



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación fisiológica e inmunológica de la exposición
concomitante a ozono y material particulado
($PM < 2.5 \mu m$) de la Ciudad de México en un modelo de
asma alérgica en cobayo (*Cavia porcellus*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Larisa Idania García Alonso



TUTOR:

M en C Carlos Iván Falcón Rodríguez

2017

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Universidad

Facultad
Carrera
Número de Cuenta

2. Datos del Tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del Sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del Sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del Sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del Sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Subtítulo

Número de páginas

Año

1. Datos del alumno

García
Alonso
Larisa Idania
Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias
Biología
301216283

2. Datos del Tutor

M en C.
Carlos Iván
Falcón
Rodríguez

3. Datos del Sinodal 1

Dra. en C. B.
Patricia
Segura
Medina

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Natalia
Manzano
León

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Adriana Elizabeth
González
Villalva

6. Datos del Sinodal 4

Biól.
Diana
Pérez
Carrera

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación fisiológica e inmunológica de la exposición concomitante a ozono y material particulado (PM<2.5µm) de la Ciudad de México en un modelo de asma alérgica en cobayo (*cavia porcellus*)

77

2017

Agradecimientos académicos

A la Secretaria de Ciencia y Tecnología e Innovación de la Ciudad de México (SECITI) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto (042/2013; 014/2014; 019/2015).

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER, Ismael Cosío Villegas de la Secretaria de Salud.

Al Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV-Zacatenco) del IPN.

A mi jurado:

Dra. en C. B. Patricia Segura Medina

Dra. Natalia Manzano León

M en C. Carlos Iván Falcón Rodríguez

Dra. Adriana Elizabeth González Villalva

Biól. Diana Pérez Carrera

A:

Biól. Sandra Luz Hernández Ojeda

Act. Christian Julián Muñoz Rosas

Dedicatoria

Christian gracias por ser mi compañero de vida y cómplice en este y todos los proyectos que realizo, no existen suficientes palabras para expresar mi gratitud y sólo se me ocurre amarte.

A mis padres **Gelasia** y **Valentín**, son el mejor ejemplo que una hija puede tener. Me enseñaron a no rendirme, a tener confianza y a seguir adelante, me dieron lo mejor de ustedes.

A mis hermanas **Idalia**, **Hassel** y **Olivia**, por su gran labor de hermanas mayores, cuidarme, amarme, estar conmigo en todo momento y guiarme al camino del éxito tal como ustedes. Gracias por mantenernos unidas

A mis sobrinos **América Sofía** y **Luis Carlos** que me inspiran a ser mejor cada día y me permiten ser parte de su ejemplo y formación. Los límites no existen, los amo.

A mis amigos por compartir memorables momentos durante tantos años, gracias por estar en mi vida.

A mi jurado por ser la columna vertebral de este proyecto, sin su esfuerzo y dedicación nada de esto sería posible.

A **Carlos** por aceptarme como su alumna y transmitirme sus conocimientos, así como su tiempo durante el desarrollo de este trabajo.

*“Después de escalar una montaña muy alta,
descubrimos que hay muchas otras montañas por escalar”*
Nelson Mandela

Índice

Índice	1
Índice de Esquemas	3
Índice de Tablas	5
Lista de Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción.....	9
1. Asma	9
1.1 Epidemiología del Asma	11
1.2 Fisiopatología del Asma.....	11
Sistema Respiratorio	11
1.3 Mecanismos de defensa Pulmonar	18
CC16 en Inflamación Alérgica	19
2. Contaminación Ambiental	19
2.1 Contaminación atmosférica.....	20
2.2 Contaminación en la Ciudad de México.....	20
3. Ozono (O₃)	22
4. Material Particulado	23
Antecedentes	25
5. Efectos de la Contaminación Atmosférica en la Salud	25
5.2 Efectos del Ozono en la salud	25
5.3 Efectos de PM<2.5µm en la salud	26
Justificación	29
Hipótesis	29
Objetivo General.....	30
Objetivos Particulares	30
Material y Método	31
Animales	31
Sensibilización	31
Exposición	32
Material Particulado	32
Ozono.....	35
Análisis de la composición del Material Particulado (PM<2.5µm)	35
Pruebas de Función Pulmonar Pletismográficas	36
Eutanasia y Lavados Broncoalveolares	39
Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA	39
Ensayos de ELISA	40
Análisis estadístico	41

Resultados	42
Análisis Gravimétrico	42
Composición Química del Material Particulado (PM<2.5µm)	43
Reactividad de las vías aéreas	46
Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA.....	47
Ensayos de ELISA	51
Biomarcador de daño pulmonar CC16.....	51
Perfil de citocinas Th1/Th2.....	52
Discusión	58
Conclusiones	64
Bibliografía.....	65
Anexos	73

Índice de Esquemas

FIGURA 1. DIAGRAMA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS.....	12
FIGURA 2. RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR UN ANTÍGENO.....	17
FIGURA 3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE SENSIBILIZACIÓN EN EL MODELO DE ASMA ALÉRGICA EN COBAYO.	32
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DEL CONCENTRADOR DE PARTÍCULAS.....	34
FIGURA 5. SISTEMA CONCENTRADOR DE PARTÍCULAS Y CÁMARAS DE EXPOSICIÓN PARA LOS COBAYOS.....	34
FIGURA 6. GENERADOR DE OZONO.....	35
FIGURA 7. PLETISMÓGRAFO BAROMÉTRICO PARA EVALUAR LA FUNCIÓN PULMONAR.	38
FIGURA 8. KIT DE ELISA DE LA MARCA MYBIOSOURCE.....	41
FIGURA 9. ANÁLISIS GRAVIMÉTRICO.	43
FIGURA 10. ANÁLISIS DE ELEMENTOS INORGÁNICOS DE LAS PM _{2.5}	44
FIGURA 11. ANÁLISIS DE LOS HAPs DE LAS PM _{2.5}	45
FIGURA 12. DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS.....	46
FIGURA 13. DETERMINACIÓN DE (1-3)-β-D-GLUCANO DEL PM _{2.5}	46
FIGURA 14. REACTIVIDAD DE LAS VÍAS AÉREAS A HISTAMINA EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA EN COBAYO.	47
FIGURA 15. CONTEO TOTAL EN LBA DE COBAYOS.....	48
FIGURA 16. CONTEO CELULAR DIFERENCIAL EN LBA DE COBAYOS.	49
FIGURA 17. POBLACIONES CELULARES DE LOS LBA DE COBAYOS CON TINCIÓN GIEMSA.	50
FIGURA 18. POBLACIONES CELULARES DE LOS LBA DE COBAYOS CON TINCIÓN GIEMSA.	51
FIGURA 19. ENSAYO DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA CC16 EN LBA DE COBAYOS.	52
FIGURA 20. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN IL-6 DE LBA DE COBAYOS.....	53
FIGURA 21. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN IL-17 DE LBA DE COBAYOS.....	53
FIGURA 22. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE IL-4 DE LBA DE COBAYOS. .	54
FIGURA 23. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE IL-10 DE LBA DE COBAYOS.	55
FIGURA 24. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE INF-γ DE LBA DE COBAYOS	56

FIGURA 25. ENSAYOS DE ELISA PARA CUANTIFICACIÓN DE TNF- α DE LBA DE COBAYOS.	56
FIGURA 26. PROPORCIONES DE DETECCIÓN DE RESPUESTA TH1/TH2	57
FIGURA 27. PROPORCIONES DE DETECCIÓN DE RESPUESTA TH1/TH2	57

Índice de Tablas

TABLA 1. FENOTIPOS DE ASMA MÁS COMUNES.....	10
TABLA 2. PRINCIPALES CITOCINAS RELACIONADAS EN EL PROCESO INFLAMATORIO.....	15
TABLA 3. TEMPORADAS CLIMÁTICAS EN LA CIUDAD DE MÉXICO.....	21
TABLA 4. TIPOS DE PARTÍCULAS QUE SE ENCUENTRAN EN LA ATMÓSFERA DE ACUERDO A SUS COMPONENTES.	24
TABLA 5. CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL PARTICULADO SEGÚN SU TAMAÑO.	24
TABLA 6. PROCESOS POR EL CUAL LAS PARTÍCULAS ENTRAN EN EL SISTEMA RESPIRATORIO.....	27
TABLA 7. GRUPOS EXPERIMENTALES.....	33

Lista de Abreviaturas

AF	Aire filtrado
Al(OH) ₃	Hidróxido de aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CC16	Proteína de las Células de Clara
CO	Monóxido de carbono
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
Fcε	Receptor de célula cebada
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HC	Hidrocarburos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IgE	Inmunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
INF-γ	Interferón gama
LBA	Lavados Broncoalveolares
NO _x	Óxidos de nitrógeno
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
OVA	Ovoalbúmina
O ₃	Ozono
OM _{2.5} mm	Material particulado con diámetro <2.5μm
PM ₁₀ mm	Material particulado con diámetro <10μm
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SO ₂	Bióxido de azufre
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Th1	Linfocito T cooperador 1
Th2	Linfocito T cooperador 2

Resumen

La contaminación atmosférica es un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en ciudades industrializadas como la Ciudad de México, en donde se encuentran dos contaminantes que persisten más en la atmósfera: Ozono (O_3), un gas altamente oxidante y material particulado ($PM_{\leq 2.5\mu m}$), el cual contiene numerosas sustancias tóxicas, las cuales pueden ser carcinogénicas. Ambos contaminantes exceden diariamente la Norma Oficial Mexicana para contaminantes criterio, que para ozono es de 0.095 ppm/hora al año y para $PM_{2.5}$ es de $45\mu g/m^3/24$ horas. Diferentes estudios han correlacionado la exposición a estos contaminantes con síntomas como: inflamación en las vías aéreas, asma, EPOC, entre otros; tanto en modelos animales como en humanos. En este trabajo se evaluó en tiempo real *in vivo* la respuesta fisiológica e inmunológica de la exposición concomitante a O_3 y $PM_{2.5}$ en un modelo de asma alérgica en cobayo, en la temporada seca-fría (noviembre a febrero), ya que durante este periodo los contaminantes persisten más tiempo en la atmósfera. Para este estudio se utilizaron 40 cobayos (*Cavia porcellus*) con un peso de 450-500g, divididos en 8 grupos. Cuatro grupos fueron control no sensibilizados y cuatro grupos fueron sensibilizados (día 1) con ovoalbúmina (OVA) e hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$) como adyuvante. Los animales fueron expuestos a aire filtrado, ozono (1h/día) y/o $PM_{2.5}$ (4h/día), durante 9 días. La exposición se realizó por medio de un sistema concentrador de partículas ubicado en CINVESTAV-Zacatenco. El día 21 se realizaron curvas de histamina por medio de pletismografía barométrica y 24 horas después se llevaron a cabo los lavados bronquioalveolares (LBA), con los que se realizó el conteo celular total y diferencial, así como los ensayos de ELISA para las diferentes citocinas como: IL4, IL-6, IL10, IL 17, $TNF-\alpha$ e $INF-\gamma$, así como un biomarcador de daño pulmonar CC16. En nuestros resultados las curvas de histamina demostraron hiperreactividad en los animales asmáticos. Se observó un incremento en el biomarcador CC16, así como la respuesta inflamatoria determinada por $TNF-\alpha$, en todos los grupos experimentales. En paralelo la

respuesta anti-inflamatoria mediada por IL-10 disminuyó en todos los grupos. Los niveles de IL-4 incrementaron en todos los grupos, con excepción del grupo asmático+PM_{2.5}. Todos estos cambios fueron comparados con respecto al grupo control expuesto a aire filtrado. Finalmente, INF- γ presentó un aumento significativo en todos los animales asmáticos con respecto a su propio control. Por otra parte, se realizó un análisis de proporción para IL-4 e INF- γ , en donde los animales asmáticos mostraron una respuesta inmune tipo Th2 en comparación con sus controles. Nuestros resultados sugieren que la exposición a ozono y PM_{2.5} induce una respuesta alérgica mediada por linfocitos Th2, con hiperreactividad en las vías aéreas para los animales sensibilizados. Es necesario evaluar los cambios de la respuesta respiratoria en la temporada seca-caliente de estos dos contaminantes en el futuro.

Introducción

1. Asma

El asma se ha reconocido como una condición patológica por más de 200 años (Koenig, 2000), sin embargo, existen diferencias de concordancia para definirla. En 2016 la Iniciativa Global para el Asma (GINA) definió el asma como:

“una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por la inflamación crónica de las vías respiratorias. Con síntomas como: sibilancia, respiración entrecortada, opresión en el pecho y tos, la cual varía en tiempo e intensidad, además de la variable de limitación de flujo aéreo.”

La principal característica que interviene en el desarrollo de esta enfermedad es la inflamación crónica de las vías respiratorias, lo que deriva en una obstrucción de los bronquios. Esta particularidad está asociada en parte, a la hiperreactividad bronquial, es decir, a la respuesta contráctil excesiva del musculo liso de los bronquios, la cual puede estar ocasionada por diversos estímulos (Torres & de Mora, 2005).

En esta característica es donde radica la heterogeneidad de esta enfermedad, ya que existen distintos factores que desencadenan las crisis asmáticas. Entre ellos, podemos encontrar a los factores ambientales y la susceptibilidad genética de los individuos. Este último punto ha sido uno de los problemas principales para el estudio, el diagnóstico y la terapéutica; ya que la combinación de factores ambientales y genéticos propician el desarrollo de diferentes fenotipos y formas de asma (Tabla 1) (GINA, 2016).

Tabla 1. Fenotipos de asma más comunes.

Fenotipo de Asma	Características
Asma alérgica (Extrínseca)	Causada por algún alérgeno, el perfil celular de estos pacientes revela inflamación de las vías respiratorias por eosinofilia.
Asma no alérgica (Intrínseca)	No está asociada con ningún alérgeno. El perfil celular de estos pacientes es: neutrofilia, eosinofilia o poca cantidad de células inflamatorias.
Asma tardía	Presencia de asma en la adultez, particularmente en las mujeres no asociada al asma alérgica. En este cuadro se presenta resistencia a los corticosteroides.
Asma con limitación de flujo aéreo	Se presenta en pacientes con un largo proceso asmático, desarrollando una limitación de flujo aéreo fija. Esto puede deberse a la remodelación de las paredes del sistema respiratorio.
Asma con obesidad	Proceso asmático asociado con la obesidad, en el cual predominan los eosinófilos.

El asma alérgica es uno de los fenotipos asmáticos más estudiado, ya que los alérgenos pueden generar un patrón de respuesta inmunológica particular, especialmente en el inicio de esta enfermedad; además es el tipo de asma que se presenta con mayor frecuencia alrededor del mundo principalmente en los países industrializados (Torres & de Mora, 2005).

1.1 Epidemiología del Asma

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 300 millones de personas en el mundo padecen asma. Adicionalmente se estima que para el 2025 se incrementará este número en 100 millones de pacientes en zonas urbanas (Barnes et al., 2009). En México el asma es una de las 10 primeras causas de urgencias médicas y de consulta externa de los servicios de salud (Solis, 2010), lo cual repercute considerablemente en la economía y en la calidad de vida del paciente.

Se calcula que a nivel global el asma tiene una prevalencia que oscila entre el 1% y el 18% (GINA, 2016). Además, a partir de 1991, comenzaron a estudiarse los casos de asma en niños a través del Estudio Internacional Sobre Asma y Alergias en la Niñez (ISAAC, por sus siglas en inglés), demostrando que existía una gran variabilidad en la prevalencia del asma en México, la cual oscila entre 0.2% al 8.6% en adultos jóvenes (Vargas, 2009), sin embargo, en el asma infantil la prevalencia es de 4.7% (del Río-Navarro et al., 2008). El aumento en la prevalencia de enfermedades respiratorias y alérgicas como el asma, contribuye a la morbilidad y a la mortalidad de los pacientes, así como al aumento de costos en medicamentos, hospitalizaciones, uso de la atención en salud, ausentismo escolar y laboral (Solis, 2010).

