

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



**ESTUDIO TOXICOLÓGICO DE CÉLULAS EPITELIALES
BRONQUIALES HUMANAS (CEBH) EXPUESTAS A
PARTICULAS FINAS Y PARTICULAS ULTRAFINAS
ATMOSFÉRICAS.**

Tesis presentada por la Bachiller:

Fernández Llerena Ana Sandra

Para optar por el título profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Dra. Nieto Montesinos Rita Milagros

Arequipa – Perú

2021

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

Expediente N°. 20180000050137
N° Trámite en Fac. 1768-2018
Fecha 16-11-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: FERNANDEZ LLERENA, Ana Sandra

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"ESTUDIO TOXICOLOGICO EN CELULAS BRONQUIALES BEAS-2B EXPUESTAS A NANO Y MICRO PARTICULAS ATMOSFERICAS LILLE-FRANCIA, 2018"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar 2) Dra. Gaby Velasco Lozano

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 :

Fecha 18/03/19

ASESOR: Dra. Rita Nieto Montesinos

DICTAMEN DE ASESOR:

Se ha procedido a revisar el manuscrito propuesto y hechas las correcciones y sugerencias, el presente proyecto está listo para su dictamen por los jurados.

Firma

Dra. Rita Nieto Montesinos
Código: 3137

Fecha 23-08-2021

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) Dra. Gaby Velasco Lozano
2) Dra. Karín Vera López

3) 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 las recurrentes, sugiriendo cambiar el título a: "ESTUDIO TOXICOLOGICO DE CELULAS EPITELIALES BRONQUIALES HUMANAS (CEBH) EXPUESTAS A PARTICULAS FINAS Y PARTICULA ULTRAFINAS ATMOSFERICAS", 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 de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma

Fecha 26-10-2021

JURADOS: Presidente

Vocal

Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha:

Hora:

Local: C- 402 (SUM)

DECANO



DEDICATORIA

A Dios por la manera en cómo me ha bendecido por darme la vida y esta oportunidad de poder crecer personal y profesionalmente, a mi esposo por su amor incondicional, paciencia y apoyo en todo momento, a mi madre por ser el pilar de todas las cosas que he hecho y la persona que me ha apoyado siempre, definitivamente sin ella nada de esto hubiese sido posible, a mi hermano que siempre ha creído en mí y en lo que puedo hacer, a mi abuelita Ana que aunque ya no está siempre tuvo palabras de ánimo y aliento para mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a y todas las personas que participaron tanto de cerca como de lejos para llevar a cabo este trabajo.

Para comenzar, agradezco a Dios, a mi esposo por su amor incondicional, paciencia, a mi madre por ser el pilar de todas las cosas que he hecho y la persona que me ha apoyado siempre.

Quiero agradecer también a la universidad Católica de Santa María a los docentes amigos que hicieron que ir a la universidad no sea una obligación sino un gusto, a la Dra. Roxana y al equipo de relaciones internacionales por la oportunidad de hacer mi internado en Francia.

Muchísimas gracias Jules y Yara por acompañarme a lo largo de mi estadía en Francia, por guiarme, ayudarme y enseñarme a amar la investigación.

Agradezco también al Sr. Garçon director del equipo de investigación de Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine y mi tutor, por su paciencia y por compartir conmigo su experiencia en la realización de pruebas toxicológicas.

Finalmente, de manera especial a mi asesora la Dra. Nieto Montesinos Rita y a cada una de mis dictaminadoras, Dra. Gutiérrez Roxana, Dra. Velasco Gaby y Dra. Vera Karin, por el apoyo y tiempo brindado durante la redacción de este trabajo de investigación. Gracias por ser parte de mi formación profesional y por la confianza brindada a lo largo de todo este tiempo.

RESUMEN

Los niveles de material particulado (MP) ambiental superan regularmente los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud en la mayoría de las áreas urbanas. Numerosos estudios experimentales ya han demostrado la toxicidad inducida por la fracción fina de MP ($PF_{2.5\mu m}$) en las vías respiratorias, principalmente desencadenada por la inflamación inducida por estrés oxidativo. Sin embargo, solo unos pocos estudios han prestado mucha atención a la fracción ultrafina de PM ($PUF_{0.1\mu m}$), que probablemente se internalice más fácilmente en las células y sea más reactiva biológicamente. En esta investigación se demostró que las superficies de las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ en la zona urbano-industrial de Dunkerque, presentan diversos compuestos nocivos, incluso reactivos (derivados cíclicos aromáticos y metales pesados), conformando grupos aromáticos alrededor de 283.8 eV, hidrocarburos alifáticos alrededor de 284.6 eV, monóxido de carbono alrededor de 286 eV y dióxido de carbono alrededor de 288 eV. Las células epiteliales bronquiales humanas CEBH, se expusieron de manera aguda y repetidamente a dosis relativamente bajas ($5 \mu g \cdot cm^{-2}$) de $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$, considerando una viabilidad de 95% y una dosis letal de 15%, para evaluar la citotoxicidad y para observar mejor los cambios críticos en la morfología, las funciones y la dinámica mitocondrial. Después de la exposición celular a dosis sub-apoptóticas de $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$, se incrementó la fosforilación oxidativa, así como la masa mitocondrial, lo que resultó en una mayor producción de anión superóxido mitocondrial. Dado este impulso oxidativo, la vía de señalización Nrf2 se activó significativamente al 95% entre GPX (0.18), HO1 (0.31) y HQO1 (0.18). Sin embargo, se observaron alteraciones de la dinámica mitocondrial a favor de un proceso de fisión acentuado, inducido por $PUF_{0.1\mu m}$ a exposición repetida. Tomados en conjunto, estos resultados respaldaron el control de calidad mitocondrial y la disfunción del metabolismo como un mecanismo de toxicidad subyacente temprano en los pulmones, lo que condujo a una acumulación de mitocondrias defectuosas y una mayor generación de ERO endógenos. Por lo tanto, estas características podrían desempeñar un papel clave en el mantenimiento del estrés oxidativo y la inflamación inducidos por MP dentro de las células pulmonares, lo que

podría contribuir de manera espectacular a la exacerbación de enfermedades pulmonares crónicas inflamatorias.

Los hallazgos de este trabajo también podrían ofrecer nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la toxicidad pulmonar.

Palabras Claves: Toxicológica, Células epiteliales bronquiales, partículas finas, ultrafinas y atmósfera.



ABSTRACT

Environmental particulate matter (PM) levels regularly exceed the reference values set by the World Health Organization in most urban areas. Numerous experimental studies have already demonstrated the toxicity induced by the fine fraction of MP (PF_{2.5}µm) in the airways, mainly triggered by inflammation induced by oxidative stress. However, only a few studies have paid much attention to the ultrafine fraction of PM (PUF_{0.1} µm), which is likely to be more easily internalized into cells and is more biologically reactive. In this research it was shown that the surfaces of PF_{2.5}µm and PUF_{0.1}µm in the urban-industrial area of Dunkerque, present various harmful compounds, even reactive ones (aromatic cyclic derivatives and heavy metals), forming aromatic groups around 283.8 eV, aliphatic hydrocarbons around 284.6 eV, carbon monoxide around 286 eV and carbon dioxide around 288 eV. CEBH human bronchial epithelial cells were acutely and repeatedly exposed to relatively low doses (5 µg.cm⁻²) of PF_{2.5}µm and PUF_{0.1}µm, considering a viability of 95% and a lethal dose of 15%, to assess cytotoxicity and to better observe critical changes in mitochondrial morphology, functions, and dynamics. After cellular exposure to sub-apoptotic doses of PF_{2.5}µm and PUF_{0.1}µm, oxidative phosphorylation increased, as well as mitochondrial mass, resulting in increased production of mitochondrial superoxide anion. Given this oxidative impulse, the Nrf2 signaling pathway was significantly activated at 95% between GPX (0.18), HO1 (0.31) and HQO1 (0.18). However, alterations in mitochondrial dynamics were observed in favor of an accentuated fission process, induced by PUF_{0.1}µm at repeated exposure. Taken together, these results supported mitochondrial quality control and metabolic dysfunction as an underlying mechanism of early toxicity in the lungs, leading to an accumulation of defective mitochondria and increased generation of endogenous ROS. Therefore, these characteristics could play a key role in maintaining MP-induced oxidative stress and inflammation within lung cells, which could dramatically contribute to the exacerbation of chronic inflammatory lung diseases.

The findings of this work could also offer new insights into the pathophysiology of pulmonary toxicity.

Key Words: Toxicological, bronchial epithelial cells, fine particles, ultrafine and atmosphere.



INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire se ha convertido en un gran problema para la sociedad del siglo XXI debido a su asociación con enfermedades respiratorias.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la contaminación ha originado una carga de morbilidad derivada de accidentes cerebrovasculares, cánceres de pulmón y neuropatías crónicas y agudas, entre ellas el asma^(1,4). No obstante, estudios clínicos y epidemiológicos han dado a conocer que la exposición constante a partículas atmosféricas tiene relación con infecciones respiratorias agudas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad cardiovascular^(2,5,8,9).

El material particulado (MP) se ha convertido en un indicador representativo común de la contaminación del aire. Los principales son los sulfatos, los nitratos, el amoníaco, el cloruro de sodio, el hollín, entre otros⁽⁹⁴⁾.

Estudios de deposición y eliminación respiratoria de partículas realizados en la década de los años 80 revelaron que las micropartículas del aire que son inhaladas por el ser humano, conocidas como partículas finas con diámetros aerodinámicos mayores a $2.5\mu\text{m}$ ($\geq\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$) pueden penetrar y alojarse profundamente dentro de los pulmones⁽³⁾. Es en el año 1980 que las micropartículas fueron consideradas en los estándares de calidad del aire definido por la OMS⁽⁷⁾.

Desde el año 2010, diversas investigaciones⁽³⁾ intentan demostrar que existen otras partículas (nano partículas) aún más dañinas para la salud, conocidas con el nombre de partículas ultrafinas con un diámetro aerodinámico mayor o igual a $0.1\mu\text{m}$ y menor a $2.5\mu\text{m}$ ($\geq\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$)⁽⁹⁴⁾.

Un estudio publicado en el 2016 por la Agencia de Salud Pública de Francia ha estimado que aproximadamente 48000 son los casos de muertes prematuras por exposición directa o indirecta a $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ y $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ contaminadas presentes en el ambiente^(1,2).

En el 2017, en Perú el Ministerio del Ambiente (MINAM) autorizó al Gobierno Regional de Arequipa realizar un “Plan de Acción” relacionado a la calidad del aire. El resultado estadístico de dicho estudio indicó que producto de la contaminación por

MP, la población infantil se encontraba afectada frecuentemente por patologías neumológicas conocidas como Síndrome de Obstrucción Bronquial Aguda (SOBA) y Asma Bronquial⁽⁵⁾.

En la actualidad el MP que incluye $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$, es estudiado a nivel mundial ya que están presentes en el medio ambiente en gran número y podrían explicar algunos de los efectos tóxicos encontrados en enfermedades respiratorias.

Es así que estas partículas podrían contribuir principalmente en los efectos nocivos causados por la contaminación del aire, aunque los mecanismos biológicos aún no han sido enteramente comprendidos⁽⁹⁾.

Además, diferentes estudios han demostrado que la contaminación por nano o micro partículas atmosféricas puede desencadenar enfermedades pulmonares inflamatorias crónicas, sin embargo, los mecanismos de inicio y mantenimiento de la inflamación bronquial aún están en estudio^(12,15).

Los resultados de las investigaciones toxicológicas realizadas *in vivo* e *in vitro* durante el 2017⁽¹⁰⁾ han mostrado que, las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$, producen una gran respuesta inflamatoria e inducen a varios tipos de efectos tóxicos adversos.

Por lo tanto, este estudio busca demostrar que, al realizar una exposición de partículas atmosféricas a células pulmonares, estas podrían desencadenar una respuesta oxidativa biológica, poniendo en manifiesto una alteración en el funcionamiento y desarrollo, esto puede incluir muerte celular.

INDICE GENERAL

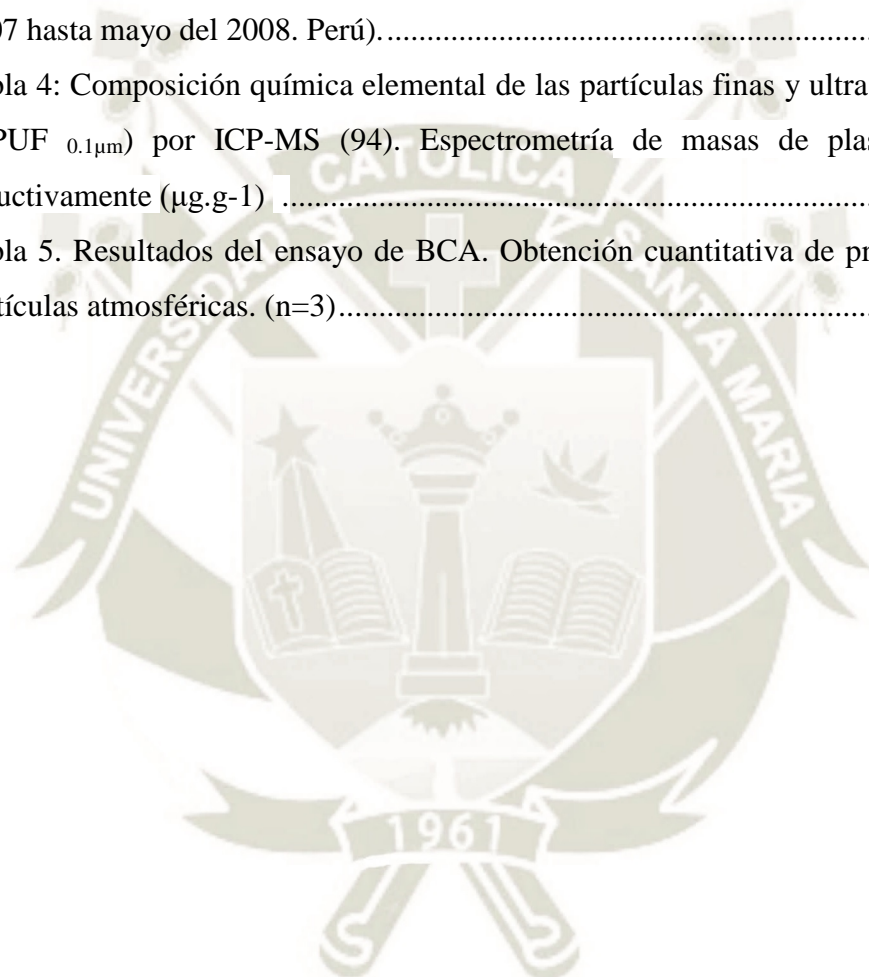
	Pág.
DICTAMEN APROBATORIO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN	ix
CAPITULO I	18
1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO	18
1.1. OBJETIVOS	18
1.2. LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.....	18
1.2.1. Definición	18
1.2.2. Múltiples contaminantes del aire	19
1.2.3. Material particulado	22
1.2.4. Composición fisicoquímica del MP.....	26
1.2.5. Nanopartículas de ZnO y TiO ₂	28
1.2.6. Análisis químicos para la determinación de la composición fisicoquímica del MP.....	29
1.2.7. Análisis Inorgánicos	30
1.2.8. Análisis Orgánicos.....	31
1.2.9. Análisis por métodos de haz de electrones.	31
1.2.10. Contexto epidemiológico.....	33
1.3. APARATO RESPIRATORIO	34
1.4. COMPORTAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS FINAS Y ULTRA FINAS EN EL APARATO RESPIRATORIO.....	38

1.5. CÉLULAS INMORTALIZADAS EPITELIALES BRONQUIALES HUMANAS (CEBH).....	41
1.6. IMPACTO CITOTÓXICO PRODUCIDO POR PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS.....	41
1.6.1. Estrés Oxidativo.....	45
1.6.2. Defensa Antioxidante	46
1.7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.....	51
1.8. ANÁLISIS MICROSCÓPICO.....	53
1.8.1. Microscopía de Transmisión electrónica	53
1.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	54
1.10. HIPOTESIS	56
CAPITULO II.....	57
2. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL	57
2.1. TÉCNICA, INSTRUMENTOS Y MATERIALES D VERIFICACIÓN ...	57
2.1.1. Material biológico.....	57
2.1.2. Instrumentos Utilizados	57
2.1.3. Materiales y reactivos	58
2.2. CAMPO DE INVESTIGACIÓN	59
2.2.1. Ámbito de la Investigación.....	59
2.2.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de las PF _{2.5µm} y PUF _{0.1µm}	60
2.3. CULTIVO CELULAR.....	64
2.3.1. Preparación del medio.	64
2.3.2. Fase de multiplicación celular	64
2.3.3. Tripsinización	66
2.3.4. Preparación de las suspensiones de partículas	67
2.3.5. Exposición de células a las suspensiones de partículas	67

2.3.6.	Viabilidad celular luminiscente.	69
2.3.7.	Análisis microscópico por transmisión electrónica	70
2.3.8.	Cuantificación específica de proteínas NRF2, GPX, HO1, NQO1 por Western Blot.	71
CAPITULO III.....		74
3. RESULTADOS		74
3.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
3.2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
3.2.1.	Caracterización de las partículas.....	75
3.3.	VIABILIDAD CELULAR.....	79
3.4.	ESTUDIO MORFOLÓGICO CELULAR.....	81
3.4.1.	Estudio morfológico por microscopía de ampliación óptica (MAO). .	81
3.4.2.	Estudio morfológico por microscopía electrónica de transmisión (MET). 85	
3.5.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	87
CONCLUSIONES		96
RECOMENDACIONES.....		97
REFERENCIA.....		98
ANEXOS		121
Anexo 1. Preparación de Soluciones		121
Anexo 2: Dosaje de proteínas		122
Anexo 3. Preparación de dilución y placas.....		123
Anexo 4 : Tablas de resultados en excel western Blot		124
Anexo 5: Tabla de resultados comparativos de medias por Tukey.		125
Anexo 6: Tabla de resultados ANOVA		126

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de los principales contaminantes atmosféricos y sus fuentes. Organización Mundial de la Salud - Traducido.....	23
Tabla 2. Comparación de las concentraciones elementales promedio en MP ₁₀ (ng/m ³).	27
Tabla 3. Concentraciones elementales promedio en MP ₁₀ (ng/m ³) (Huancayo, agosto 2007 hasta mayo del 2008. Perú).....	28
Tabla 4: Composición química elemental de las partículas finas y ultra finas (PF _{2.5µm} y PUF _{0.1µm}) por ICP-MS (94). Espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (µg.g-1)	78
Tabla 5. Resultados del ensayo de BCA. Obtención cuantitativa de proteínas de las partículas atmosféricas. (n=3).....	88



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de emisiones por sector de actividad en la región de Norte-Paso de Calais- Francia. (ATMO-NORD- PAS –DE- CALAIS- HDF,2017-2018).....	21
Figura 2. El ciclo de la contaminación del aire.....	22
Figura 3. Mecanismos de formación del Material particulado (CEMCAP-2019).....	24
Figura 4: Diferencia entre los tamaños de las partículas $PF_{2.5}$ μm PF_{10} μm . (United States Environmental Protection Agency (Traducida))	26
Figura 5: Esquema del aparato respiratorio (easy anatomy, 2018).....	34
Figura 6: Mecanismo de deposición de partículas en el tracto respiratorio.....	39
Figura 7: Mecanismo de toxicidad de las partículas atmosféricas en las vías respiratorias.....	42
Figura 8: Modelo de los niveles de estrés oxidativo. Las diferentes etapas. Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire (LCTC) Université Paris 7 – France, 2007. (Traducido)	44
Figura 9: Los pasos estándar en Western Blotting. The Human Protein Atlas. (Traducido)	55
Figura 10: Ubicación geográfica del área de muestreo.....	60
Figura 11: Soluciones de $PF_{2.5\mu m}$ (izquierda) y $PUF_{0.1\mu m}$ (derecha) diluidas en HBSS.	63
Figura 12: Medio de cultivo LHC9 para las CEBH, preparado con todos los suplementos.	64
Figura 13: El diseño básico para trabajar cultivos en una campana celular (93). La flecha negra muestra el diseño de un frasco de cultivo celular.	65
Figura 14: Equipo de conteo celular	65
Figura 15: Incubadora de dióxido de carbono.	66
Figura 16: Placa de cultivo celular de 6 pozos.	66
Figura 17: Equipo de baño ultrasonido.....	67
Figura 18: Distribución de la placa para exposición aguda (n=1;Una sola exposición)	68
Figura 19: Elaboración de placa para exposición repetida (n=3; exposición repetida tres veces).	68
Figura 20: CellTiter-Glo® Sustrato y CellTiter-Glo® Buffer.....	69

Figura 21: Placas de 96 pozos conteniendo las muestras a ser leídas en el lector de placas.	70
Figura 22: Eppendorf preparados para la desnaturalización de proteína.	71
Figura 23: Sistema de transferencia de geles BioRad Trans-Blot Turbo.	72
Figura 24: Sistema de electroforesis de minicelda XCell SureLock	72
Figura 25: Medio de saturación preparado.	72
Figura 26: Sistema de detección de bandas Western	73
Figura 27: Estándar de análisis de proteínas para la carga directa en geles.	73
Figura 28. Análisis granulométrico de PF _{2.5µm} y PUF _{0.1µm}	75
Figura 29: Composición química elemental (expresada en cantidades porcentuales %) de las superficies de PF _{2.5µm} y PUF _{0.1µm}	77
Figura 30: Análisis porcentual de superficie por XPS.	78
Figura 31: Porcentajes (%) de supervivencia celular obtenidos al evaluar muestras celulares expuestas a diferentes concentraciones de partículas ambientales (PF _{2.5µm} , PUF _{0.1µm} , TiO ₂ y ZnO).	80
Figura 32: Porcentajes (%) de supervivencia celular obtenidos al evaluar muestras celulares expuestas a diferentes concentraciones de partículas ambientales (ZnO)..	80
Figura 33: Observación microscópica de ampliación 100x de células CEBH en fase de multiplicación.	82
Figura 34: Observación microscópica de ampliación 100x a células CEBH expuestas una sola vez a partículas ambientales (PF _{2.5µm} , PUF _{0.1µm} , TiO ₂ , ZnO).	83
Figura 35: Observación microscópica de ampliación 100x a células CEBH expuestas tres veces a partículas ambientales (PF _{2.5µm} , PUF _{0.1µm} , TiO ₂ , ZnO).	84
Figura 36: Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas finas de manera aguda (PFa) y repetida (PFR). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.	85
Figura 37. Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas ultrafinas de manera aguda (PUFa), repetida (PUFR) y partículas de TiO ₂ a una sola exposición (TIO2a). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.	86

Figura 38: Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas de TiO ₂ de manera repetida (TIO ₂ r) y ZnO de manera aguda (ZNOa) y repetida (ZNO _r). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.	86
Figura 39: Gráfica de calibración para la determinación de proteínas en CEBH, después de su exposición a partículas atmosféricas (PF _{2.5} µm, PUF _{0.1} µm, TIO ₂ y ZnO)(n=3).....	88
Figura 40: Determinación de la expresión de proteínas por inmuno detección, visualizado en bandas reveladas en la membrana con el peso molecular aparente. ..	90
Figura 41. Resultados cuantitativos de las proteínas NRF2, GPX, HO1, HQO1, por Western Blot (n=2).	91
Figura 42. Comparación del contenido de proteínas (ug/ml) NRF2, GPX, HO1, NQO1 obtenidas en CEBH expuestas a PF _{2.5} µm y PUF _{0.1} µm.	92
Figura 43. Comparación de la expresión de proteínas NRF2, GPX, HO1 y NQO1 (ug/ml), presentes en células bronquiales expuestas a partículas atmosféricas. (*) indica diferencia significativa en la sobre expresión proteica causada por PFA, PFR, PUFA, PUFR, TiO ₂ A, TiO ₂ R, ZnOA, ZnOR (p<0,05).....	92
Figura 44: Comparación de la sobre expresión proteica (ug/ml) en relación a las partículas atmosféricas PFA, PFR, PUFA, PUFR, TiO ₂ A, TiO ₂ R, ZnOA, ZnOR y las CEBH (p<0,05).....	94

CAPITULO I

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los efectos tóxicos causados por partículas atmosféricas finas con un diámetro de $2.5\mu\text{m}$ ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$) y partículas atmosféricas ultra finas con un diámetro de $0.1\mu\text{m}$ ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$), en células epiteliales bronquiales (CEBH).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar que la caracterización fisicoquímica de las $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ y $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ en la zona urbano-industrial de Dunkerque presenta diversos compuestos nocivos, incluso reactivos (derivados cíclicos aromáticos y metales pesados).
2. Evaluar la citotoxicidad en células bronquiales (CEBH) expuestas a partículas atmosféricas finas ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$) y partículas atmosféricas ultra finas ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$)
3. Evaluar la morfología de los orgánulos presentes en células CEBH, considerando la internalización de las partículas atmosféricas finas ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$) y partículas atmosféricas ultra finas ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$)
4. Cuantificar en la línea celular CEBH la respuesta antioxidante considerando la sobreexpresión de proteínas (NRF_2 , GPX, HO1, NQO1).

1.2. LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA.

1.2.1. Definición

La contaminación ambiental, implica la presencia en el ambiente (aire, agua o suelo) de cualquier agente (físico, químico o biológico), que pueda ser nocivo o perjudicial para la salud, la seguridad o el bienestar de la población⁽¹⁾. En esta investigación la contaminación del aire es de especial interés.

Actualmente existen diferentes definiciones sobre la contaminación del aire, pero es difícil encontrar una definición general, ya que hay que distinguir primero el origen de la contaminación. Según la OMS considerando la ISO 14644-1 clase 8 (Clasificación de la limpieza del aire por concentración química), define a la contaminación del aire como “La introducción de contaminantes en un medio líquido o gaseoso”⁽¹⁾. Se ha considerado que la contaminación del aire existe como una mezcla compleja y que los efectos atribuidos al ozono (O₃), dióxido de nitrógeno (NO₂) o material particulado (MP) pueden estar influenciados por la toxicidad subyacente de la mezcla completa de todos los contaminantes del aire⁽²⁾.

De acuerdo con el artículo 2 de la Ley de Aire y el Uso Racional de la Energía (LAURE) del Código del Medio Ambiente Francés, se considera contaminación del aire a todas aquellas sustancias introducidas directa o indirectamente en un espacio atmosférico, que pueden originar consecuencias perjudiciales, como poner en peligro la salud humana, dañar los recursos vivos, ecosistemas, bienes materiales, olores excesivos e impactar sobre el cambio climático⁽³⁾.

El Ministerio del Ambiente en Perú ha definido a la contaminación del aire como una alteración perjudicial para el ambiente. El aire se contamina cuando se altera el equilibrio de las sustancias que lo componen o cuando se introducen sustancias gaseosas o sólidas que no son componentes de la atmósfera, éstas son producidas principalmente por la actividad humana⁽⁴⁾.

El resultado de la actividad humana se le conoce como contaminación antropogénica y es una parte importante de la contaminación del aire⁽⁵⁾. Otro tipo de contaminación es la de origen natural como el humo de los volcanes (que puede contener partículas y óxido de azufre), incendios forestales, erosión, fenómenos biológicos relacionados con el suelo y océanos o el polen que es en sí minoritario⁽⁶⁾.

1.2.2. Múltiples contaminantes del aire

Los contaminantes del aire se clasifican en dos grupos: Gases y partículas⁽⁷⁾. Por un lado, están los de material gaseoso como el ozono (O₃), dióxido de azufre (SO₂), monóxido de carbono (CO) y el amoníaco (NH₃) y, por otro lado, los contaminantes en forma de partículas, agrupados bajo el nombre de material particulado (MP) que

reúne a todos los contaminantes presentes en la atmosfera en forma de sólidos y líquidos⁽⁸⁾.

Los contaminantes en forma de partículas se clasifican en partículas biológicas (mohos, virus, parásitos, bacterias, esporas, caspa de animales, polen, entre otros.), partículas no biológicas (humo, polvo, metales pesados, isótopos radiactivos, etc.) y gases (humos de adhesivos, productos derivados del petróleo, pesticidas, pintura y productos de limpieza, radón etc.)⁽⁷⁾

Los contaminantes comunes del aire son monóxido de carbono (CO), plomo (Pb), dióxido de nitrógeno (NO₂), ozono (O₃) y dióxido de azufre (SO₂)⁽⁹⁾.

Existen contaminantes del aire que son considerados “tóxicos” y generalmente están presentes en el aire a concentraciones relativamente bajas⁽¹⁰⁾. Sin embargo, son muy tóxicos incluso en bajas concentraciones, con la propiedad adicional de persistencia duradera, por lo que también se les llama contaminantes peligrosos del aire. Estos contaminantes tóxicos incluyen compuestos orgánicos volátiles como el formaldehído, tolueno y xileno, así como semi-volátiles, entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)⁽¹⁰⁾. Varias fuentes de tóxicos en el aire son las emisiones de vehículos motorizados, emisiones industriales, productos de combustible quemado y materiales como pinturas y adhesivos en edificios nuevos. Además, hay una subclase de tóxicos del aire llamados compuestos orgánicos reactivos que contribuyen a la formación de ozono. Estos son altamente tóxicos y contribuyen significativamente a la formación de smog fotoquímico⁽⁹⁾.

Los contaminantes del aire se presentan de forma fija o móvil. Una fuente fija será una fuente que permanece en una ubicación geográfica específica (como una fábrica), mientras que para una fuente móvil será posible observar variaciones geográficas (como el tráfico por carretera)⁽¹¹⁾. Algunos contaminantes pueden pertenecer a una fuente específica, como los pesticidas para la agricultura o los nitróxidos (NO) en combustiones de los motores convencionales o en cohetes⁽¹¹⁾.

Como se muestra en la Figura 1, otros contaminantes pueden ser emitidos por varios tipos de fuentes, este es el caso del material particulado (MP), que es emitido por

diversas actividades como la agricultura, la industria, el tratamiento de residuos y el transporte⁽¹¹⁾.

