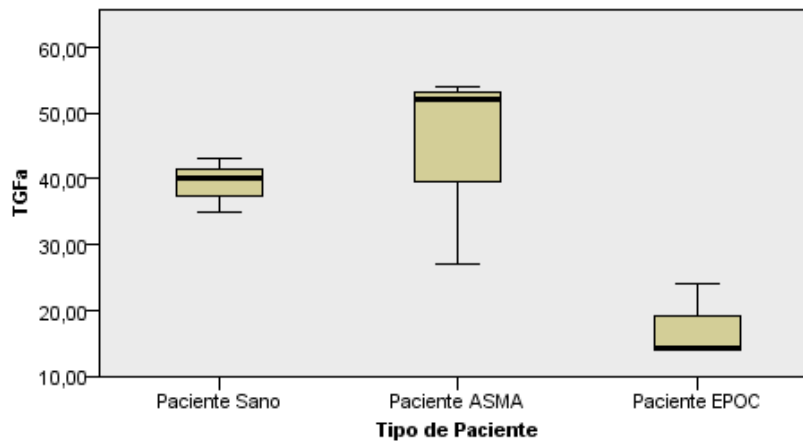
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TGFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	61,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,600
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,061

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

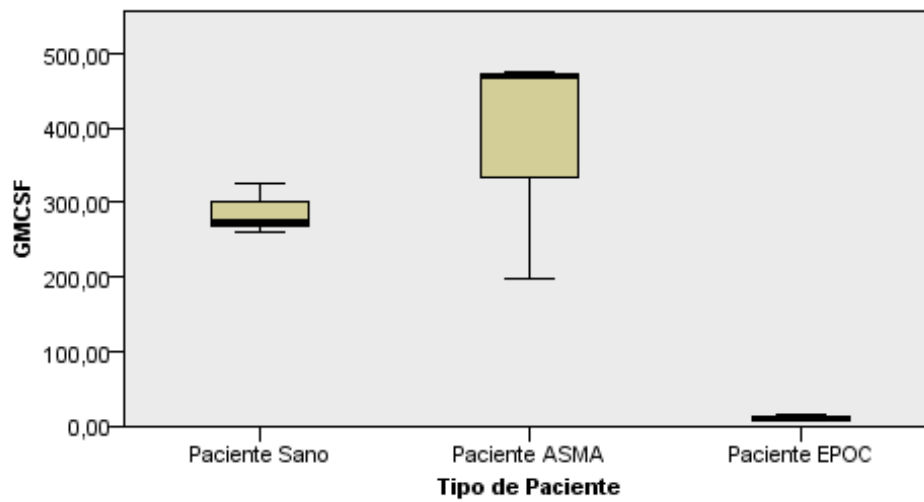
2. Citocina GMCSF

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GMCSF es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	61,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,600
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,061

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

3. Citocina GRO

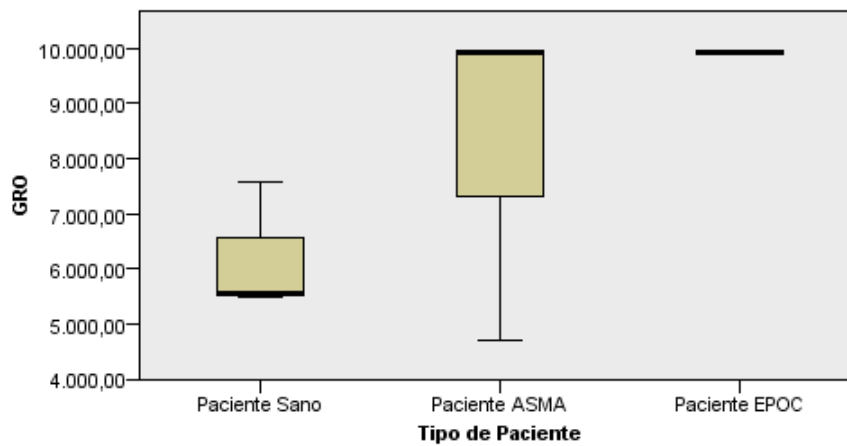
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GRO es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	147,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	3,840
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,147

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

4. Citocina IL13

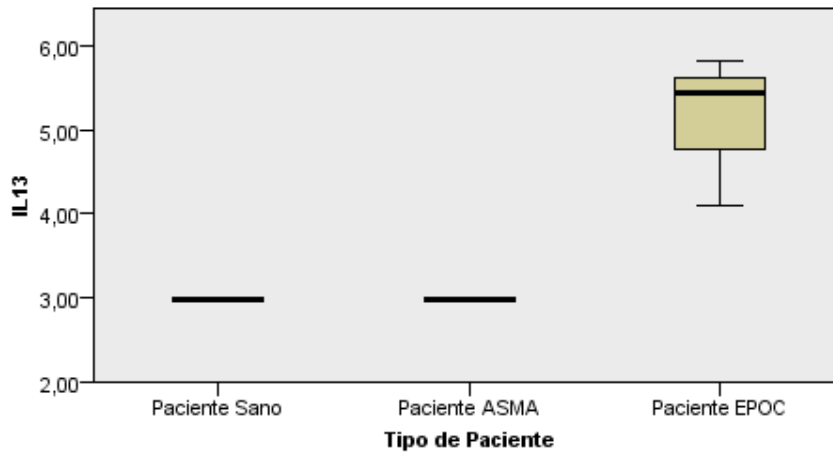
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL13 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	22,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,624
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,022

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

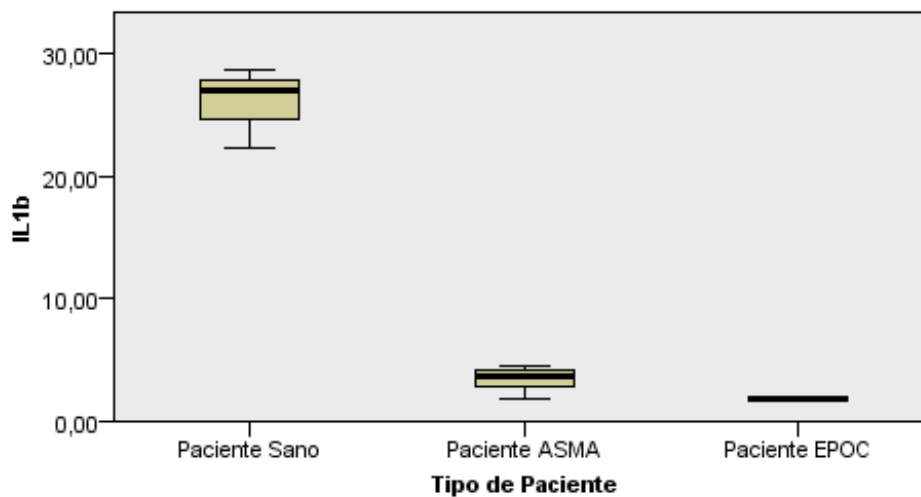
5. Citocina IL1b

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL1b es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	24,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,448
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,024

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

6. Citocina IL2

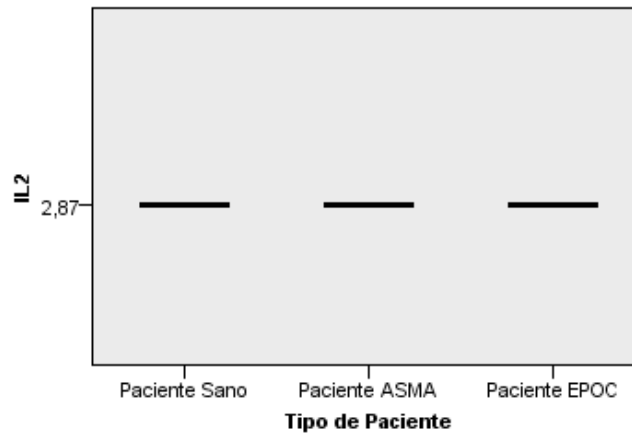
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL2 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1,000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

7. Citocina IL6

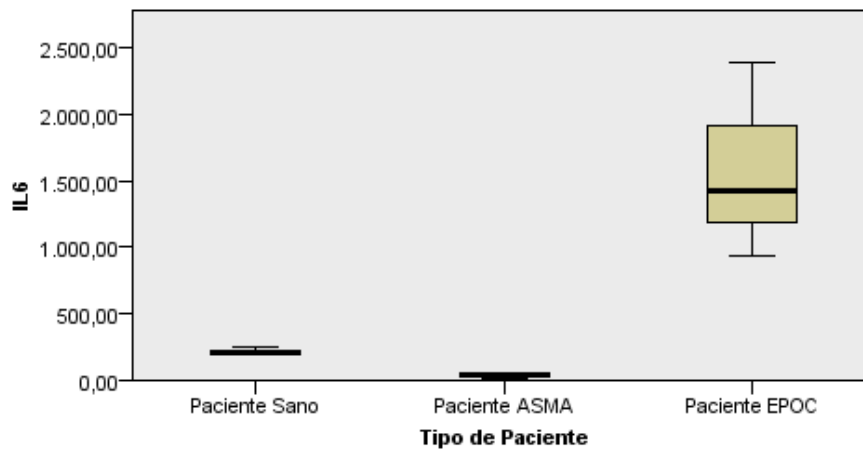
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL6 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

8. Citocina IL8

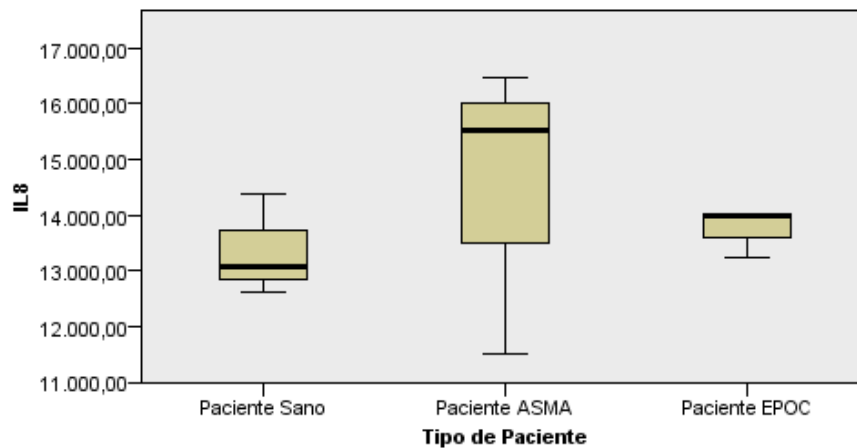
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL8 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,670	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,800
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,670

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

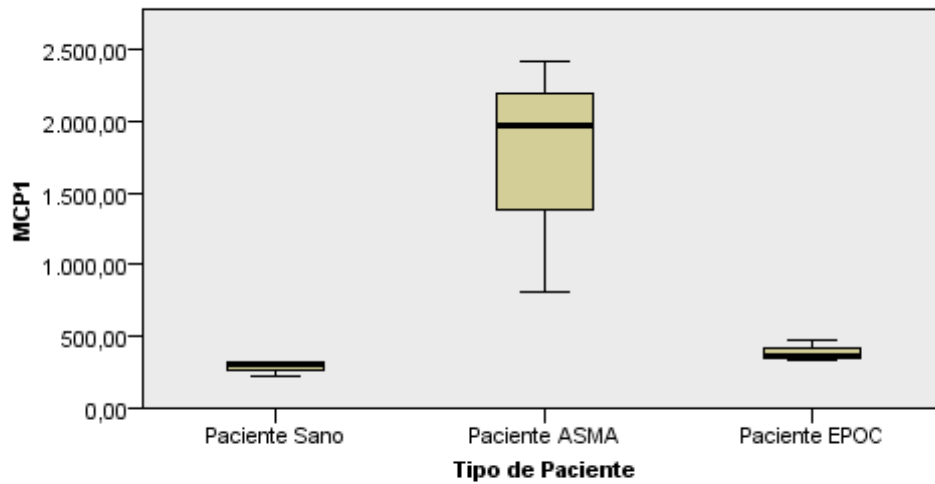
9. Citocina MCP1

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de MCP1 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