1.2 Fisiopatología del Asma

Sistema Respiratorio

El sistema respiratorio se encuentra en íntimo contacto con el medio externo, se estima que diariamente inhalamos de 10000 a 15000 litros de aire, exponiendo a las vías respiratorias a toda clase de sustancias químicas y biológicas (Sierra-Vargas, 2009).

Este sistema cumple tres funciones trascendentales: conducción del aire, filtración del aire e intercambio de gases (respiración) (Ross & Pawlina, 2007). Las vías aéreas del aparato respiratorio están divididas en una porción conductora y una porción respiratoria.

La porción conductora se distingue por la cavidad nasal, la boca, la rinofaringe, la orofaringe, la laringe y la tráquea. A partir de la tráquea, el sistema respiratorio se divide en dos porciones que se ramifican formando los bronquios (principales, secundarios y terciarios), bronquiolos y bronquiolos terminales, que progresivamente disminuyen su diámetro y longitud (Figura 1) (Ross & Pawlina, 2007).

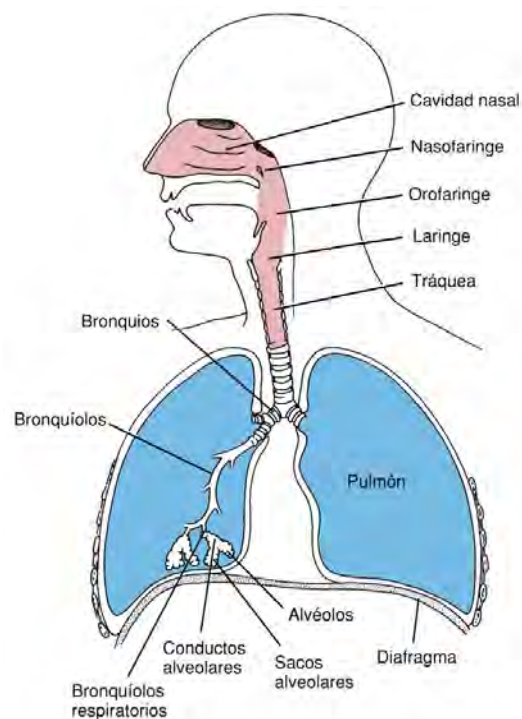


Figura 1. Diagrama de las vías respiratorias (Ross & Pawlina, 2007).

En la parte distal de los bronquiolos terminales se encuentran los bronquios respiratorios formados por los conductos alveolares, sacos alveolares y los

alveolos, encomendados de la unidad pulmonar encargada del intercambio gaseoso (Gartner & Hiatt, 2007).

El asma alérgica presenta algunas características importantes, que persisten en los bronquios o bronquiolos, tales como la inflamación de tipo crónica, hiperreactividad bronquial, hipersecreción de moco y la remodelación de las vías aéreas (Kotses, 2010; López et al., 2009). Una de las características más importantes es la hiperreactividad bronquial, la cual se define como la capacidad de reaccionar exageradamente ante un estímulo. La hiperreactividad bronquial puede asociarse a la predisposición genética denominada atopia, en la cual los individuos producen una mayor cantidad de inmunoglobulinas específicas, así como a factores ambientales, es decir la presencia de cualquier antígeno (Murdoch & Lloyd, 2010).

Dentro de los mecanismos de la enfermedad se observan dos tipos de respuesta: la respuesta temprana y la respuesta tardía. La respuesta temprana comienza de 10 a 15 minutos después de la exposición al antígeno, donde se inicia el estrechamiento de las vías respiratorias, con una mejoría a los 60 minutos aproximadamente (Lingappa & Ganong, 2000).

La fase inicial en el desarrollo del asma (sensibilización), consiste en el ingreso de un antígeno al sistema respiratorio. Una vez dentro, es reconocido por las células presentadoras del antígeno (CPA), que se encuentran en el tracto respiratorio. Estas células lo procesan y lo presentan a los linfocitos T mediante las moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase II (Holgate et al., 2012). Posteriormente los linfocitos T lo reconocen y se diferenciarán a linfocitos T cooperadores 2 (Th2) y comenzarán a secretar su patrón característico de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) (Tabla 2) (Chung, 2001; Holgate et al., 2012; Lingappa & Ganong, 2000; Oettgen & Broide, 2011). Esta respuesta Th2 inhibe la respuesta Th1, es decir, mientras la respuesta Th2 se active productos como IL-4 inhibirán a INF- γ disminuyendo la respuesta tipo Th1, por lo tanto, cuando se incrementa

INF- γ disminuirá IL-4 activando la respuesta Th1, además, recientemente se ha encontrado que la respuesta Th17 tiene una participación en el desarrollo de asma en animales (Yang et al., 2010).

La principal interleucina de la respuesta tipo Th2 es IL-4, la cual, inducirá un cambio de isotipo de células B a células plasmáticas secretoras de IgE específica. Esta inmunoglobulina interacciona con los receptores de las células cebadas ($Fc\epsilon$) y con los basófilos que están presentes por la influencia de las citocinas Th2 (Figura 1) (Holgate et al., 2012; Neote et al., 2007; Oettgen & Broide, 2011).

Posterior a la sensibilización, se presenta una fase de respuesta, la cual ocurre cuando el individuo es expuesto al alérgeno por segunda vez, el cual se acopla rápidamente a las IgE específicas, las cuales están unidas a los mastocitos. El resultado de esta unión es la degranulación de células cebadas y la liberación de potentes bronco-constrictores como histamina, leucotrienos y tromboxanos (Lingappa & Ganong, 2000).

Después de la exposición (4-8 h) al antígeno, aparece la respuesta tardía, que comienza con la liberación de mediadores como las prostaglandinas, leucotrienos y las citocinas Th2, mismas que sirven como quimiotácticos de eosinófilos (Figura 2) y otros linfocitos Th como los Th17 (Holgate et al., 2012; Lingappa & Ganong, 2000; Oettgen & Broide, 2011). Estos producirán otros mediadores que se les sumarán, tales como TNF- α , IL-4; IL-13 (Tabla 2) y quimiocinas que a su vez también son producidas por células epiteliales (Chung, 2001; Holgate et al., 2012; Neote et al., 2007). Todos estos mediadores son responsables de activar y mantener la sintomatología del asma, además de activar la hipersecreción de moco y edema pulmonar (Lingappa & Ganong, 2000).

Tabla 2. Principales citocinas relacionadas en el proceso inflamatorio.

Citocina	Procedencia	Acción
IL-2	Principalmente linfocitos T y NK.	Promueve la proliferación de linfocitos T.
IL-3	Linfocitos T, Mastocitos y Eosinófilos.	Estimula el desarrollo de mastocitos y basófilos. Promueve la supervivencia de eosinófilos.
IL-4	Linfocitos Th ₂ , NK T, Basófilos, Mastocitos y Eosinófilos.	Promueve la diferenciación de linfocitos T a Th2. Estimula linfocitos B para que realicen cambio isotipo a IgE. Regula la expresión de VCAM-1 en células endoteliales.
IL-5	Linfocitos T, Mastocitos y Eosinófilos.	Activación y diferenciación de eosinófilos.
IL-6	Predominantemente Monocitos y macrófagos; algunas veces Eosinófilos, Mastocitos y Fibroblastos.	Promueve la diferenciación de linfocitos T a Th17; así como linfocitos B a células plasmáticas.
IL-9	Linfocitos T y T9.	Aumenta el crecimiento de mastocitos. Incrementa la producción de moco.
IL-10	Linfocitos T, Linfocitos B, Macrófagos y Monocitos.	Inhibe la proliferación de linfocitos T. Regula la producción de citocinas proinflamatorias por medio de

		linfocitos Th1 y Th2.
IL-13	Predominantemente Linfocitos Th ₂ , Mastocitos, Basófilos y Eosinófilos.	Promueve el cambio de isotipo a IgG. Incrementa la hiperreactividad bronquial.
IL-17	Linfocitos Th ₁₇ , Neutrófilos y Basófilos.	Induce el reclutamiento y activación de neutrófilos.
TNF-α	Mastocitos, Macrófagos, Monocitos y Células epiteliales.	Regula la expresión de moléculas de adhesión endotelial. Quimioattractor para neutrófilos y monocitos.
INF-γ	Linfocitos T y NK.	Supresión de linfocitos Th ₂ . Inhibición del cambio de linfocitos B a isotipo IgE. Incrementa la expresión ICAM-1 en el endotelio, así como células epiteliales.

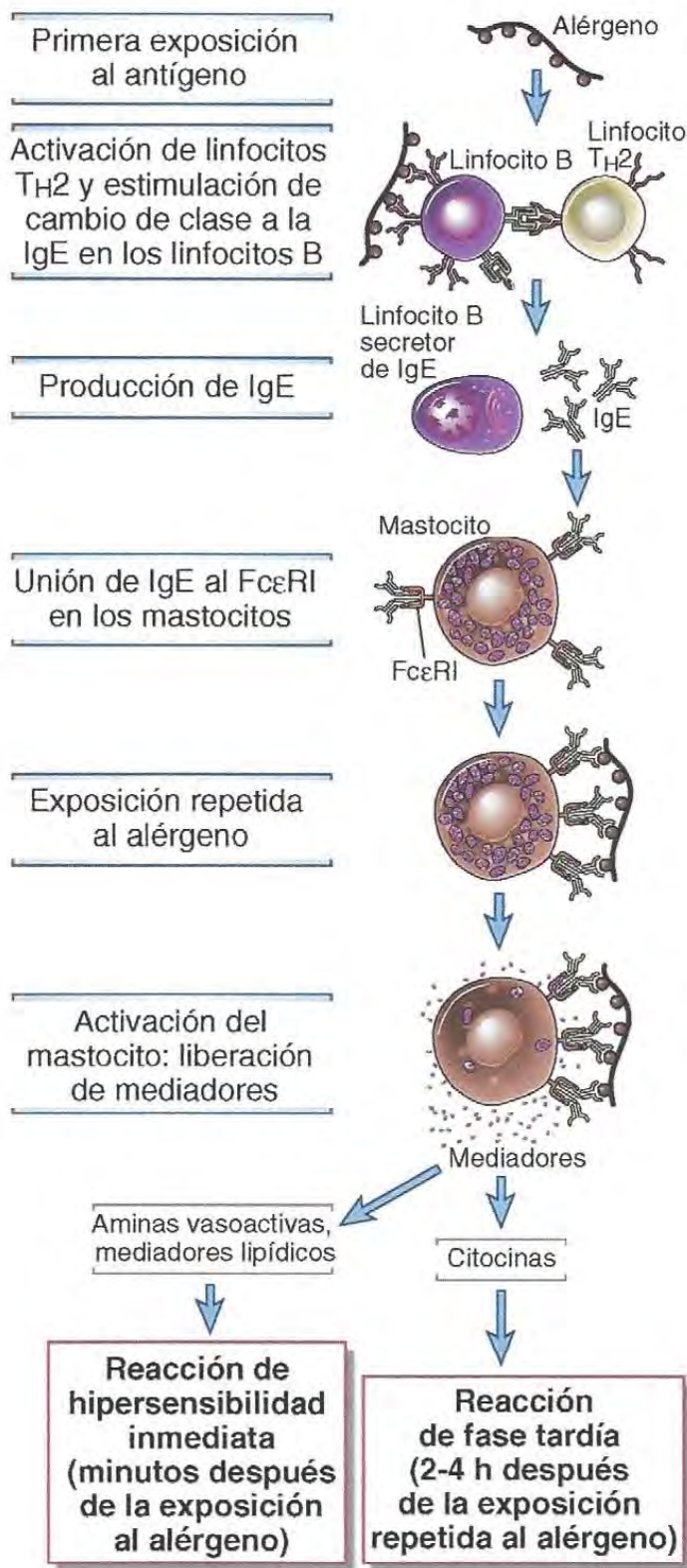


Figura 2. Respuesta inmune inducida por un antígeno (Abbas, 2002).

1.3 Mecanismos de defensa Pulmonar

Dentro de los mecanismos de defensa pulmonar se encuentra el epitelio, el cual cumple una función de protección y secreción. Las células secretoras producen sustancias protectoras que atrapan o contrarrestan los efectos de los agentes inhalados; adicionalmente, estas células tienen la capacidad de reparación y regeneración, lo que mantiene funcionando la arquitectura del sistema respiratorio, aún en afecciones severas. Aunado a esto, las células son capaces de expresar citocinas, como se mencionó anteriormente, mismas que regulan la actividad del sistema inmune encargado de combatir patógenos (BéruBé et al., 2010).

Otro componente importante es el sistema mucociliar, y su función principal es atrapar partículas foráneas, patógenos, disolver gases nocivos, humidificar el tracto respiratorio y facilitar la limpieza del pulmón mediante células ciliadas que remueven los agentes dañinos hacia el exterior (Thornon et al., 2008). El moco es sintetizado por las glándulas de la submucosa y las células caliciformes de los bronquios (Ross & Pawlina, 2007), sin embargo, en el asma puede incrementarse el número de células caliciformes en esta región, presentando hiperplasia mucoide. Por otro lado, en el epitelio bronquiolar se encuentran las células de Club las cuales se diferencian en células mucoproducidas presentando metaplasia mucoide (Kim et al., 2002).

Todos estos constituyentes (células del sistema inmune, epitelio y tejido conectivo) trabajan en colaboración para mantener la integridad epitelial y la integridad del organismo contra hospederos potenciales y sustancias agresivas del ambiente (Murphy et al., 2008). La eficiencia de este sistema reside en la alta especificidad para discriminar “lo propio” y “lo no propio” del organismo (Marshall et al., 2008).

Para que la respuesta inmune se realice de manera adecuada en el pulmón, es necesaria la intervención de moléculas de señalización como las citocinas. Estas

moléculas están implicadas en la respuesta inflamatoria y no se expresan constitutivamente en el pulmón, sino que responden a estímulos exógenos (O'Shea & Lipsky, 2002), como por ejemplo los contaminantes del ambiente. Además, el pulmón produce una proteína (CC16) que modula la respuesta inmune ante la exposición de elementos irritantes.

CC16 en Inflamación Alérgica

Existe una diversidad celular que refleja una variedad de proteínas, estas proteínas se han convertido en biomarcadores específicos en el pulmón. Tal es el caso de CC16, la cual es una proteína homodimérica con un peso de 15.8-KDa. Es secretada en grandes cantidades, en las vías aéreas por células Club no ciliadas del epitelio bronquiolar (Broeckert & Bernard, 2000). Esta proteína juega un papel importante como protector en contra del estrés oxidante y la respuesta inflamatoria en el pulmón, en los últimos años se ha utilizado como un biomarcador de daño y de exposición pulmonar (Bolton, 2008) ya que sus niveles plasmáticos evidencian el daño en el epitelio pulmonar (García et al., 2013).

2. Contaminación Ambiental

La contaminación es un problema grave en todo el mundo, ya que altera el equilibrio de los ecosistemas, por la presencia de algún agente físico, químico, biológico o la combinación de algunos de ellos. Los contaminantes pueden ser de origen natural, cuyas fuentes son los incendios forestales, las erupciones volcánicas, impactos de meteoritos y/o evapo-transpiraciones marinas o edáficas. Por otro lado se presentan las fuentes antropogénicas siendo las más importantes la industria, fuentes móviles y urbanizaciones, entre otros (Koenig, 2000). Este fenómeno puede originarse exclusiva o simultáneamente en el suelo, agua o aire; siendo este último el más importante debido al alto impacto sobre la salud, ya que lo respiramos diariamente.

2.1 Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica es una mezcla de gases, partículas o agentes biológicos que modifican la composición normal del aire al agregarse en determinadas cantidades, y puede ser perjudicial para la salud (Falcón-Rodríguez, 2012). Adicionalmente, afecta estructuras y materiales, y puede ocasionar cambios en las condiciones meteorológicas o climáticas (Vallejo et al., 2003). La composición de la contaminación ha cambiado a través del tiempo debido a su fuente de emisiones y a las condiciones climáticas de cada ciudad.