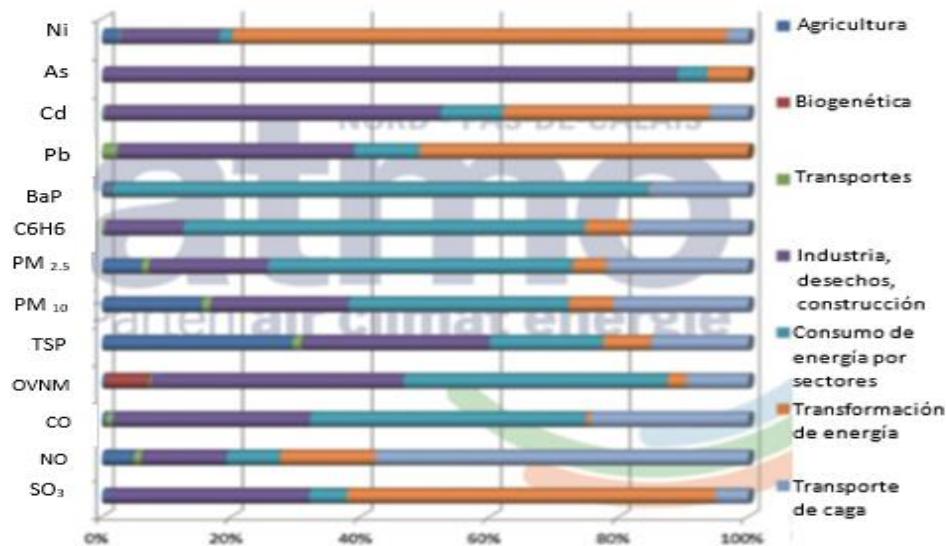


Figura 1: Distribución de emisiones por sector de actividad en la región de Norte-Paso de Calais- Francia.

Fuente: ATMO NORD PAS DE CALAIS HDF, (2018)

La figura 1 muestra que algunos sectores son los que predominan en relación a la contaminación como por ejemplo la industria (que emite el 90% de arsénico), la transformación energética (que emite entre 60% del dióxido de azufre y el 80% de todo el níquel emitido), o el transporte por carretera (que emite alrededor del 60% de dióxido de nitrógeno).

Los contaminantes atmosféricos establecen un ciclo, que comienza con la emisión de dióxido de nitrógeno, amoníaco, dióxido de azufre o material particulado de 2.5 μm ($\text{MP}_{2.5\mu\text{m}}$) primarios de origen antropogénico o natural, después estos son transportados o dispersos por el viento según el destino atmosférico⁽¹²⁾. Por medio de una conversión química en el aire dióxido de nitrógeno, amoníaco y dióxido de azufre se transforman en aerosoles secundarios⁽¹¹⁾.

Los contaminantes secundarios ya convertidos caen al suelo o el mar por lixiviación de la lluvia o por deposición seca del viento. Una vez en el suelo, las condiciones climáticas (sol y viento) dispersan a los contaminantes convertidos para reanudar el ciclo de re-dispersión en la atmósfera⁽¹²⁾ (Figura 2).

Posteriormente, la población humana puede inhalar MP, lo que lleva a un mayor número de casos de mortalidad y daños finales a la salud humana⁽¹²⁾.



Figura 2. El ciclo de la contaminación del aire.

Fuente: IDEAM, (2018)

1.2.3. Material particulado

El material particulado (MP) está definido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) como una mezcla compleja de partículas y gases extremadamente pequeños que pueden contener elementos ácidos, sustancias orgánicas, metales, polvo y suciedad⁽⁹⁾.

El MP es conocido también como aerosol atmosférico⁽¹³⁾. Es una mezcla compleja de sustancias en estado sólido y/o líquido suspendidas en el medio gaseoso atmosférico⁽¹⁴⁾. Este aerosol atmosférico es emitido por una variedad de fuentes naturales, las cuales pueden influir en el tamaño, en la superficie específica, densidad y composición química del MP⁽¹³⁾.

Las principales fuentes que contribuyen a la composición de este MP pueden ser procesos antropogénicos y fuentes naturales como residuos biológicos formados por restos de vegetales, polen, esporas y diversos microorganismos así también la oxidación de gases como el dióxido de azufre (SO_2) producido por volcanes o el dimetil sulfuro emitido por los océanos⁽⁶⁾. Los grandes espacios forestales y su producción de material orgánicos emitido por las plantas también es considerado como factor importante⁽³⁾.

El MP primario de origen antropogénico puede manifestarse en diversas actividades industriales como la construcción, minería, fábricas, cerámicas, fundición, combustión de carbón (cenizas volantes), ladrilleras y emisiones fugitivas⁽¹³⁾.

El MP secundario de origen antropogénico principalmente está formado por sulfato, nitrato y carbono contenido en la fracción orgánica⁽¹⁵⁾. El sulfato se forma a partir de precursores gaseosos como el dióxido de azufre SO_2 , emitido por la combustión de carbón en plantas de generación de energía y otras actividades industriales y el nitrato es principalmente emitido por los automóviles y algunos procesos industriales⁽¹⁶⁾. Las grandes extensiones de cultivos, la combustión de biomasa y combustibles fósiles constituyen importantes fuentes de precursores de vapores orgánicos de aerosoles orgánicos secundarios⁽¹⁷⁾. Estos contaminantes interactúan constantemente entre sí y con los componentes de la atmósfera logran cambiar de estado, aglomerarse, sedimentarse o adsorber moléculas en su superficie⁽¹⁸⁾ (Tabla 1).

Tabla 1: Descripción de los principales contaminantes atmosféricos y sus fuentes.

Contaminante	Formación	Estado Físico	Fuentes
Partículas en suspensión (MP): MP₁₀ Humos negros	Primaria y secundaria.	Sólido, líquido.	- Vehículos. - Procesos industriales. - Humo de tabaco.
Dióxido de Azufre (SO₂).	Primaria.	Gas	- Procesos industriales. - Vehículos.
Dióxido de Nitrógeno (NO₂)	Primaria y secundaria.	Gas	- Vehículos. - Estufas y cocina de gas.
Monóxido de Carbono (CO)	Primaria	Gas	- Vehículos. - Combustiones en interiores. - Humo de tabaco.
Compuestos orgánicos volátiles (COVs)	Primaria y secundaria.	Gas	- Vehículos. - Industria. - Humo del tabaco. - Combustiones en interiores.
Plomo (Pb)	Primaria	Sólido (Partículas finas)	- Vehículos - Industria.
Ozono (O₃)	Secundaria	Gas	- Vehículos (secundario a foto-oxidación de NO ₂ y COVs)

Fuente: Organización Mundial de la Salud – Traducido, (2018)

De acuerdo al ciclo de la formación de los contaminantes atmosféricos, las partículas pueden ser emitidas como tales a la atmósfera (primarias) o bien ser generadas por reacciones químicas (partículas secundarias), a través de mecanismos de formación⁽¹²⁾ (Figura 3).

El mecanismo de formación de las partículas gruesas (mayores a $2.5\mu\text{m}$) se produce por la ruptura mecánica de partículas sólidas más grandes. La fracción gruesa puede incluir polvo de carreteras, procesos agrícolas, suelo descubierto u operaciones mineras, así como materiales no combustibles liberados al quemar combustibles fósiles (figura 3). La combustión de combustibles fósiles como el carbón, el petróleo y la gasolina puede producir partículas gruesas por la liberación de materiales no combustibles o como cenizas volantes, partículas finas de la condensación de materiales vaporizados durante la combustión⁽¹⁹⁾.

Las PF (de $0.1\mu\text{m}$ hasta $2.5\mu\text{m}$) se forman principalmente a partir de gases⁽¹⁹⁾. Las PUF (hasta $0.1\mu\text{m}$) se forman por nucleación, que es la etapa inicial en la cual el gas se convierte en una partícula. Estas partículas $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ y $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ pueden crecer hasta un tamaño de $1.0\mu\text{m}$ ya sea por condensación, cuando se condensa el gas adicional en las partículas, o por coagulación, cuando dos o más partículas se combinan para formar una partícula más grande⁽¹⁹⁾.



Figura 3. Mecanismos de formación del Material particulado.

Fuente: CEMCAP⁽¹⁹⁾, (2019)

El tamaño del MP varía notablemente desde unos cuantos nanómetros (nm) hasta varias decenas de micras (μm) en función del origen y mecanismos de formación⁽²⁰⁾.

Debido a las diversas formas que presentan las partículas en el ambiente es complicado caracterizarlas con una dimensión geométrica conocida. Por ello, se utiliza el diámetro aerodinámico, este permite cuantificar la dimensión del área y el tamaño de la partícula⁽⁸⁾. Este diámetro es diferente al diámetro real (también llamado diámetro geométrico), pero es igual al diámetro de una partícula esférica de densidad unitaria que tiene la misma velocidad terminal que la partícula considerada, independiente de su forma, o densidad bajo condiciones de temperatura, presión y humedad existentes⁽²¹⁾.

A partir de este parámetro, se han establecido tres categorías principales de material particulado (MP)⁽²²⁾:

- Material particulado cuyo diámetro es mayor a $2.5\mu\text{m}$ y menor o igual a $10\mu\text{m}$ ($\text{MP}_{10\mu\text{m}}$).
- Material particulado conocido como partículas finas ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$), cuyo diámetro es mayor a $0.1\mu\text{m}$ y menor igual a $2.5\mu\text{m}$.
- Material particulado conocido como partículas ultra finas ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$) cuyo diámetro es menor igual a $0.1\mu\text{m}$.

El uso de este concepto permite también determinar el transporte, los procesos de remoción en el aire y en superficies, así como la trayectoria de las partículas dentro del sistema respiratorio. El tamaño de las partículas suspendidas es una característica muy importante, porque mientras más pequeño sea su diámetro aerodinámico mayor será su capacidad de penetrar a áreas más profundas del sistema respiratorio⁽²³⁾ (Figura 4).

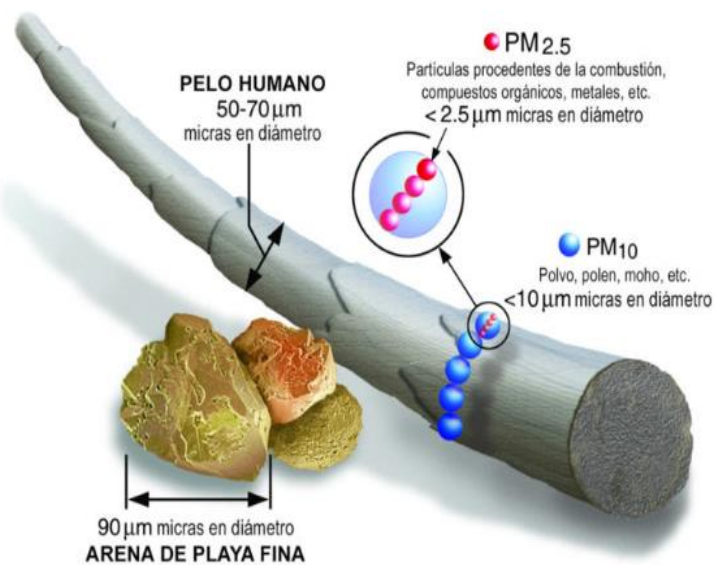


Figura 4: Diferencia entre los tamaños de las partículas $PM_{2.5}$ y PM_{10} .

Fuente: United States Environmental Protection Agency, (2019)

1.2.4. Composición fisicoquímica del MP

Los factores que describen al MP son: La diferencia en el diámetro aerodinámico, variabilidad en la composición de partículas y diferentes dosis. Es muy importante el estudio de la composición de las partículas, a pesar que es un factor que varía constantemente, pero dependiendo de las sustancias que lo componen, los efectos en la salud pueden ser diferentes⁽²⁴⁾.

De acuerdo con Morakinyo-Mayowa (2016) los principales componentes de las $PM_{2.5}$ son materiales minerales (óxidos de aluminio, calcio, sílice, titanio, hierro, magnesio, manganeso, sal y potasio), materiales orgánicos (bacterias, endotoxinas, hongos), sales marinas (sal o calcio), oligoelementos metálicos, carbono elemental o incluso aerosoles inorgánicos (sulfatos, nitratos, amonio) (25). La Tabla 2 muestra la composición promedio de MP ng/m^3 de diferentes partes del mundo. Esta tabla muestra la variabilidad en la composición de MP dependiendo de su origen. Por ejemplo, al observar el elemento hierro (Fe), se observa una variación entre la tasa de Hénin-Beaumont (Francia) a $308 ng/m^3$ y la de Shanghai (China) a $2690 ng/m^3$. La tasa encontrada en China es casi 9 veces mayor que la de Hénin-Beaumont. Además, al centrarse en la región de Haut-de-France, la composición del MP puede ser muy

variable, en particular con una concentración de hierro 3 veces superior a Dunkerque en comparación con Hénin-Beaumont. Este fenómeno de variabilidad se explica por la diferencia en las fuentes de emisiones antropogénicas, pero también por la variabilidad temporal ⁽²⁵⁾.

Tabla 2. Comparación de las concentraciones elementales promedio en MP₁₀ (ng/m³).

Sitio de estudio	(Lamaison, 2006) Dunkerque, Francia. Junio 2003 a febrero 2005.	(Robache, 2006) Hénin-Beaumont, Francia. 2004 a 2005.	(Le floch, 2004) Francia, Toulon. 2001 a 2002	(Querol, 2002) Aglomeración de Barcelona, España. 1999 a 2001	(Voutsas, 2002) Tesalónica, Grecia.	(Zhene, 2004) Shangai, China. 2001 a 2002
Al	270		207.6			
As	5.09		1.02		2.4	42.1
Ba	6.8	32.4	8.4	38		2479
Ca	862	366	1340.4	2250		9634
Cd	1.32	1.7	0.46		0.9	10.9
Co	0.55				2.4	2.8
Cu	12.6	13.7	19.1	74	36	171
Fe	977	308	577.3	890	2159	2690
K	674	189	137.4	560	836	3331
Mg	242	117	145.8	290		1984
Mn	147	9.5	13.5	24	28	186
Na	1550	1036	1361.6	940	573	1257
Ni	12.4			7	11	13.9
Pb	37.4	69.5	7.5	149	62	515
S	1784	1439				6461
Sb	2.3		3.4		3.2	22.7
Sr	3.31	1.9		7		33.2
Ti	27	41.6	6.2	50		221
V	18.3	6.1	6.9	13	39	17.6
Zn	80	99.9	78.6	250	212	1406

Fuente: Lamaison, (2006)

En Perú en la ciudad de Huancayo se realizó en el año 2007 un análisis de variabilidad de las concentraciones presentes en el MP⁽²⁵⁾.

Como se aprecia en la Tabla 3 el promedio para el MP en el centro de Huancayo fue de 6454 ng/m³ superando el Estándar de Calidad Ambiental (ECA) anual (5000 ng/m³) en más del 29%. Respecto a la composición elemental los metales (Ca, Al, Fe, K, Mg, Ti, Na, Zn, Mn, Pb, Cu, Sr, Rb, Cr, Cd, Ni, V, Zr y Y) constituyeron aproximadamente 11,9% del peso del MP₁₀, los metaloides (Si, As y Sb) el 7,5% del peso del MP₁₀, y los no metales (S, Cl, P, Br y Se) el 1,9% del peso del MP₁₀. Los cinco elementos más abundantes del MP₁₀ de Huancayo, durante el periodo de monitoreo, fueron el Si, Ca, Al, Fe y K ocupando el 7,6% del MP.

Tabla 3. Concentraciones elementales promedio en MP_{10} (ng/m^3) (Huancayo, agosto 2007 hasta mayo del 2008. Perú).

Sitio de estudio Periodo	Huancayo – Perú, agosto 2007 a mayo del 2008	Sitio de estudio Periodo	Huancayo – Perú, agosto 2007 a mayo del 2008
Si	2420	As	30
Ca	1250	Sb	10
Al	1070	P	10
Fe	730	Cu	10
K	610	Cd	0.40
S	550	Sr	4
Cl	290	Zr	2
Na	100	V	3
Mg	1100	Rb	2
Ti	70	Br	2
Zn	30	Cr	2
Mn	20	Y	3
Pb	30	Ni	2
		Se	1

Fuente: Estándar de Calidad Ambiental (ECA) Huancayo⁽²⁵⁾, (2007)

El MP tiene una profunda influencia en la salud pública, visibilidad atmosférica (smog) conservación de los materiales artificiales (corrosión) y en el clima de un lugar. En la salud pública, por ejemplo, muestra una fuerte correlación estadística positiva entre la toxicidad del MP y las enfermedades respiratorias agudas⁽²⁶⁾; siendo Lima, capital del Perú, una de las ciudades con mayor frecuencia de asma en niños por el MP proveniente de emisiones del parque automotor⁽²⁷⁾. Por tal motivo, la caracterización química y vigilancia permanente del MP es básica e importante porque nos brinda información para la elaboración de estrategias y planes de control y mitigación del MP⁽²⁷⁾.

1.2.5. Nanopartículas de ZnO y TiO₂

El uso de las nanopartículas (NP) y nanomateriales se ha incrementado vertiginosamente en los campos de la electrónica, la óptica, la industria alimentaria, textil, del cemento, plásticos, y en la medicina⁽²⁸⁾.

Un caso particular se presenta con las NP de óxido de zinc (ZnO) y de dióxido de titanio (TiO₂) ampliamente requeridas en la industria alimentaria y en el sector salud⁽²⁸⁾.

No obstante, al igual que con otras NP, las NP de ZnO, SiO₂ y TiO₂ han sido señaladas como potenciales agentes perjudiciales para la salud humana y el medioambiente. Estudios previos para estas tres NP han reportado su efecto citotóxico en los fibroblastos pulmonares humanos, un efecto inflamatorio en las células intestinales mediante la producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ERO) así como también efecto genotóxico y citotóxico en modelos vegetales. Por estas evidencias, los autores recomiendan una extrema atención para el uso seguro de estos nanomateriales⁽²⁸⁾.

1.2.6. Análisis químicos para la determinación de la composición fisicoquímica del MP

El análisis de partículas atmosféricas fraccionadas por su tamaño se ha realizado en el pasado con técnicas inorgánicas y orgánicas diferentes⁽²⁹⁾.

Los métodos rápidos, sensibles y de elementos múltiples (o para el análisis orgánico de componentes múltiples), no son sólo los necesarios para manejar las grandes cantidades de muestra que se encuentran a menudo, pero ayudan a revelar correlaciones significativas entre los diferentes componentes de contaminación y las diferentes fuentes de contaminación. Además, medir más elementos o componentes, a menudo no aumenta significativamente los costos analíticos, pero aumenta en gran medida la utilidad de los resultados⁽²⁰⁾.

Otro factor importante es la especificidad. Existe un creciente interés en los métodos analíticos capaces de identificar los compuestos químicos reales en los que existen oligoelementos potencialmente tóxicos en el aerosol.

Esta área del análisis de especiación es realizada a menudo con métodos analíticos con guiones (combinación de una técnica de separación basada en cromatografía, como cromatografía de gases, con un método de detección espectroscópico específico, como espectrometría de absorción atómica). La detección microscópica o sensible a la superficie de impurezas elementales y orgánicas es otra área de avance rápido⁽²⁹⁾.

1.2.7. Análisis Inorgánicos

Algunas de las técnicas analíticas más exitosas derivan sus ventajas de la ausencia de separaciones químicas o de disolución del material sólido. Para el análisis inorgánico, la disolución de la materia particulada no es siempre una tarea trivial. Por lo tanto, los métodos de análisis directos no destructivos tienen una ventaja definitiva⁽²⁹⁾.

El análisis elemental de las muestras de partículas de contaminación del aire es un problema ya que, la cantidad total de muestra de material suele ser pequeña (escala en mg). Esta pequeña muestra contiene una amplia gama de elementos (y compuestos) potencialmente interesantes a niveles de concentración variables⁽²⁹⁾.

Los análisis rutinarios más utilizados en partículas del aire son: Análisis de activación de neutrones (AAN), análisis de fluorescencia de rayos X (AFX), emisión de rayos X inducida por partículas (ERXIP), espectrometría de absorción atómica (EAA), espectrometría de emisión de plasma acoplada inductivamente (EEA-ICP) y espectrometría de masas (MS)⁽²⁹⁾.

Tres de estos métodos (AFX, ERXIP y AAN o AAN) permiten el análisis multielemental no destructivo de muestras sólidas y pueden aplicarse sobre las partículas de aerosol a medida que se muestrean en un filtro o una superficie impactada⁽²⁹⁾. AAN sufre de la disponibilidad limitada (y decreciente) de reactores de investigación. EAA, aunque es una técnica de un solo elemento y tiene el hecho de que el elemento analito debe ser puesto en solución antes del análisis, es quizás el método más ampliamente utilizado para el análisis de aerosoles, especialmente en la variedad electrotérmica de horno de grafito (ET-EAA) en lugar de la atomización de llama tecnológicamente más simple⁽²⁹⁾. Debido a su modesto costo, simplicidad de operación y su alta sensibilidad para una serie de elementos toxicológicamente importantes (por ejemplo, Cd, Hg y Pb), la espectrometría de emisión de plasma acoplada inductivamente acoplado a espectrometría de masas (ICP - MS), ahora se considera un método atractivo y versátil a pesar del hecho de que las partículas deben disolverse (o extraerse) antes del análisis⁽³⁰⁾.

La composición química elemental de cada muestra de partículas se evalúa mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (EEA-ICP). Esta técnica permite medir la cantidad de elementos buscados en una muestra⁽³¹⁾.

A menudo se aplican otros métodos en situaciones específicas, como la voltamperometría de separación anódica (VSA) y diversas formas de espectrometría de masas de dilución isotópica (EMDI)⁽²⁹⁾. La espectrometría de fluorescencia atómica excitada con láser (EFA) tiene una sensibilidad extrema en comparación con otras técnicas espectrométricas⁽³⁰⁾.

1.2.8. Análisis Orgánicos.

La variedad de compuestos orgánicos presentes en el aerosol es enorme, por eso la medición de bajas concentraciones de compuestos orgánicos en la atmósfera ha sido objeto de investigación durante muchos años⁽²⁹⁾.

Los métodos de medición ahora están bien establecidos para compuestos orgánicos volátiles (COV) relativamente no polares como los hidrocarburos clorados y aromáticos. De estos compuestos se toman muestras de forma rutinaria de la fase gaseosa del aire con recipientes de acero inoxidable seguidos de pre-concentración de muestras criogénicas, separación por cromatografía de gases (CG) y medición con un detector sensible. La detección se basa en ionización de llama o espectrometría de masas (MS) y separaciones más complejas como por cromatografía líquida (CL)⁽²⁸⁾.

1.2.9. Análisis por métodos de haz de electrones.

Los métodos analíticos sufren una limitación importante causada por el hecho de que incluso después de la clasificación por tamaño, las partículas ambientales son morfológica y químicamente bastante heterogéneas. Por lo tanto, en tales estudios es imposible diferenciar entre una alta concentración de un componente dado presente en solo unas pocas partículas o alternativamente una baja concentración presente en todas o la mayoría de las partículas⁽³¹⁾.

Se pueden aplicar varias técnicas micro-analíticas al análisis de muestras ambientales. Tales micro-análisis pueden revelar si un elemento o compuesto específico está distribuido uniformemente sobre todas las partículas de una población o si es un

componente solo de un grupo específico de partículas. A veces, incluso se puede inferir la distribución del elemento dentro de una sola partícula. De esta forma, se vuelve más sencillo asignar partículas a fuentes de emisión específicas (analizando partículas con una composición o forma específica), mientras que a menudo se puede derivar información más refinada sobre los mecanismos de fuente y las reacciones superficiales heterogéneas⁽²⁹⁾.

El microscopio más convencional es el electrónico analítico (MEA), el cual actualmente ha evolucionado hacia instrumentos especializados, tales como el microscopio electrónico de barrido con análisis de rayos X (MEBX), el microscopio electrónico de transmisión de barrido (METB) y el micro-analizador electrónico que incorporan análisis de rayos X dispersivos de longitud de onda (LO) y / o dispersivos de energía (DE)⁽²⁹⁾.

Además, existen las posibilidades de medir los electrones transmitidos en el microscopio electrónico de transmisión (MET), ahora con una resolución lateral a nivel atómico⁽²⁹⁾. El área seleccionada de difracción de electrones (SAED) proporciona información estructural a nivel microscópico. En los espectrómetros de pérdida de energía de electrones (EPEE) existen posibilidades para obtener información química a través de la medición del espectro de energía de electrones, así como su imagen en imágenes de pérdida de energía de electrones (IEE)⁽²⁹⁾. Los fotoelectrones proporcionan información sensible a la superficie en microscopios de escaneo Auger (MEA) y espectrómetros de fotones de rayos X (EFX, o EEAQ, espectroscopía electrónica para análisis químico)⁽³⁰⁾.

Los métodos con excitación electrónica dan lugar a una alta resolución espacial, ya que el haz de electrones excitante puede enfocarse en una sonda de 10 nm de diámetro y luego escanearse sobre la muestra⁽³¹⁾.

EFX es una herramienta poderosa para la investigación del estado químico en la superficie de la partícula que explota los cambios de energía de unión del fotoelectrón, mientras que la información en profundidad se puede obtener por pulverización de haz de iones⁽³¹⁾.

Para analizar la composición de la superficie de $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ se utiliza la espectrometría de fotoelectrones de rayos X (EFX)⁽³¹⁾.

Esto implica irradiar la muestra usando rayos X monocromáticos que ionizarán los átomos en la superficie de la muestra. Esto provoca la liberación de electrones y a través del espectrómetro se analiza el "número de electrones emitidos en un intervalo de energía en función de la energía de enlace de electrones"⁽²⁹⁾.

1.2.10. Contexto epidemiológico

El impacto sanitario de las partículas atmosféricas ha sido investigado en numerosos estudios epidemiológicos como un tema relevante y de suma importancia⁽¹⁵⁾. En efecto, varios estudios muestran que la exposición a los contaminantes atmosféricos puede estar asociado con el incremento de enfermedades respiratorias, cardiovasculares y muertes⁽⁵⁾. En octubre del 2013, el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (CIIC), concluyó que la contaminación por MP era cancerígena para los humanos y relacionó la contaminación del aire con el aumento de incidencia de cáncer al pulmón⁽³³⁾.

En marzo del 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó que más de 7 millones de personas murieron prematuramente desde el 2014 a causa de la exposición a la contaminación del aire⁽³⁴⁾. Estas cifras confirman que la contaminación del aire es ahora y será más adelante un evidente riesgo para la salud en el mundo⁽³⁵⁾.

Estudios realizados entre los años 2002 y 2007 en la ciudad de Grande- Synthe ubicada en la costa de Dunkerque, Francia, (región sujeto de estudio) indicaron que la tasa de exposición porcentual por unidad de tiempo fue del 20% para PF y 50% para PUF⁽³⁶⁾.

Según la OMS la contaminación del medio ambiente en todo el mundo provoca 29% de las muertes por cáncer de pulmón, 17% de las muertes por infección aguda de las vías respiratorias inferiores, 24% de las muertes por accidente cerebrovascular, 25% de las muertes por cardiopatía isquémica y 43% de las muertes por enfermedad pulmonar obstructiva crónica⁽³⁵⁾. La exposición de gestantes a la contaminación del aire, se asocia con resultados adversos como partos prematuros y nacimientos de edad gestacional pequeña. La evidencia emergente también sugiere que la contaminación del aire ambiente puede afectar el desarrollo neurológico en los niños y desencadenar

Diabetes Mellitus. En niños y adultos, la exposición tanto a corto como a largo plazo a la contaminación del aire ambiental puede conducir a una función pulmonar reducida, infecciones respiratorias y asma agravado⁽³⁷⁾.

A pesar que los efectos indeseables a corto o a largo plazo de la contaminación sobre la salud del ser humano han sido demostrados, existe una gran concentración de partículas PUF que están en evaluación, ya que posiblemente produzcan efectos tóxicos sobre la salud⁽³⁸⁾.

1.3. APARATO RESPIRATORIO

El aparato respiratorio (AR) es un sistema biológico que consiste en órganos y estructuras específicos utilizados para la respiración de un organismo (Figura 5).

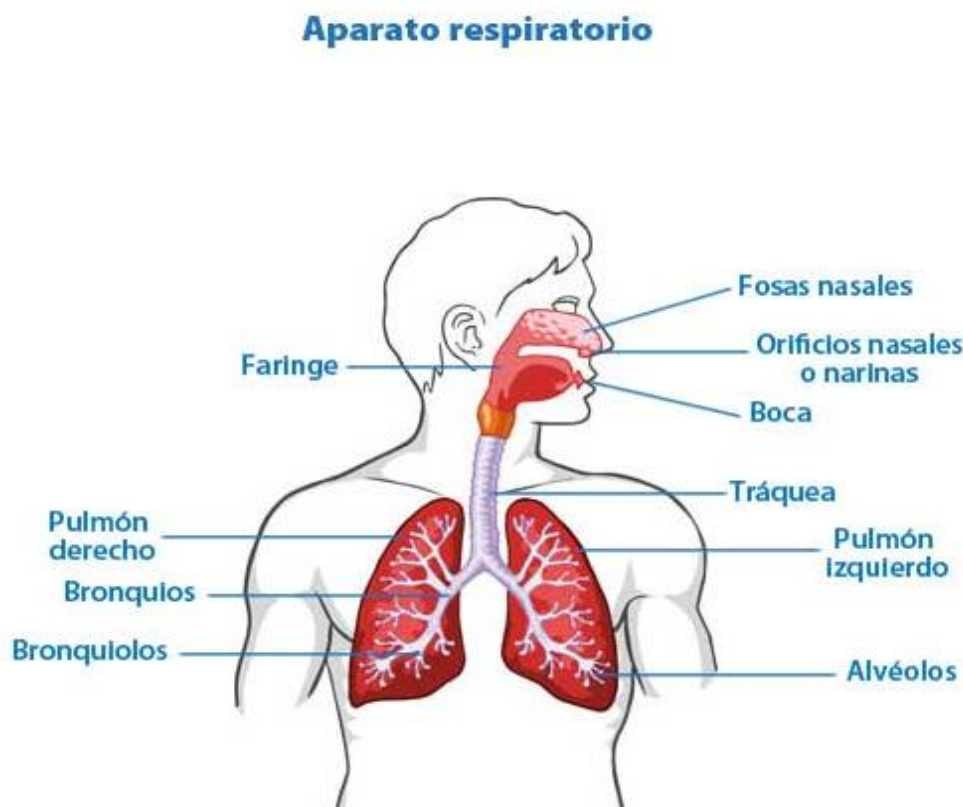


Figura 5: Esquema del aparato respiratorio.