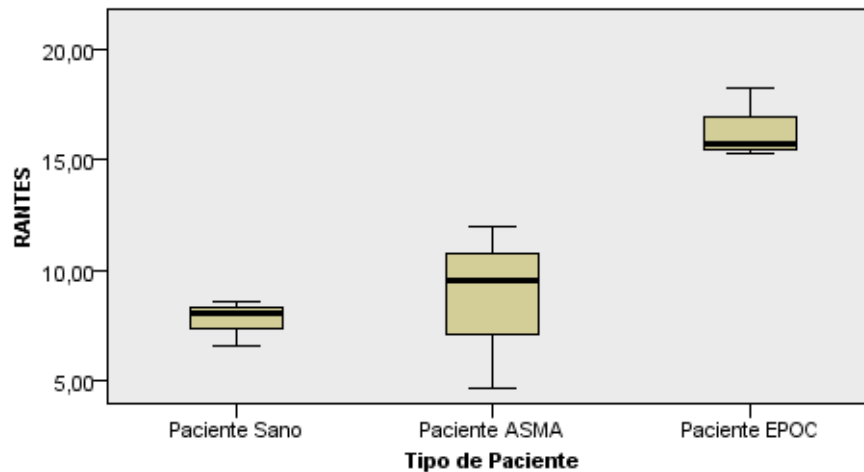
10. Citocina RANTES

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de RANTES es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	61,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,600
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,061

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

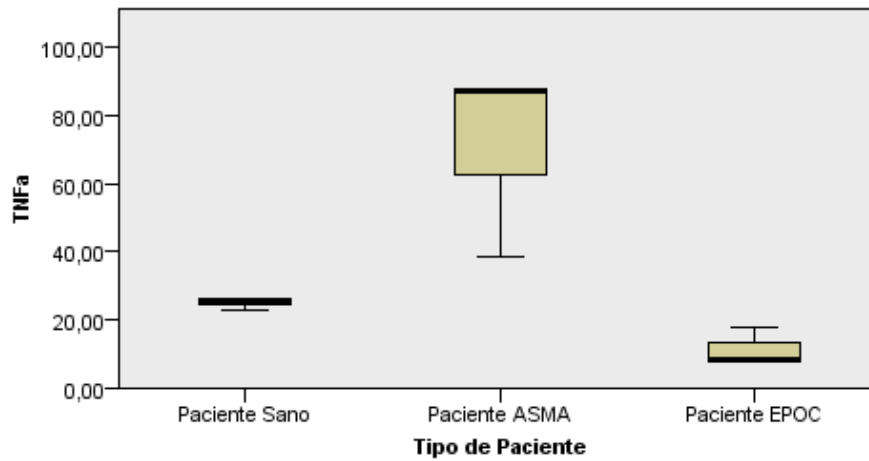
11. Citocina TNFa

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TNFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Tres días de exposición a las Partículas ultrafinas (PM_{0,1}):

Tabla N°1

Pruebas de Normalidad

Pruebas de normalidad^{b, c, d, e, f, g, h, i}							
	Tipo de Paciente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TGFa	Paciente Sano	,191	3	.	,997	3	,899
	Paciente ASMA	,325	3	.	,874	3	,308
	Paciente EPOC	,292	3	.	,924	3	,465
GMCSF	Paciente Sano	,175	3	.	1,000	3	,995
	Paciente ASMA	,288	3	.	,929	3	,483
	Paciente EPOC	,243	3	.	,972	3	,682
GRO	Paciente Sano	,267	3	.	,952	3	,577
	Paciente ASMA	,385	3	.	,750	3	,000
IL13	Paciente EPOC	,215	3	.	,989	3	,799
IL1b	Paciente Sano	,314	3	.	,892	3	,362
	Paciente ASMA	,188	3	.	,998	3	,910
IL6	Paciente Sano	,195	3	.	,996	3	,884
	Paciente ASMA	,357	3	.	,816	3	,153
	Paciente EPOC	,199	3	.	,995	3	,867
IL8	Paciente Sano	,278	3	.	,940	3	,527
	Paciente ASMA	,309	3	.	,900	3	,385
	Paciente EPOC	,350	3	.	,829	3	,186
MCP1	Paciente Sano	,214	3	.	,989	3	,803
	Paciente ASMA	,177	3	.	1,000	3	,974
	Paciente EPOC	,300	3	.	,912	3	,426
RANTES	Paciente Sano	,293	3	.	,922	3	,458
	Paciente ASMA	,385	3	.	,750	3	,000
	Paciente EPOC	,343	3	.	,844	3	,224
TNFa	Paciente Sano	,185	3	.	,998	3	,926
	Paciente ASMA	,306	3	.	,904	3	,398
	Paciente EPOC	,213	3	.	,990	3	,808

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. GRO es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

c. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

d. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

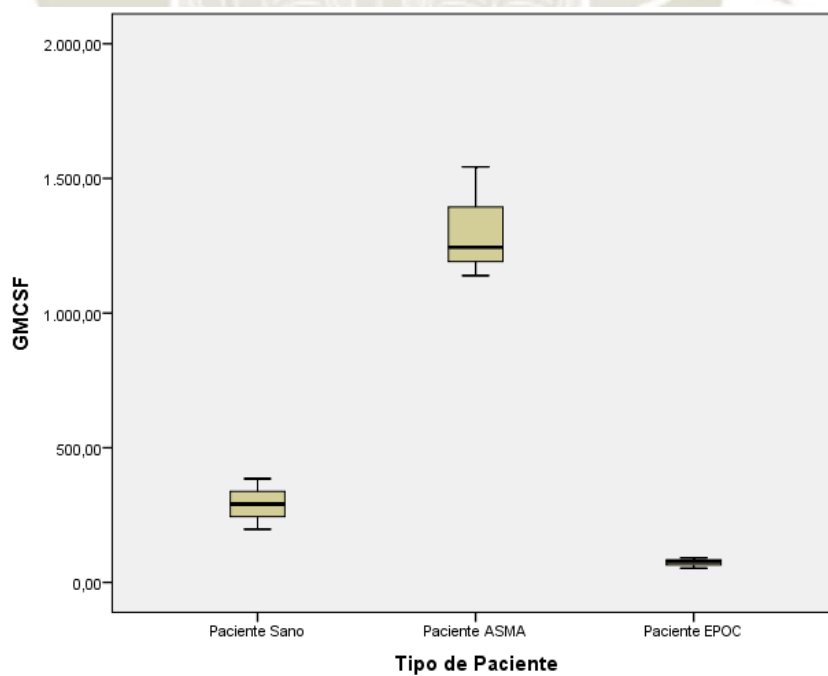
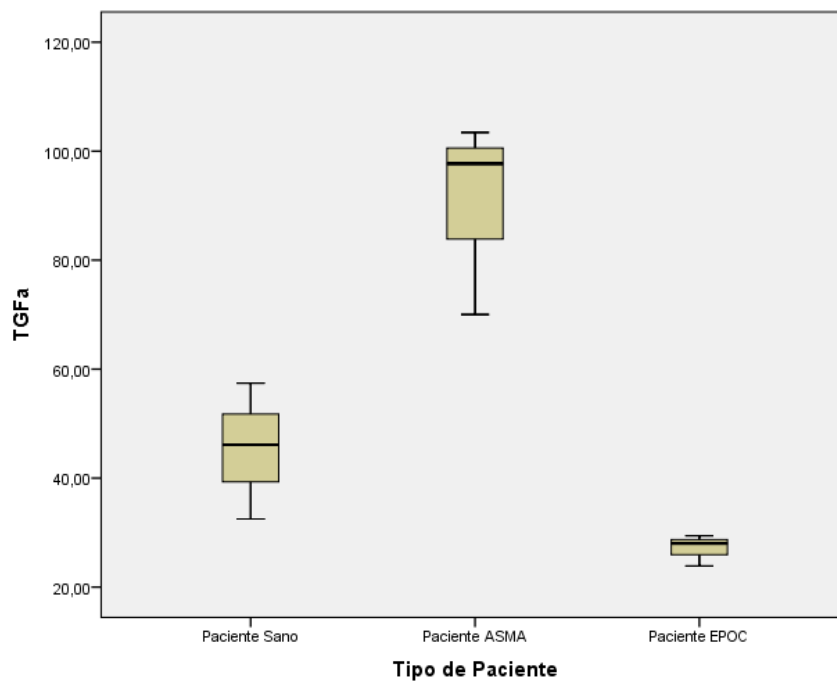
e. IL1b es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

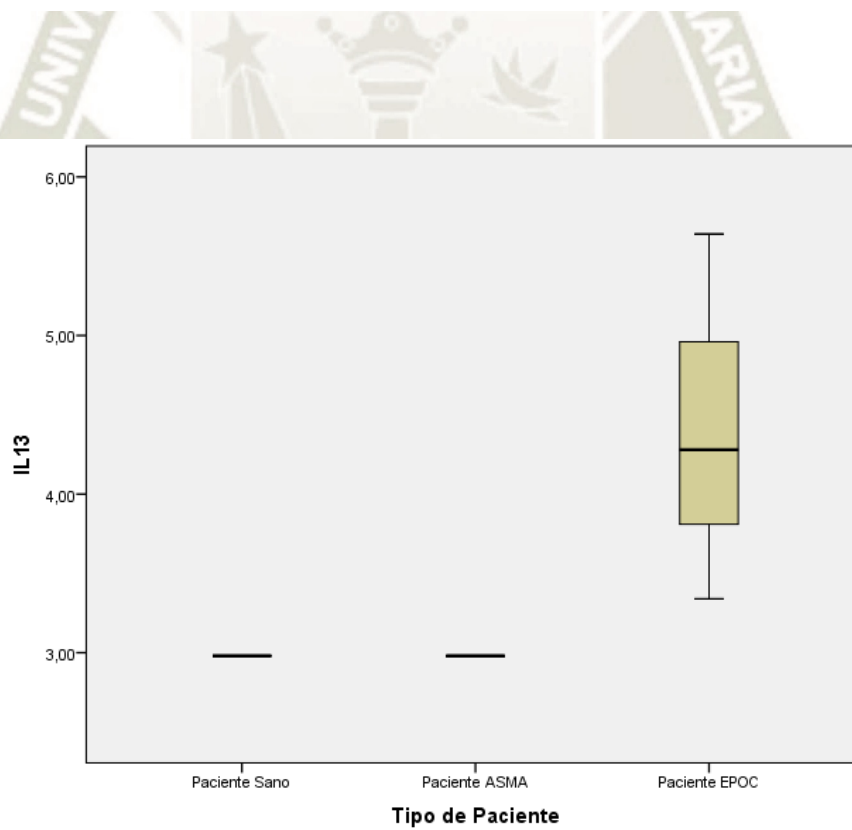
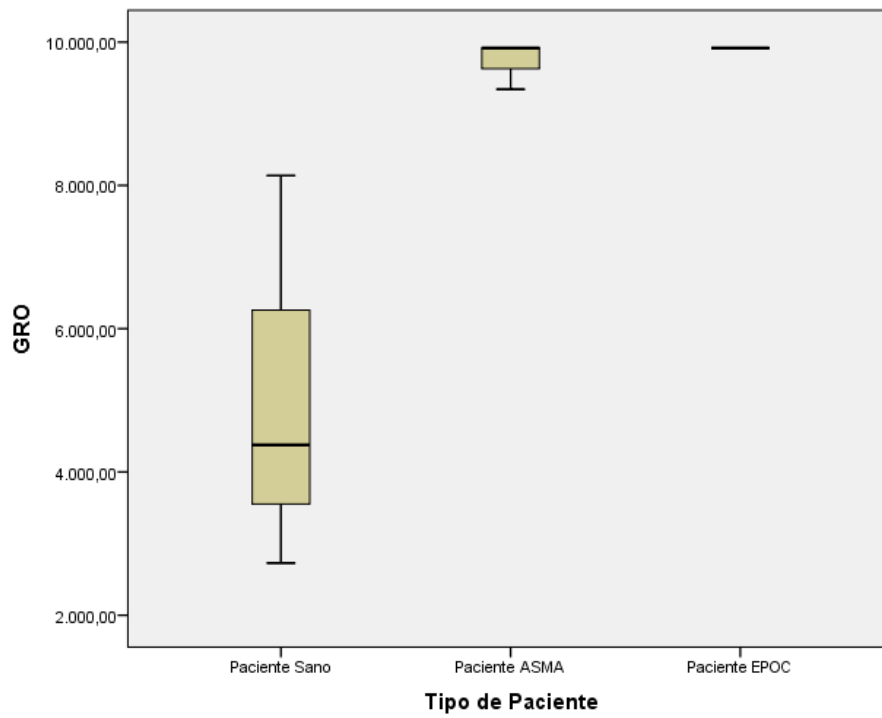
f. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