Los contaminantes atmosféricos se clasifican por su origen en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios son aquellos que, una vez liberados a la atmósfera mantienen sus propiedades tal cual fueron emitidos, estos incluyen: el monóxido de carbono (CO) y el bióxido de azufre (SO₂). Los contaminantes secundarios se forman en la atmósfera y son producto de las reacciones químicas o fotoquímicas en las que intervienen los contaminantes primarios, tal como los óxidos para dar origen al ozono (O₃) y los sulfatos (Baird & Cann, 2008). En la Ciudad de México, los residentes están expuestos crónicamente a altos índices de contaminación atmosférica.

2.2 Contaminación en la Ciudad de México

La Ciudad de México se ubica en una cuenca, con una superficie de 7854 Km², una altitud de 2240 metros sobre el nivel del mar (msnm), se encuentra rodeada por la Sierra de Guadalupe al norte, al oeste por la Sierra de las Cruces, al sur por la Sierra del Ajusco y al oriente por la Sierra Nevada que incluye a los volcanes Iztaccíhuatl y Popocatépetl. Presenta una temperatura promedio que oscila entre los 24.6°C y 11.6°C y precipitaciones anuales de 697.8mm; donde se han clasificado tres temporadas climáticas (Tabla 3) (CONAGUA, 2015).

Particularmente con la altitud en relación con el nivel del mar, la concentración de oxígeno está disminuida, lo que reduce la eficiencia de los motores de combustión interna, mismos que aumentan la concentración de monóxidos de carbono y de hidrocarburos en esta Ciudad (Vallejo et al., 2003).

Tabla 3. Temporadas climáticas en la Ciudad de México.

Temporada Climática	Descripción
Seca-Fría	Comprende los meses de noviembre a febrero; se caracteriza por la escasa precipitación y bajas temperaturas, lo que provoca inversiones térmicas.
Seca-Caliente	Comprende los meses de marzo a mayo; en esta temporada el aumento en la temperatura y la radiación favorecen la formación de contaminantes como el ozono.
Lluvias	Comprende los meses de junio a octubre; en esta temporada disminuyen los niveles de contaminantes, ya que la humedad del aire favorece la reacción en fase acuosa de algunos contaminantes gaseosos y en el suelo se inhiben los procesos de liberación y/o suspensión de partículas

La Ciudad de México cuenta con una población de 8.918 millones de habitantes (INEGI, 2015) y con una flota vehicular de 5.5 millones de vehículos, los cuales contribuyen con el 46% de las emisiones contaminantes (precursores de ozono y partículas) (SEDEMA-DF, 2014).

Dentro de los contaminantes atmosféricos de la Ciudad de México, podemos encontrar a los contaminantes criterio, tales como: dióxido de azufre (SO₂), óxidos de nitrógeno (NO_x), dióxido de nitrógeno (NO₂), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles (COV), hidrocarburos (HC), plomo (Pb), ozono (O₃) y partículas suspendidas (SEDEMA, 2015).

Dichos contaminantes alteran la composición de la atmósfera, provocando como consecuencia cambios en el clima y ocasionando enfermedades a la población. Varios estudios han correlacionado la exposición de estos contaminantes con la morbilidad debido a enfermedades cardiovasculares, enfermedades respiratorias crónicas y agudas, así como exacerbaciones de asma (Kafoury & Kelley, 2005).

El estudio más importante en México realizado por el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), relacionó la muerte de 38 mil personas con diversos padecimientos como cáncer de pulmón, enfermedades cardiopulmonares e infecciones respiratorias con la exposición a la contaminación atmosférica, entre los años 2001 y 2005 (INECC, 2009). En 2010 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que en México fallecieron 14 mil 700 personas por las mismas causas. Actualmente de acuerdo al Instituto Mexicano para la Competitividad (IMCO) el número de muertes se estimó en 1723 al año debido a la contaminación (IMCO, 2010). Siendo el ozono y material particulado PM_{2.5} los contaminantes más estudiados, ya que persisten en el ambiente durante casi todo el año.

3. Ozono (O₃)

El ozono (O₃) es un gas altamente reactivo compuesto por tres átomos de oxígeno. Es un contaminante secundario formado en la atmósfera por un complejo sistema de reacciones fotoquímicas, el cual consta de la oxidación de contaminantes primarios o precursores, como los compuestos volátiles orgánicos

(COV), especialmente el benceno (C_6H_6), el tolueno ($C_6H_5CH_3$), el monóxido de carbono (CO), y los óxidos de nitrógeno (NOx); los cuales son disociados por la luz solar (Brunekreef & Holgate, 2002). Sin embargo, para producir niveles elevados de O_3 en la atmosfera deben de existir condiciones meteorológicas particulares, es decir temperatura mayor a $27^\circ C$, cantidades elevadas de radiación UV y ausencia de viento (Segura & Arriaga, 2003). Estas condiciones están presentes en la Ciudad de México principalmente durante la época seca-caliente junto con los precursores del O_3 en la troposférico.

La Norma Oficial Mexicana de Salud Ambiental (NOM-020-SSA1-2014) establece límites permisibles de exposición para el ozono en 0.095 ppm por hora de exposición una vez al año para la protección de la salud en la población. Sin embargo, no es el único contaminante al que estamos expuestos.

4. Material Particulado

El material particulado (PM) es una compleja mezcla de sólidos o líquidos en suspensión, que se clasifican de acuerdo a su origen (Tabla 4). Mismo que puede ser de origen natural (como incendios forestales, erupciones volcánicas o erosiones), u origen antropogénico (industrial, estufas de leña y fuentes móviles que utilicen combustible como diésel y gasolinas). Éstas partículas están compuestas por un núcleo de carbón y por medio de reacciones químicas y/o fotoquímicas se agregan otros tipos de partículas, como: hidrocarburos aromáticos, metales, no metales, metaloides, elementos de transición interna; así como elementos biológicos entre los que destacan bacterias, hongos, algas, polen y virus (Falcón-Rodríguez et al., 2016).

Tabla 4. Tipos de partículas que se encuentran en la atmósfera de acuerdo a sus componentes.

Descripción	Componentes
ROFA (Partículas de residuos de combustibles)	Mezcla de sulfatos, compuestos nitrogenados, carbón y metales.
UAP (Partículas del Valle de Utah)	Altos niveles de metales en transición.
DEP (Partículas de escape de diésel)	Metales en transición así como hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Otra característica importante de las partículas, además de su composición es su tamaño, que varía desde unos cuantos nm hasta cientos de μm , los cuales de acuerdo a su tamaño se alojarán en las distintas porciones del tracto respiratorio, produciendo diferente daño, por ejemplo, las partículas finas ($\text{PM}_{2.5}$) al traspasar bronquios y alveolos, provocan enfermedades respiratorias (Tabla 5) (Falcon-Rodriguez et. al., 2016).

Tabla 5. Clasificación del material particulado según su tamaño.

Descripción	Tamaño de la partícula	Lugar donde se puede depositar
Gruesa	$\text{PM}<10\mu\text{m}$	Vías aéreas superiores
Fina	$\text{PM}<2.5\mu\text{m}$	Bronquios y alveolos
Ultrafina	$\text{PM}<1\mu\text{m}$	Atraviesan el sistema circulatorio, hígado, bazo o cerebro

Cabe destacar que la toxicidad y la concentración de los componentes de las partículas colectadas en la Ciudad de México varían en función del lugar de recolección, lo que sugiere que los efectos celulares están relacionados con el contenido de metales o endotoxinas (Rosas-Pérez et.al., 2007). En un estudio realizado por Alfaro-Moreno y colaboradores demostraron que la zona norte, al ser el principal centro de industria de la Ciudad de México, contiene los niveles más

elevados de metales y azufre; mientras que la zona sur se caracterizó por presentar un mayor nivel de material orgánico (Alfaro-Moreno et al., 2002). La Norma Oficial Mexicana de Salud Ambiental (NOM-025-SSA1-2014) establece para $PM_{2.5}$ $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ por cada 24 horas de exposición.

Antecedentes

5. Efectos de la Contaminación Atmosférica en la Salud

El impacto de la contaminación atmosférica sobre la salud es un problema complejo, ya que la susceptibilidad a la exposición de contaminantes del aire varía de persona a persona y de acuerdo a las condiciones de salud del individuo (estado de nutrición, sistema inmunológico, enfermedades cardíacas, adicción al cigarro o asma) (Vallejo et al., 2003). La exposición del sistema respiratorio a contaminantes provoca de manera general alteraciones estructurales en el parénquima pulmonar, que repercute de manera significativa en la fisiología (a nivel sistémico, orgánico o celular) (Guyton, 1994). Además, el daño puede trascender a otros sistemas como: el circulatorio, el digestivo y el nervioso (Landis & Yu, 1999). Sin embargo, el aparato respiratorio al ser el órgano de exposición, se altera con mayor frecuencia.

5.2 Efectos del Ozono en la salud

El daño a la salud asociado con el ozono puede ser agudo (con exposición de 1 a 3 horas) o crónico (con exposición de más de 3 meses) (SEDEMA, 2015). El principal sitio de acción del ozono sobre el ser humano es la mucosa de las vías respiratorias donde causa inflamación y daño celular en el tejido pulmonar (Trasande & Thurston, 2005). Los principales síntomas que provoca son: tos, sibilancia, cefalea, náuseas, malestar general e irritación de la nariz y de la faringe

(Vallejo et al., 2003); además, incrementa la respuesta inmune ante alérgenos, en algunos individuos (Molfino et al., 1991).

Varios estudios han relacionado la exposición a ozono con un incremento en exacerbaciones asmáticas, infecciones respiratorias y reducción de la función pulmonar (Trasande & Thurston, 2005). Además, está asociada con la ausencia escolar y admisiones hospitalarias por enfermedades respiratorias, tanto en asmáticos como en no asmáticos (Trasande & Thurston, 2005).

5.3 Efectos de PM_{<2.5}µm en la salud

Las partículas depositadas en el pulmón interactúan con el epitelio pulmonar a través de sedimentación, impactación interna, difusión (movimientos Brownianos) y/o cargas eléctricas (Tabla 6) (Koenig, 2000); lo que genera daño local o en todo el aparato respiratorio, incrementando la permeabilidad celular o reduciendo la actividad mucociliar (Falcon-Rodriguez et al., 2016).

Las partículas (PM_{≤2.5}µm) entran fácilmente a las vías respiratorias y son internalizadas por los macrófagos alveolares, lo que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias (Schreiber et al., 2013), junto con la migración de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos al tejido alveolar (Sánchez, 2012). El proceso inflamatorio es capaz de generar Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y estrés oxidante dentro del pulmón (Falcón-Rodríguez et al., 2016). Además, las partículas son consideradas como elementos transportadores y adyuvantes (por el alto grado de contenido de elementos y/o compuestos químicos) de la inflamación en todo el tracto respiratorio superior e inferior, aumentando el riesgo de incrementar las sensibilizaciones y el desarrollo de asma alérgica (Sánchez, 2012).

Tabla 6. Procesos por el cual las partículas entran en el sistema respiratorio.

Sedimentación	Las Partículas son depositadas en el pulmón por tamaño y peso (fuerzas gravitacionales).
Impactación Interna	Mientras el aire fluye, cargado de partículas, éstas golpean las paredes de las vías aéreas o sus bifurcaciones.
Difusión (Movimiento Brownianos)	En el proceso de inhalación, el flujo del aire disminuye y la región pulmonar se estrecha, por lo tanto, las partículas penetran a través de las paredes de la vía aérea por difusión.
Cargas Eléctricas	Es un proceso poco común, suele ocurrir cuando las partículas tienen una carga eléctrica. El epitelio, al tener carga negativa atrae a las partículas con carga positiva.

Se ha demostrado que la exposición a corto plazo de PM_{2.5}, tanto en animales como en humanos, puede disminuir la función respiratoria, así como exacerbar las crisis asmáticas (Gerlofs-Nijland et al., 2005). Sin embargo, a largo plazo es un importante factor de riesgo en el caso de la mortalidad por cáncer pulmonar y enfermedades cardiopulmonares (Pope et al., 2002). Asimismo, varios estudios epidemiológicos han demostrado la asociación entre los ingresos hospitalarios por enfermedades respiratorias, tales como: el asma y las alergias por incremento de material particulado en la atmósfera (Bernal, 2009; Brunekreef & Holgate, 2002; Gerlofs-Nijland et al., 2005).

Actualmente existen muy pocos estudios que evalúen el efecto concomitante de la exposición simultánea a O₃ y PM_{2.5}, en el desarrollo temporal de la patogénesis

del asma alérgica en tiempo real. Por lo que en este estudio se evaluaron las modificaciones fisiológicas, inmunológicas y toxicológicas inducidas por la exposición concomitante a O_3 y $PM_{2.5}$ de la Ciudad de México en un modelo de asma alérgica utilizando cobayos sensibilizados a ovoalbúmina (OVA), con la finalidad de aportar evidencias científicas que permitan emitir recomendaciones que pudiesen modificar los criterios de la Norma oficial Mexicana de Calidad del Aire, tanto para O_3 como $PM_{2.5}$, que hasta hoy se basa en sus efectos individuales y no aditivos como suelen presentarse en la mezcla de contaminantes atmosféricos de nuestra Megalópolis.

Justificación

El asma es una enfermedad que afecta a más de 300 millones de personas en el mundo y se ha pronosticado que para el 2025 habrá 100 millones más de asmáticos en zonas urbanas. Se ha señalado a la contaminación como una probable causa del incremento de pacientes asmáticos, ya que en áreas urbanas se presenta un mayor número de casos, principalmente en ciudades, como la Ciudad de México, ya que, debido a sus características geológicas, físicas y de urbanización presentan uno de los índices de contaminación más elevados. Principalmente para ozono y material particulado, los cuales exceden diariamente su norma, lo que podría incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias, o empeorarlas en la población susceptible. Por lo tanto, es importante evaluar los cambios pulmonares producidos por la exposición a estos dos contaminantes ya que este tipo de estudios no se han realizado en México.

Hipótesis

La respuesta inflamatoria característica del asma se exacerbará en los animales sensibilizados expuestos a material particulado $PM < 2.5 \mu m$ y ozono, durante la época seca-fría.

Objetivo General

Evaluar la respuesta fisiológica, inmunológica y celular de la exposición concomitante a ozono y PM2.5, en un modelo de asma alérgica en cobayo, durante la temporada seca-fría del año (noviembre-febrero).

Objetivos Particulares

- Determinar el grado de hiperreactividad de las vías aéreas mediante curvas de histamina (dosis acumulativas), evaluando el índice de bronco-obstrucción (PenH) por medio de pletismografía barométrica.
- Evaluar las diferentes citocinas (IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, TNF- α , INF- γ) y el biomarcador de daño pulmonar (CC16) en lavados bronquioalveolares, mediante ensayos de ELISA.
- Evidenciar la respuesta inflamatoria de las vías aéreas, mediante el conteo diferencial celular en lavados bronquioalveolares.

Material y Método

Animales

Se utilizaron 40 cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa Durkin-Hartley, con un peso promedio de 350 a 400 g. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de humedad, temperatura y alimentación, en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), los animales se mantuvieron dentro de un ciclo de 12/12 horas de luz/oscuridad, con un 50 a 70% de humedad ambiental, manteniéndolos dentro de una cama de olote esterilizada y con aire filtrado. Se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan S.A. de C.V.) y agua esterilizada *ad libitum*. Posteriormente, los animales se trasladaron al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (Cinvestav) unidad Zacatenco; en donde se mantuvieron bajo las mismas condiciones de higiene y alimentación. Este proyecto fue aprobado por el Comité Ético y Científico del INER (B21-13) (Anexo1).