Fuente; easy anatomy, (2018)

El AR es comúnmente conocido por ocuparse del intercambio gaseoso; sin embargo, su función es mucho más compleja⁽³⁷⁾. Funcionalmente, las vías respiratorias se dividen en dos zonas. La tráquea y las primeras 16 ramificaciones de las vías respiratorias constituyen la zona de conducción. La vía aérea principal, la tráquea, se ramifica en dos bronquios⁽³⁹⁾. Cada bronquio entra en un pulmón y se ramifica muchas veces en bronquios progresivamente más pequeños, que, a su vez, forman bronquiolos. La tráquea, los bronquios y los bronquiolos de la zona de conducción tienen tres funciones importantes que son calentar y humidificar el aire inspirado; distribuir el aire de manera uniforme a las partes más profundas de los pulmones y funcionar como parte del sistema de defensa del cuerpo⁽⁴⁰⁾. En los bronquiolos, el cartílago desaparece por completo; están suspendidos por tejido elástico en el parénquima pulmonar y la elasticidad del tejido pulmonar ayuda a mantener estas vías respiratorias abiertas. La zona de conducción tiene su propia circulación separada, la circulación bronquial, que se origina en la aorta descendente. El sitio donde se produce el intercambio de gases son los sacos alveolares de las vías respiratorias, los cuales constituyen la zona respiratoria. Este intercambio gaseoso se lleva a cabo en millones de células especializadas que forman sacos de aire de paredes delgadas, llamadas alvéolos⁽²⁷⁾. Los capilares pulmonares ocupan del 70 al 80% de la superficie alveolar, lo que los convierte en el órgano con la red capilar más extensa en el cuerpo⁽³⁸⁾. Esta circulación pulmonar tiene un flujo sanguíneo alto, debido a que recibe todo el gasto cardiaco. Una rama arterial pulmonar acompaña a cada vía aérea y se ramifica con ella. El tejido alveolar tiene un peso total de 250 g, pero una superficie total de 75 m², lo que hace que este tejido sea idóneo para el intercambio de gases⁽²⁷⁾.

Las paredes alveolares tienen tres componentes importantes: El primero, que está formado por el endotelio capilar y la membrana basal. El segundo, el intersticio pulmonar, el cual mantiene la integridad anatómica de este tejido con fibras de tejido conectivo a base de colágeno, las cuales proporcionan un soporte multidireccional mientras permiten que se retenga la permeabilidad de las vías a pesar de los grandes cambios que se experimentan en volumen. El intersticio pulmonar también contiene algunos fibroblastos, células musculares lisas, mastocitos y algunas células mononucleares esporádicas. El tercer componente es el epitelio alveolar, 95% del cual consiste en neumocitos tipo I (o células tipo I planas) y neumocitos tipo II (o células

tipo II redondeadas). De igual forma, algunos macrófagos alveolares generalmente se encuentran libres dentro del espacio alveolar⁽³⁹⁾.

A través de la respiración, la inhalación y la exhalación, el sistema respiratorio facilita el intercambio de gases entre el aire y la sangre y entre la sangre y las células del cuerpo. El AR cumple con cinco funciones claves⁽²⁵⁾.

La inhalación y la exhalación pulmonar

El AR ayuda a la respiración, también llamada ventilación pulmonar. En la ventilación pulmonar, el aire se inhala a través de las cavidades nasales y orales (nariz y boca). Se mueve a través de la faringe, la laringe y la tráquea hacia los pulmones. Luego se exhala aire, que fluye de regreso a través de la misma vía. Los cambios en el volumen y la presión del aire en los pulmones desencadenan la ventilación pulmonar⁽²⁶⁾. Durante la inhalación normal, el diafragma y los músculos intercostales externos se contraen y la caja torácica se eleva. A medida que aumenta el volumen de los pulmones, la presión del aire disminuye y el aire se precipita. Durante la exhalación normal, los músculos se relajan, los pulmones se hacen más pequeños, la presión del aire aumenta y se expulsa el aire⁽²⁵⁾.

La respiración externa que intercambia gases entre los pulmones y el torrente sanguíneo.

Dentro de los pulmones, el oxígeno se intercambia por desechos de dióxido de carbono a través del proceso llamado respiración externa. Este proceso respiratorio tiene lugar a través de cientos de millones de sacos microscópicos llamados alvéolos. El oxígeno del aire inhalado se difunde desde los alvéolos hacia los capilares pulmonares que los rodean, se une a las moléculas de hemoglobina en los glóbulos rojos y se bombea a través del torrente sanguíneo. Mientras tanto, el dióxido de carbono de la sangre desoxigenada se difunde desde los capilares hacia los alvéolos y se expulsa a través de la exhalación⁽²⁶⁾.

La respiración interna que intercambia gases entre el torrente sanguíneo y los tejidos corporales.

El torrente sanguíneo entrega oxígeno a las células y elimina el dióxido de carbono residual a través de la respiración interna, otra función clave del sistema respiratorio.

En este proceso respiratorio, los glóbulos rojos transportan oxígeno absorbido desde los pulmones alrededor del cuerpo, a través de la vasculatura⁽²⁵⁾. Cuando la sangre oxigenada llega a los capilares estrechos, los glóbulos rojos liberan el oxígeno, el cual difunde a través de las paredes capilares hacia los tejidos corporales. Mientras tanto, el dióxido de carbono (CO₂) difunde desde los tejidos hacia los glóbulos rojos y el plasma. La sangre desoxigenada transporta el dióxido de carbono a los pulmones para su liberación⁽²⁶⁾.

La vibración de las cuerdas vocales y crear sonido.

La fonación es la creación de sonido por estructuras en el tracto respiratorio superior del sistema respiratorio. Durante la exhalación, el aire pasa de los pulmones a través de la laringe, o "caja de la voz"⁽²⁵⁾. Los músculos de la laringe mueven los cartílagos aritenoides, los cuales empujan las cuerdas vocales y se juntan a ellas. Cuando esto sucede el aire que pasa entre ellos los hace vibrar, creando sonido. Una mayor tensión en las cuerdas vocales crea vibraciones más rápidas y sonidos más agudos. Una tensión menor causa una vibración más lenta y un tono más bajo⁽²⁶⁾.

El proceso de olfatear.

Este proceso comienza con las fibras olfativas que recubren las cavidades nasales dentro de la nariz⁽²⁵⁾. A medida que el aire ingresa a las cavidades, algunos químicos en el aire se unen y activan los receptores del sistema nervioso en los cilios. Este estímulo envía una señal al cerebro y las neuronas toman la señal de las cavidades nasales a través de las aberturas en el hueso etmoides y luego a los bulbos olfatorios. La señal luego viaja desde los bulbos olfativos, a lo largo del nervio craneal, hasta el área olfatoria de la corteza cerebral⁽²⁶⁾.

Todo el AR está revestido y protegido por un mismo tejido llamado epitelio pulmonar⁽⁴⁰⁾. El epitelio pulmonar es una tela compuesta principalmente de tres tipos de células que son las células ciliadas, las células basales y las células productoras. Su principal función es proteger el revestimiento respiratorio por medio de tres mecanismos de defensa, llamados tejidos linfoides, aclaramiento mucociliar y aclaramiento de macrófagos⁽³⁹⁾.

1.4. COMPORTAMIENTO DE LAS PARTÍCULAS FINAS Y ULTRA FINAS EN EL APARATO RESPIRATORIO.

Se considera que el comportamiento de las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ en el aparato respiratorio es peligroso para la salud⁽⁴¹⁾. Esto es por su aparente capacidad de eludir los mecanismos de defensa del sistema respiratorio y por su alto nivel de concentración en pequeños volúmenes del aire en el ambiente⁽¹⁾.

El aire, ingresa al organismo por los orificios externos de las fosas nasales, es filtrado y limpiado por los pelos de la nariz. Esto origina que el flujo nasal se vuelva turbulento debido al paso del aire por los cornetes y que las partículas de mayor peso se depositen en la mucosidad que recubre el epitelio olfatorio⁽⁴¹⁾.

Algunos parámetros por los que el MP es retenido y depositado en el sistema respiratorio son el comportamiento aerodinámico y fisicoquímico, sus características intrínsecas (densidad, carga, tamaño de partícula, forma y naturaleza química de la superficie), su carácter hidrofóbico y también por su estructura geométrica y características del ciclo respiratorio (frecuencia del ciclo, la velocidad de flujo y la turbulencia resultante del flujo de aire)⁽⁴²⁾.

Después de depositarse en el sistema respiratorio, las partículas solubles interactúan rápidamente con los tejidos y tienen un tiempo de vida más corto. Esta fracción soluble se elimina rápidamente, sin embargo, los compuestos de estas partículas podrían distribuirse sistémicamente en el organismo. En cuanto a las partículas insolubles, su eliminación depende de su región de depósito en el sistema respiratorio⁽⁴³⁾.

El mecanismo de deposición se puede dar por medio de cuatro procesos: Intercepción, sedimentación, impacto y difusión⁽⁴⁴⁾.

Deposición electrostática: Es un mecanismo de deposición (Figura 6) que se considera insignificante, ya que, se da en partículas cargadas y generalmente el MP tiene una distribución de carga neutra.

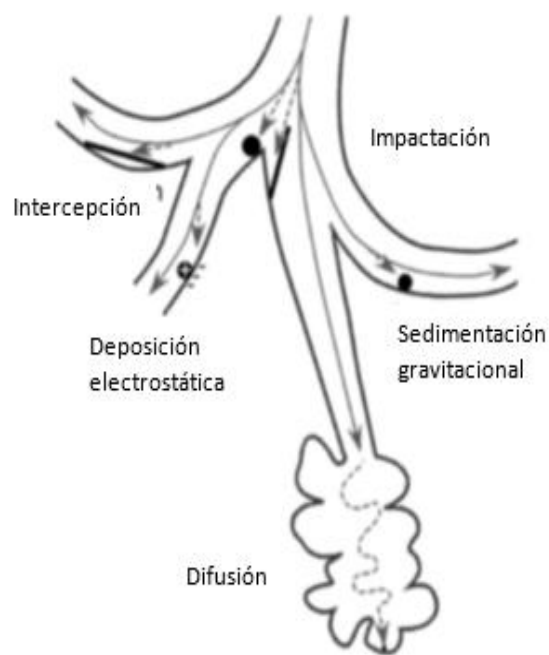


Figura 6: Mecanismo de deposición de partículas en el tracto respiratorio

Fuente: Fröhlich. &Salar-Behzadi, (2014)

Intercepción: Una partícula es interceptada o depositada cuando viaja tan cerca de una superficie de las vías aéreas que un lado de la partícula toca la superficie. Este método de deposición es más importante para fibras como por ejemplo asbestos. El largo de la fibra determina en donde se interceptará la partícula. Por ejemplo: las fibras con un diámetro de $1\mu\text{m}$ y un largo de $200\mu\text{m}$, se depositarán en el árbol bronquial⁽¹¹⁾.

Impacto: Cuando las partículas están suspendidas en el aire, tienden a viajar a lo largo de su ruta original. Cuando hay una mezcla en el sistema de la vía aérea, por ejemplo, muchas partículas no giran con el aire, sino que más bien se adhieren a una superficie en la ruta original de la partícula. La posibilidad de impacto depende del aire, velocidad y la masa del particulado⁽⁶⁾.

Sedimentación: Conforme las partículas viajan en el aire, las fuerzas gravitacionales y la resistencia del aire eventualmente superan la ascendencia (la tendencia de la partícula a permanecer arriba). El resultado es que las partículas se fijarán en una superficie del pulmón. Este tipo de deposición es más común en los bronquios y en los bronquiolos. La sedimentación no es un

factor importante cuando el diámetro aerodinámico de la partícula es menor a $0.5\mu\text{m}$.

Difusión: El movimiento aleatorio de las partículas es similar a las moléculas de gas en el aire cuando las partículas son más pequeñas de $0.5\mu\text{m}$. Cuando las partículas están en movimiento aleatorio, se depositan en las paredes de los pulmones más que nada por casualidad. Este movimiento se conoce también como "movimiento browniano". Entre más pequeño sea el tamaño de la partícula, más vigoroso será el movimiento. La difusión es el mecanismo más importante para deposición en las vías aéreas más pequeñas y los alvéolos⁽⁶⁾.

La mayoría de $\text{PF}_{10\mu\text{m}}$ se asentarán en el nivel extra torácico (85% de la respiración nasal). Sin embargo, una parte de las partículas inspiradas por vía oral se depositarán en el nivel traqueo bronquial (alrededor de 10% de las partículas). El 90% de las $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ inhaladas por vía nasal se depositarán a nivel extra torácico y las $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ que ingresan por vía oral, se depositarán predominantemente en el nivel extra torácico, pero en aproximadamente un 25% a nivel alveolar y 20% a nivel traqueobronquial⁽⁴⁷⁾. Por último, en relación con las $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$, existe una diferencia en la zona de descenso con una mayoría de las partículas depositadas en los alvéolos. Esto es debido a su pequeño tamaño que les permite migrar más profundo a lo largo de las vías respiratorias⁽²⁴⁾.

Las partículas más finas ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$) que migran profundamente, no pueden ser eliminadas por la depuración mucociliar, ya que no es efectiva en la región bronquio alveolar. En este nivel, la fagocitosis garantiza la eliminación a través de los macrófagos alveolares, pero es un mecanismo mucho más lento⁽⁴⁸⁾.

Los macrófagos alveolares, son células libres en la superficie del epitelio pulmonar, son los principales actores de la defensa no específica de los pulmones y un elemento esencial de la activación del sistema inmune de los pulmones contra un xenobiótico⁽⁴⁹⁾. Esta activación se logra a través de la producción y/o secreción de citocinas que tienen un papel crucial en el proceso inflamatorio⁽⁵⁰⁾.

La acumulación de $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ (altamente carbonatadas) en los alvéolos pulmonares, debilita la actividad fagocítica de los macrófagos por saturación. Entonces, las partículas $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ no fagocitadas permanecen en el tracto respiratorio y alteran el aclaramiento alveolar de sustancias inorgánicas y microorganismos⁽⁵¹⁾.

Las partículas pueden permanecer y quedarse en el tracto respiratorio durante meses⁽⁴³⁾. Sin embargo, esta no es una barrera final ya que existen partículas que atraviesan el epitelio pulmonar y alcanzan el sistema sanguíneo. Por lo tanto, los riesgos para la salud están relacionados principalmente con patologías respiratorias, pero también con patologías sistémicas⁽⁵³⁾. Este hecho insta a que se realicen estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* principalmente en los pulmones y células pulmonares⁽⁵⁴⁾.

1.5. CÉLULAS INMORTALIZADAS EPITELIALES BRONQUIALES HUMANAS (CEBH).

Las CEBH, pertenecen a una línea celular epitelial bronquial humana inmortalizada, que se ha utilizado para modelar la función epitelial pulmonar durante más de 30 años⁽⁵⁵⁾. De acuerdo con la organización American Type Culture Collection (ATTC), estas células CEBH se obtienen de la especie humana, “Homo Sapiens” y se encuentran en el pulmón, específicamente en el bronquio. Son células de morfología epitelial, obtenidas de la autopsia de individuos no cancerosos. Son de tipo transformado, ya que, se infectaron con un híbrido adenovirus 12-SV40 (Ad12SV40) y se clonaron. Las CEBH son células que conservan la capacidad de experimentar una diferenciación escamosa en respuesta al suero, se pueden usar para detectar agentes químicos y/o biológicos y para inducir o afectar diferenciación y/o carcinogénesis⁽⁵⁶⁾.

1.6. IMPACTO CITOTÓXICO PRODUCIDO POR PARTÍCULAS ATMOSFÉRICAS.

En los últimos años se ha destacado un punto común en cuanto al MP y es que éste induce estrés oxidativo que desencadena una serie de eventos moleculares y celulares con múltiples consecuencias, como respuesta inflamatoria, modulación de la proliferación y diferenciación celular, incluso la inducción de la muerte celular⁽⁵⁷⁾. La

producción excesiva de especies de oxígeno reactivo (ERO) es la fuente de estrés que, dependiendo de su intensidad, puede conducir a respuestas celulares progresivas y lesiones significativas⁽⁵⁸⁾.

Al no ser expulsadas totalmente del organismo, las partículas producen ERO a partir del proceso de disociación de oxígeno⁽²⁴⁾. Las partículas más finas tienden a aglomerarse para formar grupos (Figura 5) cuya superficie específica será más grande que una partícula fina del mismo diámetro. Este fenómeno se acompaña de un aumento en la reactividad de la superficie, por lo tanto, un aumento en la producción de ERO⁽⁶⁰⁾. Además, la composición de las partículas será un factor determinante como en el caso de las partículas ricas en metales de transición (hierro, cobre) como las PF_{10µm} de Shanghai⁽⁶¹⁾. Estas producen radicales de hidroxilo altamente reactivos cuando los metales en las superficies de las partículas sufren reacciones redox⁽⁶⁰⁾.

Las partículas que contienen compuestos orgánicos producen ERO cuando los macrófagos las internalizan (Figura 7). Además, estas mismas partículas tendrán la capacidad de migrar a través de la barrera epitelial en contacto con el endotelio y producir ERO allí (Figura7). Una vez producidos, los ERO producirán estrés oxidativo y fenómenos inflamatorios⁽⁶²⁾.

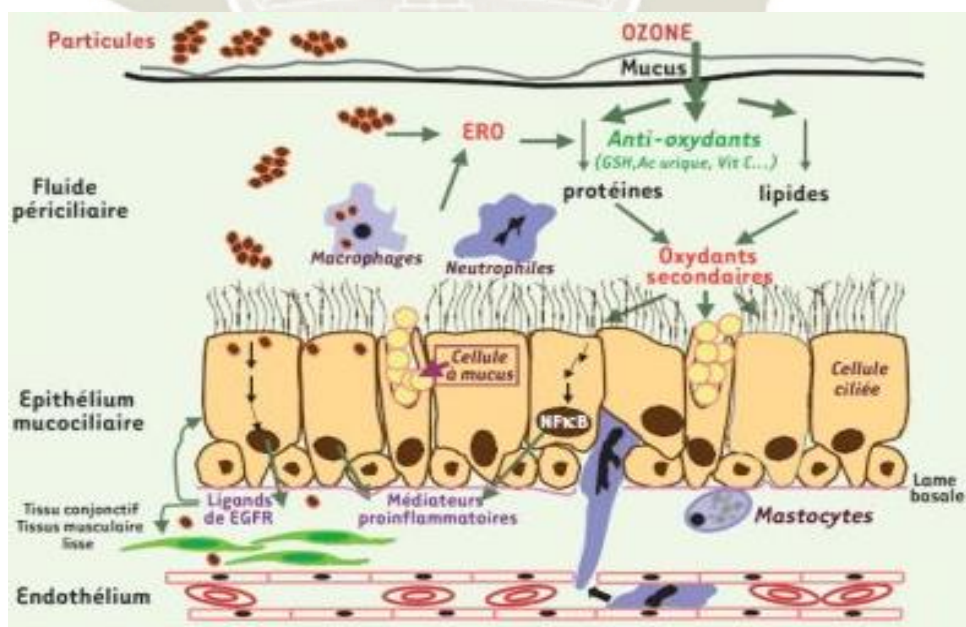


Figura 7: Mecanismo de toxicidad de las partículas atmosféricas en las vías respiratorias.

Fuente: *J Immunol*⁽⁶⁹⁾, (1999)

La toxicidad por MP se asocia con la mezcla de otros contaminantes que se encuentran en la atmósfera, como el ozono, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono y tóxicos como el benceno, butadieno, o hidrocarburos⁽⁶³⁾.

El ozono (O₃) es un gas oxidante altamente reactivo formado por reacción fotoquímica en el aire a partir de óxidos de nitrógeno (NO) y compuestos orgánicos volátiles (COV)⁽⁶⁴⁾. Es poco soluble en agua y sus efectos sobre el tejido pulmonar se localizan principalmente a nivel distal, en particular bronquial y alveolar. Debido a su alta reactividad química, el ozono no alcanza o penetra directamente en las membranas de las células epiteliales, sino que interactúa con los compuestos del líquido periciliario que cubre el epitelio mucociliar de las vías respiratorias y el surfactante que alinea los alvéolos⁽⁶⁵⁾. Estos fluidos tienen propiedades antioxidantes y proporcionan una primera línea de protección que, cuando se excede, permitirá al ozono, gracias a sus dos electrones libres, oxidar directamente las moléculas biológicas como los ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos, el ácido araquidónico⁽⁶⁶⁾. Los productos de degradación del ácido araquidónico son potentes atrayentes y promueven fuertemente la migración de neutrófilos a la superficie del tracto respiratorio. Cuando estas células se activan, causan una nueva ola de estrés oxidativo que reducirá aún más las defensas antioxidantes e inducirá el daño celular⁽⁶⁷⁾. En un nivel intermedio de estrés oxidativo, la activación de la cascada de quinasa y el factor de transcripción Nrf₂ induce la respuesta proinflamatoria⁽⁶⁸⁾.

La inflamación del sistema respiratorio se asocia en gran medida con la hipersecreción de mediadores pro-inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por las células epiteliales y los macrófagos alveolares⁽⁶⁹⁾.

Esta secreción de mediadores por las células epiteliales respiratorias está relacionada con la inducción de vías de señalización sensibles a los oxidantes, generalmente las de las quinasas, que controlan la activación de ciertos factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo, incluido el factor nuclear-2-(Nrf₂), el cual después de su migración al núcleo, se une al promotor de genes diana, incluidos los de las citosinas pro-inflamatorias⁽⁷⁰⁾.

Nrf₂ participa en la activación del elemento de respuesta a los antioxidantes (ERA). Esto controla los genes para el metabolismo de las enzimas, como la hemooxigenasa. Estas respuestas podrían desempeñar un papel en el fortalecimiento de la protección antioxidante que ocurre durante la agresión de partículas⁽⁶⁸⁾.

Cuando la agresión es demasiado grande, la gravedad de las lesiones celulares no permite el establecimiento de los mecanismos de adaptación y luego involucra un proceso de muerte celular por apoptosis o incluso por necrosis⁽⁷¹⁾.

La inducción de apoptosis se ha observado específicamente para macrófagos alveolares en respuesta al estrés oxidativo inducido por PF₂₅μm y PUF_{0.1}μm. Estas pueden acumularse en las mitocondrias y causar daño mitocondrial⁽⁷²⁾.

Existe un equilibrio permanente en el cuerpo entre sustancias oxidantes como ERO y mecanismos de defensa antioxidantes. Cuando se exceden los mecanismos de defensa, aparecerán reacciones inflamatorias; en la etapa final, puede ocurrir la muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis (muerte programada)⁽²⁴⁾ (Figura 8).

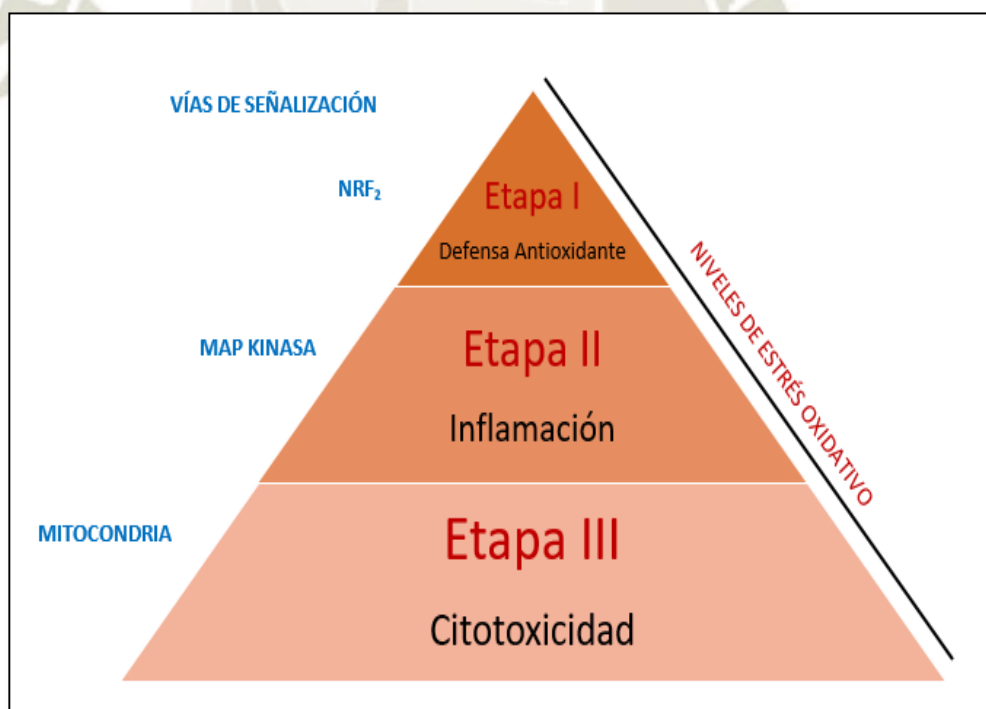


Figura 8: Modelo de los niveles de estrés oxidativo. Las diferentes etapas.

Fuente : Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire (LCTC)

Université Paris 7 – France, (2007)

1.6.1. Estrés Oxidativo

El término estrés oxidativo no tiene un significado específico aun, pero, fue descrito en 1991 como un desequilibrio entre el equilibrio de pro-oxidantes y antioxidantes (equilibrio redox) que puede conducir al daño celular⁽⁷⁰⁾.

Según la OMS, el estrés oxidativo es un fenómeno causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de ERO en células y tejidos y la capacidad de un sistema biológico para desintoxicar estos productos reactivos⁽⁵⁹⁾.

En condiciones fisiológicas, el oxígeno, esencial para la respiración, produce en las mitocondrias, especies reactivas oxigenadas (ERO) que en exceso pueden afectar la integridad celular⁽⁷³⁾.

Las moléculas esencialmente compuestas de membranas celulares (lípidos, carbohidratos y proteínas), en menor medida, el ADN, son el resultado del metabolismo del oxígeno, especies químicas que tienen uno o más electrones no apareados como el anión superóxido, radical hidroxilo, radical peróxido, entre otros⁽⁷⁴⁾. Es por eso que el ERO está involucrado en múltiples procesos biológicos como el envejecimiento y la inflamación, pero también en la patogénesis como la carcinogénesis y la aterosclerosis⁽⁷⁰⁾.

Además de la transferencia de electrones del oxígeno a nivel mitocondrial, existen otros factores endógenos responsables de la producción de ERO, como una alteración de la cadena respiratoria mitocondrial que interviene con el envejecimiento o durante los fenómenos de isquemia⁽⁷⁴⁾. La activación de las células inmunes también es una fuente importante de producción de ERO. De hecho, la presencia de agentes extraños activa los macrófagos, lo que conduce a un aumento en el consumo de oxígeno (llamado empuje respiratorio)⁽⁷⁵⁾. Este oxígeno, a través de la acción de procesos enzimáticos, se transformará en radicales libres que atacarán no solo al agente extraño sino también a los tejidos sanos⁽⁷⁶⁾.

También hay factores exógenos que conducen a la producción de ERO y, por lo tanto, a una inducción del estrés oxidativo. Estos factores son la exposición prolongada al sol y a la radiación, el contacto con carcinógenos, fumar, tomar medicamentos (incluida la píldora anticonceptiva), práctica intensa o deporte mal realizado, consumo

excesivo de alcohol, estrés intelectual o térmico, agentes infecciosos, contaminantes gaseosos (NO_2 , O_3) y partículas de aire⁽⁵³⁾.

Las respuestas celulares al estrés oxidativo, incluyen la activación de la defensa antioxidante, la inflamación y la toxicidad⁽⁷⁷⁾.

1.6.2. Defensa Antioxidante

Para prevenir el estrés oxidativo la célula debe responder a las ERO montando un sistema de defensa antioxidante. Las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en la reducción de los niveles de ERO; por lo tanto, la regulación redox de los factores de transcripción es significativa para determinar el perfil de expresión génica y la respuesta celular al estrés oxidativo⁽⁷⁸⁾. Muchos sensores y vías de peróxido de hidrógeno se activan convergiendo en la regulación de factores de transcripción, incluidos AP-1, Nrf₂, CREB, HSF₁, HIF-1, TP₅₃, NF-κB, Notch, SP₁ y CREB-1, que inducen la expresión de un número de genes, incluidos los necesarios para la desintoxicación de moléculas oxidantes y para la reparación y mantenimiento del homeostasis celular, controlando múltiples funciones celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular⁽⁷⁹⁾.

1.6.2.1. El Factor de Transcripción: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide-2 (Nrf₂).

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf₂) es un factor de transcripción sensible a redox que regula la expresión de una variedad de genes antioxidantes y de desintoxicación a través de un elemento de respuesta antioxidante. Se ha demostrado que Nrf₂ protege varios tipos de células contra la lesión aguda y crónica que acompaña al estrés oxidativo⁽⁸⁰⁾.

Nrf₂ es un factor de transcripción de la familia de cremalleras de leucina y Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch). Keap 1 es el represor específico, responsable del secuestro de Nrf₂ en el citoplasma⁽⁸¹⁾. Estas dos proteínas median la respuesta celular al estrés oxidativo y a los xenobióticos electrofílicos⁽⁸²⁾. Entre los genes diana regulados por Nrf₂ se incluyen enzimas antioxidantes, involucradas en la conjugación

electrófila, la homeostasis del glutatión, la producción de equivalentes reductores, la función del proteasoma y otros⁽⁸³⁾.

En la célula, la regulación de los niveles de Nrf2 y su actividad se produce en varios niveles, incluida la transcripción, traducción, degradación, translocación y modificaciones postraduccionales como la fosforilación⁽⁸⁴⁾. Uno de los mecanismos más importantes que determinan el aumento de los niveles de proteína Nrf2 implica una disminución de la tasa de degradación de la proteína Nrf2. En ausencia de condiciones de estrés, las concentraciones celulares normalmente bajas de Nrf2 se mantienen por degradación proteasómica, a través de un mecanismo dependiente de Keap1-Cullin 3-Roc1, en el que Keap1 sirve como la subunidad del adaptador de sustrato en la holoenzima E3.

La activación de Nrf2 le permite escapar de la proteólisis y acumularse rápidamente en el núcleo que induce sus genes diana⁽⁸⁵⁾. Keap1 es una proteína rica en cisteína (Keap1 humano y murino contiene 27 y 25 residuos de cisteína, respectivamente) y, por lo tanto, las modificaciones en los residuos de esta proteína que contienen sulfhidrilo producen cambios conformacionales⁽⁸⁶⁾. De hecho, las condiciones de estrés oxidativo y muchos productos químicos exógenos alteran el estado redox de los residuos de cisteína Keap1.

Como consecuencia, hay una desestabilización del complejo Keap1 / Nrf2, evitando la degradación de Nrf2, lo que permite la translocación de Nrf2 al núcleo⁽⁸⁷⁾.

1.6.2.2. Activación de Proteínas

Tras la exposición de las células al estrés oxidativo o compuestos electrofílicos, Nrf2 está libre de Keap1 y se transloca en el núcleo para unirse a elementos sensibles a antioxidantes en genes que codifican enzimas antioxidantes como Glutatión peroxidasa (GPX), hemo oxigenasa-1 (HO1), quinona oxidoreductasa (NQO1), glutamato-cisteína ligasa modificadora (GCLM), e inhibidor del transportador del glutamato (XCT)⁽⁸⁸⁾. El aumento de la expresión de estas enzimas o proteínas juega un papel clave en la mediación de la desintoxicación celular, la antioxidación y los efectos antiinflamatorios⁽⁸⁹⁾.

a) Glutathion Peroxidasa (GPX)

El glutathion peroxidasa es una de las enzimas que participa en la transformación de ERO, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido, para lo cual utiliza como agente reductor al glutathion reducido⁽⁹⁰⁾.