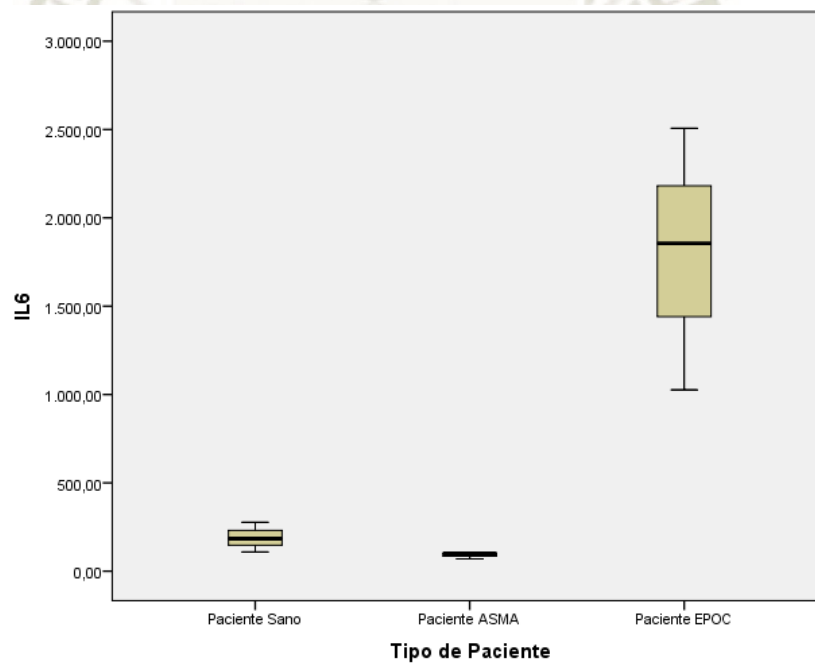
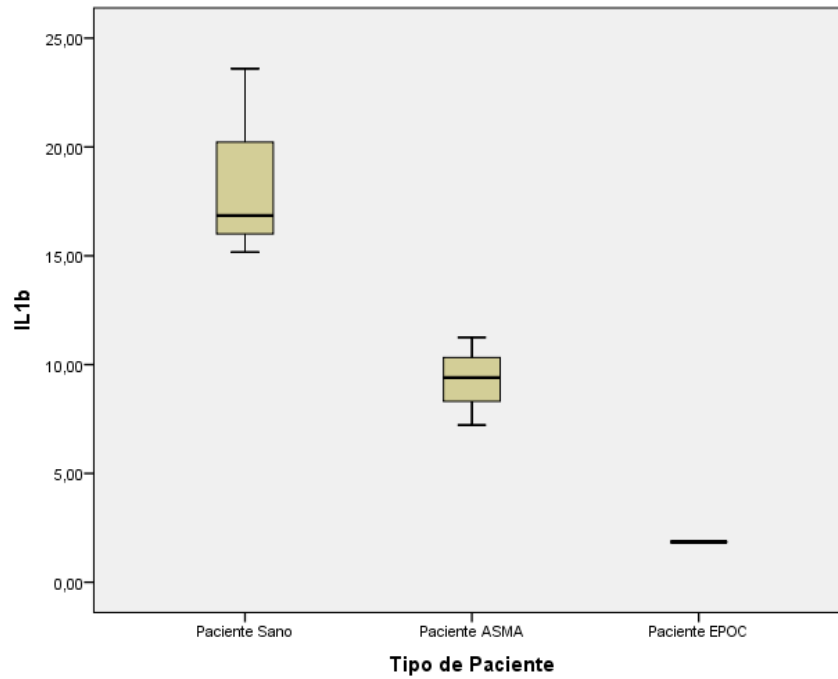
g. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

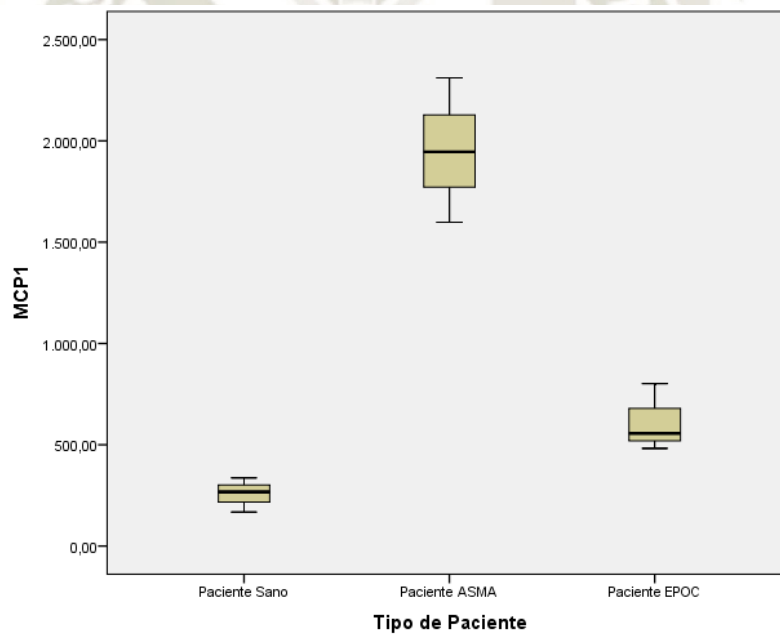
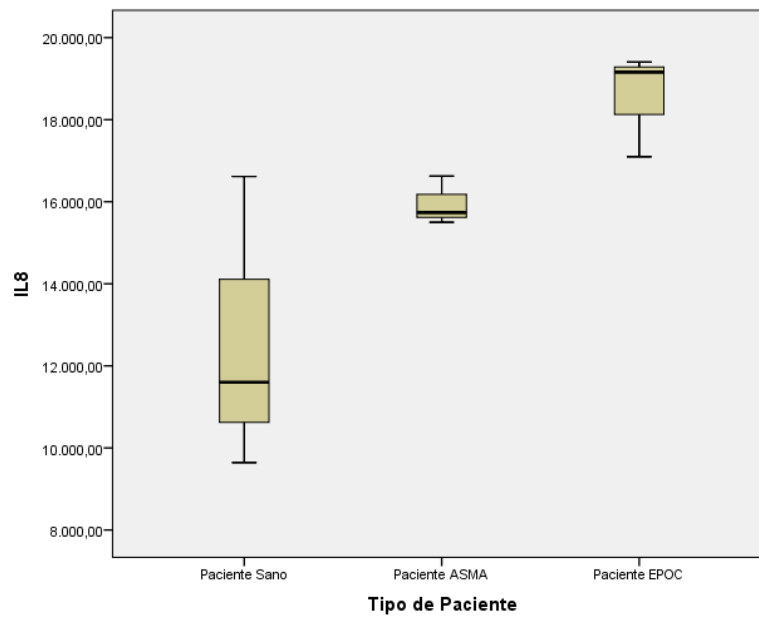
h. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

Gráficos de Normalidad









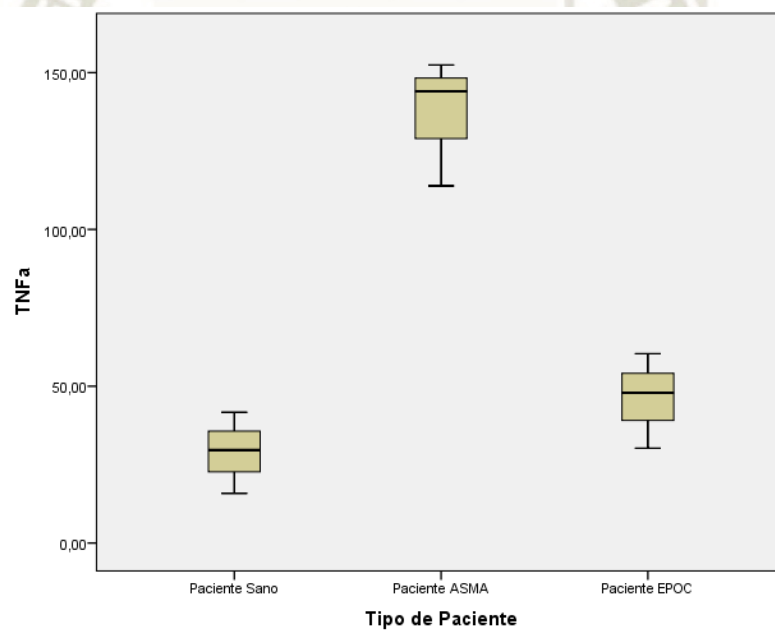
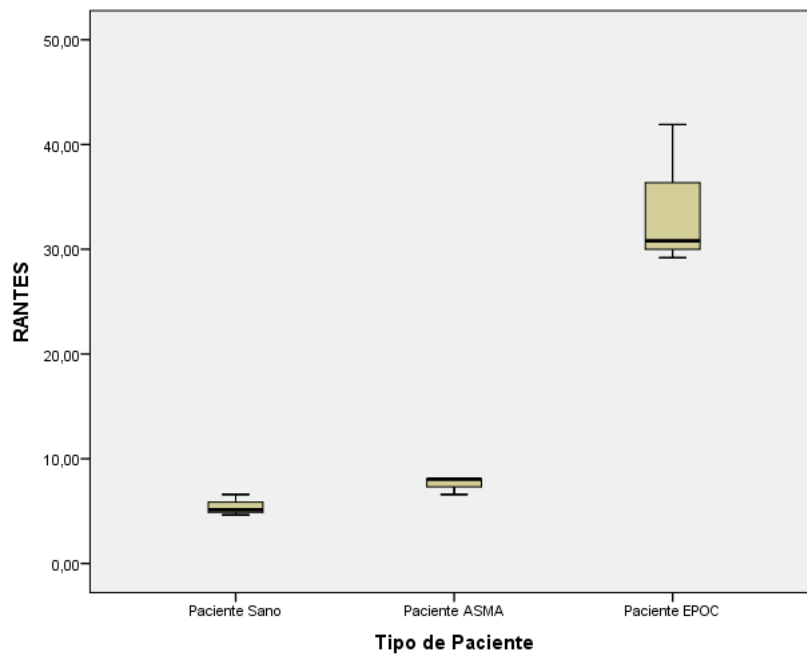