Sensibilización

Los animales fueron divididos en 8 grupos experimentales, cada grupo contenía una *n* de 5 animales. La tabla 7 muestra los diferentes grupos y el tratamiento específico seguido durante el experimento, en donde se puede observar que cada grupo sensibilizado presenta su contraparte, es decir, su propio grupo control. A cada grupo se le asignó un color. Los animales del grupo 3, 4, 6 y 8 fueron sensibilizados de la siguiente manera (Figura 3).

Día 1: los animales fueron inyectados vía intradérmica e intraperitoneal con una mezcla de 1mg/mL de Ovoalbúmina (OVA) y 1mg/mL de hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$ como adyuvante, disueltos en 1mL de Solución Salina (SS).

Día 8: se administró un refuerzo a través de la vía inhalada de 3 mg/mL de OVA durante 5 minutos con ayuda de un nebulizador (Yuehua, WH802, Corea).

Día 15: un segundo refuerzo fue administrado (vía inhalada) de 0.5 mg/mL de OVA durante 1min, nuevamente utilizando el nebulizador Yuehua WH802, Corea.

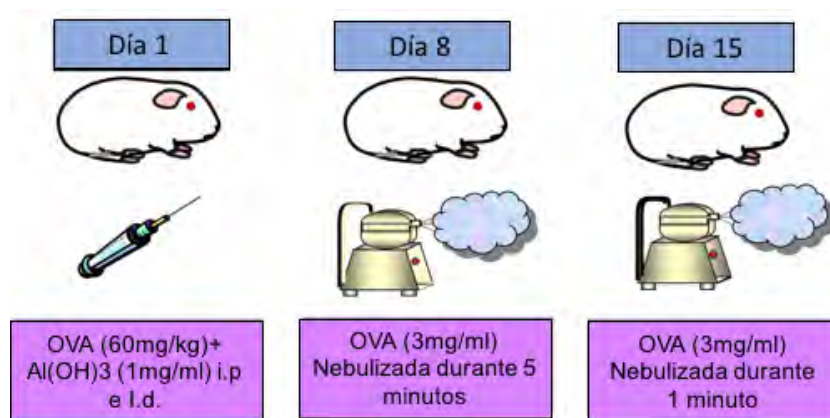


Figura 3. Diseño experimental de sensibilización en el modelo de asma alérgica en cobayo.

Exposición

Material Particulado

Los animales fueron expuestos a PM_{2.5}, por medio de un Sistema Concentrador de Partículas (SCP) durante periodos de 4 horas por día, tres días a la semana por tres semanas (Tabla 7). La exposición se llevó a cabo durante los meses de noviembre y diciembre de 2013 en el CINVESTAV unidad Zacatenco, ubicado en la zona industrial al norte de la Ciudad de México. Los grupos expuestos fueron: control+PM_{2.5} (grupo negro), asmático+PM_{2.5} (grupo azul), control+PM_{2.5}+O₃ (grupo verde) y asmático+PM_{2.5}+O₃ (grupo rojo) respectivamente, mientras que los grupos control+AF (grupo rosa) y asmático+AF (grupo morado) solo inhalaban aire filtrado.

Tabla 7. Grupos Experimentales.

Grupo	Color	Días								
		1	2	3	8	9	10	15	16	17
		Primer Semana			Segunda Semana			Tercer Semana		
Control + AF	1	AF	AF	AF	AF	AF	AF	AF	AF	AF
Asmático + AF	2	OVA + AIOH ₃ + FA	AF	AF	OVA + FA	AF	AF	OVA + FA	AF	AF
Control + PM	3	PM	PM	PM	PM	PM	PM	PM	PM	PM
Asmático +PM	4	OVA + AIOH ₃ + PM	PM	PM	OVA + PM	PM	PM	OVA + PM	PM	PM
Control + O ₃	5	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃	O ₃
Asmático + O ₃	6	OVA + AIOH ₃ + O ₃	O ₃	O ₃	OVA + O ₃	O ₃	O ₃	OVA + O ₃	O ₃	O ₃
Control + PM + O ₃	7	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃
Asmático + PM + O ₃	8	OVA + AIOH ₃ + PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	OVA + PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃	OVA + PM + O ₃	PM + O ₃	PM + O ₃

Inyección de OVA-AIOH₃
Primer Refuerzo Nebulización OVA 5 min.
Segundo Refuerzo Nebulización de OVA 30-60s

El sistema concentrador de partículas consta de una serie de unidades, en donde las partículas son tomadas directamente de la atmósfera y mediante una cadena de pasos, estas son concentradas. Las características del equipo permiten el uso para estudios de toxicología inhalatoria. En este sistema las partículas pasan a través de un baño maría, el cual se encuentra a 26-27°C y en donde son saturadas con vapor. Posteriormente, pasan a través de un condensador (Chiller), el cual mantiene bajas temperaturas (-6°C), lo que permite la concentración de las partículas de menor tamaño por transformación de gas a líquido. Con el fin de aumentar la concentración de partículas, estas pasan a través de un filtro impactador, el cual solo permite el paso de PM_{≤10}µm. En seguida, atraviesan desecadores que eliminan el exceso de agua en las partículas, manteniendo la humedad relativa dentro de ellas. Consecutivamente, atraviesan impactadores en

cascada, los cuales permiten el paso únicamente a $PM_{2.5\mu m}$ (Figura 4). Finalmente, las partículas son enviadas a las cámaras de exposición a las cuales se les controla la temperatura, la ventilación y la transpiración (Figura 5).

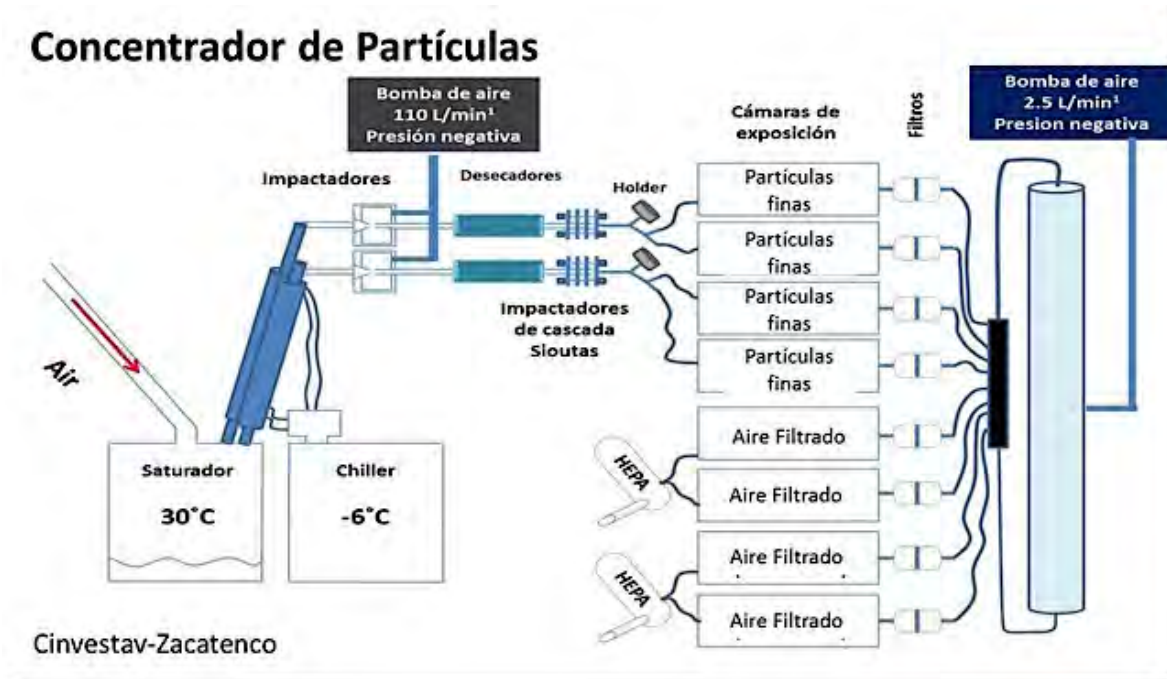


Figura 4. Esquema representativo del Concentrador de Partículas.



Figura 5. Sistema Concentrador de Partículas y cámaras de exposición para los cobayos.

Ozono

Adicionalmente, algunos grupos fueron expuestos a 0.11ppm de ozono durante periodos de una hora, tres días a la semana, durante 3 semanas (Tabla 7). Los grupos expuestos fueron: 5, 6, 7 y 8 respectivamente. Para este procedimiento se utilizó un generador de ozono de la marca Dasibi modelo 1008-PC (Figura 6).



Figura 6. Generador de ozono. Exposición de los animales a 0.11ppm.

Análisis de la composición del Material Particulado (PM_{<2.5}μm)

Las muestras del PM_{2.5} del aire ambiente fueron obtenidas utilizando muestreadores mini Vol (Air Metrics, Eugene, OR) ajustado a un flujo de 5L/min. Se utilizaron filtros de teflón de 37mm (PTFE 2 mm pore, Gelman Science, Ann Arbor, MI), los cuales fueron pesados y equilibrados en una balanza analítica antes y después de la colecta, para determinar la concentración de masas. Después se realizó el análisis de elementos inorgánicos siguiendo la técnica de Fluorescencia de Rayos X (XRF), establecida por Espinosa et al. (2012).

Además, se realizó el análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), utilizando como técnica analítica la cromatografía de masas de 4 polos con detección por espectrometría de masas (GC-qMS, modelo 6890 plus/5973N,

Agilent Technologies, CA, USA), siguiendo el procedimiento ya desarrollado por Amador-Muñoz et al. (2014) y Villalobos-Pietrini et al. (2006).

Finalmente, se realizó la determinación de algunos de los elementos aerobiológicos como las endotoxinas y el (1-3)- β -D-Glucano. Las muestras fueron resuspendidas en 50 mM de Tris-buffer (Lonza Walkersville, MD USA) y se sometieron a extracción usando sonicador (Branson 5800) durante 1 h a 22°C, con intervalos de agitación en un vortex de 1 min durante 15 min. Se realizaron diluciones 1:10 de cada suspensión preparada.

Para el análisis de endotoxinas, se utilizó el método cinético cromogénico de lisado de amebocitos (Pyrochrome; Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA), en donde el estándar de endotoxina fue derivado de *Escherichia coli* 0113:H10 (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA, Lot. 139). El análisis de 1-3)- β -D-Glucano, se realizó al igual que el de endotoxinas con el Kit cinético cromogénico de lisado de amebocitos (GlucateLL; Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA), en donde el estándar fue (1-3)- β -D-Glucan 200 pg/mL (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA, Lot. 1189027). Se registró la densidad óptica en ambos ensayos, a 405 nm de longitud de onda en el equipo Pyros Kinetix Flex (Associated of Cape Cod, Inc., East Falmouth, MA, USA), los datos se analizaron con ayuda del programa Pyros EQS v 1.2.

Pruebas de Función Pulmonar Pletismográficas

El día 21 se evaluaron los parámetros respiratorios funcionales de todos los animales utilizando un equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (BUXCO XA, BUXCO Inc. EUA). Se midió el Índice de broncoobstrucción PENH (Enhanced Pause por sus siglas en inglés) para determinar tanto la respuesta al reto antigénico (Broncoespasmo) como la hiperreactividad de la vía aérea (HVA) realizando curvas no acumulativas a histamina nebulizada en dosis de (0.013 a 0.13 mg/ml) calculándose la Dosis

provocativa 200 (DP_{200}) (dosis que duplica el índice de broncoobstrucción basal). El cociente DP_{200} post-reto/ DP_{200} pre-reto representa el grado de reactividad de las vías aéreas. Valores menores a 1 indican que la DP_{200} post-reto fue menor a la DP_{200} pre-reto, lo que representa un incremento en la reactividad de las vías aéreas o hiperreactividad. Valores mayores a 1 indican que la DP_{200} post-reto fue mayor a la DP_{200} pre-reto, lo que sugiere una disminución en la reactividad de las vías aéreas o hiporreactividad.

En esta técnica cada uno de los cobayos se introdujo en un pletismógrafo (Figura 7), en el cual el animal recibe un flujo continuo de aire (aproximadamente 10 ml/s) que no interfiere con las señales respiratorias. La presión dentro del pletismógrafo es medida por un transductor de presión diferencial (SCXL004DN SenSym, CA, EUA) conectado a un preamplificador, y continuamente analizado a través de un programa especial (Buxco Biosystem XA v1.1) en una computadora. En este sistema, el cambio en la presión de la cámara representa la diferencia entre la expansión/contracción del tórax y el volumen corriente (aire removido/añadido a la cámara durante la inspiración/espriación). En situaciones normales hay una estrecha correlación entre el movimiento de la caja torácica y el flujo nasal. Sin embargo, cuando existe obstrucción de las vías aéreas los movimientos torácicos pueden volverse más amplios, incluso aunque el volumen corriente permanezca sin cambios o disminuya. Los cambios de presión generados durante la inspiración y espriación son analizados por el programa, para obtener un índice de la RL llamado Penh, el cual se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$PenH = Te / RT - 1 * PEF / PIF$$

Donde:

Te= Tiempo total espiratorio

RT= Tiempo total de relajación

PEF= Pico de Flujo Espiratorio (presión positiva máxima, cmH₂O)

PIF= Pico de Flujo Inspiratorio (presión negativa máxima, cmH₂O)



Figura 7. Pletismógrafo Barométrico para evaluar la función pulmonar.

Debido a que este índice es calculado por el programa en cada una de las respiraciones, los valores utilizados en este estudio fueron los promedios de cada uno de los períodos estudiados. Se incluyeron solamente las respiraciones con volumen corriente mínimo de 1 ml, tiempo mínimo inspiratorio de 0.15 s, tiempo máximo inspiratorio de 3 s y diferencia máxima entre volúmenes inspiratorio y espiratorio de 10%. Se rechazaron aproximadamente entre el 7 y 10% de las respiraciones por cada intervalo de tiempo, mismas que ocurrieron principalmente durante los movimientos voluntarios del animal.

En un estudio se demostró que el Penh se correlaciona estrechamente con la medición de la presión intrapleural y de la RL en ratones (Hamelmann et al., 1997). En este sentido, cabe recordar que la RL refleja la resistencia de la vía aérea (Raw) y/o la resistencia del tejido parenquimatoso pulmonar (Rti). Por lo

tanto, en este estudio el Penh es considerado como un índice de la resistencia pulmonar total (iRL), como ha sido propuesto por otros autores (Allen et al., 1995; Chand et al., 1993).

Eutanasia y Lavados Broncoalveolares

El día 22 se realizó la eutanasia de todos los animales por sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/Kg). Una vez que los animales presentaron paro cardiorrespiratorio, se procedió a realizar los lavados broncoalveolares (LBA). El LBA es un procedimiento directo para la obtención de líquido alveolar, el cual ha demostrado ser un útil para proveer información sobre los mecanismos biológicos de inflamación (López et al., 2013).

Para la realización de esta técnica, se efectuó una pequeña incisión en el cuello exponiendo la tráquea, en donde se colocó una cánula de textura suave para permitir una recolección eficiente del LBA. Se instiló dos veces un volumen de SS estéril (5mL aproximadamente) a 37°C. La SS se mantuvo durante un minuto dentro de los pulmones y posteriormente se aspiró suavemente. El líquido recuperado se mantuvo a 4°C y luego se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para obtener la fracción celular.

Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA

El conteo celular se realizó a partir de los LBA obtenidos y centrifugados previamente. Por medio de este conteo se puede observar el aumento o disminución de células inflamatorias, tanto en grupos control como en grupos sensibilizados. El número total de células en el LBA se estableció tomando 10 μ L de la suspensión celular y colocando 40 μ L de Azul de Tripano al 0.4% como colorante vital.

La muestra se colocó en una cámara de Neubauer, para realizar el conteo directo de las células. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución (5) y por el factor de la cámara (10,000), obteniendo el número de células por mL de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener 1×10^6 células/mL adicionando SS y de esta solución se tomaron 50 μ L que fueron centrifugados utilizando una citocentrífuga (Cyto cent, Wescor Inc., Utah, USA) para obtener un botón celular el cual se tiñó con la técnica Giemsa.