Las enzimas GPX son las principales enzimas antioxidantes que eliminan el peróxido de hidrógeno o los hidroperóxidos orgánicos y, por lo tanto, protegen las biomembranas y los componentes celulares contra el estrés oxidativo⁽⁹¹⁾. También se ha demostrado que las enzimas GPX protegen contra el peroxinitrito, un potente oxidante generado por la reacción del superóxido y el óxido nitroso. Las isoformas de GPX difieren en su estructura primaria y localización⁽⁹²⁾. La clásica GPX1 mitocondrial citosólica (cGPX) es una enzima dependiente de selenio y fue la primera de la familia GPX en ser descubierta. GPX2, que también se conoce como GPX gastrointestinal, es una enzima citosólica expresada predominantemente en el epitelio del tracto gastrointestinal⁽⁹³⁾. El plasma extracelular GPX (pGPX o GPx3) se expresa principalmente en el riñón, desde donde se libera a la circulación sanguínea. El hidroperóxido de fosfolípido (GPx4) se expresa en la mayoría de los tejidos, y GPx5 (o eGPX) es el GPX secretor específico del epidídimo⁽⁹²⁾.

b) Hemo oxigenasa-1 (HO-1)

La hemo oxigenasa-1 (HO-1) es una enzima limitante de la velocidad inducible por el estrés que cataliza la degradación del hemo para generar biliverdina, hierro libre y monóxido de carbono. Desempeña un papel vital en la defensa y reparación del daño inducido por el estrés oxidativo⁽⁹⁴⁾. La falta de HO-1 puede causar cambios profundos en la homeostasis celular en ratones y humanos genéticamente deficientes, lo que está asociado con la susceptibilidad al estrés oxidativo⁽⁹⁵⁾. Además, HO-1 también se considera una proteína importante para las acciones antiinflamatorias y antiapoptóticas⁽⁹⁶⁾, por lo tanto, se ha convertido en un objetivo potencial para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares con altos niveles de estrés oxidativo, como la aterosclerosis, la isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, hipertensión, diabetes y obesidad⁽⁹⁷⁾.

La inducción de HO-1 bajo estrés oxidativo se activa principalmente por el Nrf₂. La posterior translocación de Nrf₂ en el núcleo y la unión al elemento de respuesta antioxidante, dan como resultado la activación transcripcional de las enzimas antioxidantes de fase II, incluida HO-1⁽⁹⁸⁾.

c) Quinona Oxidorreductasa -1. (NQO-1)

La quinona oxidorreductasa- 1 (NQO1) es una enzima clave involucrada en la defensa contra formas reactivas de oxígeno e inhibición de la neoplasia⁽⁹⁹⁾. Bajo condiciones de estrés oxidativo, el aumento resultante en la proteína NQO1 proporciona a la célula múltiples capas de protección contra las agresiones ambientales⁽¹⁰⁰⁾. En primer lugar, la actividad catalítica de NQO1 se dirige hacia la reducción completa y la desintoxicación de quinonas altamente reactivas. En segundo lugar, la oxidorreductasa mantiene los antioxidantes endógenos solubles en lípidos, la α -tocoferol-hidroquinona y el ubiquinol en sus formas reducidas y activas. En tercer lugar, se requiere NQO1 para la estabilización de la proteína p53 en respuesta a estímulos que dañan el ADN y, por lo tanto, influye en las decisiones del destino celular⁽¹⁰¹⁾. Esto sugiere un papel importante de NQO1 cuando se induce bajo estrés, ya que, mantiene la estabilidad de proteínas críticas tales como p53 y otros factores de transcripción⁽⁹⁹⁾.

En condiciones constitutivas normales, Nrf₂ se asocia con la proteína de unión al citoesqueleto Keap1, que regula la distribución subcelular del factor bZip y también lo dirige a la degradación dependiente del proteasoma. El estrés oxidativo inhibe la interacción Nrf₂ - Keap1, promoviendo así la acumulación nuclear del factor de transcripción y la transactivación de NQO1 y otros genes⁽¹⁰²⁾.

d) Glutamato-Cisteína-Ligasa Modificadora (GCLM)

El glutatión (GSH) es el tiol no proteico principal en las células de mamíferos que participa en muchas funciones celulares críticas, incluida la defensa antioxidante y el crecimiento celular⁽¹⁰³⁾. La síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes implica dos pasos enzimáticos que requiere ATP, estos son la formación de γ -glutamilcisteína a partir de glutamato y cisteína y la formación de GSH a partir de γ -glutamilcisteína y glicina⁽¹⁰⁵⁾. El primer paso de la biosíntesis

de GSH es la limitación de velocidad de la reacción catalizada por glutamato-cisteína ligasa (GCL, también conocida como γ -glutamilcisteína sintetasa), mientras que el segundo paso es catalizado por la sintetasa GSH⁽¹⁰⁵⁾. La enzima GCL está compuesta por una subunidad catalítica (GCLC) y un modificador (GCLM) que están codificados por diferentes genes y se disocian en condiciones reductoras⁽¹⁰⁶⁾. GCLC exhibe toda la actividad catalítica de la enzima aislada, así como la inhibición por retroalimentación por GSH⁽¹⁰⁵⁾. La subunidad modificadora GCLM, es enzimáticamente inactiva, pero desempeña una función reguladora importante al reducir el K_m (afinidad que tiene la enzima por su sustrato) de GCL para glutamato y elevar el K_i (inhibición enzimática) para GSH⁽¹⁰⁵⁾. La sobre expresión de GCLM y la asociación de GCLM con GCLC es responsable del aumento aparente en el estado de actividad de GCL⁽⁹⁶⁾.

e) Inhibidor del Transportador del Glutamato (XCT)

XCT es un sistema transportador de cistina / glutamato, es un anti portador que en humanos está codificado por el gen SLC7A11⁽¹⁷⁷⁾. El XCT se caracterizó por primera vez en fibroblastos de pulmón fetal humano en cultivo por Bannai y Kitamura en 1980⁽¹⁷⁸⁾. El sistema XC, actúa como un anti portador independiente de sodio y dependiente de cloruro de las formas aniónicas de cistina y glutamato⁽¹⁷⁹⁾.

SLC7A11, es identificado como un ácido desoxirribonucleico (cDNA) complementario para el transportador de XCT-aminoácidos (conocido como XCT humano)⁽¹⁷⁷⁾, que cuando se expresa con la cadena pesada del antígeno de superficie 4F2 (4F2hc), también denominado CD98, induce la actividad de transporte XC. El oxígeno regula la actividad del sistema XC, dándole a esta proteína un papel relevante en situaciones de estrés oxidativo⁽¹⁷⁹⁾.

Entonces, Nrf₂ y la activación de otras proteínas es uno de los sistemas antioxidantes críticos involucrados en el mantenimiento del estado redox para la defensa del estrés oxidativo intracelular⁽¹⁸⁰⁾.

Cuando las CEBH son dañadas por una variedad de estímulos oxidativos, aumenta la producción de factores inflamatorios y la actividad de las enzimas proteolíticas, y se promueve el inicio de la apoptosis con una mayor generación de ERO⁽¹⁸²⁾.

La apoptosis es una forma fisiológica de muerte celular. Sus causas y mecanismos de ejecución no se entienden claramente. El estrés oxidativo, el óxido nítrico y sus congéneres, Ca²⁺, proteasas, nucleasas y mitocondrias se consideran mediadores de la apoptosis⁽¹⁸³⁾.

Los niveles de viabilidad y / o las tasas de proliferación de las células son buenos indicadores de la salud celular. Los agentes físicos y químicos pueden afectar la salud celular y el metabolismo. Estos agentes pueden causar toxicidad en las células a través de diferentes mecanismos, como la destrucción de las membranas celulares, la prevención de la síntesis de proteínas, la unión irreversible a los receptores, la inhibición del alargamiento del polidesoxinucleótido y las reacciones enzimáticas⁽¹⁸¹⁾.

Para determinar la muerte celular causada por estos mecanismos, existe la necesidad de ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular a corto plazo, que son rápidos, confiables y reproducibles.

1.7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.

La viabilidad celular *in vitro* y los ensayos de citotoxicidad con células cultivadas se usan ampliamente para pruebas de citotoxicidad de productos químicos, para la detección de efectos sobre la proliferación celular que conducen a la muerte celular y para conocer la cantidad de células viables⁽⁸³⁾.

Los ensayos basados en la viabilidad celular 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 reporteros genéticos, el tráfico de componentes celulares o el monitoreo de la función de los orgánulos⁽¹⁸¹⁾.

La aplicación de estos ensayos ha sido de creciente interés en los últimos años. Actualmente, estos ensayos también se utilizan en investigaciones para evaluar tanto la toxicidad de los compuestos como la inhibición del crecimiento de células tumorales durante el desarrollo del fármaco ya que son rápidos, económicos y no requieren el

uso de animales. Además, son útiles para analizar gran cantidad de muestras. Los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad se basan en diversas funciones celulares, como la permeabilidad de la membrana celular, la actividad enzimática, la adherencia celular, la producción de ATP, la producción de coenzimas y la actividad de absorción de nucleótidos⁽¹⁸⁴⁾.

Existen diferentes clasificaciones para los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular, según los tipos de medición de los puntos finales (cambios de color, fluorescencia, luminiscencia, entre otros)⁽¹⁸⁷⁾. Así se tiene:

- Ensayos de exclusión de colorante: Ensayos de azul de tripano, eosina, rojo de Congo, eritrosina B.
- Ensayos fluorométricos: Ensayo alamarBlue.
- Ensayos luminométricos: Ensayo ATP y ensayo de viabilidad en tiempo real.

El ATP (trifosfato de adenosina) representa el depósito de energía química más importante en las células y se utiliza para procesos de síntesis, señalización, transporte y movimiento biológicos. Por lo tanto, el ATP celular es uno de los puntos finales más sensibles para medir la viabilidad celular⁽¹⁸⁵⁾. Cuando las células se dañan letalmente y pierden integridad de la membrana, pierden la capacidad de sintetizar ATP y el nivel de ATP de las células disminuye drásticamente⁽¹⁸⁶⁾. El ensayo ATP se basa en la reacción de oxidación de luciferina a oxiluciferina. La enzima luciferasa cataliza esta reacción en presencia de iones Mg^{2+} y ATP produciendo una señal luminiscente. Existe una relación lineal entre la intensidad de la señal luminiscente y la concentración de ATP o el número de células⁽¹⁸⁸⁾.

El conteo de CEBH viables usando reactivos luminiscentes de tipo resplandor como el CellTiter-Glo® proporciona la detección de alto rendimiento, proliferación celular y citotoxicidad automatizadas, incluyendo la cuantificación de ATP presente. Esto, indica la presencia de células metabólicamente activas⁽⁹⁰⁾.

Después de determinar la viabilidad, es necesario visualizar la inclusión de las partículas atmosféricas en las estructuras pequeñas de las células. Para este tipo de análisis, se utiliza un instrumento llamado, microscopio óptico de luz⁽⁹¹⁾.

1.8. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Los microscopios ópticos están diseñados para crear imágenes magnéticas visuales o fotográficas de objetos pequeños. Para lograr esto, el microscopio está diseñado para realizar tres tareas que son crear una imagen ampliada de la muestra, distinguir diferentes detalles de la imagen y hacer que la imagen final sea visible para el ojo humano o la cámara. Esta clase de instrumentos de caracterización incluye desde una simple lupa hasta microscopios avanzados de lentes múltiples⁽¹⁸⁹⁾.

Los microscopios de luz se pueden configurar en varias plataformas diferentes, para diferentes propósitos y con diferentes niveles de personalización⁽¹⁹⁰⁾.

Un microscopio vertical, es aquel en el cual la muestra se observa desde arriba con un lente objetivo. Los microscopios verticales se utilizan con mayor frecuencia para el trabajo de histología, y están equipados con una óptica de alta resolución, pero corta distancia de trabajo⁽¹⁹¹⁾.

Un microscopio invertido es la base del laboratorio de cultivo de tejidos, donde las muestras se ven a través de lentes objetivas colocadas debajo de la muestra. Esto permite la observación de células vivas en cultivo, por ejemplo, a través de fondos transparentes de matraces de cultivo de tejidos o placas de pocillos múltiples⁽¹⁹²⁾.

El microscopio óptico es, de hecho, un instrumento muy versátil cuando se considera la variedad de modos en los que está construido y utilizado. Las dos categorías principales de microscopios son (a) transmisión, en la cual la luz pasa a través del objeto en estudio para formar una imagen; y (b) reflexión (incidente), en la que se forma una imagen a partir de la luz reflejada desde la superficie del objeto. Ambos tipos se fabrican en modelos monoculares y binoculares, así como en modelos de etapa vertical e invertida⁽¹⁹³⁾.

1.8.1. Microscopía de Transmisión electrónica

La microscopía de transmisión electrónica (MTE) es una aplicación utilizada para el análisis y visualización de muestras que están en el orden de micrómetros y nanómetros. Esta técnica utiliza la emisión de haces de electrones como la base fundamental de su funcionamiento, a diferencia del microscopio óptico que utiliza

radiación de fotones, esta técnica permite tener imágenes de alta resolución enfocando electrones de alta energía⁽²⁴⁾.

Dado que la longitud de onda de un electrón es mucho más pequeña que la longitud de onda de la luz visible, los efectos de difracción ocurren en dimensiones físicas mucho más pequeñas. La resolución de imagen en MTE, es del orden de 1.0nm, que es mucho mejor que la resolución en μm de microscopía óptica. Cuando los electrones penetran en una muestra, se difractan para formar un patrón de difracción. Este patrón de difracción se puede transformar con una lente para obtener la imagen de muestra⁽⁵⁹⁾.

La MTE es importante en la investigación de los efectos toxicológicos a nivel celular, ya que, el uso de técnicas de imágenes avanzadas permite también determinar las inclusiones citoplásmicas⁽³²⁾. Mediante la microscopía es posible el análisis visual de las células, pero es difícil realizar cuantificaciones exactas por ejemplo de las proteínas.

Conocer la cantidad de proteínas en las células, permite determinar la forma y la estructura de las células, ya que, las proteínas dirigen casi todos los procesos vitales, es por esta razón que permiten a las células mantener su integridad, defenderse de agentes externos, reparar daños, controlar y regular funciones, entre otros⁽³⁴⁾.

1.9. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

La cuantificación de proteínas es necesaria antes de manipular muestras de proteínas, para su aislamiento, su caracterización o separación respectiva por cromatografía, electroforesis, inmunoquímica y para procedimientos posteriores. Cada método tiene diferentes ventajas y limitaciones. Lo importante es saber cómo seleccionar el ensayo de cuantificación de proteína más apropiado para una aplicación específica⁽⁷⁸⁾. Los métodos de ensayo para la cuantificación de proteínas que se usan comúnmente en laboratorios bioquímicos son el ensayo Lowry, el ensayo Bradford, el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), Western Blot (WB) y espectroscopía UV para la determinación de la concentración de proteínas⁽⁹²⁾.

Western Blot (WB) es un método común para detectar y analizar proteínas. Se basa en una técnica que implica la transferencia, también conocida como transferencia de proteínas separadas por electroforesis del gel a una membrana donde se pueden

visualizar específicamente. El procedimiento fue descrito por primera vez por H. Towbin en 1979⁽⁷⁸⁾ y dos años más tarde le dio su nombre W. Neal Burnette⁽⁷⁸⁾. Towbin cambió la transferencia electroforética de proteínas de geles de poliacrilamida a láminas de nitrocelulosa y obtuvo con precisión el patrón de gel original. La configuración consta de un conjunto estándar de siete pasos⁽⁵⁶⁾, como se observa en la Figura 9.

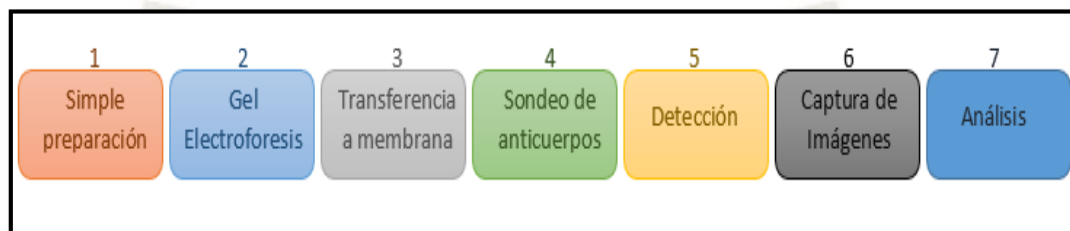


Figura 9: Los pasos estándar en Western Blotting.

Fuente: The Human Protein Atlas, (2018)

Las muestras se preparan y se cargan en un gel y durante la electroforesis las proteínas cargadas negativamente se mueven hacia el ánodo cargado positivamente. Para analizar más a fondo las proteínas, se transfieren a una membrana en un procedimiento llamado transferencia⁽⁵⁷⁾. Para visualizar la proteína de interés, la membrana generalmente se prueba primero usando un anticuerpo primario específico de proteína seguido de un anticuerpo secundario marcado utilizado para la detección. Se toma una imagen de la membrana y se analiza el resultado⁽⁷⁹⁾.

Al agregar una solución de marcador separada a uno de los pocillos en el gel, es posible estimar el tamaño de la proteína además de las interacciones de anticuerpos que se utilizan para verificar la proteína específica. La separación en el gel no solo se debe al tamaño sino también, en cierta medida, a la carga molecular, las regiones hidrofóbicas y el grado de desnaturalización. La configuración del experimento se puede variar de muchas maneras para adaptarse mejor a la consulta específica⁽⁹²⁾.

Al analizar los resultados, deben tenerse en cuenta las variaciones entre los carriles con respecto a la carga y las tasas de transferencia entre borrones. Además, la relación no lineal de la señal generada a través del rango de concentración de las muestras también es un aspecto a tener en cuenta al interpretar los resultados⁽⁷⁹⁾.

El resultado de un experimento WB depende de tres factores importantes; la capacidad del anticuerpo para unirse a una proteína específica, la fuerza de la interacción y la concentración de la proteína de interés en sí. Además, la especificidad de la unión al objetivo y una baja reactividad cruzada también son características importantes⁽⁷⁷⁾. El resultado de WB no siempre es fácil de interpretar, ya que el tamaño de la proteína puede variar del peso teórico debido a modificaciones post-traduccionales, como la glucosilación o las interacciones con otras proteínas. Sin embargo, WB es un método muy común y casi todos los anticuerpos comerciales disponibles han sido validados con este método⁽⁹²⁾.

1.10. HIPOTESIS

Dado que las partículas atmosféricas cuyo diámetro aerodinámico oscila entre los $2.5\mu\text{m}$ ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$) y $0.1\mu\text{m}$ ($\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$) ingresan fácilmente por las vías respiratorias llegando hasta los alveolos, es probable que originen estrés oxidativo, sobre expresión de proteínas, inflamación, alteraciones de la dinámica mitocondrial, y finalmente esto conlleve a una muerte celular.

CAPITULO II

2. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

2.1. TÉCNICA, INSTRUMENTOS Y MATERIALES D VERIFICACIÓN

2.1.1. Material biológico.

Las células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) de acuerdo con la organización American Type Culture Collection (ATTC), son células aisladas a partir del epitelio bronquial humano normal, obtenidas a partir de la autopsia de individuos no cancerosos y, posteriormente infectadas con el virus híbrido adenovirus 12-SV49 (Ad12SV40) para su inmortalización.

2.1.2. Instrumentos Utilizados

- Baño térmico (Lab Armor®, Bead Bath™ Model 74300706)
- Cámara de flujo laminar (Class II tipe A2; BA2 marca Lumes)
- Cámara de nitrógeno líquido (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages)
- Centrífuga (Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104)
- Contador celular (Invitrogen Safe Imager 2.0 Blue-Light Transilluminator)
- Incubadora con fuente de CO₂ (Thermo Scientific Steri Cycle 370 CO₂ Incubator)
- Incubadora de microplacas (VWR®, Signature™ Incubating/Cooling Shaker)
- Escáner de membrana de Western Blot (BioRad®, PowerPac™ HC High-Current Power Supply)
- Lector espectrofotométrico de microplacas (BioTek®, Synergy™ microplates)
- Microcentrífuga (Fisher Scientific®, Eppendorf™ 5424R Microcentrifuges)
- Sistema de electroforesis (minicelda XCell SureLock)
- Sistema de transferencia (The Trans-Blot Turbo Transfer System)

- Agitador Vortex (Fisher Scientific Vortex Mixer, Cat # 02215365)
- Baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics Ultrasonic Cleaner 20.8L CPN-952-817)
- Sistema de quimioluminiscencia (Fusion FX Spectra)
- Analizador de partículas Nano ZS (Malvern Instruments ©, Malvern, Inglaterra)
- Espectro de fotoelectrones de rayos X (XPS_K ALPHA, Thermo Scientific)
- Espectro de masas de plasma acopladas inductivamente ICP-MS (iCAP™ RQ ICP-MS, Thermo Scientific™)

2.1.3. Materiales y reactivos

- Células epiteliales bronquiales humanas (CEBH 2B, ATCC® crl-9609 tm)
- Medio de desarrollo de células epiteliales bronquiales (Gibco® LHC-9 medium)
- Partículas atmosféricas (SAGE. Escuela de Minas de Douai)
- Frascos de cultivo de 75 y 25 cm³
- Tubos Falcon de 15 y 50 mL
- Tubos Eppendorf de 3 y 5 mL
- Pipetas descartables 1, 5, 15, 25, 50 mL
- Micropipetas de 0,1 µL hasta 20 mL
- Membrana de nitrocelulosa 0.45µm (ThermoScientific, Nitrocellulose Membrane, 88018)
- Papel filtro de Western-Blot (ThermoScientific, Western Blotting Filter Paper, 88620)
- Suero fetal de bovino (FBS) (Culture system containing B-ALITM Basal Media 00193516)
- Tripsina EDTA (Reactivo para el pasaje celular) (Gibco™ Trypsin-EDTA)

- Solución Azul de Tripán 0.4% (reactivo usado para la viabilidad celular)
- M-PER (reactivo para la extracción de proteínas)
- Lisis y Cockteil (reactivos para la lisis celular)
- Kit de Pierce BCA Assay (cuantificación de proteínas)
- SDS-Sample Buffer 4X reducing
- TBS Tween 20X (reactivo para inmunoensayos)
- Ladder (marcador de peso molecular de proteínas)
- Leche en polvo sin calorías
- Anticuerpo primario de β -actina
- Anticuerpo primario de NRF2, XCT, NQO-1, GPX, GCLM.
- Anticuerpo secundario cabra anti-conejo, anti-ratón.
- Substrato químicoluminiscente
- Buffer stripping WB PLUS (reactivo para inmunoensayos)
- Luminiscente CellTiter-Glo (reactivo para la viabilidad celular)
- Buffer RLTplus QIAshredder (lisado celular)
- Kit high (kit para la transcripción inversa)

2.2. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

2.2.1. Ámbito de la Investigación

La investigación se realizó en el laboratorio Impacto Ambiental en la Salud Humana Química (IMPECS) del equipo anfitrión 4483 (EA-4483), el cual existe desde 2010 y corresponde a la fusión de tres equipos: EA-2679: Variabilidad genética de la respuesta del cuerpo a su entorno químico, EA-2689: Biología y fisiología de los estados escépticos y EA-2690: Carcinógenos tóxicos y ocupacional y ambiental.

La agrupación de estos laboratorios es debido a la complementariedad de los temas estudiados, así como la comprensión de los peligros de ataque químico (y especialmente la contaminación) en la salud humana (AERES, 2013).

IMPECS se compone de varias entidades ubicadas en diferentes complejos de la Universidad de Lille 2 y el Instituto Pasteur de Lille. El IMPECS se une al Polo de Investigación de la Facultad de Medicina. Esta unidad está dirigida desde 2013 por el Dr. Jean-Marc Lo Giudice, investigador del Instituto Nacional de Salud e Investigación Médica (INSERM).

2.2.2. Obtención y caracterización fisicoquímica de las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$.

Para la caracterización fisicoquímica, el equipo de Ciencias Atmosféricas e Ingeniería Ambiental (SAGE) recolectó partículas finas ($PF_{2.5\mu m}$) y partículas ultrafinas ($PUF_{0.1\mu m}$) en la Escuela de Minas de Douai, Francia. El sitio de muestreo se encuentra en la costa de Dunkerque en la ciudad de Grande-Synthe. El área es representativa de un área urbano-industrial (Figura 10). La zona de actividad se encuentra al norte de la ciudad. La dirección predominante del viento (noreste a suroeste) en el área desplaza masas de aire húmedo y salino del mar que pueden influir en la composición química de los aerosoles de partículas.

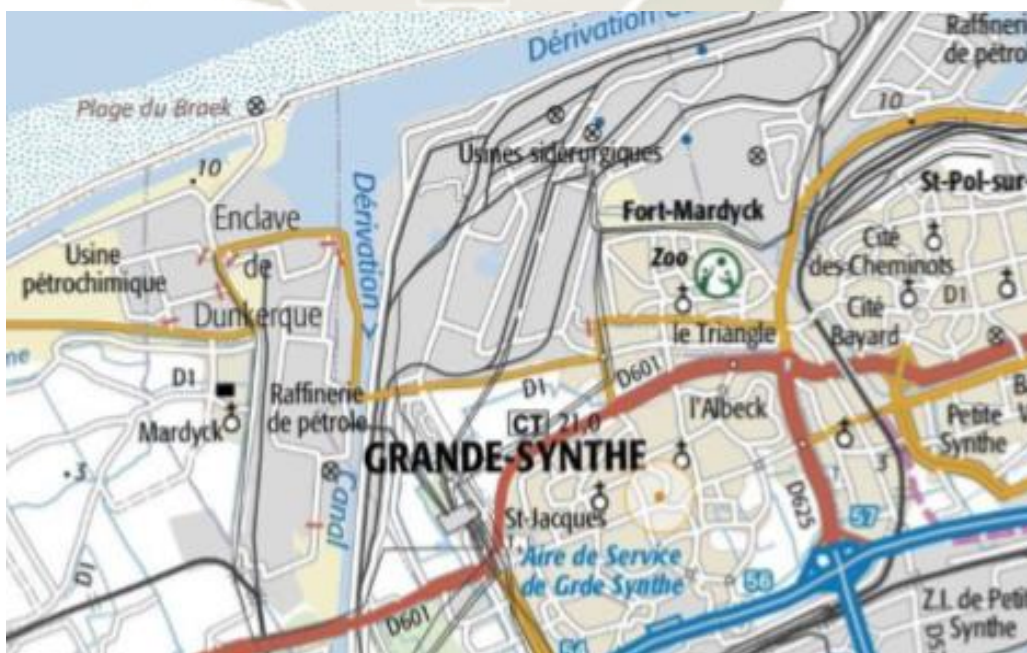


Figura 10: Ubicación geográfica del área de muestreo.

Se realizó un muestreo de impacto de alto volumen por filtración con un filtro de policarbonato para obtener exactamente la fracción ultrafina (con un diámetro aerodinámico inferior a $0,18\mu\text{m}$). Las muestras se recolectaron durante 7 días cada una, entre el 9 de septiembre de 2017 y el 14 de abril del 2018 (27 semanas en total), se almacenaron en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego se reunió todas las muestras para obtener una acumulación suficiente de partículas para permitir una caracterización fisicoquímica detallada y análisis toxicológicos.

Los métodos de muestreo y extracción de las partículas son diferentes, las $\text{PUF}_{0,1\mu\text{m}}$ se analizaron en suspensión en HBSS, mientras que las $\text{PF}_{2,5\mu\text{m}}$ se analizaron en seco. Las $\text{PUF}_{0,1\mu\text{m}}$ obtenidas se pesaron en una balanza con una escala de precisión de 10^{-4} y luego se suspendieron en solución salina (HBSS) a la concentración deseada, para exponer los cultivos celulares (Figura 11). La obtención de la solución final requiere diluciones en cascada con un paso de sonicación de 5 minutos entre cada dilución para desaglomerar las partículas.

Análisis granulométrico

Las partículas ($\text{PF}_{2,5\mu\text{m}}$ y $\text{PUF}_{0,1\mu\text{m}}$) se suspendieron en HBSS a una concentración de 1.0 mg / mL . Las suspensiones se analizaron mediante una técnica de granulometría láser utilizando un analizador de partículas Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments ©, Malvern, Inglaterra). El principio de esta técnica se basa en la dispersión dinámica de la luz por el movimiento browniano de las partículas. La ecuación de Stokes-Einstein establece la relación entre el movimiento browniano y el tamaño de las partículas. Cuanto más pequeña es una partícula, mayor es su movimiento browniano. Al tomar dos mediciones en un pequeño intervalo de tiempo (aproximadamente $100\text{ }\mu\text{s}$), la luz dispersa permite analizar la intensidad del movimiento y, por lo tanto, deducir el tamaño de las partículas. La concentración de masa de $\text{PUF}_{0,1\mu\text{m}}$ es insignificante en comparación con la de $\text{PF}_{2,5\mu\text{m}}$, pero son mucho más numerosas. Por eso hablaremos de cantidad (número) en el caso de ambos tipos de partículas. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), los datos presentados en los resultados son un promedio de 13 escaneos sucesivos.

Determinación del potencial Z

El potencial zeta se analizó de acuerdo con el principio de electroforesis. Dos electrodos (ánodo y cátodo) colocados en los extremos del equipo permiten dar una segunda dimensión al movimiento de las partículas en la solución. Además de ser sometidos al movimiento browniano, las partículas más cargadas son atraídas a los electrodos en un gradiente electroquímico. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente (25° C), los datos presentados en los resultados son un promedio de 13 exploraciones sucesivas.

Determinación de la composición química elemental por espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP - MS)

Este tipo de espectrometría de masas utiliza un plasma acoplado inductivamente para ionizar las muestras, con el objetivo de atomizar la muestra y crear iones poliatómicos pequeños y atómicos para que luego sean detectados. Se utilizó para detectar metales y varios no metales en muestras líquidas a concentraciones muy bajas. Esto a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos estos iones, se separaron de acuerdo con su masa y su carga y finalmente se detectaron por medio de un dispositivo adecuado.

Para las PF_{2,5µm} y las PUF_{0,1µm} se utilizó el protocolo de (Thermo Scientific iCAP RQ ICP-MS with iMR).

Partículas finas (PF_{2,5µm}):

Las muestras se pesaron y se mineralizaron en medio ácido (HNO₃: H₂O₂: HF, proporción 1 mL/1mL/0,25 mL). Los metales y metaloides (Al, As, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn Sr, Tl, V, Zn) fueron analizados por ICP-MS. Las muestras ya en líquido se introducen utilizando un nebulizador y una cámara de pulverización. El nebulizador utiliza la expansión supersónica del gas para convertir el líquido en una niebla fina, y la cámara de pulverización entonces elimina las gotas que son demasiado grandes para ser procesadas en el plasma. Esto ocurre en la interfaz de muestra del instrumento.