Tabla N°2

Estadístico de Kruskal Wallis para muestras independientes

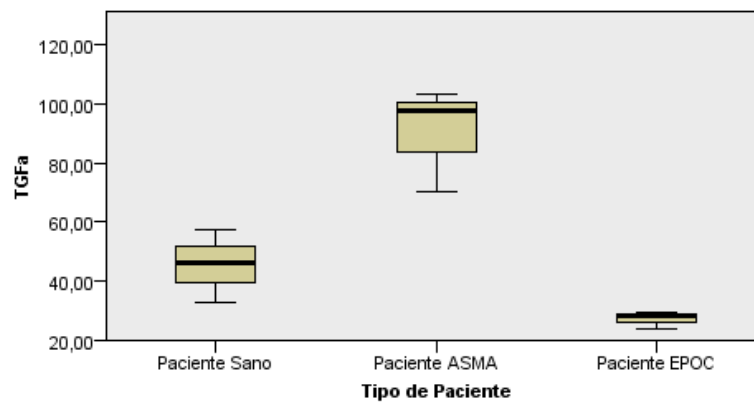
1. Citocina TGfα

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TGfα es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

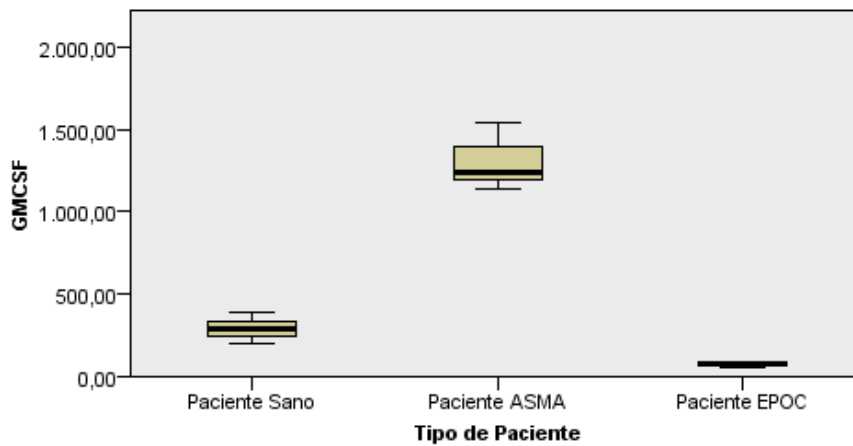
2. Citocina GMCSF

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GMCSF es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

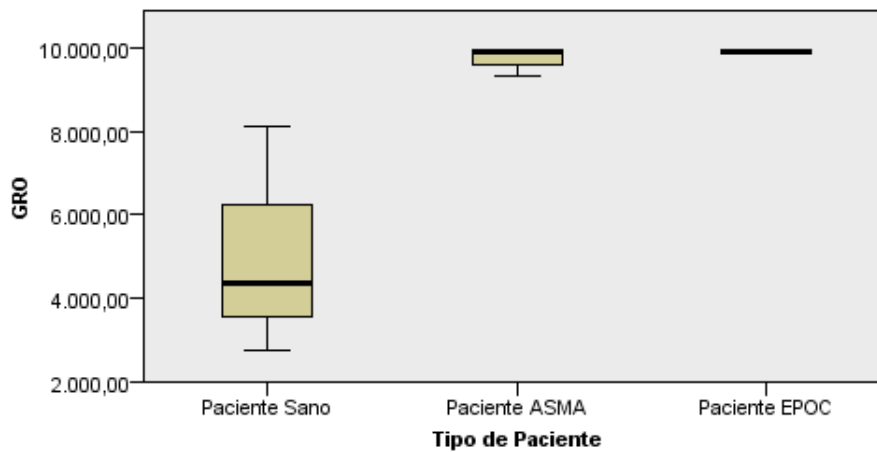
3. Citocina GRO

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GRO es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	35,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,720
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,035

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

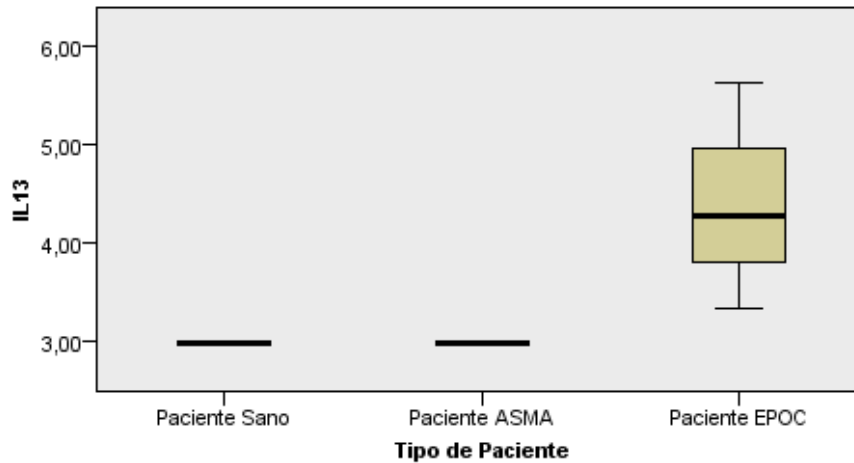
4. Citocina IL13

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL13 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	22,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,624
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,022

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

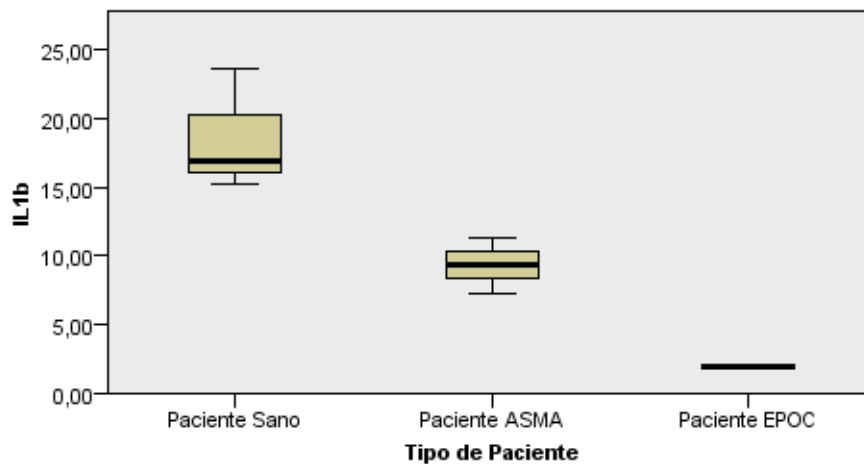
5. Citocina IL1b

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL1b es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	24,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,448
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,024

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

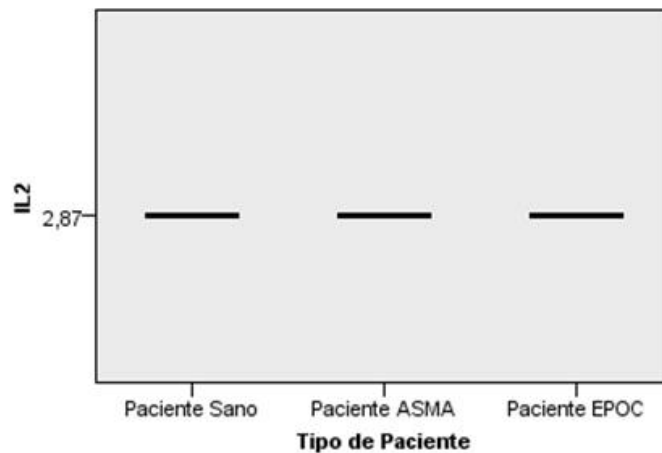
6. Citocina IL2

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL2 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1,000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

7. Citocina IL6

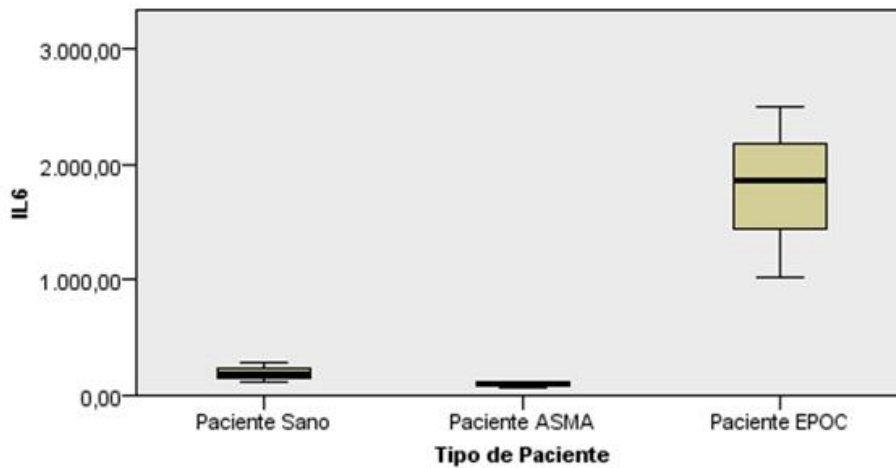
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL6 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

8. Citocina IL8

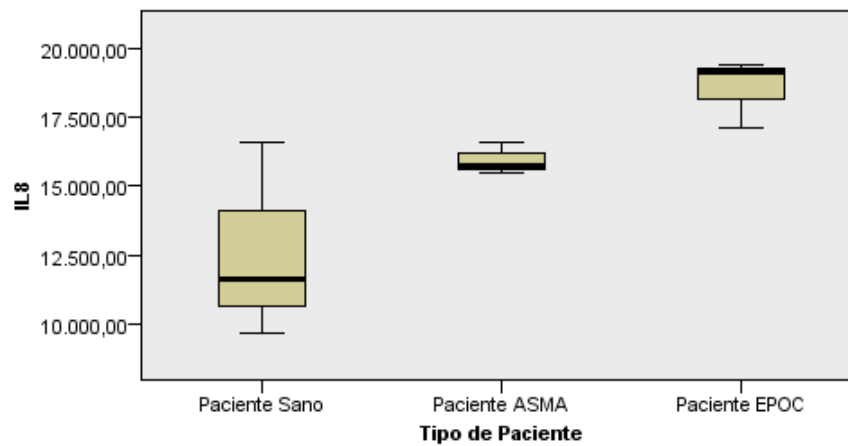
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL8 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	51,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,956
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,051

Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

9. Citocina MCP1

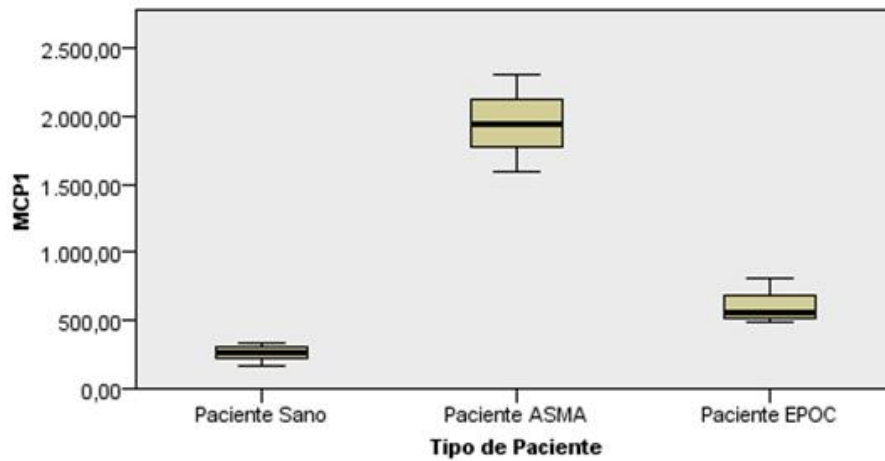
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de MCP1 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