La técnica de Giemsa para frotis (células en medio líquido), se realizó con el siguiente protocolo: las laminillas fueron fijadas con metanol (5-7min) y secadas al aire. Se diluyó el colorante de Giemsa 1:20 con agua desionizada y se tiñeron las laminillas durante 15-60 min, se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar nuevamente al aire. Todas las laminillas fueron montadas y evaluadas. Esta tinción se realiza con una mezcla de azul de metileno y eosina como colorantes principales, misma que tiñe los núcleos y gránulos de color púrpura en neutrófilos y basófilos, mientras que los gránulos de eosinófilos se tiñen en naranja-rosa. Se realizó el conteo utilizando un microscopio de campo claro (Zeiss Axio Scope A1) observándolo a 1000X.

Ensayos de ELISA

Para ampliar el entendimiento de los efectos de los contaminantes sobre organismos sensibilizados, se realizaron ensayos de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) sobre las citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias relacionadas con el asma y con la exposición de material particulado y ozono como: IL-4 (MBS), IL-6 (MBS), IL-17 (MBS), IL-10 (MBS), TNF- α (MBS), INF- γ (MBS). Adicionalmente, se evaluó el biomarcador de daño pulmonar: la proteína CC16.

Para estos ensayos se utilizaron kits específicos para cobayo de la marca MyBioSource Ink., San Diego, Cal., USA (Figura 8), los cuales tienen una alta sensibilidad y alta especificidad para cada citocina. Cada kit contiene un instructivo según la citocina a analizar. Los ensayos se realizaron siguiendo las indicaciones del proveedor.



Figura 8. Kit de ELISA de la marca MyBiosource.

Análisis estadístico

Los valores descriptivos de las variables fueron expresados como media \pm error estándar con grupos experimentales de $n=5$. Las comparaciones entre los grupos experimentales contra los controles se evaluaron mediante el análisis de varianza ANOVA de una y dos vías, seguidas por las pruebas de comparaciones múltiples

Dunnett y las comparaciones entre grupos se calcularon con pruebas *t* de *Student*. En todos los casos las significancias se establecieron con una $p \leq 0.05$. Adicionalmente, se realizaron análisis de proporciones Th1/Th2 usando los resultados de las citocinas de las ELISAs previamente mencionadas.

Todo el análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el programa GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software Ink., Cal., USA).

Resultados

Análisis Gravimétrico

Las concentraciones de PM2.5 se midieron a través de la diferencia de peso de los filtros de teflón obtenidos de la salida de las cámaras de exposición, antes y después de la exposición. Esto evidenció que los animales fueron expuestos a una concentración aproximada de $506 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante los 9 días del experimento (Figura 9).

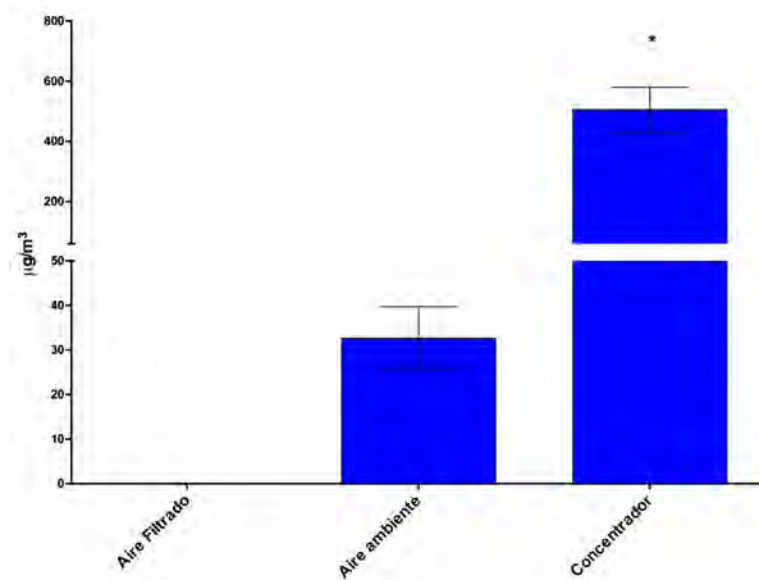


Figura 9. Análisis gravimétrico. La gráfica muestra la concentración total de las PM_{2.5} durante 3 semanas de la época seca-fría. Las barras representan el promedio \pm error estándar (*) $p < 0.05$, ANOVA.

Composición Química del Material Particulado (PM_{<2.5}µm)

Dentro del análisis elemental de los filtros de teflón, se encontró la presencia de 12 componentes de los 16 elementos inorgánicos analizados, con al menos 0.5 µg/m³. Estos elementos fueron los siguientes: aluminio (Al), silicio (Si), fósforo (P), azufre (S), cloro (Cl), potasio (K), calcio (Ca), talio (Ti), hierro (Fe), cobre (Cu) y cinc (Zn) (Figura 10). Por otro lado, el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos, evidenció que 14 elementos de los 18 elementos evaluados presentaron al menos 1 µg/m³, tales como: naftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, trifenileno+criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, indeno[123-cd]pireno y benzo[ghi]perileno (Figura 11).

Inorgánicos

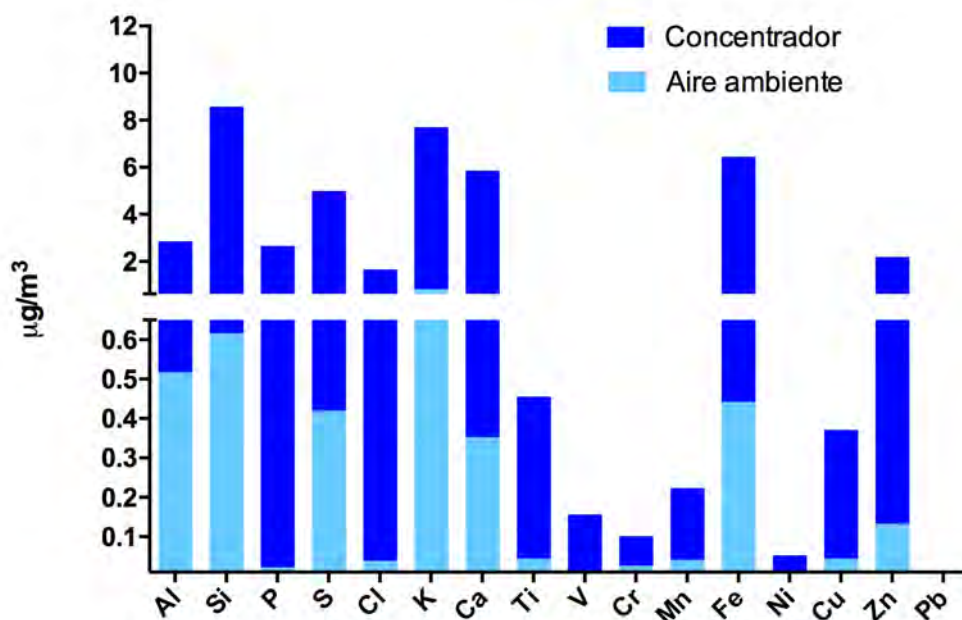


Figura 10. Análisis de elementos inorgánicos de las $\text{PM}_{2.5}$. La gráfica muestra las concentraciones de elementos inorgánicos en el medio ambiente (azul claro) y las alcanzadas con el SCP (azul oscuro). Las barras representan el promedio.

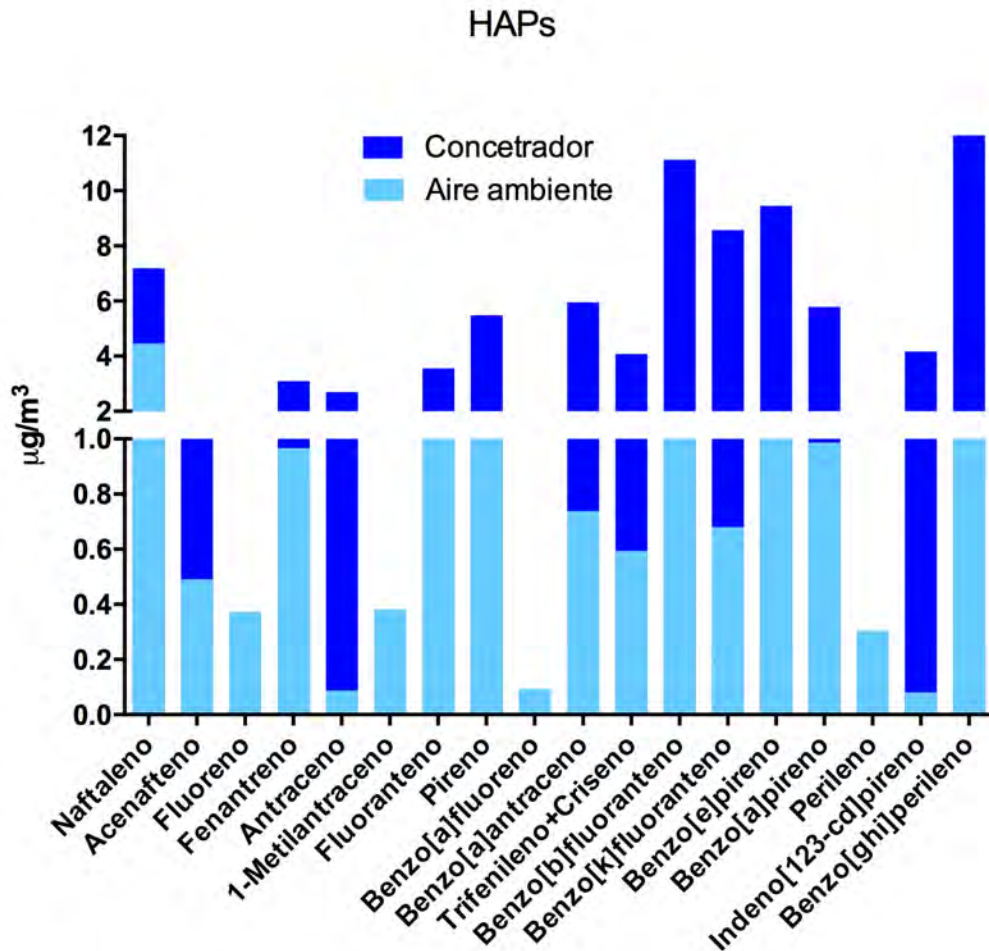


Figura 11. Análisis de los HAPs de las PM_{2.5}. La gráfica muestra los HAPs encontrados en las PM_{2.5}, en el medio ambiente (azul claro) y las alcanzadas con el SCP (azul oscuro). Las barras representan el promedio.

Además, se determinaron las concentraciones de endotoxinas y (1-3)-β-D-Glucano de las PM_{2.5} del aire ambiente después de la exposición de los animales. Las endotoxinas del PM_{2.5} concentrado, presentaron un incremento en comparación con las del aire ambiente (Figura 12). Por otro lado, el glucano también mostró un incremento, pero no fue significativo (Figura 13).

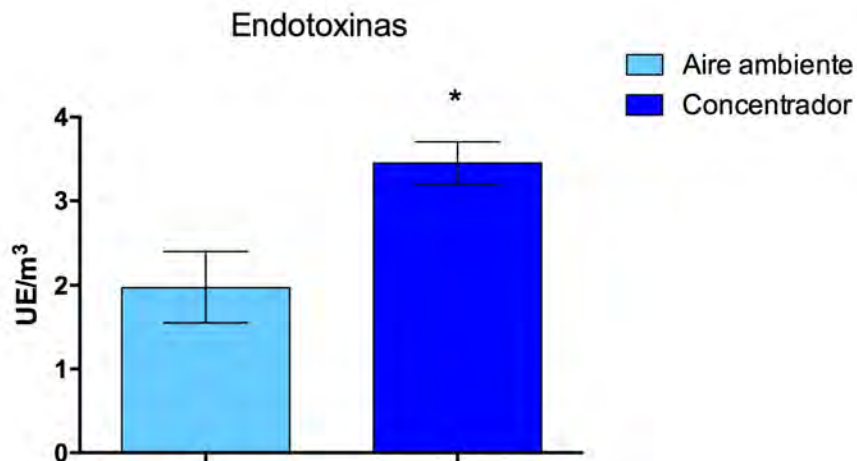


Figura 12. Determinación de endotoxinas. La gráfica muestra las concentraciones de endotoxinas en el medio ambiente (azul claro) y las alcanzadas con el SCP (azul oscuro). Las barras representan el promedio \pm error estándar (*) $p < 0.05$, ANOVA.

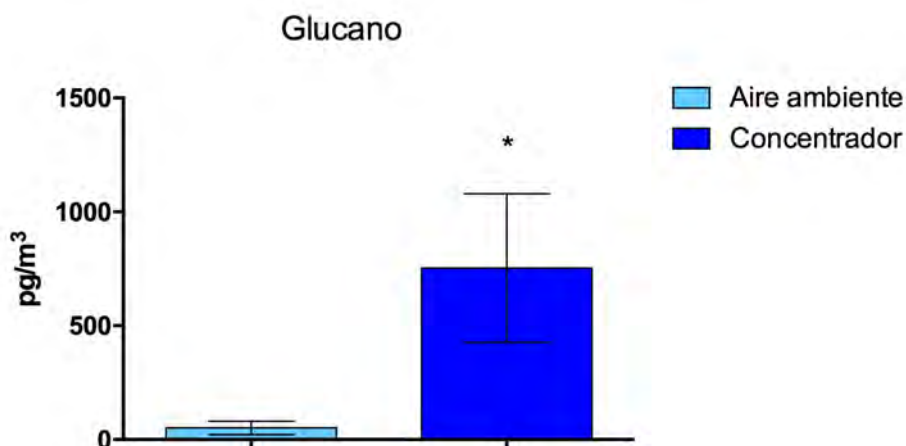


Figura 13. Determinación de (1-3)- β -D-Glucano del $PM_{2.5}$. La gráfica muestra las concentraciones de glucano en el medio ambiente (azul claro) y las alcanzadas con el SCP (azul oscuro). Las barras representan el promedio \pm error estándar (*) $p < 0.05$, ANOVA.

Reactividad de las vías aéreas

La DP_{200} de histamina fue similar antes y después del reto antigénico para los animales sanos expuestos a AF, $PM_{2.5}$ y/o O_3 ; mientras que todos los animales asmáticos expuestos a AF, $PM_{2.5}$ y/o O_3 exhibieron un grado de hiperreactividad

significativo, es decir requirieron dosis menores de histamina para alcanzar la DP_{200} . Por otro lado, el grupo de animales control+ $PM_{2.5}+O_3$ (grupo verde) presentaron una respuesta hiporreactora (Figura 12). Cabe destacar que tanto los animales asmáticos+ O_3 (grupo café) y los animales asmáticos+ $PM_{2.5}+O_3$ (grupo rojo) tuvieron una respuesta más rápida en comparación con los demás grupos animales.