Partículas ultra finas (PUF_{0,1µm}):

Se analizaron cuatro muestras de 250 μ L de la solución de HBSS que contenía las PF_{2.5 μ m}, después de la mineralización ácida, por ICP-MS para los elementos principales y traza de acuerdo con el mismo protocolo que para PF_{2.5 μ m}. (Figura 11)

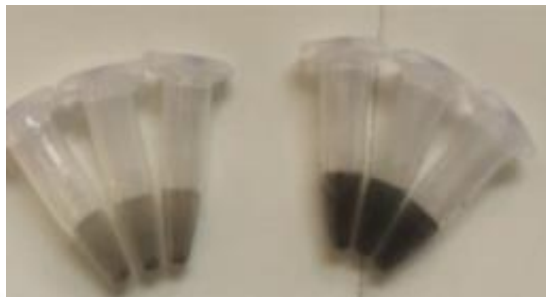


Figura 11: Soluciones de PF_{2.5 μ m} (izquierda) y PUF_{0.1 μ m} (derecha) diluidas en HBSS.

Fuente: Elaboración propia.

El contenido de la superficie de las partículas se investigó mediante espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS_K ALPHA, Thermo Scientific).

Análisis por espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS)

Las PF_{2.5 μ m} y las PUF_{0.1 μ m} se analizaron por triplicado (n=3). Los análisis se llevaron a cabo con una fuente de MgK α monocromada cuyo tamaño de punto se puede ajustar de 400 μ m a 30 μ m de diámetro. Las muestras se depositaron en una placa semiconductora de silicio y se introdujeron bajo un vacío secundario del orden de 10⁻⁷ mbar antes de transferirlas a la cámara de análisis (10⁻⁹ mbar). El tiempo de residencia en la cámara de introducción fue del orden de 60 minutos (para obtener una desgasificación correcta de las muestras). El tiempo de residencia en la cámara de análisis fue del orden de 320 minutos (duración del análisis para todas las muestras). Para cada muestra, se realizó un espectro global XPS (encuesta) que permitió resaltar los niveles centrales de los átomos emisores cuya energía de unión es inferior a 1254 eV (resolución de 1.0 eV). Luego, se realizaron espectros de mayor resolución (resolución de 0.05 eV) en los niveles centrales de los elementos detectados. La duración de la exposición a rayos X para cada muestra fue del orden de 600 s.

La metodología y manipulación de las técnicas utilizadas en la obtención y caracterización fisicoquímica de las PF_{2.5 μ m} y PUF_{0.1 μ m}, fueron desarrolladas

experimentalmente con el equipo SAGE y con Jules Soty (PhD en biología molecular en la Universidad de Lille · EA4483-IMPECS).

2.3. CULTIVO CELULAR.

2.3.1. Preparación del medio.

Se utilizó la línea celular CEBH para los distintos ensayos de citotoxicidad. Estas células se cultivan en medio de interface aéreo-líquida Lonza/ Clonetics™ B-ALI. Este medio consiste en un medio de cultivo líquido para células de Epitelio Bronquial (LHC9), el cual se compone de 250 mL B-ALI™ medio y suplementos de crecimiento como 1.0 mL de extracto pituitario bovino (BPE) y 0.25 mL de cada uno de los siguientes componentes, hidrocortisona, epinefrina, transferrina, insulina, ácido retinoico, triyodotironina, GA-1000 y hEGF (0,25 mL), como se muestra en la figura 12. Todos los componentes se deben almacenar a -20 °C hasta su uso.



Figura 12: Medio de cultivo LHC9 para las CEBH, preparado con todos los suplementos.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.2. Fase de multiplicación celular

Descongelación

Las células se encuentran en congelación en nitrógeno líquido a -196°C, para descongelarlas se les sometió inicialmente a temperatura ambiente y posteriormente a baño maría de 37°C durante 3 a 4 minutos. Una vez descongeladas, se les transfirió a

un frasco de cultivo celular (Figura 13) con 15 mL de medio de cultivo (LHC9), el cual se incubó a 37°C. Luego de 6 horas se procedió a cambiar el medio de cultivo para eliminar el DMSO o glicerol residual que se utilizó durante la congelación.

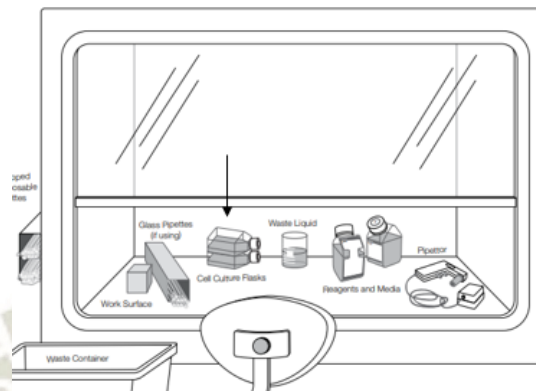


Figura 13: El diseño básico para trabajar cultivos en una campana celular ⁽⁹³⁾. La flecha negra muestra el diseño de un frasco de cultivo celular.

Multiplicación

Para determinar los efectos tóxicos de las partículas sobre la multiplicación de las células fue necesario tener una concentración inicial de células en cada uno de los pozos, por esa razón se extrajo 10 μ L de la solución reconstituida con LHC9 y se colocó en una lámina microscópica para realizar el conteo en el equipo de conteo celular (Figura 14). Para pasar las células a una nueva placa celular se tomó en cuenta 300 000 células y 2mL de LHC9 por pozo. Una vez terminada la distribución, se indujo a multiplicación celular, llevando la placa a una incubadora de CO₂ a 37°C (Figura 15).



Figura 14: Equipo de conteo celular

Fuente: Elaboración propia.



Figura 15: Incubadora de dióxido de carbono.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.3. Tripsinización

Inicialmente se calentó el PBS y LHC9 a 37°C y se descongeló la tripsina 10X (se preparó tripsina 1X (con PBS y tripsina 10X)). Se sacó el frasco de cultivo celular que contiene las células en suspensión y se aspiró el medio de forma que las células se adhieran a las paredes para después lavar el frasco con 5mL de PBS, se realizó una segunda aspiración para retirar el PBS con células muertas, se añadió 4mL de tripsina 1X. Seguidamente, para inhibir la acción de la tripsina se añadió 8mL del medio LHC9 y después se centrifugó durante 5 minutos a 1100 rpm. Finalmente, se recuperó el sedimento de células y se reconstituyó con 5mL del medio LHC9 y se distribuyó en las placas como se muestra en la figura 16.

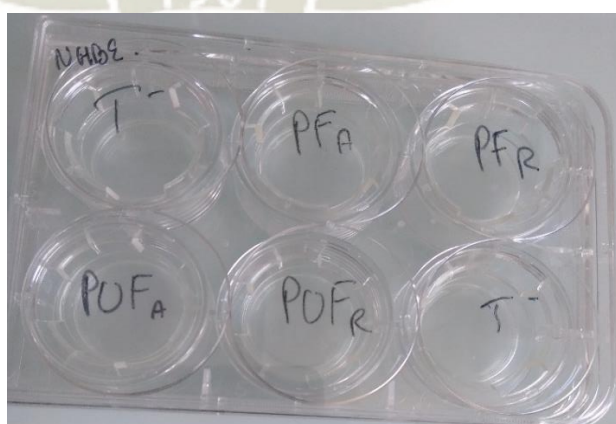


Figura 16: Placa de cultivo celular de 6 pozos.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.4. Preparación de las suspensiones de partículas

Los cálculos para la preparación de las suspensiones se realizaron de acuerdo al diámetro de cada pozo, considerando también el volumen de cada pozo (2mL) y el factor de dilución, después se agregó 500 μ L del antifúngico y se llevó a congelación a -80°C .

Tener en consideración que la DL10 de las células fue $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para PF $_{2.5\mu\text{m}}$, PUF $_{0.1\mu\text{m}}$ y TiO $_2$, varió para ZnO a $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Anexo 1.

2.3.5. Exposición de células a las suspensiones de partículas

Para empezar con la exposición se descongelaron las suspensiones de partículas), después se llevaron las soluciones a ultrasonido durante 2 minutos. Figura 17.



Figura 17: Equipo de baño ultrasonido.

Fuente: Elaboración propia.

Ya sonicadas las suspensiones, se aspiró el medio de cultivo y gota a gota se añadió 2mL de suspensión de partículas sobre toda la superficie de las placas.

La exposición a partículas se realizó en dos placas de forma repetida (varias veces) y de forma aguda (una sola vez).

Distribución de placa con exposición aguda.

Esta placa posee 5 pocillos ocupados. El primero fue un control positivo el cual tuvo sólo CEBH y medio de cultivo, en los dos siguientes pocillos las CEBH fueron expuestas en uno a las partículas finas PF y en el otro a las partículas ultrafinas PUF.

Los dos últimos pocillos fueron los controles negativos los cuales estaban formados por las CEBH expuestas a partículas de TiO_2 en uno y en el otro por partículas ZnO . Esta exposición se realizó una sola vez al tercer día, los dos primeros días las CEBH de todos los pocillos sólo estuvieron en medio de cultivo. Figura 18

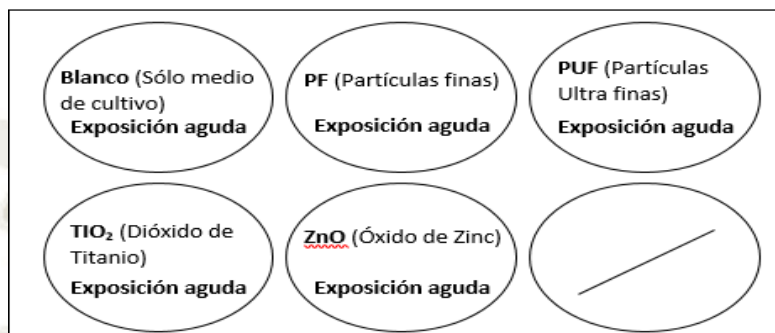


Figura 18: Distribución de la placa para exposición aguda ($n=1$; Una sola exposición)

Fuente: Elaboración propia

Distribución de placa con exposición repetida.

Esta placa posee 5 pocillos ocupados. El primero fue un control positivo el cual tuvo sólo CEBH y medio de cultivo, en los dos siguientes pocillos las CEBH fueron expuestas en uno a las partículas finas PF y en el otro a las partículas ultrafinas PUF. Los dos últimos pocillos fueron los controles negativos los cuales estaban formados por las CEBH expuestas a partículas de TiO_2 en uno y en el otro por partículas ZnO . Esta exposición se realizó una vez por día repetidamente por 3 días. Figura 19

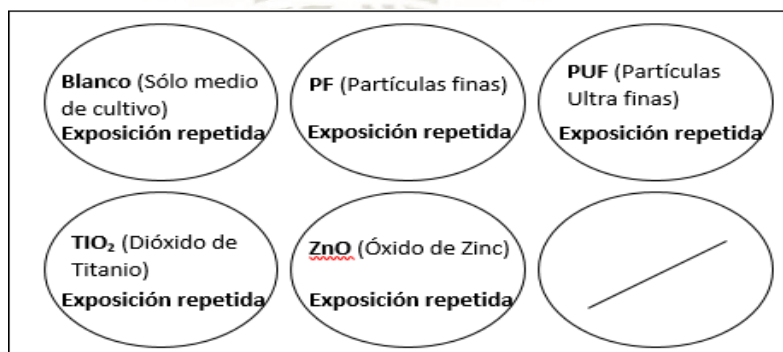


Figura 19: Elaboración de placa para exposición repetida ($n=3$; exposición repetida tres veces).

Fuente: Elaboración propia.

Finalmente, en el tercer día, después de la exposición, se incubaron a 37°C ambas placas por 24 horas.

2.3.6. Viabilidad celular luminiscente.

Se determinó la dosis en la que el 10% de células murieron (DL₁₀) a través de un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®. Este es un método homogéneo para determinar el número de células en cultivo, basado en la cuantificación del ATP presente, el cual es directamente proporcional a la presencia de células metabólicamente activas.

Se preparó el reactivo único (reactivo CellTiter-Glo®) conformado por CellTiter-Glo® Sustrato y CellTiter-Glo® Buffer (Figura 20). Una vez preparado el reactivo, se llevó las placas previamente expuestas a los diferentes tipos de partículas a temperatura ambiente. En cada pozo, se añadió 150 µL del reactivo preparado, 150µL de medio LHC9 y después se llevó a la mezcladora por 2 minutos.

Se tomó 150µL de las suspensiones preparadas en la placa anterior y se transfirieron a una placa de 90 pozos. En uno de los pozos se preparó un blanco constituido por 75µL de reactivo y 75µL de medio LHC9. Figura 21.

Finalmente se llevó al equipo correspondiente para la lectura de placas.



Figura 20: CellTiter-Glo® Sustrato y CellTiter-Glo® Buffer

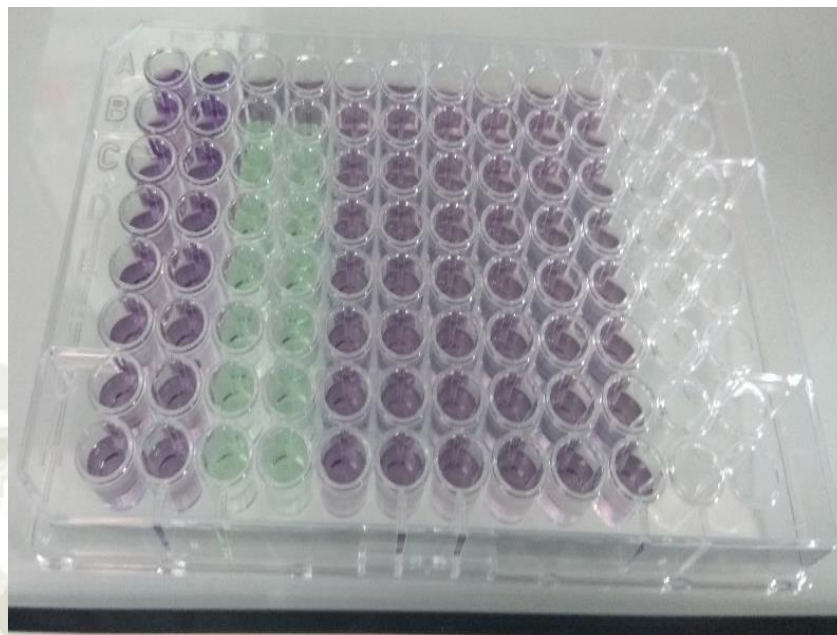


Figura 21: Placas de 96 pozos conteniendo las muestras a ser leídas en el lector de placas.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.7. Análisis microscópico por transmisión electrónica

Previo al análisis microscópico, se fijó las células con glutaraldehído, para lo cual se levantó la monocapa con un cell scraper, se centrifugó para conseguir un pellet y se fijó completamente con glutaraldehído al 2 % en tampón Cacodilato 0.1 M a pH 7.4, por 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente se procedió a lavar las células por 10 minutos con tampón Cacodilato y sacarosa isomolar, se deshidrató en serie creciente con etanol al 30, 50, 70, 90 % y 2 veces adicionales en etanol al 100%, 15 minutos en cada concentración. Se lavó las células con óxido de propileno al 100%, 2 veces por 10 minutos y se traspasó las muestras a los bloques del ultra micrótopo, para realizar cortes semi-finos, a los cuales se adicionó una resina Epoxi y se polimerizó en una estufa a 55°C durante 48 horas.

Se realizó la tinción con Azul de Toluidina y se observó al microscopio óptico (para ubicar la zona deseada), se contrastó con rejillas conteniendo citrato de plomo y acetato de uranilo y finalmente se observó al microscopio electrónico de transmisión.

2.3.8. Cuantificación específica de proteínas NRF2, GPX, HO1, NQO1 por Western Blot.

2.3.8.1. Migración

Las células fueron descongeladas a temperatura ambiente y colocadas en una cubeta de hielo para después preparar las nuevas muestras a partir de los resultados obtenidos en Excel (cantidad de proteínas y reactivo para cada una). Se completó el volumen de 20 μ L con H₂O.

Para realizar un spin se colocó los nuevos eppendorf en una mini centrifuga y se llevó a 70°C durante 10 minutos (para la desnaturalización de proteínas). Figura 22.

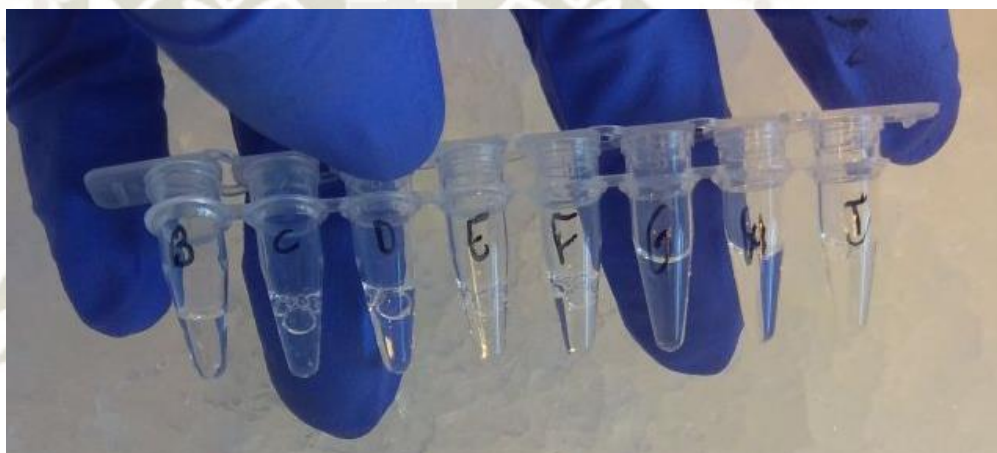


Figura 22: Eppendorf preparados para la desnaturalización de proteína.

Fuente: Elaboración propia.

2.3.8.2. Transferencia

Para la preparación se colocó el gel sobre el papel con membrana (fondo) y por encima del gel el papel 2 (parte superior), se dejó por 10 minutos en el equipo de transferencia, tiempo suficiente para que las proteínas sean transferidas del gel a la membrana (Figura 23). Finalmente se activó el generador (200v, 300Ma). Figura 24.



Figura 23: Sistema de transferencia de geles BioRad Trans-Blot Turbo.



Figura 24: Sistema de electroforesis de minicelda XCell SureLock

2.3.8.3.Saturación

Se colocó la membrana en el medio de saturación (BSA 5% con TBS o leche 5% con TBS) por 45 minutos. Figura 25.

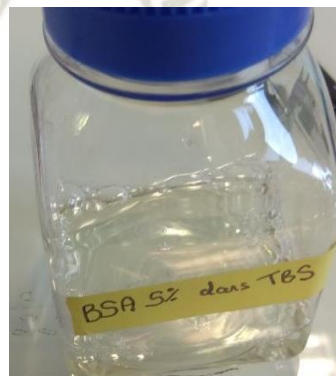


Figura 25: Medio de saturación preparado.

Fuente: Elaboración propia

2.3.8.4. Incubación

Incubación I: Para la incubación se preparó la solución de anticuerpo I (1:1000) en la cual se sumergió la membrana y después se dejó en movimiento lento por 24 horas a 4°C.

Incubación 2: Para esta última fase fue necesario sacar la membrana y recuperar la solución de anticuerpo I, lavarla 3 veces con buffer TBST, cada vez 5 minutos. Posteriormente se colocó la membrana en la solución de anticuerpo II (1:10000) por 45 minutos. Finalmente se lavó la membrana 3 veces con buffer TBST (cada vez 5 minutos) y se dejó en TBS para después añadirle el revelador (los dos reveladores son al 50% A y 50% de B), antes de llevarla a lectura al equipo de bandas (Western™ Detection System). Figura 26.

Fue necesario comparar las bandas de peso molecular con un formato diseñado para una estimación precisa y conveniente del peso molecular de las proteínas después de la transferencia por Western Blot. Figura 27.

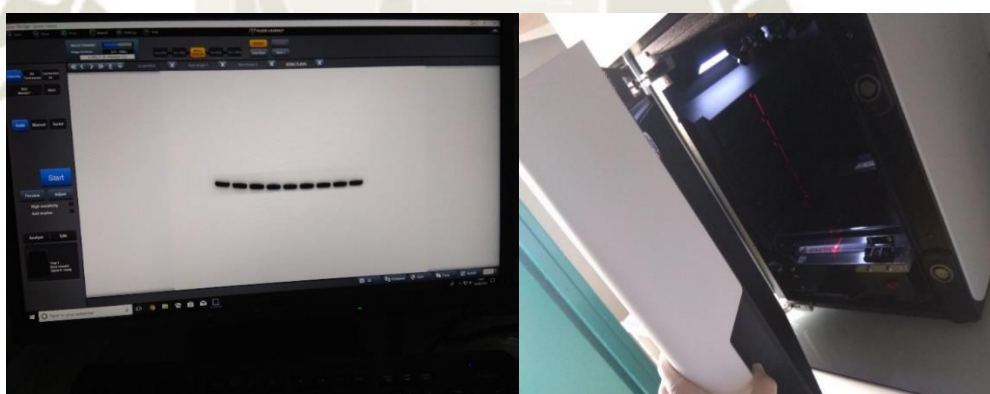


Figura 26: Sistema de detección de bandas Western



Figura 27: Estándar de análisis de proteínas para la carga directa en gels.

CAPITULO III

3. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados en este trabajo de investigación, fueron expresados como media \pm desviación estándar ($\bar{x} \pm \sigma$). Para las pruebas de significancia estadística fue usado el análisis de varianza ANOVA. Las diferencias entre las expresiones de cada proteína se evaluaron a través de la prueba de Tukey, el cual fue utilizado para realizar comparaciones múltiples con el respectivo vehículo a un $p < 0.05$. Todo esto fue analizado con ayuda del software estadístico GraphPad Prisma 8.

3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existe una asociación entre la exposición del ser humano a las partículas atmosféricas, tales como las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$, producidas por la contaminación atmosférica y los efectos nocivos en el hombre. La importancia de esta asociación es tal que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció en el año 2014, que la contaminación atmosférica es el mayor factor de riesgo ambiental para la salud a nivel mundial, siendo además un importante factor previsible⁽⁶⁾.

Los resultados de la presente investigación demuestran que, existen altos niveles de partículas finas en microambientes de la ciudad de Dunkerque, una ciudad industrial en Francia.

Los resultados de esta investigación responden a cuatro objetivos, siendo el principal evaluar los efectos tóxicos causados por partículas finas ($PF_{2.5\mu m}$) y ultra finas ($PUF_{0.1\mu m}$) atmosféricas, en un modelo *in vitro* de células epiteliales bronquiales (CEBH).

En la presente investigación, se trabajó con protocolos de cultivo celular, microscopía de transmisión óptica y cuantificación específica de NRF2, GPX, HO1, NQO1 por Western Blot.

3.2.1. Caracterización de las partículas

3.2.1.1. Análisis granulométrico

Se mencionó en el marco teórico que la función primordial del sistema respiratorio es el intercambio gaseoso⁽³⁷⁾; Sin embargo, su función es mucho más compleja. Cada bronquio entra en un pulmón y se ramifica muchas veces en bronquios progresivamente más pequeños, que forman bronquiolos. Las partículas inhaladas penetran en el tracto respiratorio y se dirigen a diferentes sitios anatómicos, esta acción depende principalmente de su tamaño⁽³⁹⁾.

La Figura 28 muestra la distribución cuantitativa de PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm} según su diámetro aerodinámico. El resultado se presentó en gráficas semilogarítmicas. Los diámetros de las partículas se grafican en escala logarítmica y el porcentaje correspondiente de finos en escala aritmética⁽¹²³⁾.

La distribución en relación al tamaño de las PF_{2.5µm} fue relativamente homogénea, la media en el pico de detección fue de 1.265µm (100%), a diferencia del análisis de tamaño de partícula de la PUF_{0.1µm} que reveló dos fracciones distintas, con un primer pico a un promedio de 1.078µm (28.1%) y un segundo pico a 0.188µm (71.9%). Figura 28.

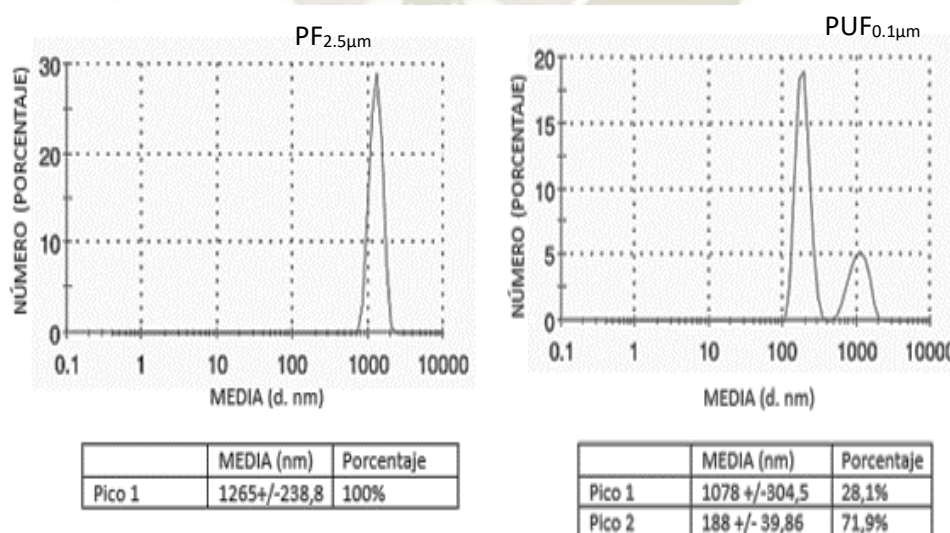


Figura 28. Análisis granulométrico de PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm}

Figura: Elaboración propia

La Figura 28 representa la distribución del material particulado en función del número (porcentaje) y masa de las partículas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Putaud⁽¹²³⁾, en un estudio realizado en 33 puntos de muestreo repetidos por toda Europa, en el que se concluye que el número de partículas incrementa en mayor medida que la masa en zonas contaminadas. Ello se explica con el incremento en la concentración de partículas de mayor tamaño, en las zonas con mayor grado de contaminación con respecto a áreas más limpias. El Análisis de distribución granulométrica llevado a cabo en este estudio afirma que entre el 70 - 80% de las partículas en la zona de Dunkerque, presentan un diámetro $< 0.1\mu\text{m}$ y entre 90 -100 % son de diámetros $>1.0\mu\text{m}$, esta diferencia sería por los diferentes contaminantes de la región, esencialmente por materia carbonosa⁽²²⁾.

3.2.1.2. Determinación del potencial zeta.

El potencial zeta es un método de medición muy utilizado en el análisis granulométrico, esencialmente en partículas de 3 nm a $10\mu\text{m}$ ⁽¹²³⁾.

El potencial zeta representa la carga superficial adquirida por la partícula cuando está en suspensión. El resultado obtenido al analizar la granulometría de la muestra también permite deducir el potencial zeta en la misma medición (Figura 28). Los valores promedios determinados del potencial zeta, se presentan asociados con los valores granulométricos. Por lo tanto, se obtuvo un primer valor promedio encontrado en el potencial zeta, de -12,4 mV en relación al tamaño de las $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$, a diferencia del análisis del tamaño de las partículas $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$, que reveló un potencial zeta promedio de -17.3 Mv (resultante de 13 escaneos). La medición del potencial zeta permitió determinar las cargas eléctricas presentes en la superficie de las partículas ($\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$ y $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$), cuanto más negativo el potencial zeta, tanto mayor es la estabilidad de las mismas en disolución⁽¹²³⁾. Por lo tanto, los resultados muestran, estabilidad de disolución en las partículas, ya que, se encuentran dentro del rango sugerido (-10 mV a -40 mV) en investigaciones previamente reportadas⁽¹²³⁾.

3.2.1.3. Composición elemental de la superficie

Los espectros de espectroscopía fotoelectrónica de rayos-x (XPS) muestran la intensidad de los electrones en función de la energía y enlace de medida (específica

para cada elemento atómico)⁽⁹⁵⁾. La figura 29 muestra el porcentaje de cada uno de los elementos analizados en las partículas. Es importante aclarar que el orden es el mismo para cada tipo de partícula: carbono, oxígeno, cloro, silicio, sodio, nitrógeno, azufre y calcio. Las composiciones similares fueron las de oxígeno (aproximadamente 22% en ambos casos), azufre (1%), sodio (70% de diferencia) y calcio (50% de diferencia). En el caso del carbono presente existe un 87% de diferencia entre las PF_{2.5µm} y las PUF_{0.1µm}, también en elementos como cloro o silicio presentes alrededor del 1% en PF_{2.5µm} y mucho más presentes en PUF_{0.1µm} alrededor del 6%. Se identificó una gran diferencia en el nitrógeno, dos veces más presente en PF_{2.5µm} que en PUF_{0.1µm}.

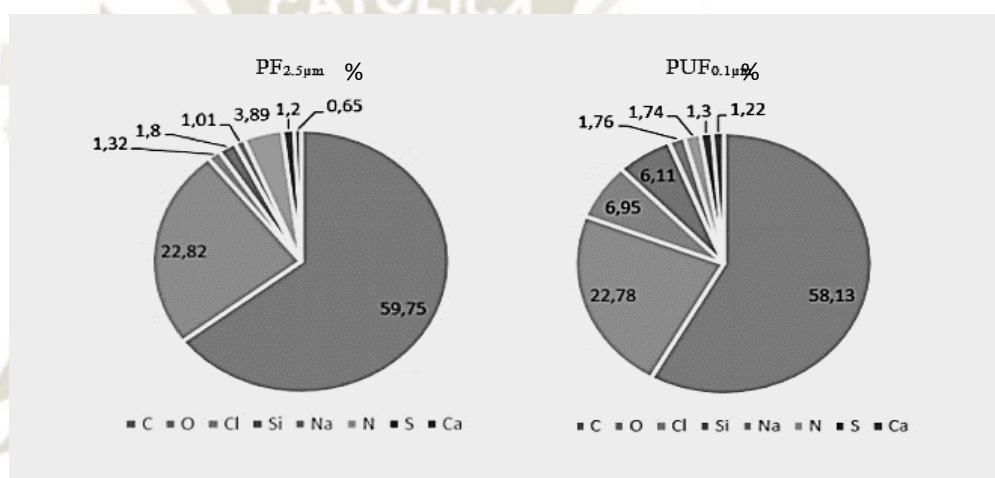


Figura 29: Composición química elemental (expresada en cantidades porcentuales %) de las superficies de PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm}.