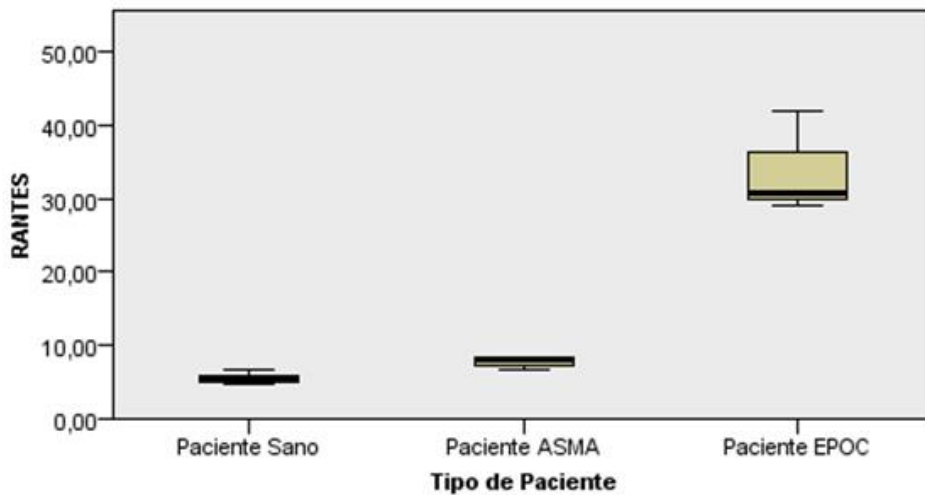
10. Citocina RANTES

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de RANTES es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	31,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,938
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,031

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

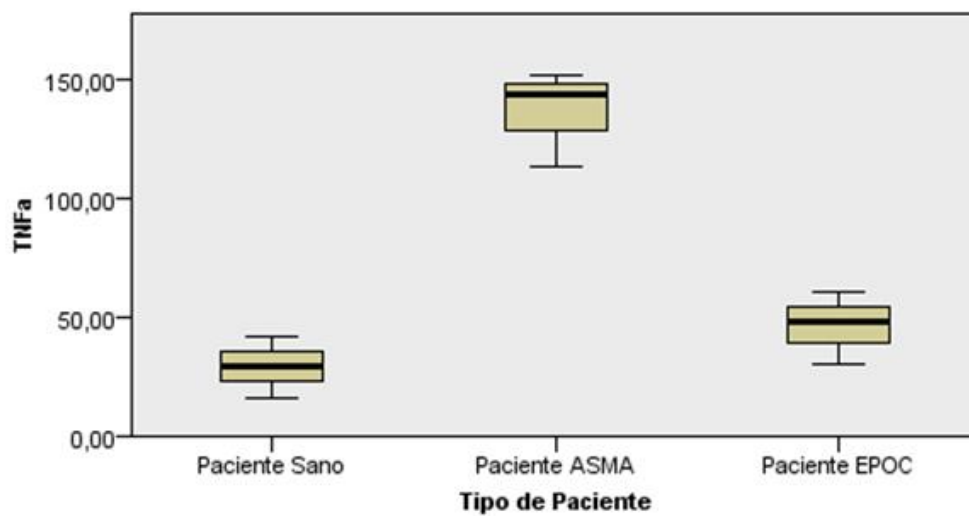
11. Citocina TNFa

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TNFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	39,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,489
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,039

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Un día de exposición a las Partículas Ultrafinas (PM_{0,1})

Tabla N°1
Pruebas de Normalidad

Pruebas de normalidad^{b, c, d, e, f, g, h, i}							
	Tipo de Paciente	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TGfFa	Paciente Sano	,304	3	.	,908	3	,412
	Paciente ASMA	,341	3	.	,847	3	,233
	Paciente EPOC	,240	3	.	,974	3	,692
GMCSF	Paciente Sano	,315	3	.	,891	3	,359
	Paciente ASMA	,308	3	.	,902	3	,391
	Paciente EPOC	,250	3	.	,967	3	,652
GRO	Paciente Sano	,196	3	.	,996	3	,879
	Paciente ASMA	,197	3	.	,996	3	,873
IL13	Paciente EPOC	,284	3	.	,933	3	,499
IL1b	Paciente Sano	,212	3	.	,990	3	,812
	Paciente ASMA	,202	3	.	,994	3	,852
IL6	Paciente Sano	,331	3	.	,866	3	,284
	Paciente ASMA	,246	3	.	,970	3	,667
	Paciente EPOC	,310	3	.	,898	3	,380
IL8	Paciente Sano	,205	3	.	,993	3	,841
	Paciente ASMA	,273	3	.	,945	3	,549
	Paciente EPOC	,361	3	.	,807	3	,132
MCP1	Paciente Sano	,364	3	.	,800	3	,114
	Paciente ASMA	,176	3	.	1,000	3	,981
	Paciente EPOC	,316	3	.	,889	3	,351
RANTES	Paciente Sano	,202	3	.	,994	3	,851
	Paciente ASMA	,291	3	.	,925	3	,469
	Paciente EPOC	,271	3	.	,947	3	,558
TNfFa	Paciente Sano	,185	3	.	,998	3	,922
	Paciente ASMA	,335	3	.	,858	3	,262
	Paciente EPOC	,175	3	.	1,000	3	,999

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. GRO es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

c. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

d. IL13 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

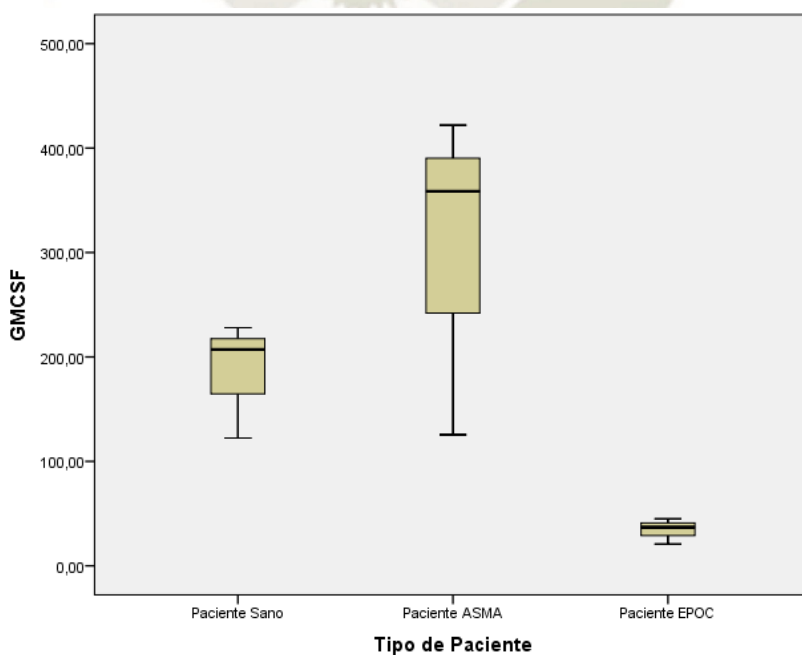
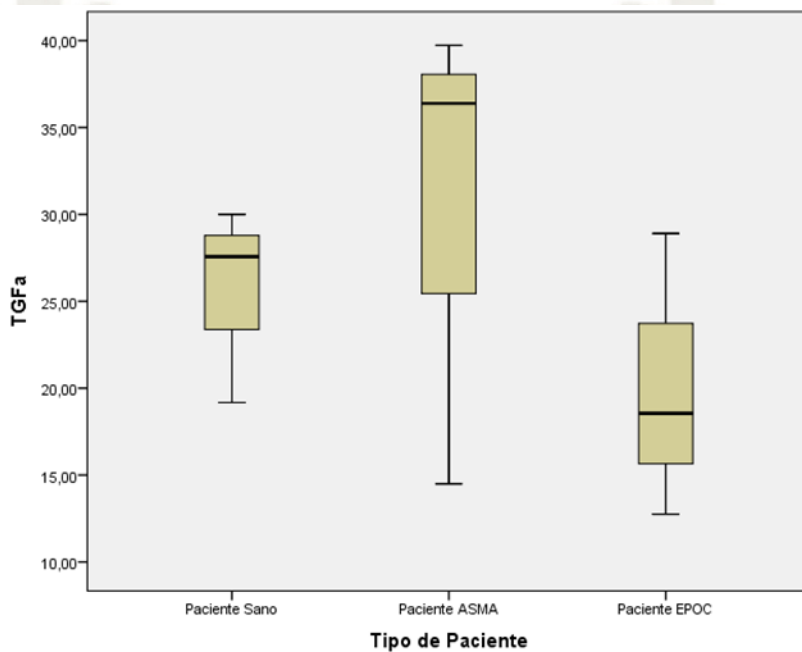
e. IL1b es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

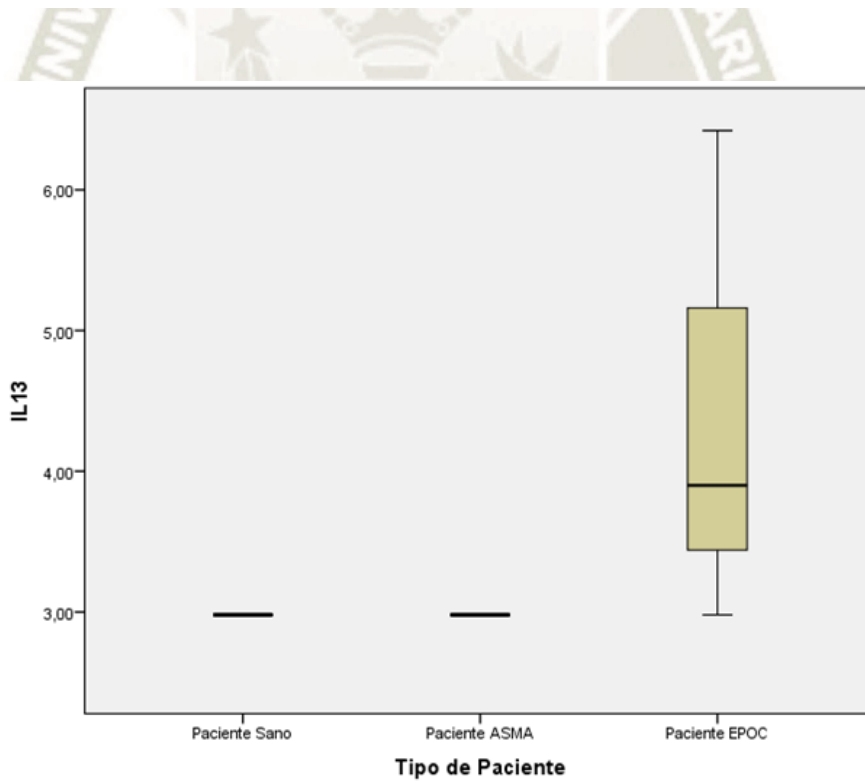
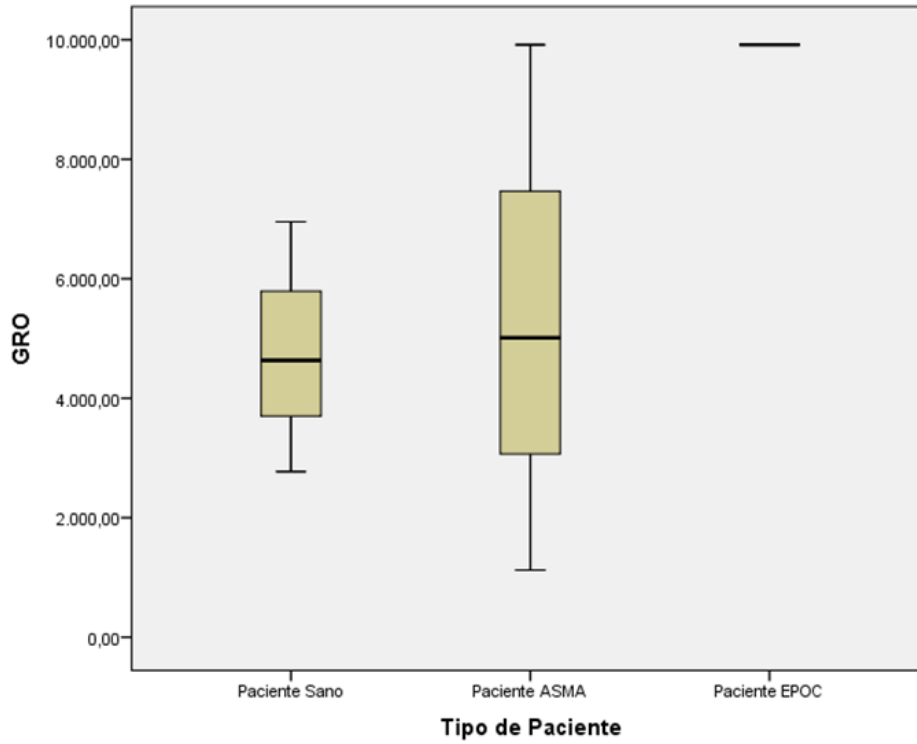
f. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente Sano. Se ha omitido.