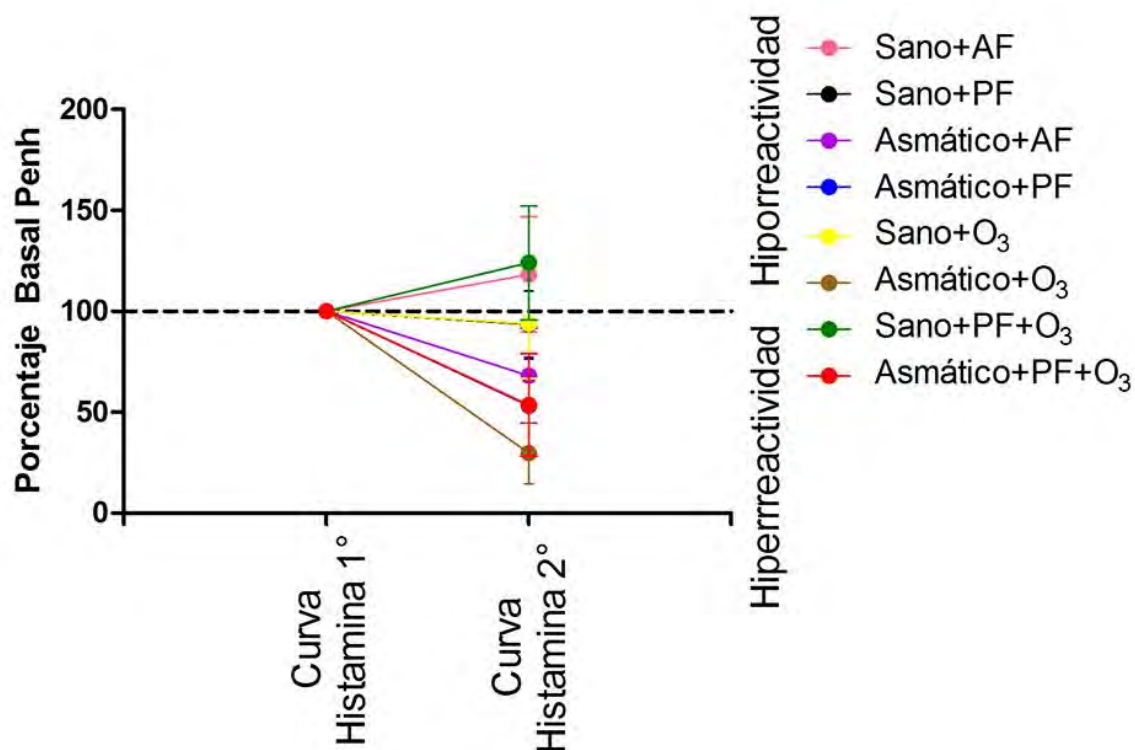


Figura 14. Reactividad de las vías aéreas a histamina en un modelo de asma alérgica en cobayo. La gráfica muestra el cociente de la dosis provocativa 200 (DP_{200}) de cobayos sensibilizados y no sensibilizados. La línea discontinua señala el límite entre hiporreactividad (valores mayores al 100%) e hiperreactividad (valores menores al 100%).

Conteo total y diferencial de células infiltradas en LBA

El número de células inflamatorias totales en LBA fue obtenido a través de la tinción con azul de tripano de células viables, y se expresó en millones de células por mililitro. Por otro lado, el conteo diferencial para la caracterización morfológica

de las células inflamatorias se realizó mediante la técnica de Giemsa, y se expresó en porcentaje de células por mililitro.

El número de células inflamatorias totales fue mayor en los animales asmáticos $PM_{2.5}+O_3$ (grupo rojo), con respecto al grupo de animales control no asmáticos+AF (grupo rosa) (Figura 13). Con respecto a los otros grupos no hubo diferencias significativas.

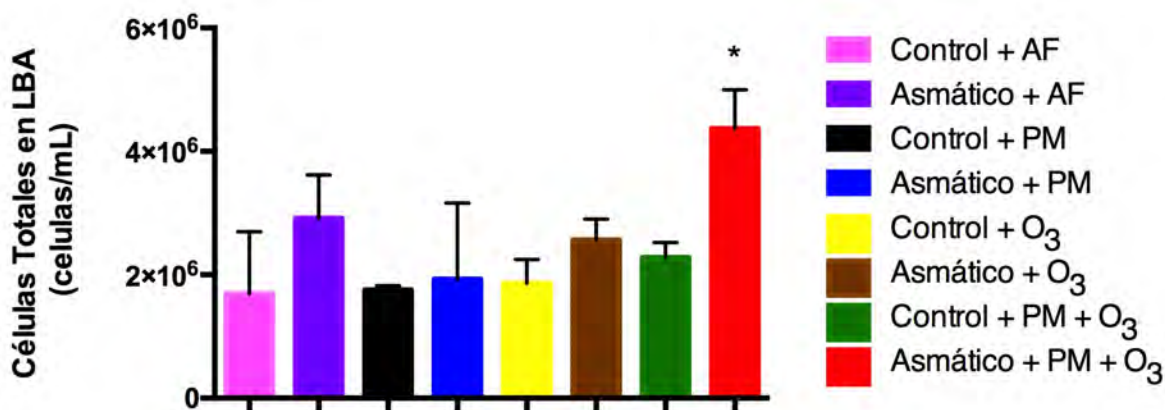


Figura 15. Conteo total en LBA de cobayos. La gráfica muestra las células infiltradas en los LBA de cobayos en todos los grupos, tomando como control el grupo rosa (control + AF). Las barras corresponden a la media \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo $p<0.05$ y $*p<0.01$, ANOVA con ajustes para Dunnett.

En el conteo diferencial, el porcentaje de eosinófilos en LBA mostró un aumento significativo en todos los animales sensibilizados (asmático+AF, asmático+ $PM_{2.5}$ y asmático+ $PM_{2.5}+O_3$), en comparación con el grupo de animales control+AF (rosa). En el caso de los neutrófilos únicamente los animales asmáticos+ O_3 (café) presentaron un incremento (Figura 14). También se encontró un incremento significativo en el número de macrófagos principalmente en los animales expuestos a $PM_{2.5}$. No se observaron diferencias representativas en los linfocitos y en los basófilos. En las figuras 15 y 16 se muestran las fotomicrografías representativas de las células de LBA de cada grupo.

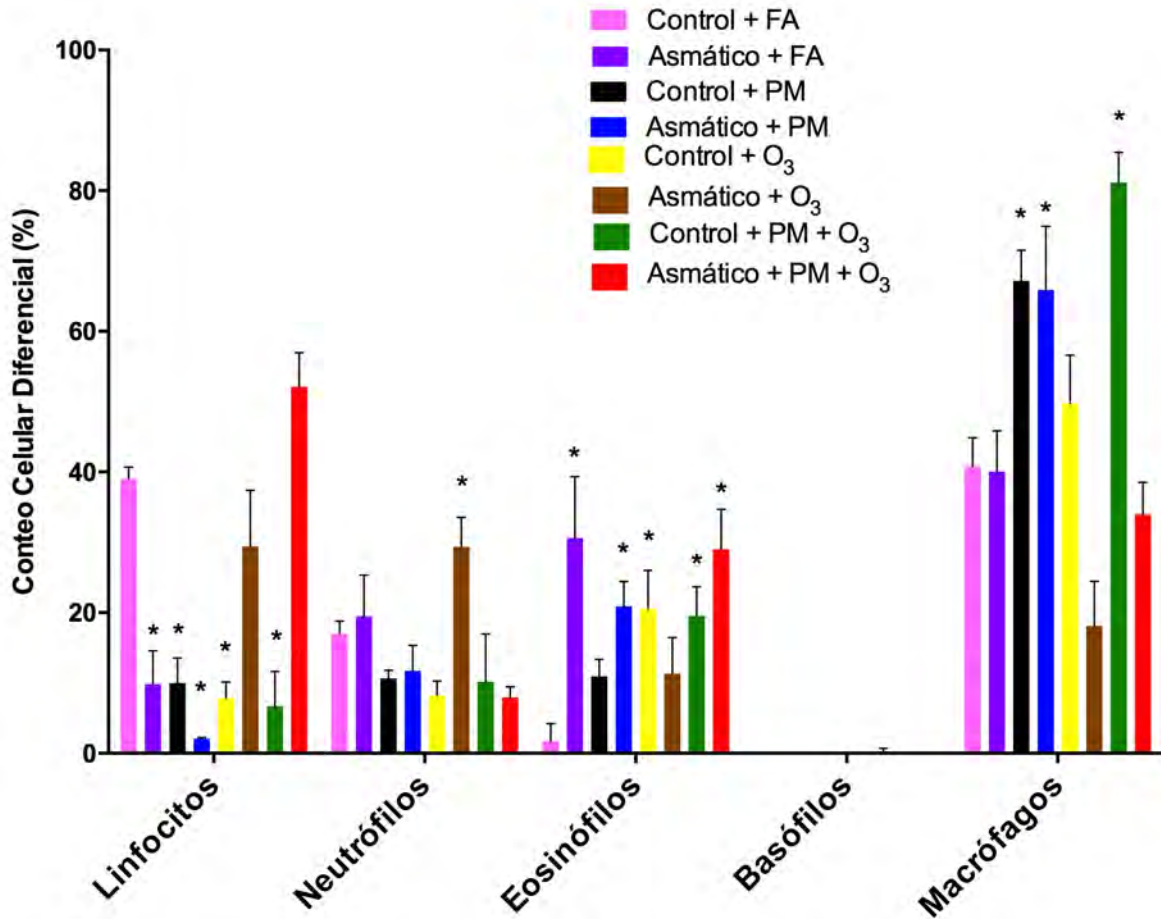


Figura 16. Conteo celular diferencial en LBA de cobayos. La gráfica muestra el porcentaje de cada tipo celular (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y macrófagos) para los 8 grupos expuestos a aire filtrado (AF), ozono (O₃) y/o material particulado (PM). Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo (*) $p < 0.05$ vs control+AF, ANOVA con ajustes para Dunnett.

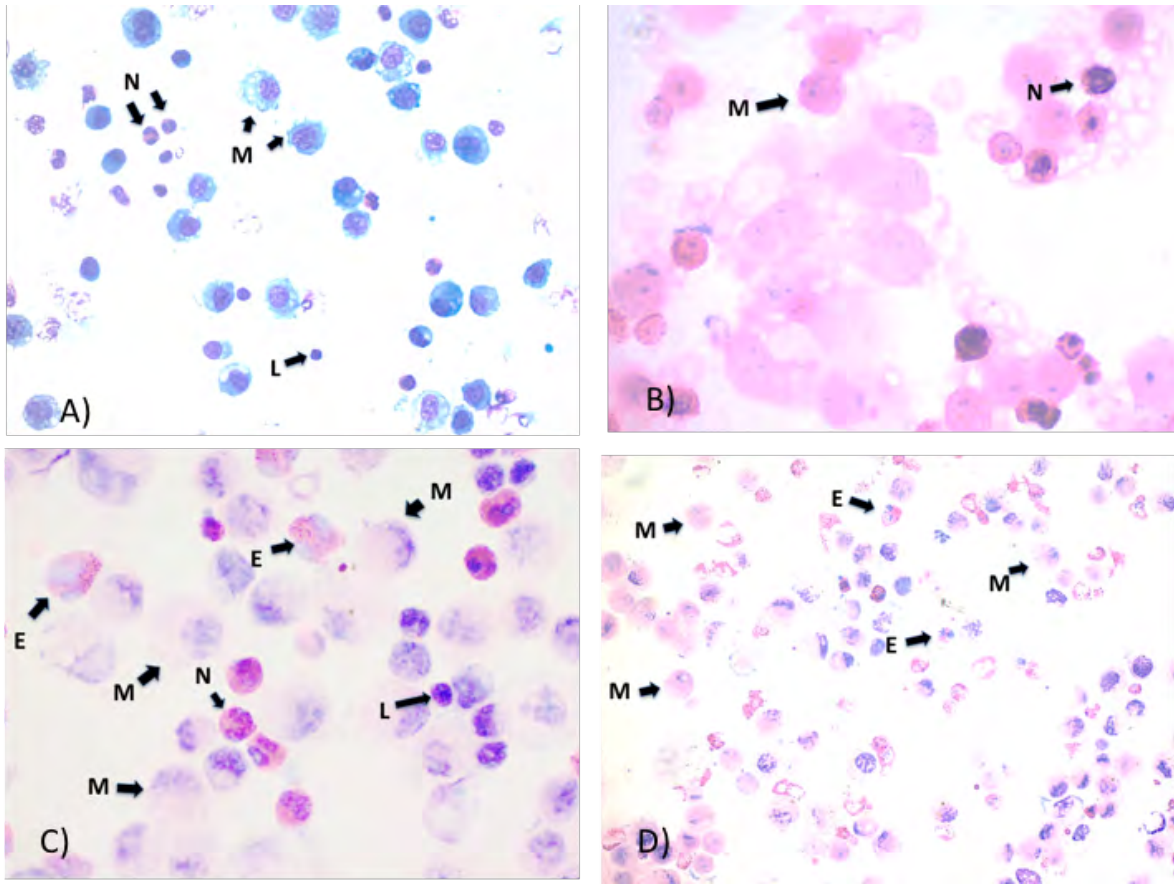


Figura 17. Poblaciones celulares de los LBA de cobayos con tinción Giemsa. Se muestran células de cobayos, A) no sensibilizados expuestos a aire filtrado (grupo rosa), B) asmáticos expuestos a aire filtrado (grupo morado), C) no sensibilizados expuesto a $PM_{2.5}$ (grupo negro), D) asmáticos expuestos a $PM_{2.5}$ (grupo azul). Las flechas indican (M) macrófagos, (N) neutrófilos, (L) linfocitos y (E) eosinófilos. Aumento 1000X.

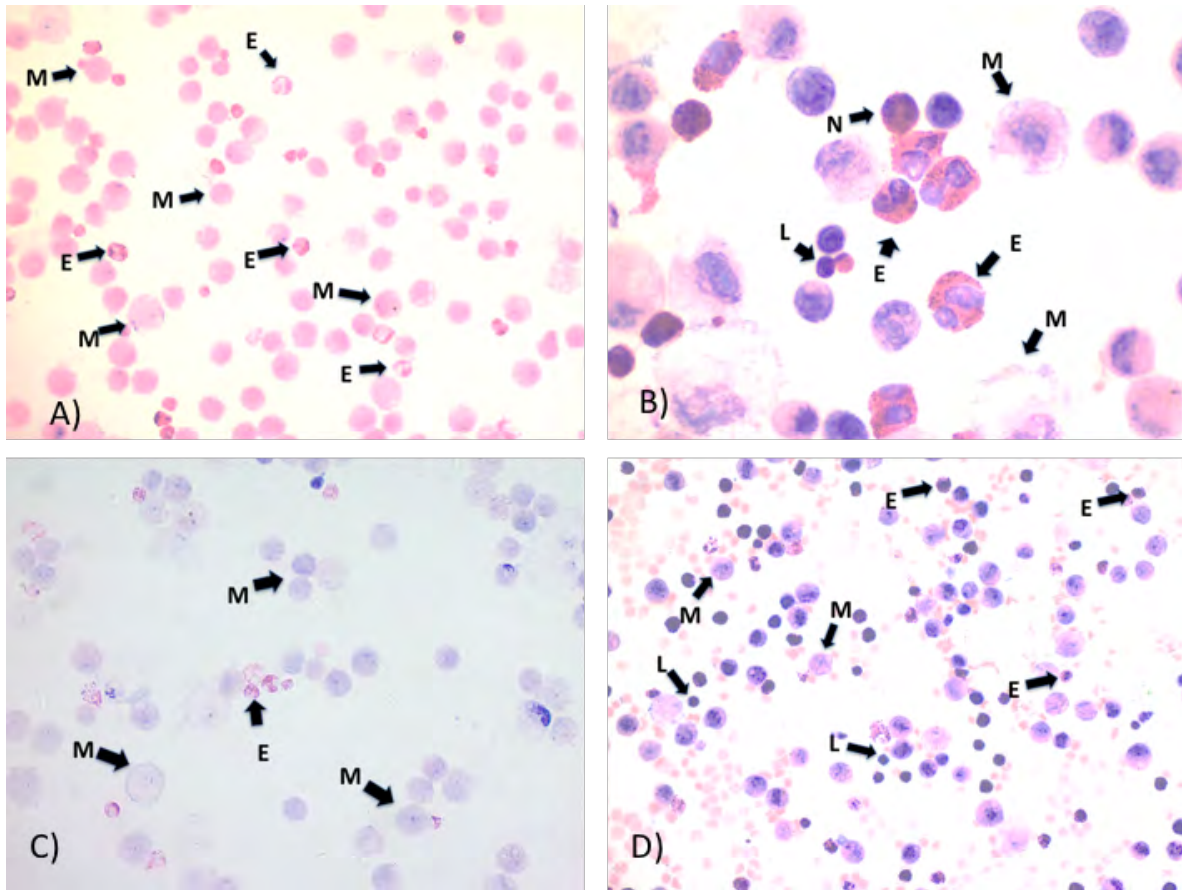


Figura 18. Poblaciones celulares de los LBA de cobayos con tinción Giemsa. Se muestran células de cobayos A) no sensibilizados expuestos a ozono (grupo amarillo), B) asmáticos expuestos a ozono (grupo café), C) no sensibilizados expuestos a ozono y PM_{2.5} (grupo verde), D) asmáticos expuestos a ozono y PM_{2.5} (grupo rojo). Las flechas indican (M) macrófagos, (N) neutrófilos, (L) linfocitos y (E) eosinófilos. Aumento 1000X.