Figura: Elaboración propia

Partículas finas (PF_{2.5µm})

Las muestras analizadas tuvieron espectros XPS similares que revelan la ausencia de trazas de hierro o elementos metálicos (límite de detección del orden de 0.1% atómico). En la superficie, las partículas estuvieron predominantemente compuestas de C, O con porcentajes más bajos de N, Na, Ca, Si, Cl y S. Como se muestra en la Figura 29. Estos dos tipos de elementos químicos (C y O) se encuentran en la superficie de las PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm} conformando grupos aromáticos alrededor de 283.8 eV, hidrocarburos alifáticos alrededor de 284.6 eV, monóxido de carbono alrededor de 286 eV y dióxido de carbono alrededor de 288 eV⁽²²⁾. Estos compuestos

producen toxicidad por aspiración relacionada con su viscosidad; cuanto mayor es la viscosidad, menor es la volatilidad y por lo mismo menor el riesgo de aspiración⁽²⁰⁾.

Partículas ultra finas (PUF_{0.1µm})

Las muestras mostraron espectros XPS similares a las PF_{2.5µm} que indican la ausencia de hierro o metal menor a una concentración de 0.01% (Figura 30).

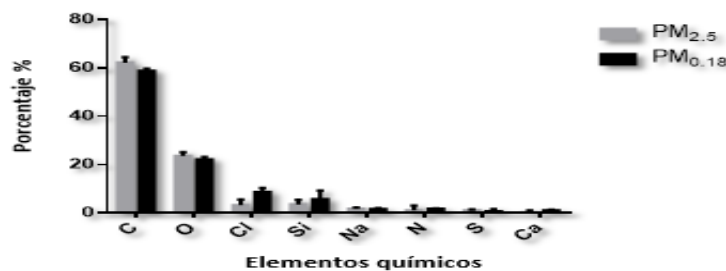


Figura 30: Análisis porcentual de superficie por XPS

Fuente: Elaboración propia

Oligoelementos metálicos (µg.g-1)

Tabla 4: Composición química elemental de las partículas finas y ultra finas (PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm}) por ICP-MS (94). Espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (µg.g-1).

	As	Ba	Be	Cd	Ce	Co	Cs	Cu	La	Mn	Mo	Ni	Pb	Rb
PF _{2.5}	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
PUF _{0.18}	63,0	63,0	0,0	18,5	7,4	11,1	7,4	425,9	3,7	581,5	37,0	200,0	540,7	44,4

	Sb	Sn	Sr	Ti	Zn	Cr	V	Al	Ca	Fe	Mg	Si
PF _{2.5}	47,1	49,6	91,8	3,0	4000,2	97,3	75,0	5250,2	17904,5	16406,1	6591,3	9383,5
PUF _{0.18}	48,1	111,1	48,1	7,4	2459,3	122,2	196,3	3622,2	11855,6	10266,7	6344,4	7566,7

Fuente: Elaboración propia

Metales y metaloides fueron detectados por ICP-MS. Los niveles de Mn, Zn, Ca y Fe, fueron particularmente más altos que los del resto de metales (Tabla 4) en comparación con lo que generalmente se mide en la región, destacando el marcado carácter industrial de esta muestra, así como los valores muy elevados de Ca y Fe. Al exceder

el resultado los valores regulares entre 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Ca y Fe ⁽³⁹⁾ refleja un incremento de combustión de petróleo y carbón, presentado como cenizas carbonáceas procedentes de la combustión de carburantes fósiles, principalmente en automóviles⁽¹¹⁰⁾.

3.3. VIABILIDAD CELULAR

El ensayo de viabilidad celular luminiscente, fue un método homogéneo, utilizado para determinar el número de células viables en el cultivo basándose en la cuantificación del ATP presente, el cual es un indicador de células metabólicamente activas. El formato homogéneo de "añadir-mezclar-medir"⁽⁵⁷⁾ dio como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP fue directamente proporcional al número de células presentes en cultivo. Como tendencia común a este tipo de análisis, la señal de fluorescencia disminuyó a medida que se incrementaba cada uno de los factores evaluados (porcentaje de células muertas y la concentración DL_{10}), como se indica en la Figura 31. Los valores de intensidad de fluorescencia requeridos para determinar la DL_{10} en células expuestas a $\text{PF}_{2.5\mu\text{m}}$, $\text{PUF}_{0.1\mu\text{m}}$ y TiO_2 , se obtuvieron a una concentración de $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y en ZnO a $1.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$, considerando a TiO_2 y ZnO como controles. La DL_{10} se utilizó para medir la dosis por la cual se da un envenenamiento potencial del 10% de células a corto plazo (toxicidad aguda) y a un plazo mayor (toxicidad repetida), obteniendo una concentración similar en ambas formas como se observa en la Figura 31.

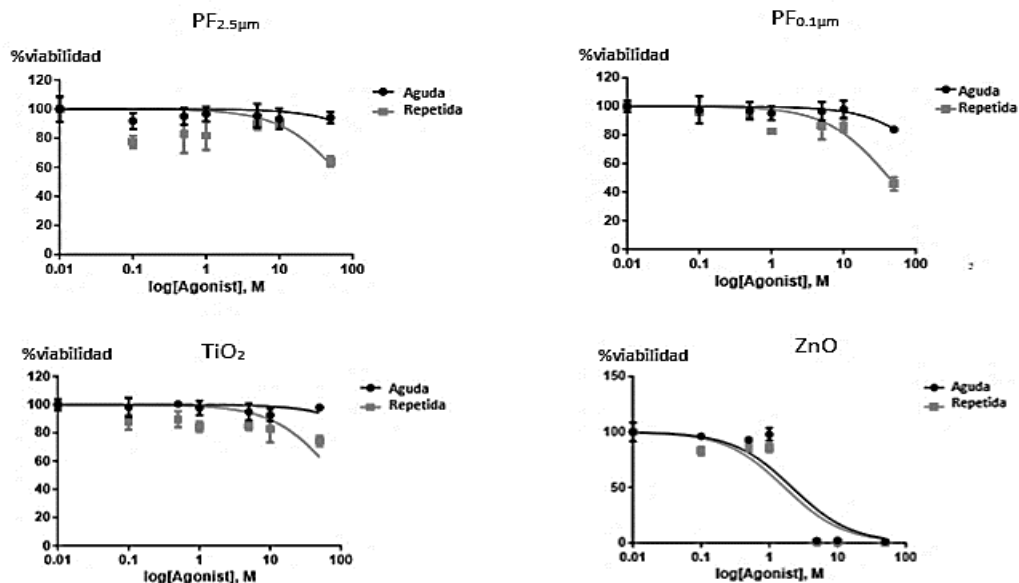


Figura 31: Porcentajes (%) de supervivencia celular obtenidos al evaluar muestras celulares expuestas a diferentes concentraciones de partículas ambientales (PF_{2.5µm}, PUF_{0.1µm}, TiO₂ y ZnO).

Fuente: Elaboración propia

Existió una optimización de variación con la DL₁₀ de ZnO (Figura 32), el 10% de muertes de células se dio a una concentración menor en ambas formas (aguda y repetida).

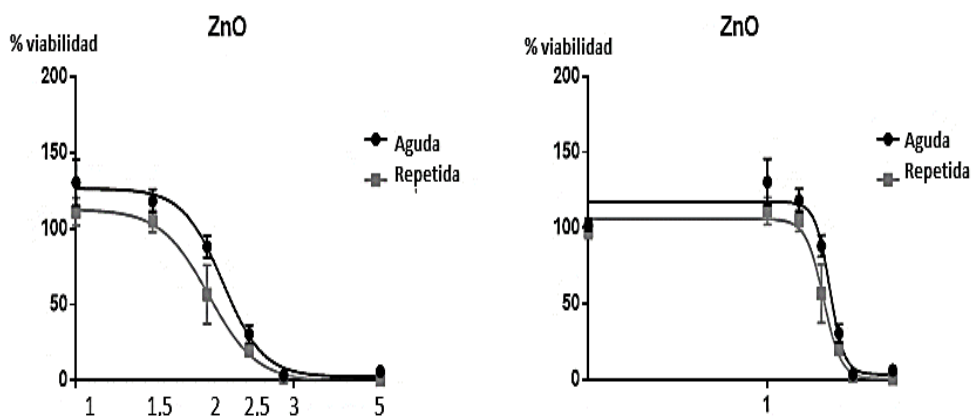


Figura 32: Porcentajes (%) de supervivencia celular obtenidos al evaluar muestras celulares expuestas a diferentes concentraciones de partículas ambientales (ZnO).

Fuente: Elaboración propia

Se expuso las células epiteliales bronquiales a diferentes dosis de partículas para obtener el DL₁₀, considerando pruebas previas⁽⁹⁶⁾.

Algunos autores trabajan con una viabilidad de 70% y una dosis letal de 30% para su investigación⁽¹²³⁾, otros 80% de viabilidad (109,110,128), bibliografía sobre investigación *in vitro* en celulares pulmonares recomienda 80%⁽²²⁾ y en el laboratorio donde se realizó la investigación considera una viabilidad adecuada entre 80 y 95% y una dosis letal entre 15 y 20%⁽¹¹⁰⁾. Así, nuestros resultados están dentro de los rangos tanto de autores externos del laboratorio como del laboratorio mismo. De esta manera garantizamos la expresión correcta de todos los componentes inherentes a esta línea celular en la siguiente generación de células cultivadas tanto para la propagación celular como para los tratamientos realizados. La razón fundamental del resultado de viabilidad celular se debe a que las condiciones brindadas fueron las adecuadas, además que el medio favoreció la alimentación de éstas y por ende su correcto desarrollo.

3.4. ESTUDIO MORFOLÓGICO CELULAR.

3.4.1. Estudio morfológico por microscopía de ampliación óptica (MAO).

El microscopio de ampliación óptica aporta información detallada sobre la estructura de las células y los tejidos, así como sobre las variaciones funcionales que experimentan en situaciones normales y patológicas. Estos datos tienen una traducción directa en el aspecto de esas mismas células en las secciones histológicas convencionales^(197, 201).

Las imágenes vistas a través de la microscopía óptica, de las CEBH en el proceso de multiplicación, se mostraron confluentes (Figura 33). En ciertas áreas se observaron estructuras más o menos granulares, su desarrollo no muestra mayor complicación en cuanto a la multiplicación.

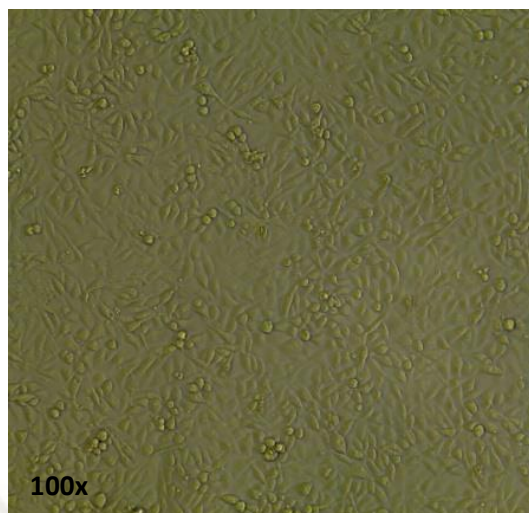


Figura 33: Observación microscópica de ampliación 100x de células CEBH en fase de multiplicación.

Fuente: Elaboración propia

La estructura granular está relacionada, en general, con la presencia de partículas relativamente pequeñas y uniformes⁽¹⁹⁸⁾. Las organelas que con mayor frecuencia se asocian con este aspecto son las mitocondrias (oncocitomas), los lisosomas (tumores de células granulares) y los gránulos de secreción⁽¹⁹⁸⁾. Por lo tanto, la presencia de estructuras granulares visibles indica que las PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm} están adheridas a la célula bronquial.

Exposición aguda:

En esta parte de la investigación los resultados son cualitativos. En la Figura 34 se observan las partículas atmosféricas en el medio LHC9 y el leve incremento de tamaño de las CEBH. El tamaño de las células expuestas una sola vez (forma aguda), a partículas ultra finas (PUF_{0.1µm}) es menor al tamaño de las células expuestas una sola vez a partículas finas (PF_{2.5µm}) y la cantidad de células es mayor. El crecimiento anormal de las células es debido a que pierden el control de su crecimiento y la capacidad de síntesis de algunas proteínas que son importantes para regular el ciclo celular⁽¹¹⁰⁾. Es por esa razón que se observa también la disminución de células por campo y la presencia de algunas de ellas con signos de muerte. El medio presenta una ligera coloración oscura debido a la presencia de las partículas.

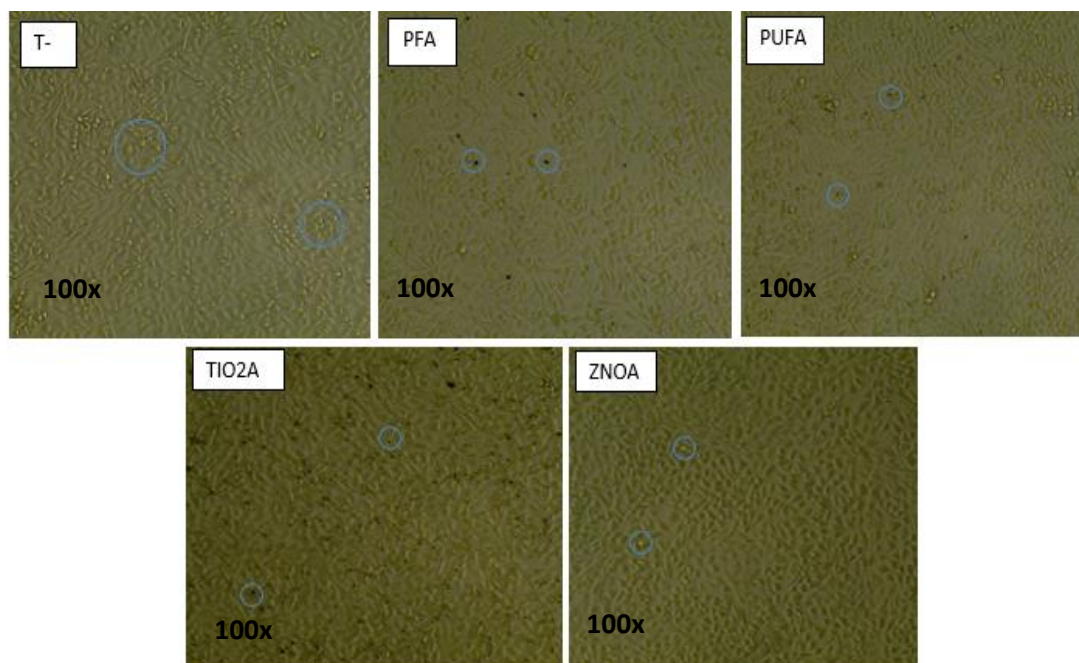


Figura 34: Observación microscópica de ampliación 100x a células CEBH expuestas una sola vez a partículas ambientales ($PF_{2.5\mu m}$, $PUF_{0.1\mu m}$, TiO_2 , ZnO).

Fuente: Elaboración propia

El TiO_2 y el ZnO son nano partículas muy utilizadas como controles en estudios de viabilidad celular, debido a su citotoxicidad⁽⁹⁰⁾. En función a estos se hicieron las comparaciones.

Las partículas de dióxido de Titanio a las que fueron expuestas una sola vez las CEBH (TiO_2A), se encuentran dispersas por todo el medio, alterando la cantidad de células debido a procesos inflamatorios⁽¹⁹⁹⁾. Estudios previos⁽¹⁹⁹⁾, han demostrado que estas partículas inducen a un incremento en la producción de prostaglandina E2, reflejando una actividad pro-inflamatoria cuyo mecanismo se ha identificado por el incremento de la expresión de ciclooxigenasa 1 y 2⁽¹⁹⁹⁾. Esta información es de suma importancia, ya que la presencia de partículas de TiO_2 en células bronquiales puede producir la muerte de estas por procesos inflamatorios.

Las partículas de monóxido de Zinc a las que fueron expuestas una sola vez las CEBH ($ZnOA$), son solubles en el medio y atrapadas por las células después de la exposición, es por esta razón que se puede ver la disminución en cantidad de células, pero no la

coloración negra esparcida⁽²⁸⁾. El ZnO figura en la lista de sustancias peligrosas, sujeto al reglamento de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), debido a su citotoxicidad al ser inhalado, produciendo la fiebre de los humos metálicos y muerte celular⁽²⁸⁾.

Exposición repetida:

Después de exponer a las a partículas 3 veces consecutivas es claro evidenciar el incremento de partículas en cada uno de los medios, así como la coloración oscura en el medio y algunas alteraciones en la forma de cada célula (Figura 35).

Las CEBH expuestas repetidamente a partículas ultra finas (PUFR_{0.1µm}), en comparación con las expuestas de manera repetida con partículas ultra finas (PFR_{2.5µm}), se encuentran en menor cantidad y con un tamaño mayor, fijas al medio y con forma redondeada (Figura 35).

La exposición repetida con partículas de dióxido de Titanio (TiO₂R), refleja el abarcamiento casi total de las partículas en el medio, así como células de color amarillento y de tamaño aparentemente reducido.

Las CEBH expuestas repetidamente a partículas de óxido de Zinc (ZnOR), presentan notablemente un gran tamaño, una coloración amarillenta y una forma no bien definida.

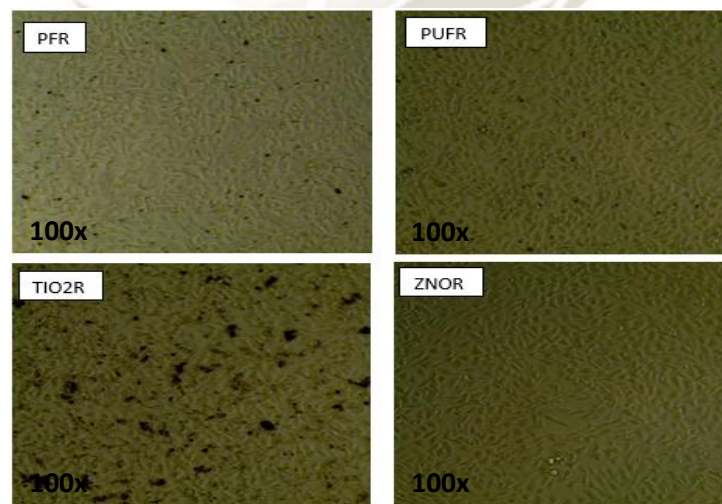


Figura 35: Observación microscópica de ampliación 100x a células CEBH expuestas tres veces a partículas ambientales (PF_{2.5µm}, PUF_{0.1µm}, TiO₂, ZnO).

Fuente: Elaboración propia

En la exposición crónica (repetida) a partículas ultra finas ($PUF_{0.1\mu m}$) el resultado demuestra que las partículas por su tamaño pueden alcanzar la región alveolar, que es el sitio principal de intercambio de gases en el pulmón⁽³⁰⁾. Los efectos de la $PUF_{0.1\mu m}$ pueden extenderse más allá de su capacidad para promover la inflamación; por ejemplo, la exposición de los macrófagos alveolares humanos a partículas finas ($PF_{2.5\mu m}$) afecta la capacidad fagocítica, lo cual puede incrementar la susceptibilidad a las infecciones, en aquellos sujetos que estén afectados a largo plazo a enfermedades respiratorias⁽⁶⁰⁾.

3.4.2. Estudio morfológico por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Secciones celulares expuestas a las partículas fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión con la finalidad de observar posibles alteraciones mitocondriales a nivel de morfología (Figura 36 y 37). Después de la exposición a partículas, las mitocondrias aparecen ligeramente con un aumento de volumen (hinchazón) y pérdida de densidad (Figura 36, 37 y 38). Las fotos también muestran la presencia de partículas internalizadas en las células expuestas y formación de autofagosomas (Figura 38).

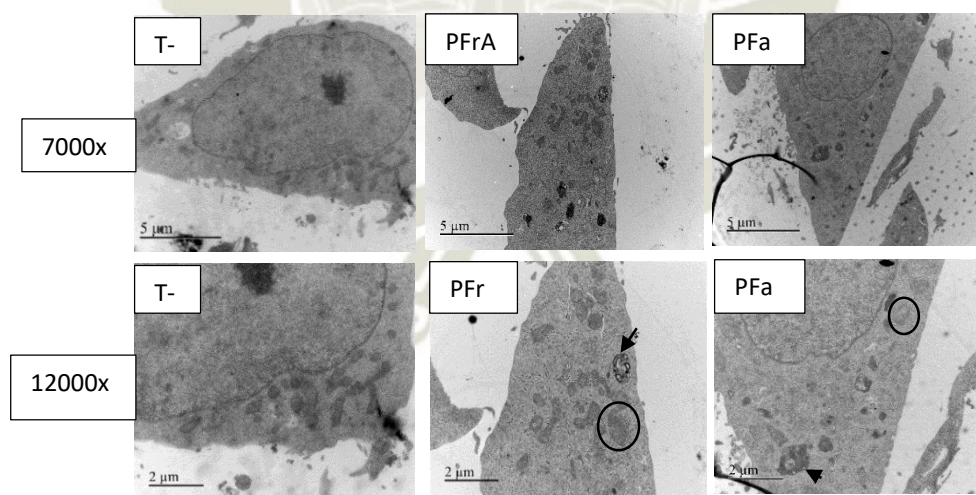


Figura 36: Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas finas de manera aguda (PFa) y repetida (PFR). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.

Fuente: Elaboración propia

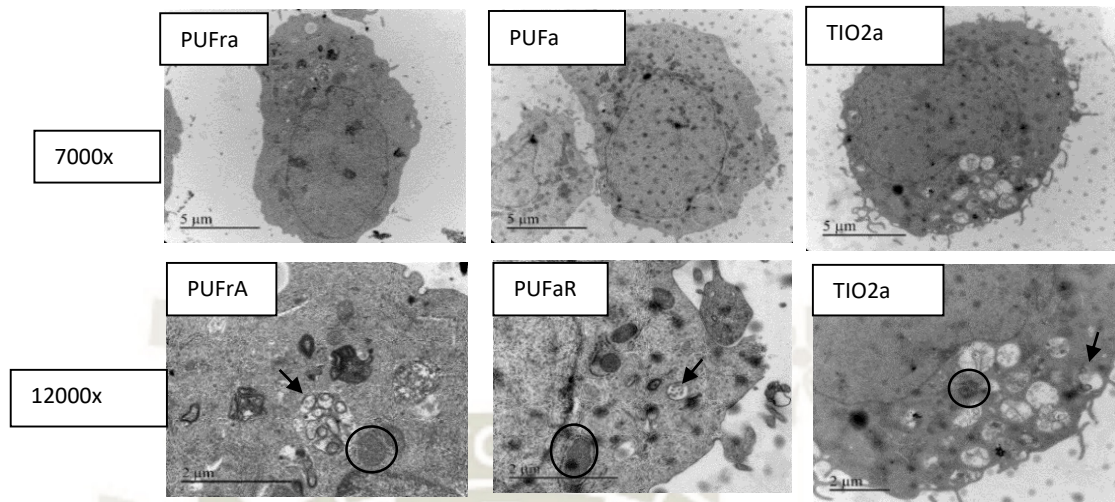


Figura 37. Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas ultrafinas de manera aguda (PUFa), repetida (PUFr) y partículas de TiO_2 a una sola exposición (TIO2a). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.

Fuente: Elaboración propia

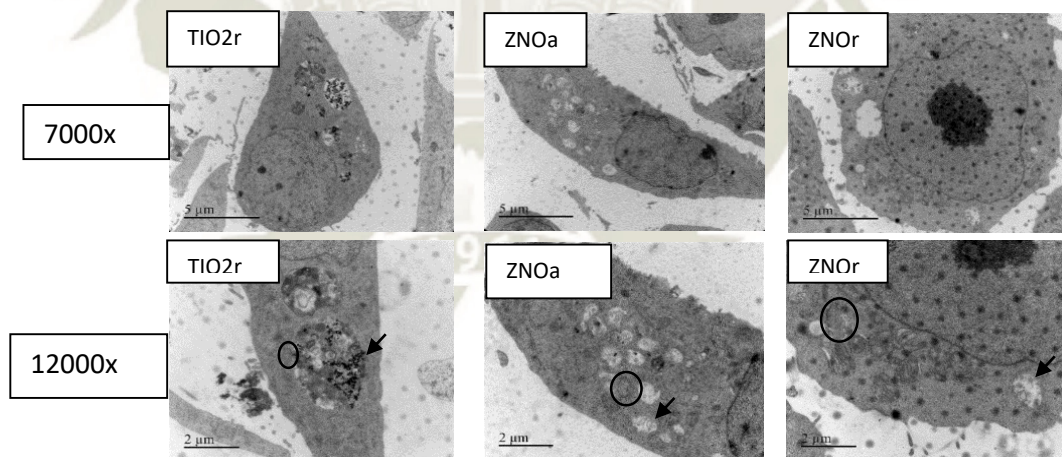


Figura 38: Observación microscópica electrónica de transmisión (MET) a 7000x y a 12000x de cuerpos celulares expuestos a partículas de TiO_2 de manera repetida (TIO2r) y ZnO de manera aguda (ZNOa) y repetida (ZNOr). Los círculos negros muestran las mitocondrias y las flechas negras apuntan a los autofagosomas.

Fuente: Elaboración propia

Las partículas suspendidas en el ambiente contienen una gran cantidad de metales solubles, componentes orgánicos y endotoxinas que provocan el efecto tóxico a partir de ciclos reductivos y oxidativos⁽⁵⁹⁾. El estrés oxidativo mediado por las $PF_{2.5\mu m}$ Y $PUF_{0.1\mu m}$ está dado por la generación directa de especies reactivas de oxígeno desde la superficie de sus componentes solubles, por la alteración en la función de las mitocondrias, por la reducción de la NADPH-oxidasa y por la activación de células inflamatorias capaces de generar especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como de daño oxidativo al DNA⁽⁶⁰⁾. Además, células epiteliales y macrófagos generan ERO en respuesta a la captación de la partícula, por medio de reacciones biológicas de oxidación que ocurren en la membrana celular y la mitocondria. Se pudo observar en esta investigación, que el efecto tóxico en células epiteliales bronquiales (CEBH) está presente y varía según las veces de exposición, también se entiende que la exposición crónica a la contaminación del aire urbano, desarrolla malformaciones y cuerpos como autofagosomas en las muestras expuestas que alteran las vías respiratorias a largo plazo y producen alteraciones ciliares ultra estructurales del epitelio de las vías respiratorias, lo que sugiere que la exposición crónica a los niveles urbanos de contaminación del aire puede causar alteraciones respiratorias y deterioro de las defensas respiratorias contra agentes infecciosos⁽⁶⁰⁾.

3.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Luego de exponer las CEBH a partículas atmosféricas ($PF_{2.5\mu m}$, $PUF_{0.1\mu m}$, TiO_2 y ZnO) de manera aguda (una sola vez) y de manera repetida (tres veces), se lisaron estas y se extrajeron las proteínas totales. Posterior a ello se procedió a realizar el ensayo de BCA para cuantificar las proteínas totales en las muestras de los diferentes tiempos. La técnica de BCA se fundamenta en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} del sulfato cúprico por acción de algunos aminoácidos como cisteína o el enlace peptídico en un medio alcalino que se da gracias al $NaOH$ 0.1M, para luego ser quelado con 2 moléculas del ácido bicinónico lo cual forma un complejo que da una coloración morada proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

El ensayo de BCA dio como resultado una curva de calibración de diferentes concentraciones (donde el R_2 es siempre superior a 0.9970).

El valor de R_2 de la Figura 39, indica que la curva de calibración es lineal, por lo tanto, se puede usar para extrapolar las concentraciones de proteínas de la muestra. Así, a partir de los datos que nos proporcionó la ecuación respectiva de la gráfica de calibración se pudo extrapolar los datos para hallar la concentración total de proteínas de la muestra (Anexo 3, tabla 2).

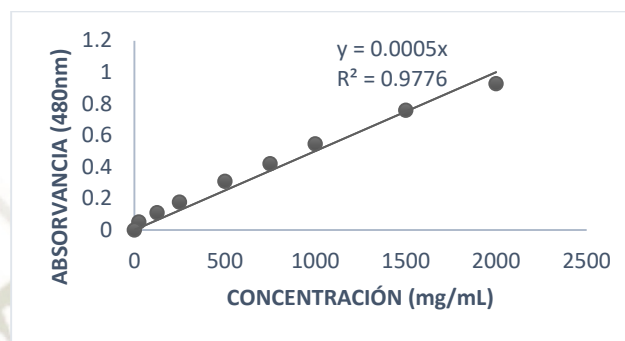


Figura 39: Gráfica de calibración para la determinación de proteínas en CEBH, después de su exposición a partículas atmosféricas ($PF_{2.5\mu m}$, $PUF_{0.1\mu m}$, TiO_2 y ZnO)($n=3$)

Fuente: Elaboración propia

Con el resultado obtenido en el ensayo de BCA (Tabla 5) se realizó el ensayo de Western Blot, ya que, es necesario colocar una cantidad específica y conocida de proteínas. Es común en el diseño de la metodología esta técnica antes del Western Blot, ya que tiene una alta sensibilidad en comparación al ensayo de Lowry o Biuret y tiene menos variabilidad que el ensayo de Bradford. En una investigación donde se estudió el rol de Nrf_2 como un factor de transcripción implicado en la defensa de la actividad antioxidante, se cuantificaron las proteínas por medio de Western Blot, utilizando también previamente la técnica de BCA⁽³⁹⁾.

Tabla 5. Resultados del ensayo de BCA. Obtención cuantitativa de proteínas de las partículas atmosféricas. ($n=3$)

Partículas	Concentración de st.	Absorbancia de muestra	Concentración de proteínas en muestra
Blanco	2000	0.9279	0.4653
PFa	1500	0.7588	0.4495
PFR	1000	0.5463	0.5169
PUFa	750	0.4194	0.4746
PUFR	500	0.3081	0.5045
TiO _{2a}	250	0.1753	0.4568
TiO _{2r}	125	0.1090	0.2611
ZnOa	25	0.0505	0.4874
ZnOr	0	0	0.6379

Fuente: Elaboración propia

Para realizar la cuantificación de proteínas en la muestra, se normalizó la cantidad de proteínas a 500 $\mu\text{g/mL}$ con SDS y PBS, incubándolo durante 5 minutos a 95°C para que así pierdan su conformación nativa las proteínas por acción de la SDS. Posterior a esto, se sembró las muestras en los pocillos del gel de electroforesis sin olvidar el marcador (Ladder), para que se dé la separación de las proteínas por acción de electricidad. Las proteínas con alto peso molecular se quedaron retenidas en la parte superior y las proteínas con un peso molecular menor se abrieron paso hacia abajo. Después se procedió a realizar la electrotransferencia del gel a la membrana, para lo cual se procedió a realizar el “sandwich” en el cual la membrana va posicionada hacia la parte inferior ya que, al ser una migración de cátodo a ánodo, la fuente de poder permite el desplazamiento de las manchas del gel a la membrana.

Luego se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario y luego a realizar el bloqueo de la membrana con leche, la cual tiene una gran cantidad de proteínas y bloquea todos los espacios libres que no estén ligados al anticuerpo primario, después se incubó con el anticuerpo secundario para finalmente agregarle el reactivo quimioluminiscente.