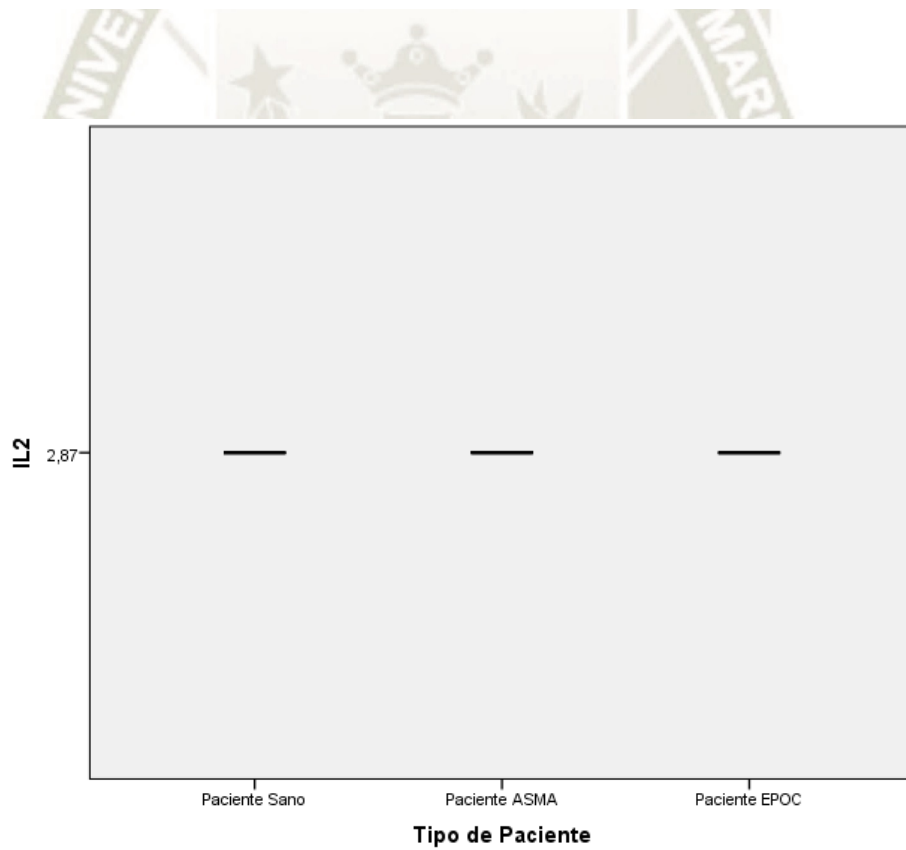
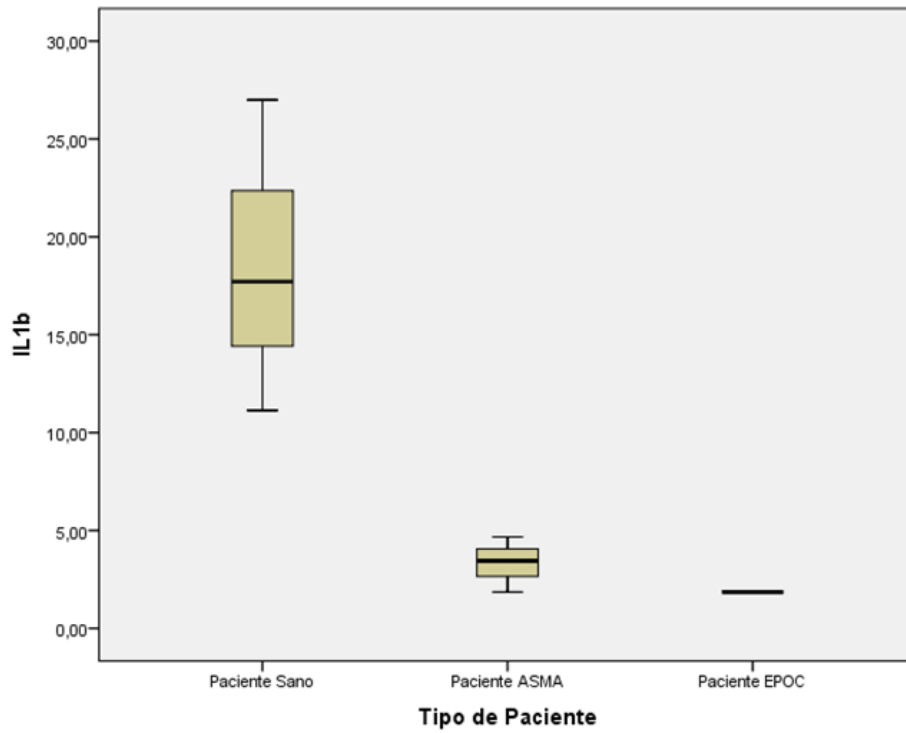
g. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente ASMA. Se ha omitido.

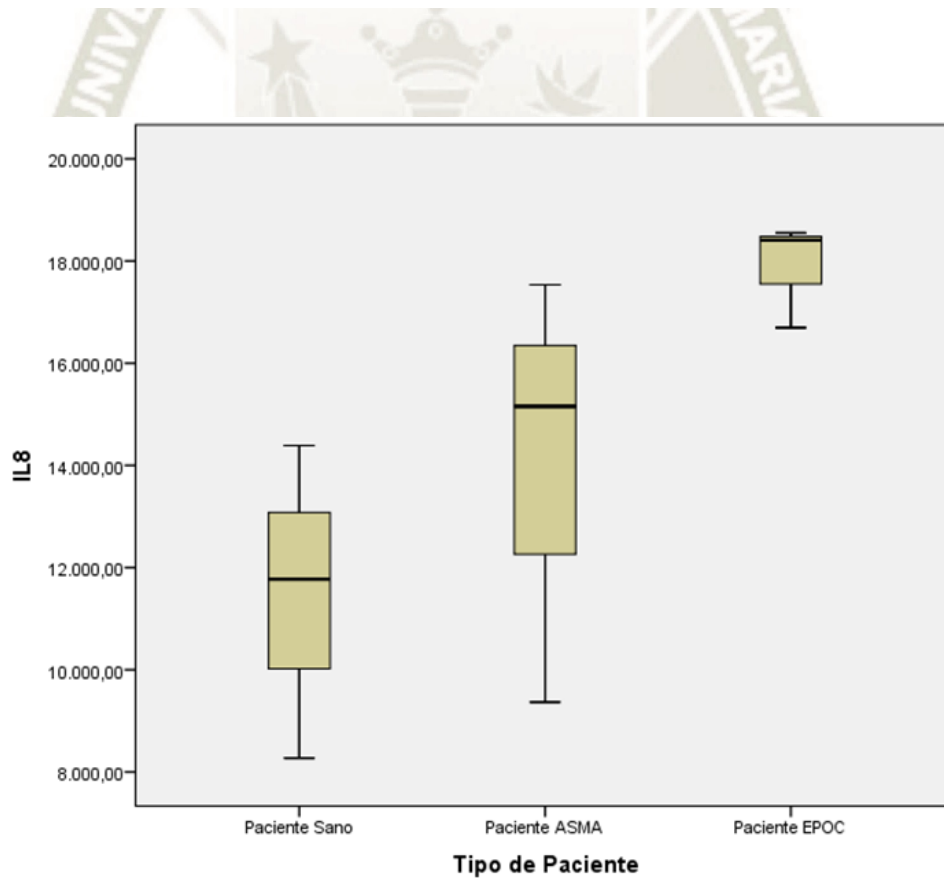
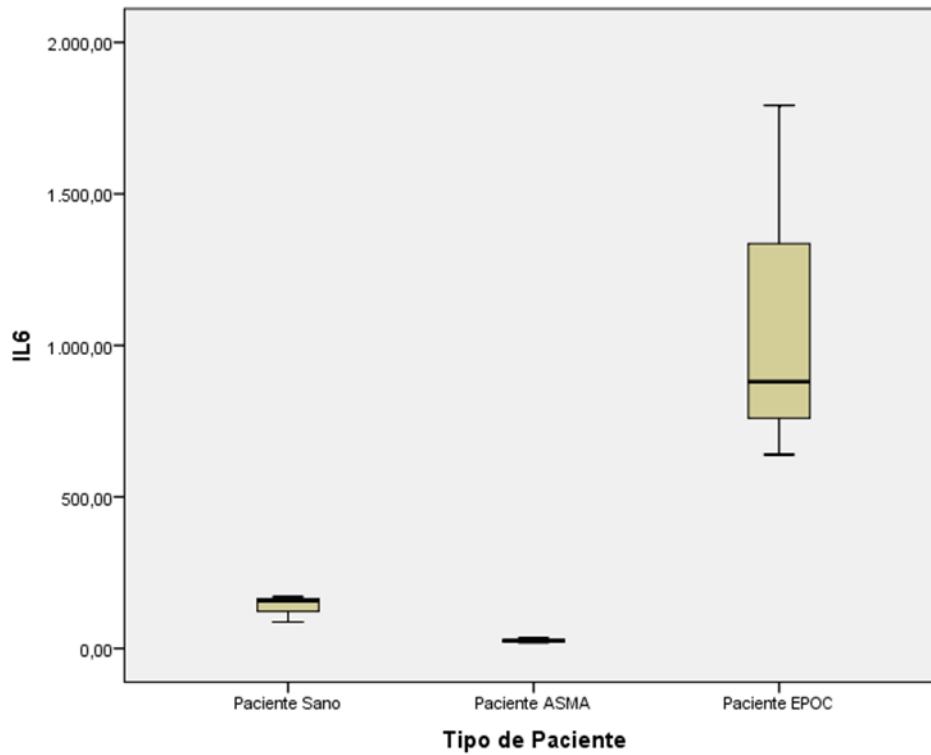
h. IL2 es constante cuando Tipo de Paciente = Paciente EPOC. Se ha omitido.