Ensayos de ELISA

Biomarcador de daño pulmonar CC16

La determinación de CC16 se realizó a través de ensayos de ELISA, en donde los niveles de esta proteína presentaron un incremento significativo en todos los animales expuestos, tanto a O₃ como a PM_{2.5} (Figura 17), lo que indica que la exposición a estos contaminantes produce daño pulmonar inflamatorio.

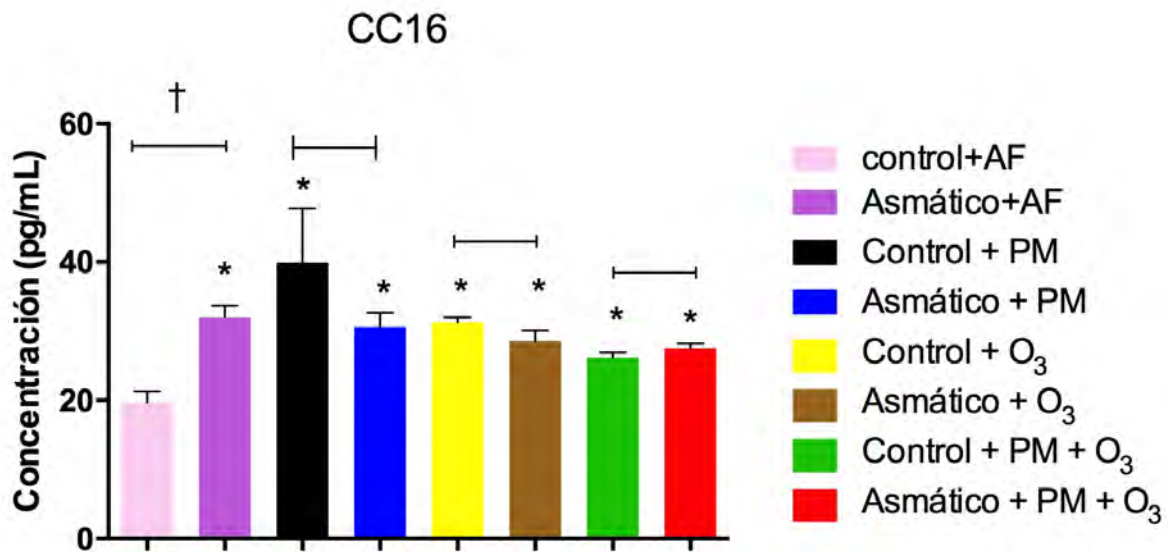


Figura 19. Ensayo de ELISA para cuantificación de proteína CC16 en LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo (*) $p<0.05$, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de Student (†) $p<0.05$.

Perfil de citocinas Th1/Th2

Se determinó la expresión por ensayos de ELISA de las citocinas dominantes del perfil Th1/Th2, como: IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, TNF- α , INF- γ . Sin embargo, no se obtuvieron respuestas diferenciales para todas las citocinas, tal fue el caso de IL-6 e IL-17 en las que los niveles no mostraron diferencias significativas (Figuras 20 y 21).

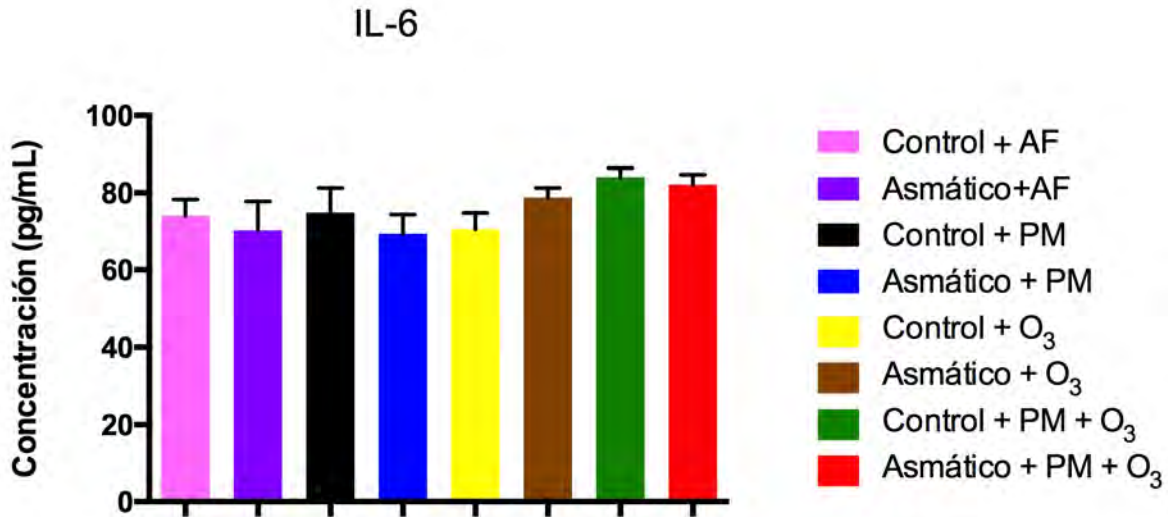


Figura 20. Ensayos de ELISA para cuantificación IL-6 de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de *Student*.

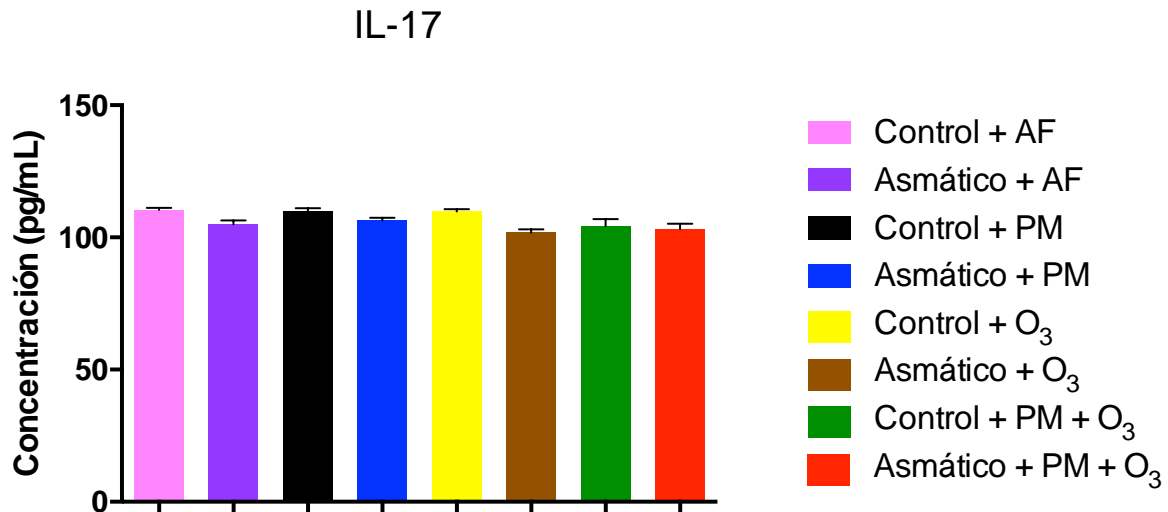


Figura 21. Ensayos de ELISA para cuantificación IL-17 de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de *Student*.

Por otro lado, se presentaron diferencias considerables para IL-4, IL-10, TNF- α e INF- γ . En el caso de IL-4 se observó un incremento al comparar todos los animales, con excepción del grupo de animales asmáticos+PM_{2.5} (grupo azul) y el grupo de animales control+PM_{2.5}+O₃ (grupo verde), con respecto al grupo de

animales control+AF (grupo rosa) (Figura 22). Adicionalmente se observó otra diferencia significativa de todos los animales sensibilizados (asmático+AF, asmático+PM_{2.5}, asmático+O₃ y asmático+PM_{2.5}+O₃) con respecto a su propio grupo control (control+AF, control+PM_{2.5}, control+O₃ y control+PM_{2.5}+O₃), destacando la comparación de los animales expuestos a ambos contaminantes, el grupo de animales control+PM_{2.5}+O₃ (grupo verde) vs animales asmático+PM_{2.5}+O₃ (grupo rojo).

Para la citocina antiinflamatoria IL-10 se observó una disminución en todos los grupos de animales, particularmente en los animales asmáticos+PM_{2.5}+O₃ (grupo rojo) (Figura 23).

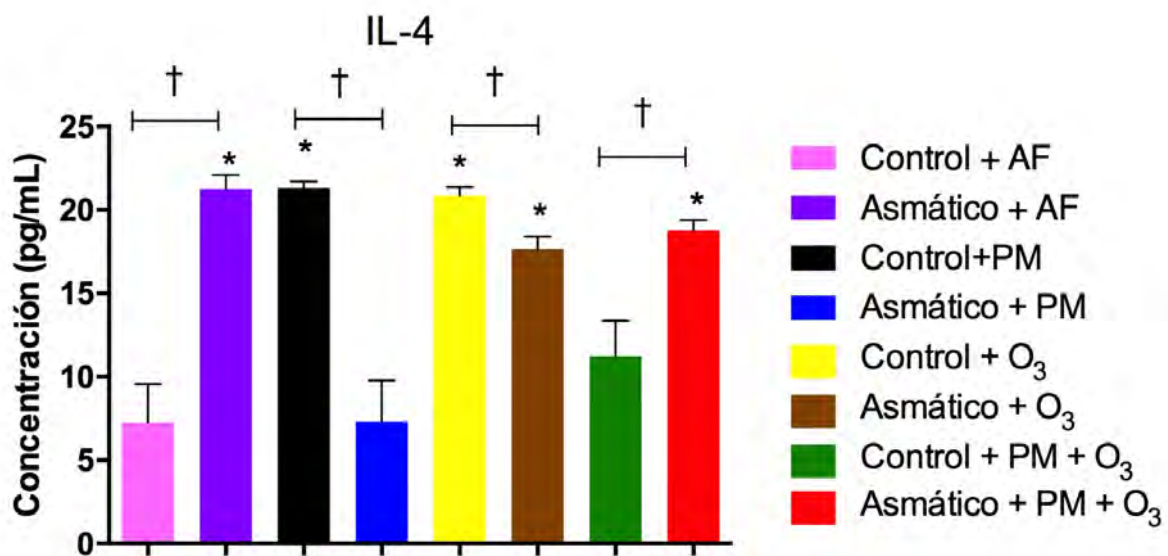


Figura 22. Ensayos de ELISA para cuantificación de IL-4 de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo (*) $p<0.05$, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de Student (†) $p<0.05$.

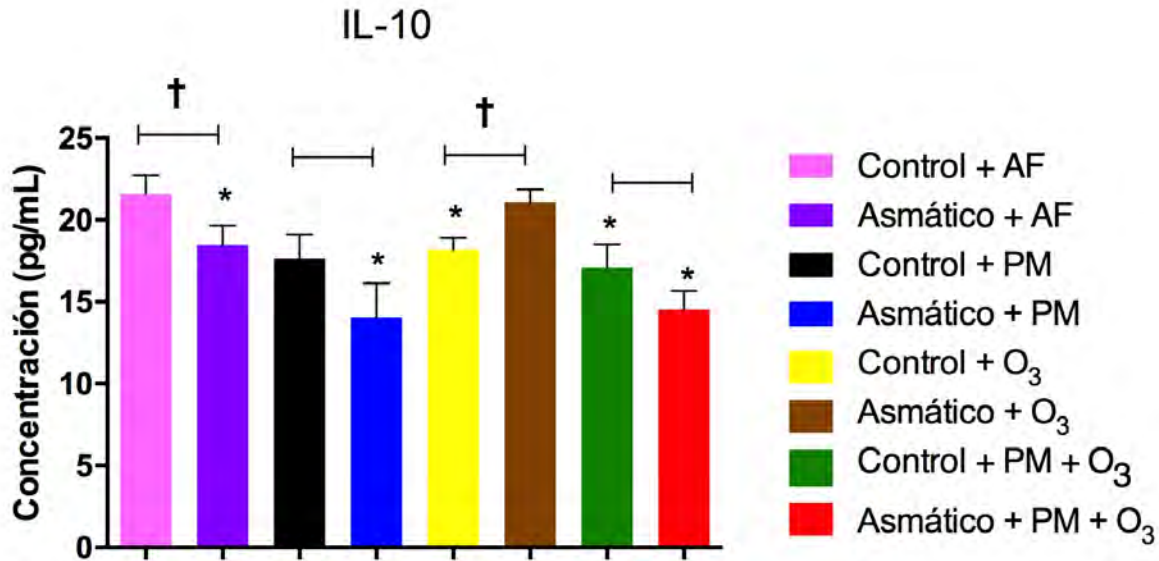


Figura 23. Ensayos de ELISA para cuantificación de IL-10 de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de $n=5$ cobayos por grupo (*) $p < 0.05$, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas *t* de Student (†) $p < 0.05$.

Los niveles de $\text{INF-}\gamma$ aumentaron en los animales expuestos a ozono, tanto asmáticos como controles (grupos amarillo y café). Sin embargo, disminuyó su expresión en animales control+ $\text{PM}_{2.5}$ (grupo negro) (Figura 24). Finalmente, los niveles de $\text{TNF-}\alpha$ aumentaron en la mayoría de los grupos animales, específicamente en el grupo de animales control+ $\text{PM}_{2.5}$ (grupo negro), en contraste con la disminución de esta citosina en los animales asmáticos+ $\text{PM}_{2.5}$ (grupo azul) (Figura 25).

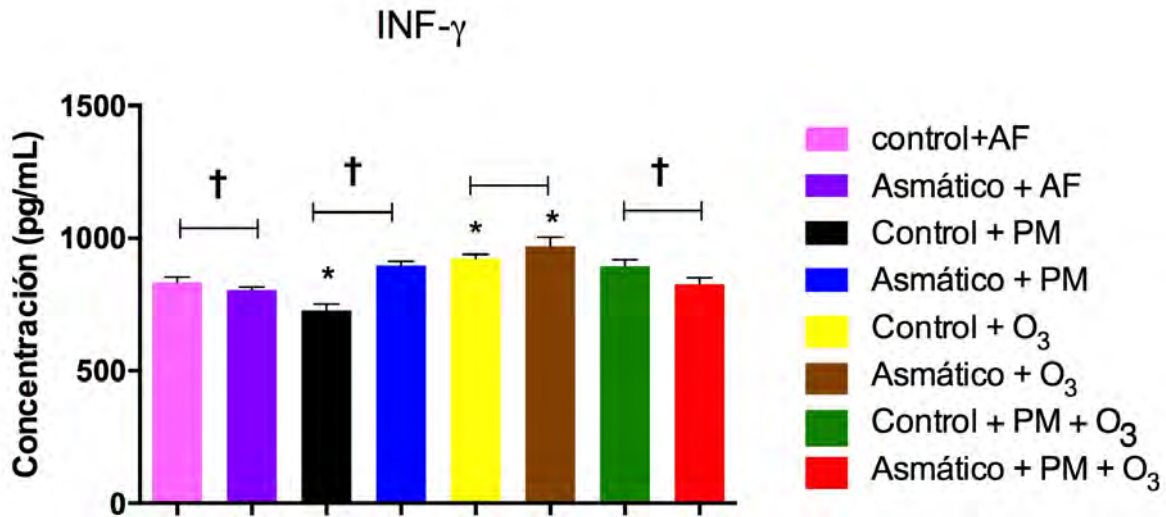


Figura 24. Ensayos de ELISA para cuantificación de INF- γ de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de n=5 cobayos por grupo (*) p<0.05, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de Student (†) p<0.05.