La proteína β -actina se usó como control de carga ya que es una proteína que está en las células y tiene función motora y contráctil. Este control nos garantiza que la carga de proteína es la misma en todo el gel ya que es usada para normalizar los niveles de proteína detectados, las proteínas de todos los carriles son transferidas a la membrana con la misma eficiencia, la incubación del anticuerpo (primario, y de ser necesario secundario también) y la detección de la señal son uniformes en todos los carriles. Se muestra en la Figura 40, los niveles de NRF2, GPX, HO1, NQO1 y sus densitometrías están en el anexo 4.

Los datos producidos en una transferencia de Western Blot, se ven traducidos en bandas correspondientes a la proteína diana que se hacen visibles tras el tratamiento de la transferencia con el sustrato. La transferencia por lo general se prueba con un anticuerpo contra un gen constitutivo bien caracterizado que se usa como una medida general de los niveles de expresión de proteína en las células usadas como fuente para una muestra particular⁽³⁹⁾.

Para conseguir distinguir el tipo de proteína que conforma la muestra, se realizó una comparación con los marcadores de peso molecular (para el tamaño) y un control positivo (tamaño y señal), como se observa en la Figura 40.

Estos resultados normalmente se consideran semicuantitativos, es decir, proporcionan una comparación relativa de los niveles de proteína, pero para una cuantificación de la densidad óptica de una proteína diana específica se procede a programas estadísticos y modelos gráficos. Figura 41

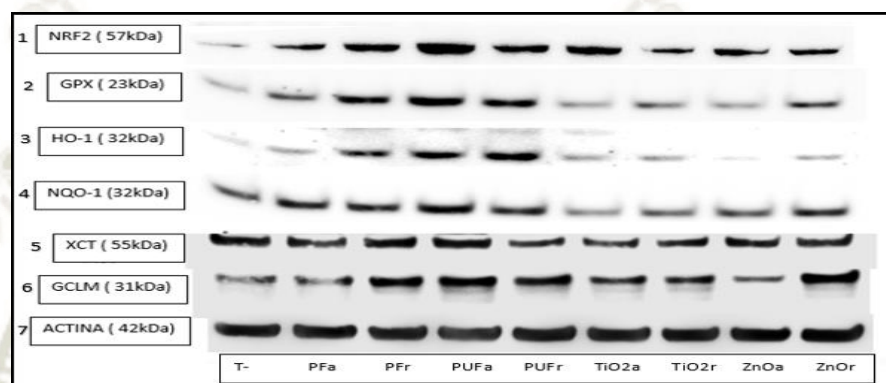


Figura 40: Determinación de la expresión de proteínas por inmuno detección, visualizado en bandas reveladas en la membrana con el peso molecular aparente.

Fuente: Elaboración propia

Los datos registrados se ingresaron a imageJ, este es un sistema utilizado para cuantificar las densimetrías de las bandas (Anexo 4). Para representar gráficos y resultados significativos se utilizó el software estadístico GraphPad Prisma 8.

Los resultados de la figura 41 corresponden a la cantidad de proteína total en cada uno de los casos sobre el total de actina obtenida. Los datos correspondientes los encontramos en la tabla 5, 6 y 7 del anexo 4.

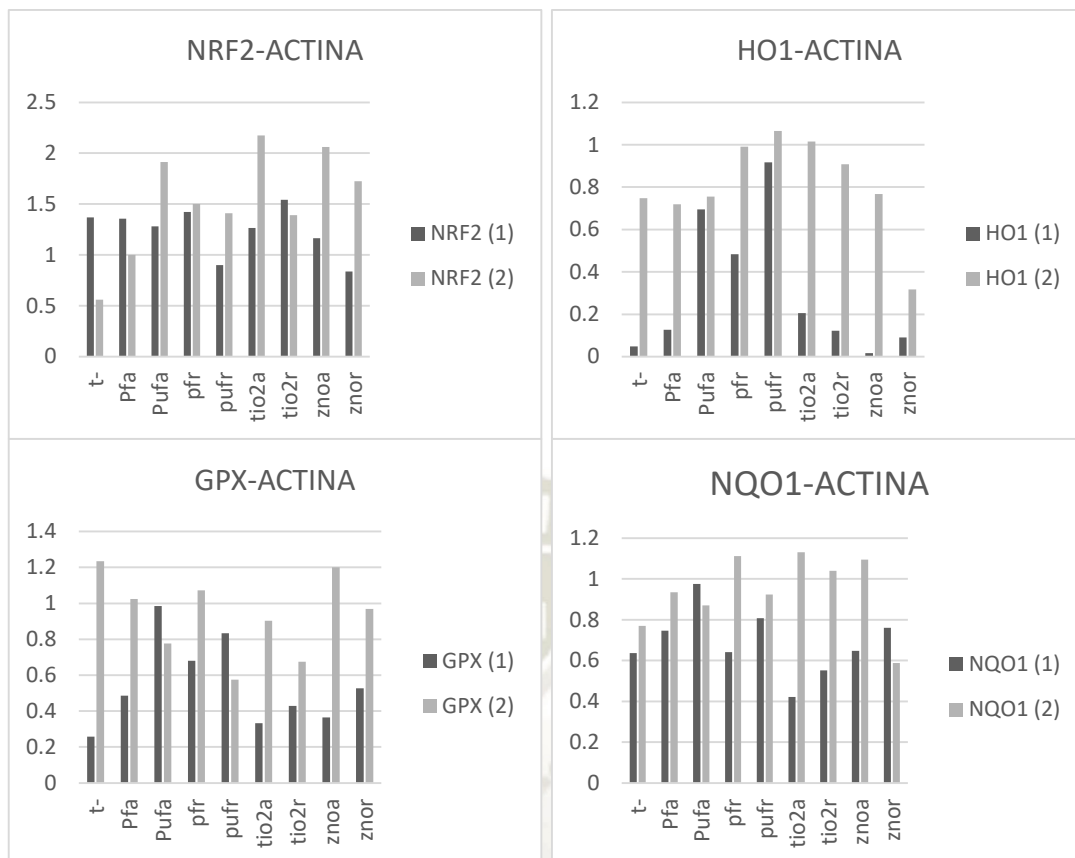


Figura 41. Resultados cuantitativos de las proteínas NRF2, GPX, HO1, HO1, por Western Blot (n=2).

Fuente: Elaboración propia

Se cuantificó la proteína de interés ejecutando en paralelo un análisis interno de la cantidad en las muestras en las bandas obtenidas, de la misma manera esto será utilizado para comparar el contenido de proteína entre las muestras, siendo las partículas de interés las PF_{2.5µm} y las PUF_{0.1µm} (Figura 42).

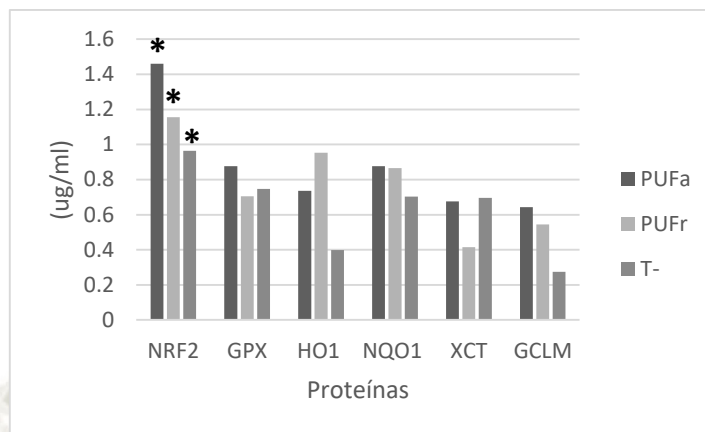


Figura 42. Comparación del contenido de proteínas (ug/ml) NRF2, GPX, HO1, NQO1 obtenidas en CEBH expuestas a PF_{2.5}µm y PUF_{0.1}µm.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de múltiple comparación de medias por el test de Tukey muestran diferencia significativa entre la proteína Nrf₂ y el resto de proteínas (Anexo 5) Figura 43. Esto se debe a que el factor de transcripción Nrf₂, es la primera proteína en este estudio en presentar una sobre expresión, esto le permite perder su fijación en el citoplasma y llegar al núcleo celular, por lo tanto, se da una sobre producción de Nrf₂^(68,70).

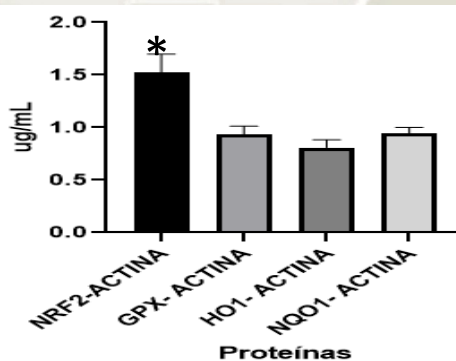


Figura 43. Comparación de la expresión de proteínas NRF2, GPX, HO1 y NQO1 (ug/ml), presentes en células bronquiales expuestas a partículas atmosféricas. (*) indica diferencia significativa en la sobre expresión proteica causada por PFA, PFR, PUFA, PUFR, TiO₂A, TiO₂R, ZnOA, ZnOR (p<0,05).

Fuente: Elaboración propia

En las muestras de CEBH expuestas a PFA, PFR, PUFA, PUR, TIO₂A, TiO₂R, ZnOA, ZnOR, durante 72 horas de manera exposición repetida y 24 de manera exposición una sola vez o aguda, se observó diferencia significativa al 95% de 0.1840 entre la proteína Nrf₂ y GPX, de 0.3112 entre Nrf₂ y HO1, de 0.1807 entre Nrf₂ y HQO1. Sin embargo, no se observó aumento significativo con relación a la comparación del resto de proteínas. Esto expresa claramente la activación de la proteína de transcripción Nrf₂.

En un estudio realizado por Borgie et al, en 2014, se mencionó que las partículas atmosféricas de mayor importancia son las que tienen un diámetro aerodinámico menor o igual a 2.5µm, porque estas se depositan en las vías respiratorias profundas en una proporción mucho mayor que las partículas más grandes. Al penetrar profundamente, llegan a los alvéolos pulmonares donde se produce el intercambio de gases entre el aire y la sangre y persisten durante mucho tiempo en el organismo porque resisten en parte los procesos de eliminación⁽¹¹⁰⁾. Además, se demostró que estas partículas pequeñas (diámetro igual o inferior a 2,5µm) pueden ser muy numerosas, por tanto, ofrecen una mayor superficie de contacto. En otro estudio se demostró que las PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm} son capaces, por un lado, de inducir la expresión de enzimas metabólicas que aseguran la biotransformación de compuestos orgánicos en metabolitos más tóxicos o incluso cancerígenos y de inducir la expresión de Nrf₂ que promueve la crecimiento y aumento del estrés oxidativo⁽⁶⁵⁾. Las respuestas inflamatorias están moduladas por algunos factores de transcripción y la vía de señalización celular⁽⁹⁰⁾. Nrf2 ha sido considerado como un factor de transcripción nuclear clave que detecta las condiciones oxidantes y protege a las células del estrés oxidativo y la inflamación⁽⁸¹⁾. En las células, la activación de Nrf2 inhibe la expresión de moléculas de adhesión inducidas por citocinas proinflamatorias, lo que da como resultado la amplificación de la señalización de algunas proteínas. Teniendo en conocimiento que Nrf₂ es una proteína activadora de otras proteínas con el papel protector frente al estrés oxidativo⁽⁹⁰⁾ reafirmamos la presencia de un proceso inflamatorio y oxidativo en las células de estudio.

La proteína Nrf2 en los resultados muestra diferencia significativa en la sobre expresión proteica y al comparar este resultado entre las partículas de estudio PF_{2.5µm}

y PUF_{0.1µm}, las partículas que originan una sobre expresión considerable son las PUF_{0.1µm}(Figura 43).

Curiosamente no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el test de comparación múltiple entre las concentraciones medias del material particulado con tamaño 2.5µm y 0.1µm (figura 44), las razones pueden variar ya que las partículas diluidas en suspensiones no tienen exactamente las mismas características fisicoquímicas que los aerosoles, y los diferentes disolventes utilizados para su dilución en función de los estudios pueden modificar determinados parámetros, introduciendo un sesgo en los estudios comparativos entre las distintas pruebas. De hecho, Braydich, en el 2014 demostró cambios significativos en la morfología, la química de la superficie, el potencial de disociación y agregación iónica de las nanopartículas en función de diferentes fluidos fisiológicos (intersticial, lisosomal y alveolar)⁽¹¹⁰⁾. Sin embargo, si podemos notar la relación gráfica cuantitativa entre las exposiciones de partículas atmosféricas a CEBH (Figura 44).

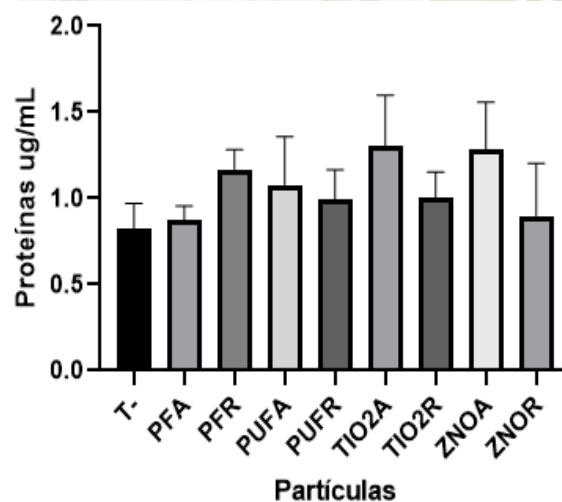


Figura 44: Comparación de la sobre expresión proteica (ug/ml) en relación a las partículas atmosféricas PFA, PFR, PUFA, PUFR, TiO₂A, TiO₂R, ZnOA, ZnOR y las CEBH ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia

Según el estudio de Berdörester en 1994, la similitud de composición química observada entre las PF_{2.5µm} y PUF_{0.1µm} nos lleva a pensar que la reactividad más fuerte observada para PUF_{0.1µm} (genes más modulados, citocinas secretadas en mayor

número) proviene principalmente de su mayor superficie específica y su mayor número por unidad de masa⁽¹¹⁰⁾.

De hecho, para las dos fracciones estudiadas, las células se expusieron a la misma dosis en masa. Por tanto, la mayor toxicidad de PUF_{0.1µm} puede explicarse en este estudio por una persistencia acentuada en el estrés oxidativo mitocondrial. Además, la toxicidad celular es mayor en el caso de las PUF_{0.1µm}, por la presencia de dichas partículas internalizadas en las células, como se demostró en esta investigación mediante observación microscópica después de la exposición.

El estudio de los efectos de la contaminación del aire en la salud es un tema complejo. Los seres humanos están expuestos de forma crónica a dosis mucho más bajas que las utilizadas en los estudios toxicológicos. La génesis y exacerbación de la enfermedad pulmonar crónica es un proceso acumulativo y progresivo. Por razones económicas y prácticas, es imposible reproducir condiciones reales generando inflamación crónica. Por lo tanto, aumentamos la dosis para obtener una reacción aguda. Es decir, en este estudio no hay duda de la evaluación cuantitativa del riesgo.

CONCLUSIONES

- En el trabajo de investigación desarrollado, se demostró a través de pruebas de caracterización fisicoquímica que, las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ obtenidas en la zona urbano-industrial de Dunkerque, presentan diversos compuestos nocivos, incluso reactivos (derivados cíclicos aromáticos y metales pesados). Las muestras analizadas tuvieron espectros (XPS) similares que revelan la ausencia de trazas de hierro o elementos metálicos.
- Se logró a través del ensayo de viabilidad celular luminiscente evaluar la citotoxicidad al exponer las células epiteliales bronquiales humanas (CEBH) a micro ($PF_{2.5\mu m}$) y nano ($PUF_{0.1\mu m}$) partículas a una dosis de exposición baja de $5 \mu g \cdot cm^{-2}$.
- La evaluación de la morfología de los orgánulos presentes en CEBH, considerando la internalización de las partículas atmosféricas finas ($PF_{2.5\mu m}$) y partículas atmosféricas ultra finas ($PUF_{0.1\mu m}$), indica que el efecto toxico en las CEBH varía según las maneras de exposición (aguda y repetida), también se entiende que la exposición continua a las partículas atmosféricas del aire urbano desarrolla malformaciones y autofagosomas en las muestras.
- Se logró cuantificar en la línea celular CEBH la sobreexpresión de las proteínas Nrf2, GPX, HO1, NQO1, por medio de bandas obtenidas al desarrollar la técnica de Western Blot y el sistema para cuantificar las densimetrías de las bandas. imageJ. En relación a la comparación de medias, se obtuvo como resultado por el test de Tukey, la diferencia significativa en la proteína Nrf2. Lo cual indica que las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ son capaces de inducir la expresión de Nrf2 que promueve la crecimiento y aumento del estrés oxidativo.
- Finalmente se concluye que las $PF_{2.5\mu m}$ y $PUF_{0.1\mu m}$ inducen efectos tóxicos (muerte celular, malformación celular, deformación mitocondrial e incremento de estrés oxidativo y proceso inflamatorio celular por sobre expresión de citoquinas), causados invitro por partículas finas ($PF_{2.5\mu m}$) y ultra finas ($PUF_{0.1\mu m}$).

RECOMENDACIONES

- Realizar mayores estudios sobre Nrf2, ya que esta proteína es también un factor de transcripción y está envuelta en la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, estos genes ayudan a proteger la célula del daño que causan los radicales libres.
- Expandir los estudios realizados en la presente investigación a otras líneas celulares y en células de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas o alérgicas.
- Realizar estudios con mayores repeticiones y variaciones de dosis para identificar con precisión las vías de señalización implicadas en la exacerbación de la inflamación, n = 5 o más.
- Realizar estudios en relación a la toxicología genética producida por la exposición de partículas atmosféricas y analizar el efecto mutagénico y genotóxico de las partículas.
- Expandir estudios similares con exposiciones in vivo en modelos de ratón, dirigidos al estudio toxicológico de PUF0.1 μ m. Por lo tanto, será posible comparar resultados obtenidos en sujetos sanos in vitro e in vivo para acentuar la representatividad de los resultados.
- Realizar estudios con determinados biomarcadores identificados que podrían permitir el desarrollo de estrategias de pronóstico y prevención.

REFERENCIA

1. Cleaning equipment for air or other gases: vocabulary. Draft International Standard ISO /DIS 3649.2. Geneva, 1979.
2. Report on a WHO Working Group. Health Aspects of Air Pollution with Particulate Matter, Ozone and Nitrogen, Dioxide. Germany, 2003.
3. Directive Du Parlement Européen Et Du Conseil. CONCERNANT LA QUALITÉ DE L’AIR AMBIANT ET UN AIR PUR POUR L’EUROPE, 2008.
4. Ministerio del Ambiente, EDUCCA. Aire Limpio para todos. Manual para Educadores, “Perú, país Maravilloso”, 2ª edición, 2009.
5. Dominici F, Peng RD, Zeger SL, White RH, Samet JM. Particulate air pollution and mortality in the United States: did the risks change from 1987 to 2000? Am J Epidemiol. 166(8):880-8,2007
6. Particules en suspension dans l’air : leurs effets sur la santé, [internet], <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/particules-air-effets-sante> , 2019
7. Enciclopedia medio ambiente. Contaminantes atmosféricos. [internet]. https://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/atmosfera/los-contaminantes-atmosfericos.asp ,2020
8. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, “INECC”. Qué son, cómo son y cómo se originan las partículas. Libros 59. Publicación 2, 2012.
9. United States Environmental Protection Agency. Particulate Matter (PM) Pollution. An official website of the United States government [internet]. <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>.2018
10. Alka Dwevedi, Jaigopal Sharma. Production of clean air using combotechnology. Solutions to Environmental Problems Involving Nanotechnology and Enzyme Technology, 2019.
11. European Commission. “Second Position Paper on Particulate Matter”. CAFE Working Group on Particulate Matter, 2004.

12. GreenFacts. Facts on Health and the environment. Particulate Matter. [internet]. <http://www.greenfacts.org/en/particulate-matter-pm/level-2/01-presentation.htm>, 2020.
13. Environmental Protection Agency. Particulate Matter: The Basics. [consultado en enero del 2020] [Internet] <https://www.sentryair.com/blog/industry-topics/particulate-matter-the-basics/>.2010.
14. Arciniégas Suárez C. Diagnóstico y control de material particulado: Partículas suspendidas totales y fracción respirable pm10*.
15. Aga E, Samoli E, Touloumi G, Anderson HR, Cadum E, Forsberg B, Goodman P, Goren A, Kotesovec F, Kriz B, Macarol-Hiti M, Medina S, Paldy A, Schindler C, Sunyer J, Tittanen P, Wojtyniak B, Zmirou D, Schwartz J, Katsouyanni K. Short-term effects of ambient particles on mortality in the elderly: results from 28 cities in the APHEA2 project. *Eur Respir J Suppl*, 40: 28-33, 2003.
16. Dominici F, Peng RD, Zeger SL, White RH, Samet JM. Particulate air pollution and mortality in the United States: did the risks change from 1987 to 2000? *Am J Epidemiol*. 166(8):880-8,2007
17. 38. Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak F Jr, Puybonnieux-Textier V, Quénel P, Schneider J, Seethaler R, Vergnaud JC, Sommer H. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*, 2;356(9232):795-801, 2000.
18. 7. Solarte I, Caicedo M, Restrepo S. Contaminación atmosférica y enfermedad respiratoria en niños menores de 14 años en Santa Fe de Bogotá. *Revista Médica Sanitas*;Volumen 5;2, 2010.
19. Bistream. Bloque 1, Pdf. [internet]. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10385/BloqueI.pdf?sequence=2&isAllowed=y>, 2020.
20. Department for Environment, Food and Rural Affairs; Scottish Executive; Welsh Assembly Government y Department of the Environment in Northern Ireland, “Particulate Matter in the United Kingdom”. 2005. SCIELO Rev. 2011.

21. Criba. Propiedades de una partícula. [consultado el 18 de enero del 2020] [Internet]. Disponible en: <http://www.criba.edu.ar/cinetica/solidos/Capitulo2.pdf>.
22. Dergham. M, Lepers. C, Verdin. A, Cazier. F, Billet. S, Courcot. D, Shirali. P, Garcon. G, 2015. Temporal–spatial variations of the physicochemical characteristics of air pollution Particulate Matter (PM_{2.5–0.3}) and toxicological effects in human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Environmental research* n°137. p. 256-267
23. Borgie. M, Dagher. Z, Ledoux. F, Verdin. A, Cazier. F, Martin. P, Hachimi. A, Shirali. P, Greiges-Gerge. H, Courcot. D, 2015. Comparison between ultrafine and fine particulate
24. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet*, 360(9341) :1233-42
25. Jesus Cardenas. Doctissimo. Révision médicale. 13 février 2018.
26. Visiblebody. Learn Site. [internet]. <https://www.visiblebody.com/es/learn/respiratory/5-functions-of-respiratory-system>, 2020
27. Jessica Andrea Flood-Garibay, a Miguel Ángel Méndez-Rojas, a Erwin Josuan Pérez-Cortés. Sistema inmune respiratorio y consecuencias de contaminación aérea por materia particulada. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 57(3):170-80. PDF. 2019.
28. Setyawati MI, Tay CY, Leong DT. Mechanistic investigation of the biological effects of SiO₂, TiO₂, and ZnO nanoparticles on intestinal cells. *Small*. 2015;11(28):3458-68. doi: 10.1002/sml.201403232.
29. Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2012). Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol*. 13(7):663–4
30. Ministère de l'Environnement, de l'Energie et de la Mer, 2016

31. Ferran Ballester. Contaminación Atmosférica, Cambio Climático Y Salud. Unidad de Epidemiología y Estadística. Escuela Valenciana de Estudios para la Salud. Artículo v79n2/159-175.2010.
32. Who Health organization. Ambient air pollution: Health impacts.[Internet]; <https://www.who.int/airpollution/ambient/health-impacts/en/>, Pulicación, 2020.
33. Eddahibi S. Fonctions Cellulaires Et Moléculaires De L'appareil Respiratoire Et Des Vaisseaux. These de Doctorat. Université Paris XII- Val de Marne, 2005.
34. Pui DY, Qi C, Stanley N, Oberdörster G, Maynard A, Recirculating Air Filtration Significantly Reduces Exposure to Airborne Nanoparticles. Environ Health Perspect, 116(7): 863–866, 2008.
35. Zimmermann k. Respiratory System: Our Avenue for Gas Exchange. Reference Article: Respiratory system facts, function and diseases. 2019.
36. Baeza, A. et Marano, F., 2007. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires- Un rôle central pour le stress oxydant. Medecine/science n° 5, vol. 23.
37. Lundborg. M, Dahlén. S, Johard. U, Gerde. P, Jastrand. C, Camner. P, Lastborn. L, 2006. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. Environmental research n°100, p. 197-204
38. Holtzman. M, Byers. D, Alexander-Brett. J, Wang. X, 2014. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. Nature Reviews Immunology n°14. P. 686-698
39. Aranibar Aragón, B. Determinación del efecto de bafilomicina a 1 y mg132 sobre el tiempo de vida media de la proteína 1 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad (lrp1) en células de carcinoma hepático (hepg2). Universidad Católica de Santa María ,Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. 2018.
40. Lamaison, L., 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous

- influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
41. Oberdörster. G, Ferin. J, Lehner. B. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environmental Health Perspectives* n°102 p.173-179. 1994
 42. Harrison RM, YinJ. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?. *Sci Total Environ*, 17 ; 249(1-3) : 85-101, 2000.
 43. European Commission. "Second Position Paper on Particulate Matter". CAFE Working Group on Particulate Matter, 2004.
 44. Morais Ferraira T, Forti M., Umbelino de Freitas C, Parra-Nascimento F, Leite-Junger W, Gouveia N. Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly. Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. *Int.J. Environ. Res. Public Health*, 13, 94.2016.
 45. Ogino. K, Nagaoka. K, Okuda. T, Oka. A, Kubo. M, Eguchi. Y, Fujikura. Y. PM2.5-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice. *Environmental toxicology* doi: 10.1002/tox.22303.2016
 46. Fröhlich. E, Salar-Behzadi. S. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. *Int. J. Mol. Sci* n°15(3), p. 4795-4822; 2014
 47. Aloui R, Magne F, Devouassoux G, Deverchere J, Ritter P, Bentaher A, Pacheco Y. Effets des particules fines sur les cellules épithéliales bronchiques. *SCIENCEDIRECT .Revue des Maladies Respiratoires*. 33,767-774. 2016.
 48. Refsnes M, Hetland RB, Ovrevik J, Sundfor I, Schwarze PE & Lag M. Different particle determinants induce apoptosis and cytokine release in primary alveolar macrophage cultures. *Part Fibre Toxicol* 3, 10. 2006.
 49. Lundborg. M, Dahlén. S, Johard. U, Gerde. P, Jastrand. C, Camner. P, Lastborn. L. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environmental research* n°100, p. 197-204.2006

50. Corbo GM, Forastiere F, Dell'Orco V, Pistelli R, Agabiti N, De Sthefanis B, Ciappi G, Perucci CA. Effects of environment on atopic status and respiratory disorders in children. *J Allergy Clin Immunol* 92(4) :616-23, 1993.
51. Refsnes M, Hetland RB, Ovrevik J, Sundfor I, Schwarze PE & Lag M. Different particle determinants induce apoptosis and cytokine release in primary alveolar macrophage cultures. *Part Fibre Toxicol* 3, 10. 2006
52. Krishna MT, Chauhan AJ, Frew AJ, Holgate ST. Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury. *Rev Environ Health*; 13 : 59–71. 1998.
53. Zhao, Klimecki F. Culture conditions profoundly impact phenotype in BEAS-2B, a human pulmonary epithelial model. *Applied Toxicology*, p945-951. 7, 2015.
54. Células Inmortalizadas Epiteliales Bronquiales Humanas (CIEBH) Y Adenovirus De Tipo 40 Vacuolado Del Simio (VS). BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™). American Type Culture Collection (ATCC) ; (Citado 26/01/2020). [Internet]; <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx#history>
55. Xiao GG, Wang M, Li N, et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to Diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem*; 278 : 50781–90. 2003.
56. Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol*; 195 : 35–44. 2004.
57. Tetteh M. Estrés oxidativo. Environmental Health Fact Sheet. (Citado : 27/01/2020). [Internet] ; hsc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf.
58. Lamaison, L., 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.

59. Witschger, O. & Fabriès, J-F., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. INRS, hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires, 21
60. Health Effects Institute, Boston, MA. Understanding the Health Effects of Ambient Ultrafine Particles. Library of Congress Catalog Number for the HEI Report Series: WA 754 R432, 2013.
61. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, et al. Organic compounds from Diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 25 : 515–21. 2001.
62. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999; 163 : 5582–91.
63. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. Un rôle central pour le stress oxydant. *Med Sci (Paris)*. 2007 May; 23(5): 497–501. Published online. May 15. doi: 10.1051/medsci/2007235497. 2007.
64. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002; 105 : 411–4.
65. Li N, Nel E. Role of the Nrf2-mediated signalling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antiox Redox Signal*; 8 : 88–98. 2006
66. Auger F, Gendron MC, Chamot C, et al. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*; 215 : 285–9 ;2006.
67. Bayram H, Ito K, Issa R, et al. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J* 2006; 27 : 705–13.
68. Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, et al. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 2003; 111 : 714–8.