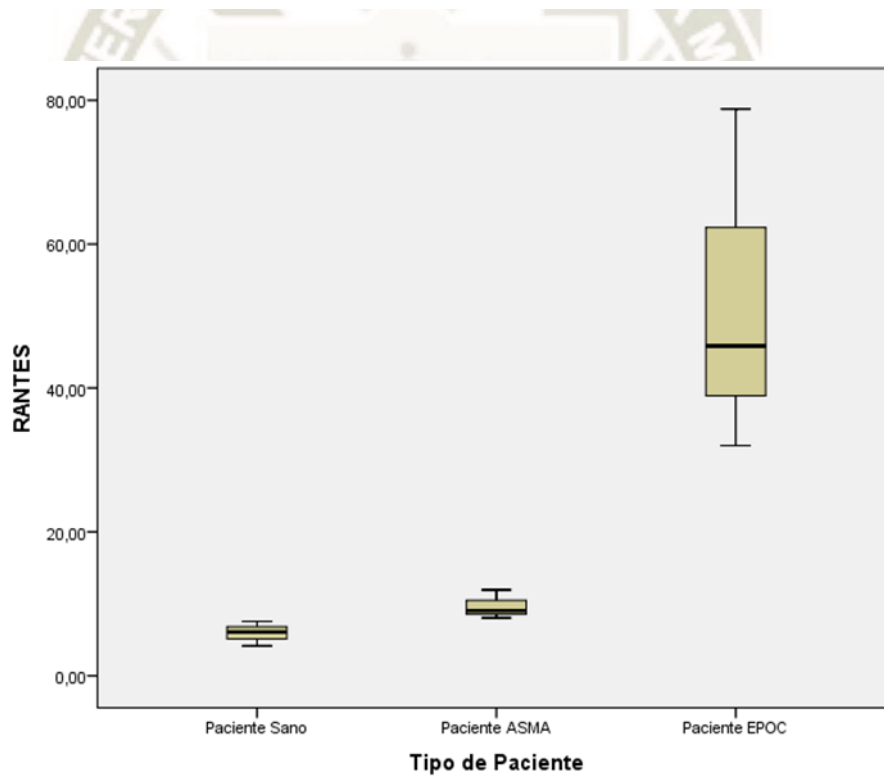
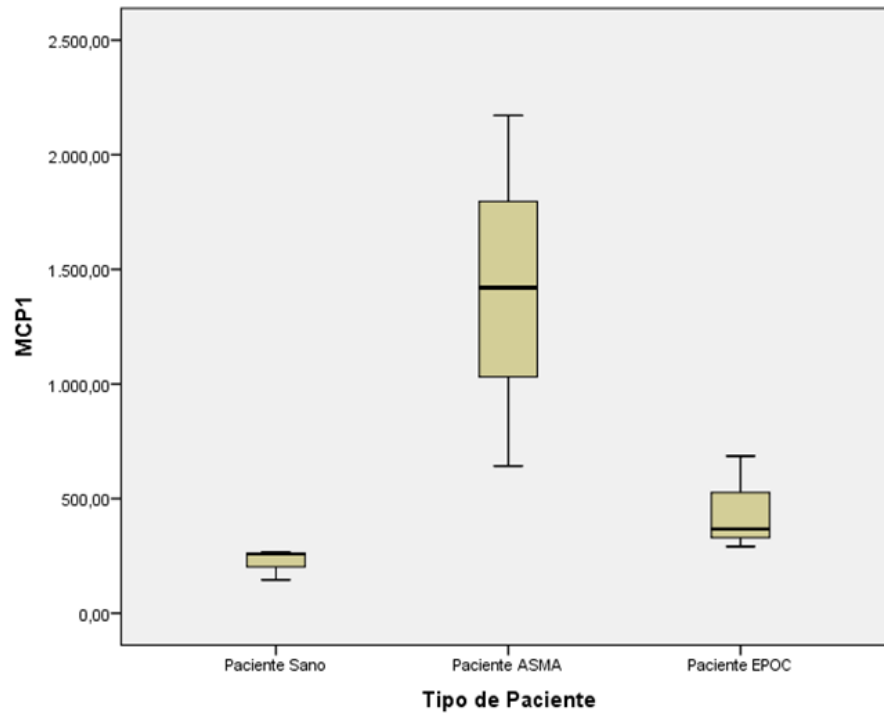
Gráficos de Normalidad











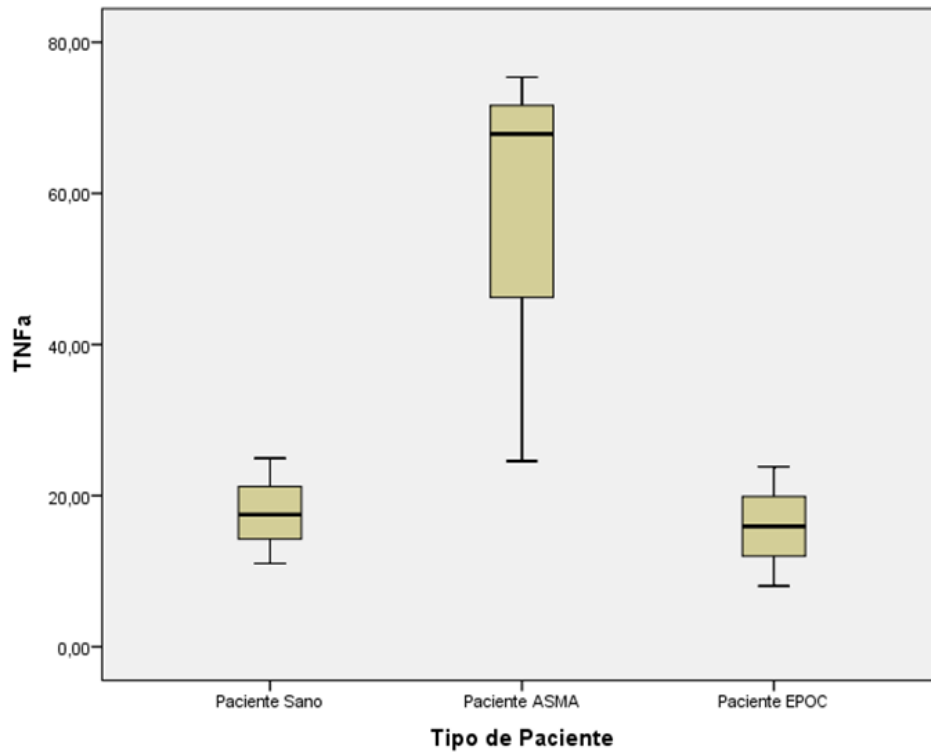


Tabla N°2

Estadístico de Kruskal Wallis para muestras independientes

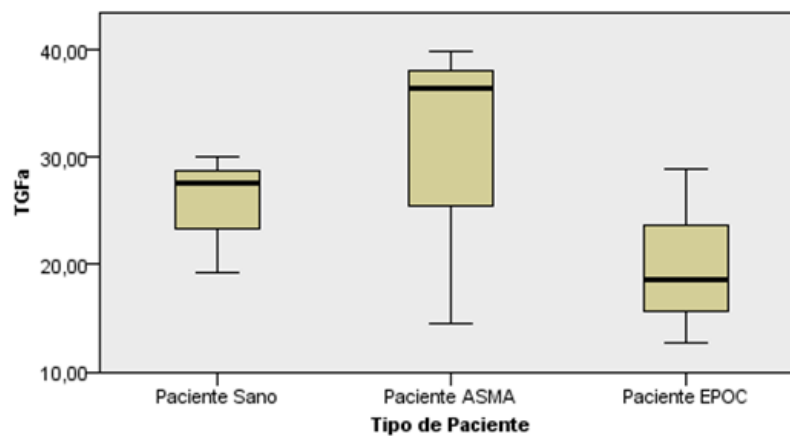
1. Citocina TGfα

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TGfα es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,393	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	1,867
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,393

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

2. Citocina GMCSF

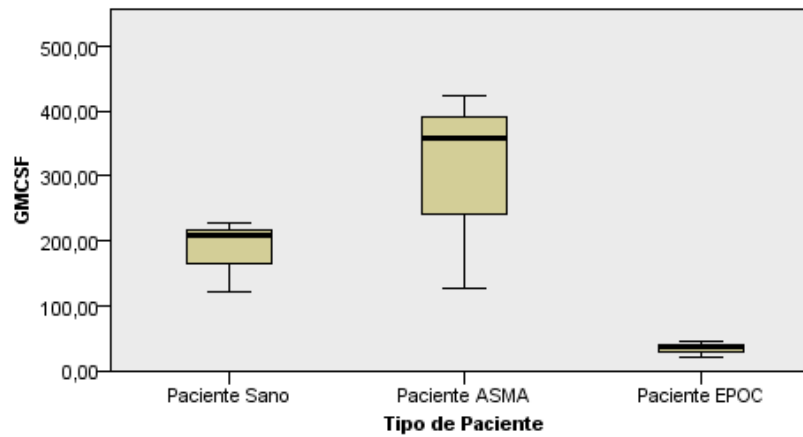
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GMCSF es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	51,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,956
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,051

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

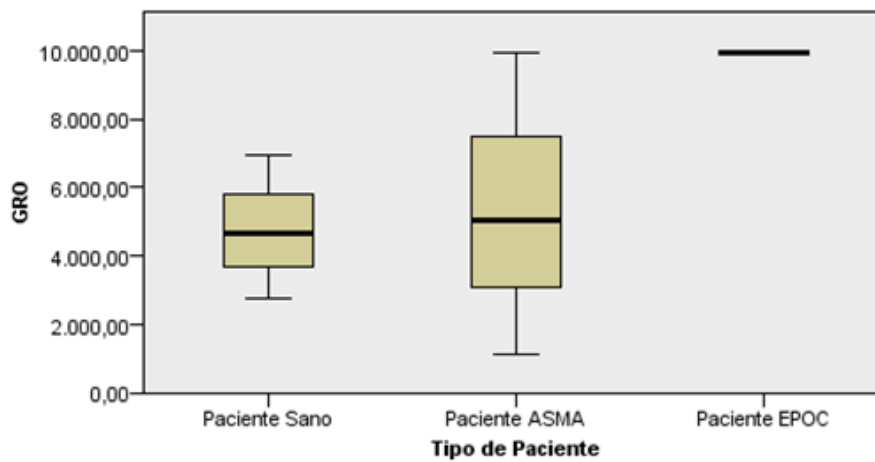
3. Citocina GRO

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de GRO es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	120,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	4,242
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,120

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

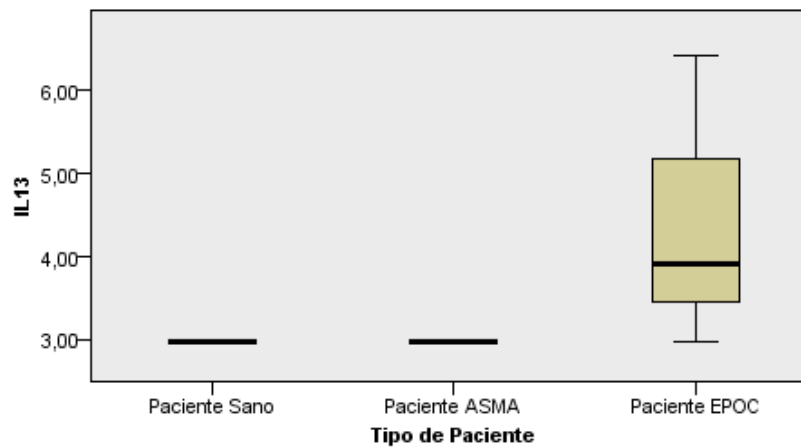
4. Citocina IL13

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL13 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	105,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	4,500
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,105

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

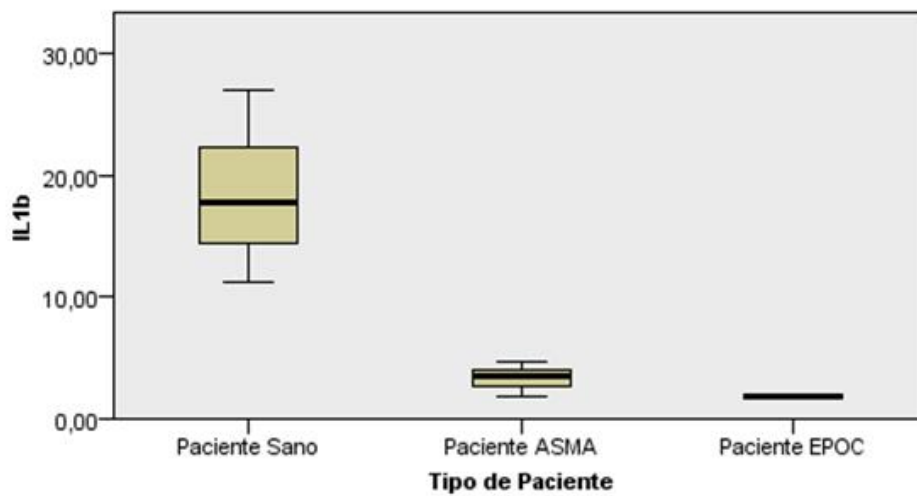
5. Citocina IL1b

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL1b es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	34,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,764
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,034

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

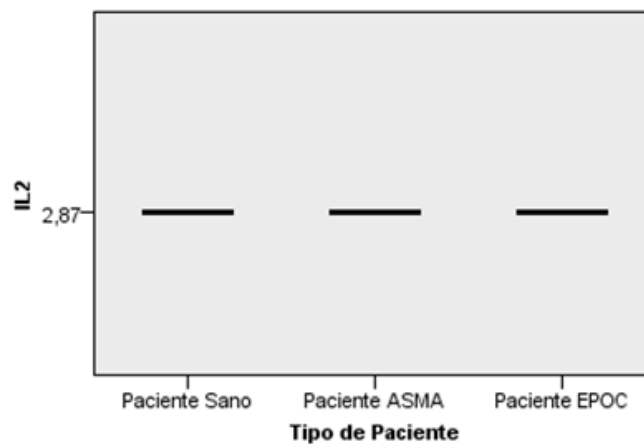
6. Citocina IL2

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL2 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	1.000,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	,000
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	1,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

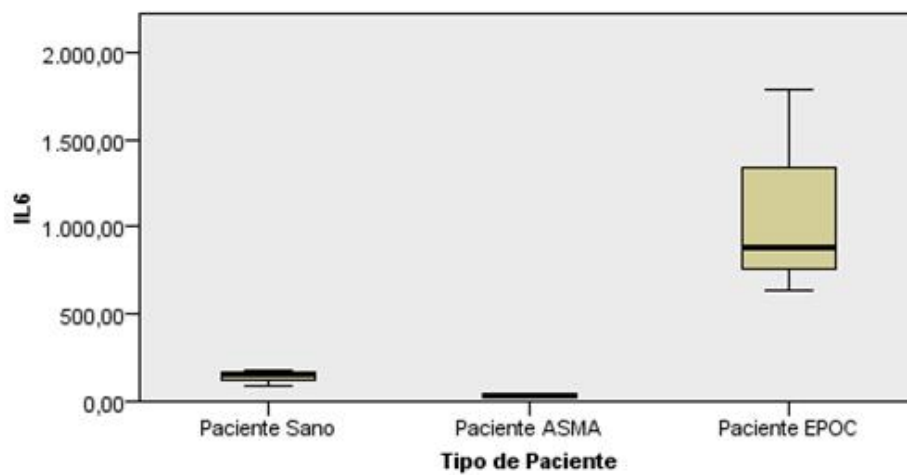
7. Citocina IL6

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL6 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

8. Citocina IL8

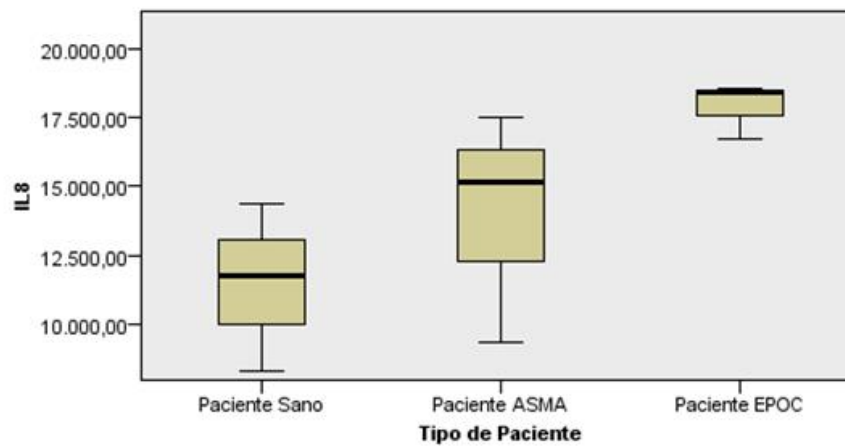
Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de IL8 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	79,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	5,067
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,079

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.
2. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

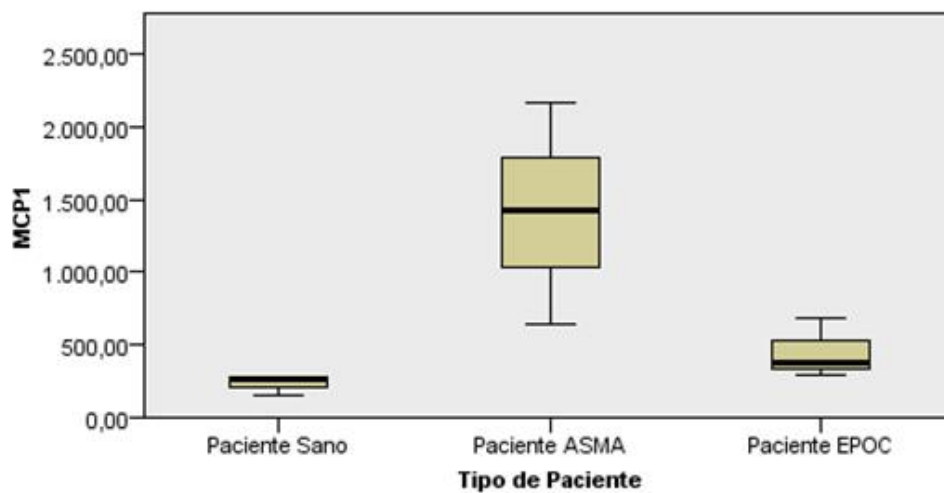
9. Citocina MCP1

Resumen de prueba de hipótesis

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1 La distribución de MCP1 es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	39,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	6,489
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,039

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

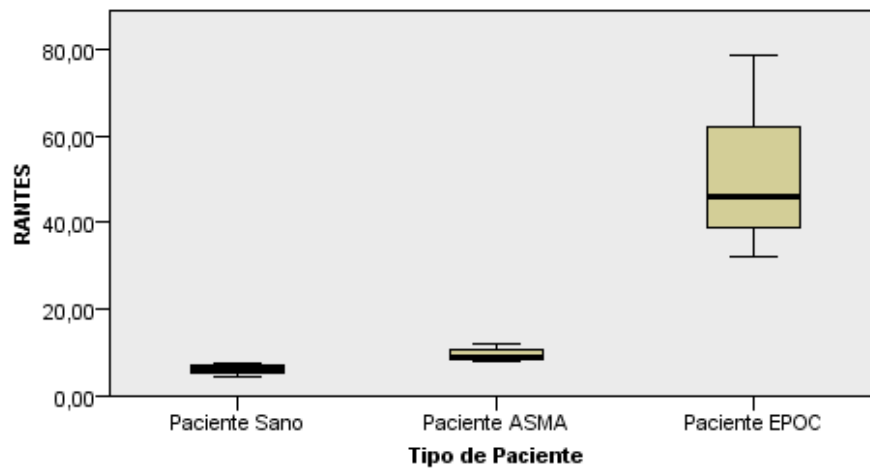
10. Citocina RANTES

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de RANTES es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	27,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	7,200
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,027

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

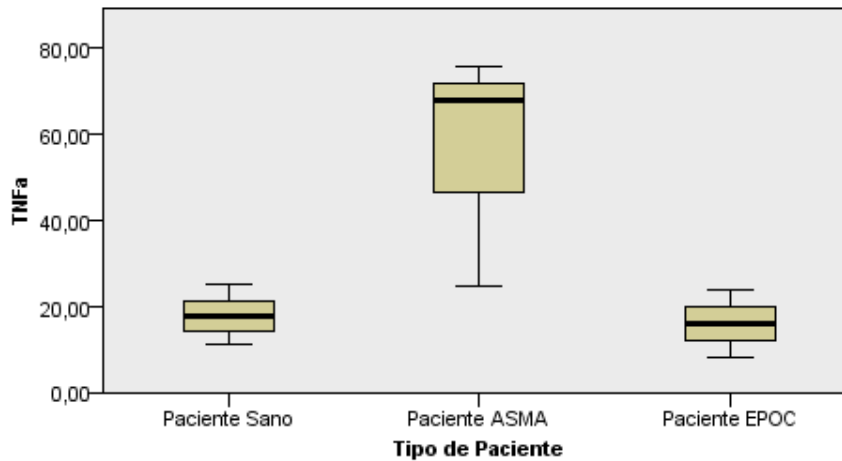
11. Citocina TNFa

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de TNFa es la misma entre las categorías de Tipo de Paciente.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	99,000	Retener la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



N total	9
Estadístico de contraste	4,622
Grados de libertad	2
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,099

Los estadísticos de prueba se ajustan para empates. No se realizan múltiples comparaciones porque la prueba global no muestra diferencias significativas en las muestras.

ANEXO 3

Caracterización química de las partículas finas (PM_{2.5})

PM _{2,5}														
Elemento químico	As	Ba	Be	Cd	Ce	Co	Cs	Cu	La	Mn	Mo	Ni	Pb	Rb
Concentración (µg/g)	23,0	140,3	0,4	16,9	8,5	5,4	4,4	367,0	8,4	1350,4	25,6	98,7	399,4	26,3
Elemento químico	Sb	Sn	Sr	Tl	Zn	Cr	V	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	Si
Concentración (µg/g)	47,1	49,6	91,8	3,0	4000,2	97,3	75,0	5250,2	17904,5	16406,1	1240,3	6591,3	43510,8	9383,5

Caracterización química de las partículas finas (PM_{0.1})

PM _{0.1}														
Elemento químico	As	Ba	Be	Cd	Ce	Co	Cs	Cu	La	Mn	Mo	Ni	Pb	Rb
Concentración (µg/g)	0,17	0,17	0,00	0,05	0,02	0,03	0,02	1,15	0,01	1,57	0,10	0,54	1,46	0,12
Elemento químico	Sb	Sn	Sr	Tl	Zn	Cr	V	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	Si
Concentración (µg/g)	0,13	0,30	0,13	0,02	6,64	0,33	0,53	9,78	32,01	27,72	82,00	17,13	764,5	20,43