69. Hiura TS, Li N, Kaplan R, et al. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from Diesel exhaust particles. *J Immunol* 2000; 165 : 2703–11.
70. Soysal P, Isik AT, Carvalho AF, et al. Oxidative stress and frailty: a systematic review and synthesis of the best evidence. *Maturitas*. 2017;99:66– [PubMed] [Google Scholar]
71. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–772. [PubMed]
72. Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 39, 73–82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711
73. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. Un rôle central pour le stress oxydant. *Med Sci (Paris)*. 2007 May; 23(5): 497–501. Published online. May 15. doi: 10.1051/medsci/2007235497. 2007.
74. Li N, Xia T, Nel A. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2008 May 1;44(9):1689-99. [PubMed]
75. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004 May; 11(9):1163-82. [PubMed] [Ref list]
76. Nabavi SF, Barber AJ, Spagnuolo C, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM, Sobarzo-Sánchez E. Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016 Oct; 53(5):293-312.
77. Hyeon S, Lee H, Yang Y, Jeong W. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 65, December 2013, Pages 789-799. [ScienceDirect]
78. Covas G, Antunes F. Hydrogen Peroxide and Cell Signaling. *Methods in Enzymology*, 2013. (Consultado 27/01/2020); [internet];

- <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/transcription-factor-nrf2>
(ScienceDirect).
79. Osburn W, Kensler T. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res.* 2008 Jul-Aug;659(1-2):31-9. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.11.006. [PubMed]
 80. Hayes JD1, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2009 Apr;34(4):176-88. doi: 10.1016/j.tibs.2008.12.008. [PubMed]
 81. Huang H, Nguyen T, Pickett C. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry.* (Consultado 27/01/2020). [internet] <http://www.jbc.org/content/277/45/42769.short>.
 82. Jeddiab F, Soozangarab N, Sadeghiab M, Hossein M, Samadicd N. Contradictory roles of Nrf2/Keap1 signaling pathway in cancer prevention/promotion and chemoresistance. *DNA Repair.* Volume 54, June 2017, Pages 13-21. [ScienceDirect]
 83. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi, K, Douglas J, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999 Jan 1; 13(1): 76–86. [PubMed].
 84. Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* 2006 Aug 9; 25(15):3605-17. [PubMed]
 85. Johnson DA, Amirahmadi S, Ward C, Fabry Z, Johnson JA. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicol. Sci.* 2010;114:237–46. [PMC free article] [PubMed].
 86. Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4–driven aggresome-like induced structure formation

- and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:1427–32. [PMC free article] [PubMed]
87. Cisneros E, Pupo J, Céspedes E. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutati6n peroxidasa. ,ISSN 1561-3011, 1997.
 88. Brigelius-Flohe R, Flohe L. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors* 2003;17:93–102. Crossref, Medline, Google Scholar
 89. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005;60:293–300. Crossref, Medline
 90. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951–965. Crossref, Medline, Google Scholar
 91. H. J. Duckers, M. Boehm, A. L. True et al., “Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation,” *Nature Medicine*, vol. 7, no. 6, pp. 693–698, 2001. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#).
 92. M. H. Ghattas, L. T. Chuang, A. Kappas, and N. G. Abraham, “Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity,” *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, no. 12, pp. 1619–1628, 2002. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#)
 93. LEE J, KANG J, STIPANUK M. Differential regulation of glutamate–cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem*,393, 181–190, 2006.
 94. S. W. Ryter, J. Alam, and A. M. K. Choi, “Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications,” *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 2, pp. 583–650, 2006. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#)

95. . N. Wakabayashi, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw et al., “Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, no. 7, pp. 2040–2045, 2004.
96. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. PNAS January 30, 2001 98 (3) 1188-1193; [Internet] <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1188>.
97. Siegel D, Gustafson D., Dehn D.L, Yi Han J, Boonchoong P, Berliner L.J, Ross D. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1: Role as a Superoxide Scavenger Molecular Pharmacology May 2004, 65 (5) 1238-1247; [Internet]: <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1238>.
98. Nioi P, Hayes J. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. Volume 555, Issues 1–2, 2 November 2004, Pages 149-171. [ScienceDirect]
99. . Ross D, Siegel D. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. Methods in Enzymology. Volume 382, 2004, Pages 115-144. [ScienceDirect].
100. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. FASEB J. 1999 Jul; 13(10):1169-83. [PubMed] [Ref list]
101. Yang H, Magilnick N, Lee C, Kalmaz D, Ou X, Chan J.Y, Lu1 S. Nrf1 and Nrf2 Regulate Rat Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit Transcription Indirectly via NF-κB and AP-1. Mol Cell Biol. 2005 Jul; 25(14): 5933–5946. [PMC]
102. Enciclopedia medio ambiente. Contaminantes atmosféricos. [internet]. https://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/atmosfera/los-contaminantes-atmosfericos.asp ,2020

103. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, “INECC”. Qué son, cómo son y cómo se originan las partículas. Libros 59. Publicación 2, 2012.
104. European Commission. “Second Position Paper on Particulate Matter”. CAFE Working Group on Particulate Matter, 2004.
105. United States Environmental Protection Agency. Particulate Matter (PM) Pollution. An official website of the United States government [internet]. <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>.2018
106. Arciniégas Suárez C. Diagnóstico y control de material particulado: Partículas suspendidas totales y fracción respirable pm10*.
107. Department for Environment, Food and Rural Affairs; Scottish Executive; Welsh Assembly Government y Department of the Environment in Northern Ireland, “Particulate Matter in the United Kingdom”. 2005. SCIELO Rev. 2011.
108. Criba. Propiedades de una partícula. [consultado el 18 de enero del 2020] [Internet]. Disponible en: <http://www.criba.edu.ar/cinetica/solidos/Capitulo2.pdf>.
109. Borgie. M, Dagher. Z, Ledoux. F, Verdin. A, Cazier. F, Martin. P, Hachimi. A, Shirali. P, Greiges-Gerge. H, Courcot. D, 2015. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells. Environmental pollution n°205. p.250-260
110. Sotty Jules. Evaluation des impacts toxicologiques des polluants microparticulaires (PM2.5) et nanoparticulaires (PM0.1) sur l’exacerbation de l’asthme et la BPCO. Master 2 Evaluation et Gestion des Risques en Environnement Professionnel Spécialité Recherche. 2015
111. Environmental Protection Agency. Particulate Matter: The Basics. [consultado en enero del 2020] [Internet] <https://www.sentryair.com/blog/industry-topics/particulate-matter-the-basics/>.2010.
112. Nascimento A. C. Moreira J. V. Influence of Zeta Potential in Physical and Mechanical Properties of Recycled Paper. International Journal of Innovative

- Research in Engineering & Management (IJIREM). ISSN: 2350-0557, Volume-2, Issue -5, 2015.
113. Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al.; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2012). Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. *Lancet Oncol.* 13(7):663–4
 114. Ferran Ballester. Contaminación Atmosférica, Cambio Climático Y Salud. Unidad de Epidemiología y Estadística. Escuela Valenciana de Estudios para la Salud. Artículo v79n2/159-175.2010.
 115. Who Health organization. Ambient air pollution: Health impacts.[Internet]; <https://www.who.int/airpollution/ambient/health-impacts/en/>, Publicación, 2020.
 116. Who Health organization. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. [Internet]; <https://www.who.int/phe/publications/air-pollution-global-assessment/en/>. Publicación, 2016.
 117. Eddahibi S. Fonctions Cellulaires Et Moléculaires De L'appareil Respiratoire Et Des Vaisseaux. These de Doctorat. Université Paris XII- Val de Marne, 2005.
 118. Zimmermann k. Respiratory System: Our Avenue for Gas Exchange. Reference Article: Respiratory system facts, function and diseases. 2019.
 119. Lundborg. M, Dahlén. S, Johard. U, Gerde. P, Jastrand. C, Camner. P, Lastborn. L, 2006. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environmental research* n°100, p. 197-204
 120. Holtzman. M, Byers. D, Alexander-Brett. J, Wang. X, 2014. The role of airway epithelial cells and innate immune cells in chronic respiratory disease. *Nature Reviews Immunology* n°14. P. 686-698
 121. Coraux, C., Hajj R, Lesimple P, Puchelle E. Réparation et régénération de l'épithélium respiratoire. *Medecine/sciences*, 21: 1063-9. 2005

122. ATMO-HDF. Qu'est ce que la pollution de l'air et d'où vient-elle ? . [INTERNET]. (Consultado 01-2020). : <<http://www.atmo-hdf.fr/tout-savoirsur-l-air/polluants/origine-de-la-pollution.html>>. 2017.
123. Lamaison, L., 2006. Caractérisation des particules atmosphériques et identification de leurs sources dans une atmosphère urbaine sous influence industrielle. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, 351p.
124. Morais Ferraira T, Forti M., Umbelino de Freitas C, Parra-Nascimento F, Leite-Junger W, Gouveia N. Effects of Particulate Matter and Its Chemical Constituents on Elderly. Hospital Admissions Due to Circulatory and Respiratory Diseases. Int.J. Environ. Res. Public Health, 13, 94.2016.
125. Oberdörster. G, Ferin. J, Lehner. B. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. Environmental Health Perspectives n°102 p.173-179. 1994
126. . Lundborg. M, Dahlén. S, Johard. U, Gerde. P, Jastrand. C, Camner. P, Lastborn. L. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. Environmental research n°100, p. 197-204.2006
127. . Ogino. K, Nagaoka. K, Okuda. T, Oka. A, Kubo. M, Eguchi. Y, Fujikura. Y. PM2.5-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in NC/Nga mice. Environmental toxicology doi: 10.1002/tox.22303.2016
128. Fröhlich. E, Salar-Behzadi. S. Toxicological Assessment of Inhaled Nanoparticles: Role of in Vivo, ex Vivo, in Vitro, and in Silico Studies. Int. J. Mol. Sci n°15(3), p. 4795-4822; 2014.
129. Baeza, A. et Marano, F., 2007. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires - Un rôle central pour le stress oxydant. Medecine/science n° 5, vol.
130. Witschger, O. & Fabriès, J-F., 2005. Particules ultra-fines et santé au travail. 1- Caractéristiques et effets potentiels sur la santé. INRS, hygiène et sécurité du travail – Cahiers de notes documentaires, 21-35.

131. Células Inmortalizadas Epiteliales Bronquiales Humanas (CIEBH) Y Adenovirus De Tipo 40 Vacuolado Del Simio (VS). BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™). American Type Culture Collection (ATTC) ; (Citado 26/01/2020). [Internet]; <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-9609.aspx#history>
132. Aloui R, Magne F, Devouassoux G, Deverchere J, Ritter P, Bentaher A, Pacheco Y. Effets des particules fines sur les cellules épithéliales bronchiques. SCIENCE DIRECT .Revue des Maladies Respiratoires. 33,767-774. 2016.
133. Krishna MT, Chauhan AJ, Frew AJ, Holgate ST. Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury. Rev Environ Health; 13 : 59–71. 1998.
134. Refsnes M, Hetland RB, Ovrevik J, Sundfor I, Schwarze PE & Lag M. Different particle determinants induce apoptosis and cytokine release in primary alveolar macrophage cultures. Part Fibre Toxicol 3, 10. 2006.
135. Xiao GG, Wang M, Li N, et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to Diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. J Biol Chem; 278 : 50781–90. 2003.
136. Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. Toxicol Appl Pharmacol; 195 : 35–44. 2004.
137. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, et al. Organic compounds from Diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. Am J Respir Cell Mol Biol; 25 : 515–21. 2001.
138. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. J Immunol 1999; 163 : 5582–91.
139. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. Un rôle central pour le stress oxidant. Med Sci (Paris). 2007 May; 23(5): 497–501. Published online. May 15. doi: 10.1051/medsci/2007235497. 2007.

140. Auger F, Gendron MC, Chamot C, et al. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*; 215 : 285–9 ;2006.
141. Li N, Nel E. Role of the Nrf2-mediated signalling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antiox Redox Signal*; 8 : 88–98. 2006
142. Xiao GG, Wang M, Li N, et al. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to Diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. *J Biol Chem*; 278 : 50781–90. 2003.
143. Gilmour PS, Ziesenis A, Morrison ER, et al. Pulmonary and systemic effects of short-term inhalation exposure to ultrafine carbon black particles. *Toxicol Appl Pharmacol*; 195 : 35–44. 2004.
144. Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, et al. Organic compounds from Diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 25 : 515–21. 2001.
145. Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N, Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J Immunol* 1999; 163 : 5582–91.
146. Baeza A, Marano F. Pollution atmosphérique et maladies respiratoires. Un rôle central pour le stress oxidant. *Med Sci (Paris)*. 2007 May; 23(5): 497–501. Published online. May 15. doi: 10.1051/medsci/2007235497. 2007.
147. Auger F, Gendron MC, Chamot C, et al. Responses of well-differentiated nasal epithelial cells exposed to particles: role of the epithelium in airway inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol*; 215 : 285–9 ;2006.
148. Li N, Nel E. Role of the Nrf2-mediated signalling pathway as a negative regulator of inflammation: implications for the impact of particulate pollutants on asthma. *Antiox Redox Signal*; 8 : 88–98. 2006

149. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, et al. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002; 105 : 411–4.
150. Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, et al. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect* 2003; 111 : 714–8.
151. Hiura TS, Li N, Kaplan R, et al. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from Diesel exhaust particles. *J Immunol* 2000; 165 : 2703–11.
152. Bayram H, Ito K, Issa R, et al. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J* 2006; 27 : 705–13.
153. Soysal P, Isik AT, Carvalho AF, et al. Oxidative stress and frailty: a systematic review and synthesis of the best evidence. *Maturitas*. 2017;99:66–72. [PubMed] [Google Scholar]
154. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018; 13: 757–772. [PubMed]
155. Islam, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* 39, 73–82. doi: 10.1080/01616412.2016.1251711
156. Tetteh M. Estrés oxidativo. *Environmental Health Fact Sheet*. (Citado : 27/01/2020). [Internet] ; hsc.umich.edu/wp-content/uploads/OxidativeStressSPN.pdf.
157. Li N, Xia T, Nel A. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med*. 2008 May 1;44(9):1689-99. [PubMed]
158. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004 May; 11(9):1163-82. [PubMed] [Ref list]

159. Nabavi SF, Barber AJ, Spagnuolo C, Russo GL, Daglia M, Nabavi SM, Sobarzo-Sánchez E. Nrf2 as molecular target for polyphenols: A novel therapeutic strategy in diabetic retinopathy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016 Oct; 53(5):293-312.
160. Hyeon S, Lee H, Yang Y, Jeong W. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 65, December 2013, Pages 789-799. [ScienceDirect]
161. Covas G, Antunes F. Hydrogen Peroxide and Cell Signaling. *Methods in Enzymology*, 2013. (Consultado 27/01/2020); [internet]; <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/transcription-factor-nrf2> (ScienceDirect).
162. Osburn W, Kensler T. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):31-9. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.11.006. [PubMed]
163. Hayes JD1, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci*. 2009 Apr;34(4):176-88. doi: 10.1016/j.tibs.2008.12.008. [PubMed]
164. Huang H, Nguyen T, Pickett C. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry*. (Consultado 27/01/2020). [internet] <http://www.jbc.org/content/277/45/42769.short>.
165. Jeddab F, Soozangarab N, Sadeghiab M, Hossein M, Samadid N. Contradictory roles of Nrf2/Keap1 signaling pathway in cancer prevention/promotion and chemoresistance. *DNA Repair*. Volume 54, June 2017, Pages 13-21. [ScienceDirect]
166. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi, K, Douglas J, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*. 1999 Jan 1; 13(1): 76-86. [PubMed].

167. Lo SC, Li X, Henzl MT, Beamer LJ, Hannink M. Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J.* 2006 Aug 9; 25(15):3605-17. [PubMed]
168. Johnson DA, Amirahmadi S, Ward C, Fabry Z, Johnson JA. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicol. Sci.* 2010;114:237–46. [PMC free article] [PubMed].
169. Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4–driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011;108:1427–32. [PMC free article] [PubMed]
170. Brigelius-Flohe R, Flohe L. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors* 2003;17:93–102. Crossref, Medline, Google Scholar
171. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, MacNee W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 2005;60:293–300. Crossref, Medline
172. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999;27:951–965. Crossref, Medline, Google Scholar
173. H. J. Duckers, M. Boehm, A. L. True et al., “Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation,” *Nature Medicine*, vol. 7, no. 6, pp. 693–698, 2001. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#).
174. M. H. Ghattas, L. T. Chuang, A. Kappas, and N. G. Abraham, “Protective effect of HO-1 against oxidative stress in human hepatoma cell line (HepG2) is independent of telomerase enzyme activity,” *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 34, no. 12, pp. 1619–1628, 2002. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#)

175. S. W. Ryter, J. Alam, and A. M. K. Choi, “Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications,” *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 2, pp. 583–650, 2006. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#)
176. N. Wakabayashi, A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw et al., “Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 7, pp. 2040–2045, 2004.
177. Nioi P, Hayes J. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Volume 555, Issues 1–2, 2 November 2004, Pages 149-171. [ScienceDirect]
178. Siegel D, Gustafson D., Dehn D.L, Yi Han J, Boonchoong P, Berliner L.J, Ross D. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1: Role as a Superoxide Scavenger *Molecular Pharmacology* May 2004, 65 (5) 1238-1247; [Internet]: <https://doi.org/10.1124/mol.65.5.1238>.
179. Asher G, Lotem J, Cohen B, Sachs L, Shaul Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. *PNAS* January 30, 2001 98 (3) 1188-1193; [Internet] <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1188>.
180. Ross D, Siegel D. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. *Methods in Enzymology*. Volume 382, 2004, Pages 115-144. [ScienceDirect].
181. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*. 1999 Jul; 13(10):1169-83. [PubMed] [Ref list]
182. 174. Yang H, Magilnick N, Lee C, Kalmaz D, Ou X, Chan J.Y, Lu1 S. Nrf1 and Nrf2 Regulate Rat Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit Transcription Indirectly via NF-κB and AP-1. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul; 25(14): 5933–5946. [PMC]

183. Yang H, Zeng Y, Lee TD, Yang Y, Ou X, Chen L, Haque M, Rippe R, Lu SC. Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20; 277(38):35232-9.
184. Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, Mulcahy RT. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene. Revision of the ARE consensus sequence. *J Biol Chem.* 2002 Aug 23; 277(34):30730-7. [PubMed] [Ref list]
185. Gochenauer GE, Robinson MB. Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3H]glutamate transport and expression of both system xc(-) subunits. *J Neurochem.* 2001 Jul; 78(2):276-86. [PubMed] [Ref list]
186. Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1980 Mar 25; 255(6):2372-6. [PubMed] [Ref list]
187. Hewett S.J, Huang Y, Lambros M, Gout P.W, Kalivas P.W, Massie A, Smolders I, Methner A, Pergande M, Smith S.B, Ganapathy V, Maher P. The Cystine/Glutamate Antiporter System xc⁻ in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Feb 10; 18(5): 522–555. [PubMed]
188. Mota S.I, Costa R. O, Ferreira I. L, Santana I, Caldeira G, Padovano C, Fonseca A.C, Baldeiras I, Cunha C, Letra L, Oliveira C.R, Pereira C. M. F, Rego A.C. Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* Volume 1852, Issue 7, July 2015, Pages 1428-1441. (ScienceDirect).
189. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Okhura Y, Ueno KA. Combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 1996;19(11):1518-1520. PubMed.

190. Riss T.L., and Moravec R.A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. (2004) *Assay. Drug Dev. Technol.* 2, 51–62. PubMed
191. Park C, Hyun Hong S, Shik Shin S, Lee D-S, Ho Han M, Cha H-J, Kim S, Kim H-S, Kim J-Y, Park E-K, Jeon Y-J, Hyun Choi Y. Activation of the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway Contributes to the Protective Effects of *Sargassum serratifolium* Extract against Oxidative Stress-Induced DNA Damage and Apoptosis in SW1353 Human Chondrocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2018 Jun; 15(6): 1173. Published online 2018 Jun 5.
192. Chrzanowska C, Hunt SM, Mohammed R, Tilling PJ. The use of cytotoxicity assays for the assessment of toxicity. In: EHT 9329, Final Report to the Department of the Environment. 1990 [PubMed]
193. Maehara Y, Anai H, Tamada R, Sugimachi K. The ATP assay is more sensitive than the succinate-dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology.* 1987;23:273-276. [PubMed]
194. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink H, Worzella TJ, Minor L. Cell viability assays. 2013 Mar 1 (updated 2016 Jul 1). In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al. editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. [PubMed]
195. Garcia O, Massieu L. Glutamate uptake inhibitor L-transpyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: Involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *Journal of Neuroscience Research.* 2003;74:956-966. [PubMed]
196. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of Biomolecular Screening.* 2004;506-515. [PubMed]

197. Kip D. Hauch, Buddy D. Ratner. *Microscopy for Biomaterials Science. Biomaterials Science (Third Edition)*, 2013.
198. Lloreta Trull, J. La apariencia óptica de las células y los tejidos patológicos desentrañada a través del microscopio electrónico. bases ultraestructurales de la microscopía óptica. revista española de patología. vol. 41, n.º, 2008.
199. Ma Q, Wang W, Chu P. K, Mei S, Ji K, Jin, L, Zhang Y. Concentration-and time-dependent response of human gingival fibroblasts to fibroblast growth factor 2 immobilized on titanium dental implants. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 1965-1975. Jörgen Bergström. *Experimental Characterization Techniques. Mechanics of Solid Polymers*, 2015.
200. A.S. Holik. *Optical Microscopy. Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, 2001.
201. Bannai S, Kitamura E. Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1980 Mar 25; 255(6):2372-6. [PubMed] [Ref list]

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de Soluciones

Se realizaron los cálculos para la preparación de la solución

*El diametro en cada pozo de la placa es de 9,6 cm²

*la solucion madre contiene 2,7 µg/mL

1. PF - PUF - TiO₂ (5 µg/cm²)

2. ZnO (1.5 µg/cm²)

Entonces:

5 µg.....cm²

X9.6 cm²

X= 48 µg por pozo

En 2mL (volumen en los pozos)

X= 24 µl/mL ; 0.024 µg/µL

➔ 2,7 µg/µL en 10 mL

$C \cdot V = C_2 \cdot V_2$

2,7 µg/µL . 1000µL = 0.024µg/µL . X

X= 112.5 factor de dilución

➔ 10000µl / 112.5= **88.8µL**

➔ 88.8µL (Solución patrón de partículas) +
10000µL – 88.8µL (LHC9)

Solución de medio preparada para la
exposición.

Después se Agregó el anti fúngico a 100x de
concentración en 50mL. (500µL)

$C \cdot V = C \cdot V$
100X . X= 1 X 50000µL
X= 500µL

Entonces:

1.5 µg.....cm²

X9.6 cm²

X= 14.4 µg por pozo

En 2mL (volumen en los pozos)

X= 7.2 µl/mL ; 0.0072 µg/µL

2,7 µg/µL en 10 mL

$C \cdot V = C_2 \cdot V_2$

2,7 µg/µL . 1000µL = 0.0072µg/µL . X

X= 375 factor de dilución

➔ 10000µl / 375 = **26.66µL**

➔ 26.66µL (Solución patrón de partículas)
+ 10000µL – 26.6µL (LHC9)

Solución de medio preparada para la
exposición.

Después se Agregó el anti fúngico a 100x
de concentración en 50mL. (500µL)

$C \cdot V = C \cdot V$
100X . X= 1 X 50000µL
X= 500µL

Anexo 2: Dosaje de proteínas

1. Lisamiento de Células

Se trabajó con las placas expuestas en la manipulación anterior, inicialmente se aspiró cada uno de los pozos y se añadió 1ml de PBS para realizar el lavado, después se añadió 100µl de la solución lisadora (RIPA) de células.

Para continuar se pasó un scraper por encima de cada pozo para concretar con el lisamiento, y se recolectó el contenido de cada pozo en diferentes eppendorf (previamente marcados), fue necesario después llevar a centrifuga (sobrenadante: proteínas; precipitado: restos celulares) x 15 minutos a 17000 G (v max) para recuperar el sobrenadante y colocarlo en nuevos eppendorf.

Finalmente se añadió 10µL del inhibidor de proteasa fosfatasa (para terminar el lisamiento) y se llevó a -80°C.

2. Dosaje De Proteínas

Para el dosaje de proteínas se trabajó con los eppendorf a -80°C y se preparó previamente la gama antes de preparar la placa.

3. Preparación estándar de dilución

Se añadió a los nuevos eppendorf (a cada uno) preparaciones combinadas (ejemplo al epp .1 (A) sólo 60µL de BSA; Al epp. 2(B)75µL BSA+25µLRIPA; los siguientes epp. se preparan en cascada. (Tabla 1)

4. Preparación de la placa

Ya preparados los epp. Se agregaron 10µL en pozos celulares de una placa (incluyendo los eppendorf con la exposición de partículas) (Tabla 2)

5. Preparación del reactivo

Para la preparación de reactivo se consideró que A es 50 veces diluido en B (la cantidad de preparación dependió de la cantidad de pozos utilizados, en este caso son 36 pozos, pero se prepararon para 40 en caso de tener pérdidas).

Obtenidos los resultados se añadió a cada pozo 200µL de la nueva solución reactivo preparada (según protocolo) y se llevó a estufa por 30 minutos a 37°C, finalmente se realizó la lectura espectro-absorbancia de las muestras.

Anexo 3. Preparación de dilución y placas

Frasco	Volumen de diluyente (μL) ripa	Volumen de la solución de proteína(μl) BSA	Concentración estándar de BSA (μg/ml)
A	0	60 de stock	2000
B	25	75 de stock	1500
C	65	65 de stock	1000
D	35	35 de B dilución	750
E	65	65 de C dilución	500
F	65	65 de E dilución	250
G	65	65 de F dilución	125
H	80	20 de G dilución	25
I	100	0	0

TABLA N°1. Preparación de dilución estándar(BSA)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	I	A	I	T-	T-	ZnOr	ZnOr				
B	B		B		PFa	Pfa						
C	C		C		PFr	PFr						
D	D		D		PUFa	PUFa						
E	E		E		PUFr	PUFr						
F	F		F		TiO2a	TiO2a						
G	G		G		TiO2r	TiO2r						
H	H		H		ZnOa	ZnOa						

TABLA N°2. Preparación de placa con las diluciones de estándares y muestras expuestas a partículas.

Blanco	T-	PFA	PFR	PUFA	PUFR	TIO2A	TIO2R	ZNOA	ZNOR	BLEU	BLEU
7μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	20μL	7.5μL	7.5μL

TABLA N°3. Equipo de electroforesis: el blanco de proteínas (7μL), las muestras (20μL) y bleu 4X (7.5μL)

Muestra	Cantidad	Placa	Buffer RLTplus
Celulas	$\leq 5 \times 10^6$	$\leq 6\text{cm}$	350 μL
Celulas	$\leq 1 \times 10^7$	6-10cm	600 μL

TABLA N°4. Volúmenes de Buffer RLT Plus para interrupción de muestra.

Anexo 4 : Tablas de resultados en excel western Blot

	actina	NRF2...1	GPX...1	HO1 ...1	NQO1 ...1	NRF2 - ACTIN	GPX-Actina	HO1- actina	NQO1-actina
t-	24538.811	33584.953	6348.518	1171.255	15611.225	1.3686463	0.25871335	0.04773072	0.636185062
Pfa	27919.225	37841.903	13549.225	3530.912	20827.225	1.35540664	0.4853009	0.12646884	0.745981488
pfr	29577.054	42054.024	20141.811	14301.882	18934.933	1.42184627	0.6809945	0.48354654	0.640189955
pufa	26529.347	33950.681	26128.64	18428.468	25855.518	1.27974055	0.98489571	0.69464461	0.974600615
pufr	26329.347	23712.903	21957.468	24125.589	21264.347	0.90062632	0.83395414	0.91630032	0.807629107
tio2a	27481.64	34743.56	9140.933	5661.933	11559.518	1.26424624	0.33261963	0.20602602	0.420626935
tio2r	25943.054	40007.731	11114.054	3173.811	14302.761	1.54213652	0.42840191	0.1223376	0.551313697
znoa	26005.054	30301.974	9473.175	431.891	16820.589	1.16523403	0.36428207	0.01660796	0.646819995
znor	25239.811	21156.953	13297.468	2301.497	19166.882	0.83823738	0.52684499	0.09118519	0.759390865

TABLA N°5 Resultados cuantitativos del primer estudio a proteínas celulares en western blot.

	actina 2	NRF2	GPX	HO1	NQO1	NRF2 - ACTIN	GPX-Actina	HO1- actina	NQO1-actina
t-	16822.589	9414.288	20778.518	12582.518	12937.225	0.55962183	1.23515578	0.74795372	0.76903888
pfa	23586.761	23571.095	24161.64	16946.225	22019.175	0.99933581	1.02437295	0.71846342	0.933539582
pfr	25402.64	38110.217	27228.054	25156.64	28248.761	1.50024631	1.07185922	0.99031597	1.112040363
pufa	28195.225	53896.631	21897.054	21301.104	24541.468	1.91155173	0.77662278	0.75548622	0.870412206
pufr	27442.64	38698.388	15777.933	29226.054	25334.296	1.41015544	0.57494224	1.06498697	0.923172698
tio2a	18627.347	40488.217	16838.054	18917.054	21065.296	2.1735901	0.90394268	1.01555278	1.130880098
tio2r	16838.347	23432.095	11376.933	15293.882	17501.882	1.39159117	0.67565617	0.90827692	1.039406184
znoa	14764.175	30448.338	17715.761	11335.64	16165.882	2.06231218	1.1999154	0.76778012	1.094939744
znor	15693.832	27037.51	15198.104	4984.518	9223.64	1.72281123	0.96841256	0.31761	0.587723891

TABLA N°6 resultados cuantitativos del segundo estudio a proteínas celulares en western blot.

	ACTINA 3	XCT	GCLM	XCT-ACTINA	GCLM-ACTINA
t-	26315.811	18320.861	7212.861	0.69619215	0.27408849
pfa	26879.054	14988.74	6985.154	0.55763644	0.25987351
pfr	23791.225	16086.79	15314.326	0.67616485	0.6436964
pufa	22253.054	23323.033	19703.569	1.04808234	0.88543213
pufr	28004.175	11613.619	15246.447	0.41471027	0.54443479
tio2a	25574.054	9446.619	10256.033	0.36938293	0.40103274
tio2r	25373.225	10295.376	10127.79	0.40575749	0.39915265
znoa	27907.347	13562.205	4229.376	0.48597256	0.15155063
znor	30156.054	12534.619	19568.447	0.41565846	0.64890609

TABLA N°7 Resultados cuantitativos del estudio a proteínas reguladoras en western blot

	NRF2	GPX	HO1	NQO1	XCT	GCLM
pufa	1.59564614	0.88075924	0.72506542	0.92250641	1.04808234	0.88543213
pufr	1.15539088	0.70444819	0.83589327	0.8654009	0.41471027	0.54443479
T-	0.96413407	0.74693456	0.39784222	0.70261197	0.69619215	0.27408849

Tabla N°8 Promedios comparativos para PUFa Y PUFR.

Anexo 5: Tabla de resultados comparativos de medias por Tukey.

Comparación Tukey.	Media	95.00% de dife.	D. Significativa	Resumen
NRF2-ACTINA vs. GPX- ACTINA	0.5889	0.1840 to 0.9938	Yes	**
NRF2-ACTINA vs. HO1- ACTINA	0.7161	0.3112 to 1.121	Yes	***
NRF2-ACTINA vs. NQO1- ACTINA	0.5856	0.1807 to 0.9905	Yes	**
GPX- ACTINA vs. HO1- ACTINA	0.1272	-0.2777 to 0.5321	No	ns
GPX- ACTINA vs. NQO1- ACTINA	-0.003364	-0.4083 to 0.4015	No	ns
HO1- ACTINA vs. NQO1- ACTINA	-0.1305	-0.5354 to 0.2744	No	ns



Anexo 6: Tabla de resultados ANOVA

Tabla ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Entre columnas	2.78	3	0.9268	F (3, 32) = 9.22	P=0.0002
Dentro de las columnas	3.216	32	0.1005		
Total	5.996	35			