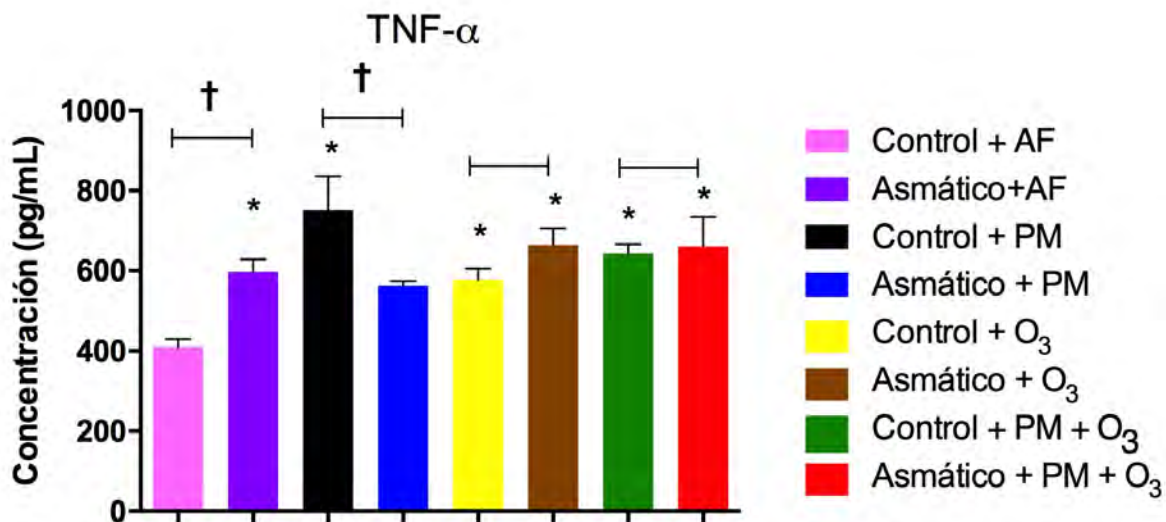


Figura 25. Ensayos de ELISA para cuantificación de TNF- α de LBA de cobayos. Las barras corresponden a las medias \pm error estándar de n=5 cobayos por grupo (*) p<0.05, ANOVA con ajustes para Dunnett, pruebas t de Student (†) p<0.05.

Consecutivamente se evaluó la respuesta Th1/Th2 por medio de gráficas de proporción de la expresión de las citocinas de los ensayos de ELISA. En la proporción INF- γ /IL-4 todos los animales sensibilizados presentaron una respuesta

Th2, más que sus controles no sensibilizados (Figura 26). Por otra parte, no hubo diferencias significativas en la proporción $TNF-\alpha/IL-10$ (Figura 27).

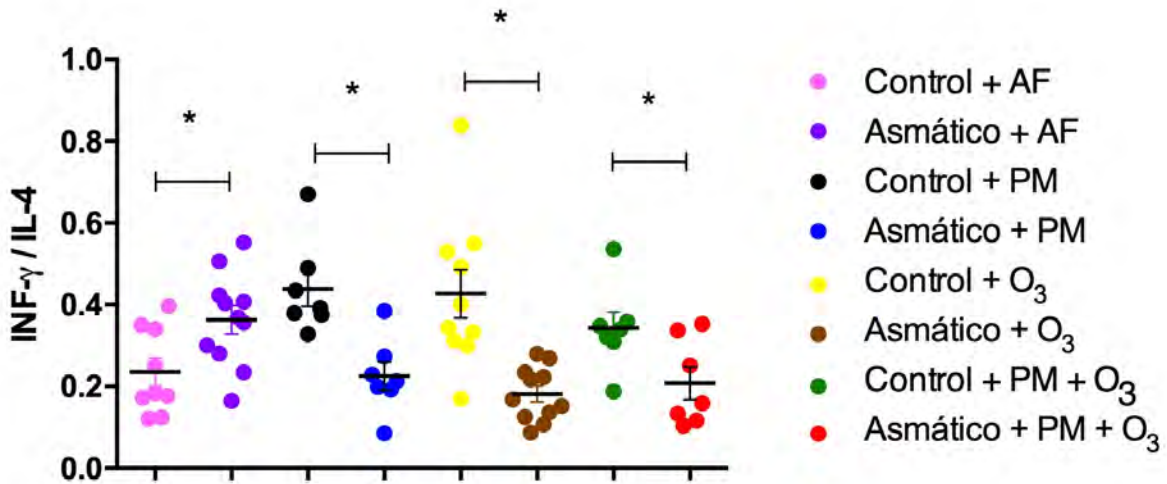


Figura 26. Proporciones de detección de respuesta Th1/Th2. En la gráfica se muestra la proporción de $INF-\gamma/IL-4$ de LBA. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar, (*) $p < 0.05$.

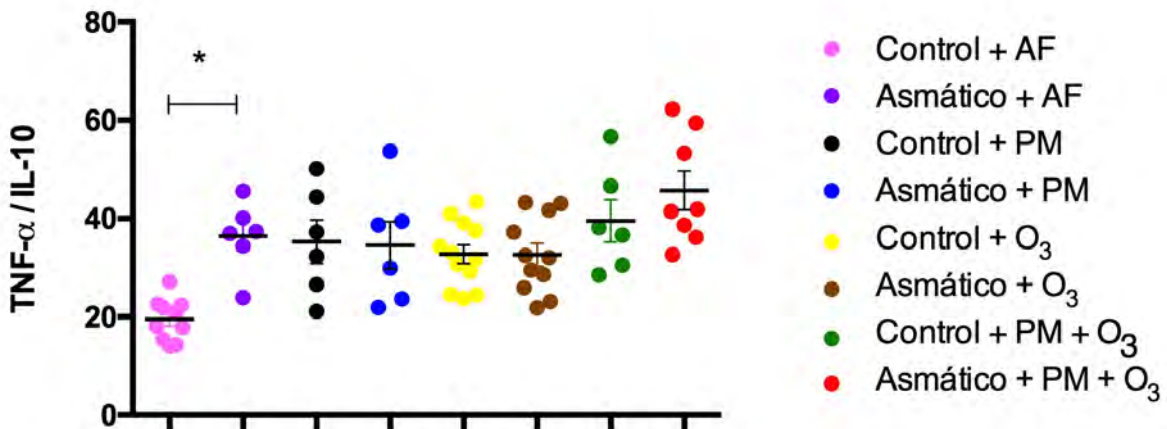


Figura 27. Proporciones de detección de respuesta Th1/Th2. En la gráfica se muestra la proporción de $TNF-\alpha/IL-10$ de LBA. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar, (*) $p < 0.05$.

Discusión

Los efectos de la contaminación atmosférica se han convertido en un problema de salud pública, ya que afectan a millones de personas alrededor del mundo, particularmente en mega-ciudades, como en la Ciudad de México, ya que cuenta con un alto crecimiento demográfico, poblacional, industrial y de tráfico vehicular. Dichas características influyen considerablemente en la generación de contaminantes como el PM y el O₃, ya que impactan de manera directa o indirecta la calidad del aire. Algunos estudios epidemiológicos han relacionado estos dos contaminantes con un aumento en las admisiones hospitalarias y en la mortalidad, principalmente por enfermedades respiratorias, exacerbaciones de asma y enfermedades cardiovasculares (Borja-Aburto et al., 1997; Kafoury & Kelley, 2005; Madden et al., 2000; Medina-Ramón et al., 2006; Valavanidis et al., 2009). Esto sugiere que el O₃ y el PM, están asociados con un incremento en la respuesta inflamatoria, especialmente en individuos susceptibles, tales como las personas asmáticas (Escamilla-Nuñez et al., 2008). Por otra parte, se ha identificado que la temporada climática es un factor importante debido a la composición del PM, el cual contiene metales, endotoxinas e hidrocarburos aromáticos, además, este contaminante puede interactuar con el ozono (Nel, 2005); esta interacción puede determinar el desarrollo de procesos inflamatorios y la generación de patologías pulmonares como el asma (Kafoury & Kelley, 2005).

Una de las principales características del asma es la inflamación crónica, la cual se ha asociado a la hiperreactividad de las vías aéreas. (Murdoch & Lloyd, 2010; Ramos-Ramírez et al., 2013), misma que se manifiesta a través de síntomas respiratorios asociados a la obstrucción del flujo de aire (bronco-obstrucción). En nuestro modelo de asma alérgica en cobayo, la sensibilidad de las vías aéreas se incrementa por la exposición del ozono y el PM, es decir genera hiperreactividad. Esta respuesta hiperreactora se observó en los animales sensibilizados (asmáticos) expuestos a ambos contaminantes (Figura 14). Cabe destacar que el grupo de animales asmáticos expuestos a ambos contaminantes, así como el de

animales asmáticos expuestos a ozono presentaron una respuesta más severa en comparación con sus propios controles. Este resultado coincide con otros estudios, los cuales sugieren que el PM_{2.5} y/o ozono agravan las exacerbaciones en pacientes asmáticos (Kafoury & Kelley, 2005; Li N. et al., 2010; Riedl, 2008).

Los mecanismos precisos que activan el desarrollo de la hiperreactividad en las vías aéreas por exposición de contaminantes no han sido evidenciados hasta el momento. En nuestro estudio observamos el incremento en el número de eosinófilos en los animales asmáticos, con excepción del grupo de animales asmático+O₃, ya que este último grupo presentó un fenotipo neutrofílico (Figura 16). Se ha descrito que la respuesta inflamatoria durante exacerbaciones asmáticas se caracteriza por el reclutamiento de dos subtipos celulares muy importantes: el eosinofílico, el cual juega un papel importante en la respuesta tardía, asociado a un engrosamiento de la membrana basal y el incremento de linfocitos CD3, CD4, CD8, macrófagos, mastocitos y TGF-β. Por otro lado, la respuesta neutrofílica está asociada principalmente a casos de asma severa. Entre los principales mediadores inflamatorios en esta respuesta encontramos a las metaloproteinasas y citocinas (TNF-α, IL-1b, IL-6. e IL-8, entre otros) (Barnes et al., 2009; Wenzel et al., 1999), por lo que el infiltrado de eosinófilos en la respuesta asmática es típica, y se ha relacionado con la persistencia inflamatoria de las vías aéreas (Barthel et al., 2008). Adicionalmente, la exposición a O₃ produjo asma de tipo severa, incluso más que la mezcla de ambos contaminantes. Además, observamos un alto nivel de macrófagos en todos los grupos expuestos a PM_{2.5}, lo que evidencia la función de este subtipo celular para fagocitar pequeñas partículas como se ha descrito en otros trabajos (Ishii et. al., 2005).

Para evaluar la severidad de daño pulmonar en nuestro experimento se determinó la proteína CC16 en LBA a través de la técnica de ELISA. En nuestro estudio se observó un incremento de esta proteína en todos los grupos de animales, con respecto al grupo de animales control+AF (grupo rosa) (Figura 19). Este resultado evidencia el daño pulmonar en los animales sensibilizados (asmáticos), así como

los animales controles (no asmáticos) expuestos a $PM_{2.5}$ y/ O_3 . Esta proteína está asociada con el estrés oxidante (Bolton, 2008; García et al., 2013) por lo tanto la exposición ozono y $PM_{2.5}$ y el propio modelo de sensibilización incrementan el daño pulmonar. La generación de ROS puede activar una gran cantidad de respuestas como la producción de citocinas, ya sean pro-inflamatoria o anti-inflamatorias, así como el inicio de la división celular como hiperplasia de músculo liso bronquial, entre otras vías de respuesta celular (Trasande & Thurston, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente, las células del sistema inmune de las vías aéreas son una fuente importante de mediadores inflamatorios. Diversos estudios en modelos animales han descrito que las citocinas juegan un papel importante en la respuesta alérgica, particularmente sobre la fisiopatología del asma (Chung, 2001). Los altos niveles de algunas citocinas están relacionados con la exposición a contaminantes como: $PM_{2.5}$ y ozono (Kafoury & Kelley, 2005; Manzano-León et al., 2016). Nuestro estudio demostró niveles significativos para la citocina IL-4 en nuestro grupo de interés animales asmáticos expuestos a ambos contaminantes (asmático+ $PM_{2.5}$ + O_3) (Figura 22). IL-4 juega un papel importante en la activación de la respuesta inflamatoria (Chung, 2001).

Por otro lado, se observó una baja producción de la citocina IL-10 en todos nuestros grupos con respecto al grupo control+AF (grupo rosa) (Figura 23). Probablemente, el decremento de IL-10 está asociado a la inflamación causada por la propia sensibilización y/o inhalación de ambos contaminantes, ya que una de sus funciones principales es la anti-inflamación e inmunosupresión, es decir regular la respuesta inflamatoria dentro del pulmón (Stampfli et al., 1999). Otra proteína asociada a la respuesta inmune dentro del pulmón es la proteína CC16 la cual juega un papel importante en inmuno-modulación directa en la activación de la respuesta tipo Th2 en murinos (Johansson, 2008).

En cuanto a los niveles de $INF-\gamma$ se observaron diferencias significativas de cada grupo con respecto a su control. Sin embargo, no se observaron diferencias de

todos los grupos con respecto al grupo control+AF (grupo rosa). Se ha descrito que la secreción de INF- γ está asociada a una respuesta Th1 (Hansen et al., 1999) sugiriendo que esta respuesta se manifiesta en nuestro experimento.

Otra citocina importante en el asma es TNF- α , cuya función principal es la respuesta pro-inflamatoria, además, promueve la liberación de varios subtipos celulares entre ellos neutrófilos, durante la reacción inflamatoria por alérgenos (Stampfli et al., 1999). Nuestros resultados mostraron el aumento de TNF- α en todos los grupos con respecto al grupo control+AF (grupo rosa), con excepción del grupo asmático+PM_{2.5} (grupo azul) (Figura 25). Se ha observado en otros estudios que la exposición a PM durante la temporada seca-caliente aumentó los niveles de TNF- α en cultivos de monocitos (Osornio-Vargas et al., 2003), sin embargo, en temporada seca-fría disminuyó sus niveles, tanto en cultivos de monocitos, como en modelos animales (Farina et al., 2011; Manzano-León et al., 2016). Cabe mencionar que durante la temporada seca-caliente la composición de las PM presenta una mayor cantidad de endotoxinas, mientras que en la temporada seca-fría predominaron los HAPs (Manzano-León et al., 2016). Esto podría sugerir que la interacción de las PM con el ozono promueva la oxidación de los HAPs, mostrando un comportamiento similar al observado en la temporada seca-caliente.

También se evaluaron las citocinas IL-6 e IL-17 (Figura 20 y 21); sin embargo, no se encontró una respuesta significativa para ninguna de estas dos citocinas. Algunos estudios han demostrado que tanto IL-6 como IL-17 son esenciales en la diferenciación de la respuesta Th17 en el asma, como otro mecanismo diferente a Th2 (Newcomb & Peebles, 2013; Zhao et al., 2009). Esto sugiere en nuestros experimentos que no se activó la respuesta tipo Th17 durante las tres semanas de exposición. Además, algunos estudios moleculares han sugerido que la exposición a contaminantes ambientales influye en el desarrollo de la respuesta inmune, ya sea tipo Th17, así como Th1 (inmunidad celular dominante) o Th2 (inmunidad humoral dominante) (Trasande & Thurston, 2005).

Por otro lado, se realizó la proporción Th1/Th2 a partir de los resultados de los ensayos de las citocinas IL-4, IL-10, TNF- α e INF- γ , ya que este grupo de citocinas funcionan en conjunto y no de forma individual en la respuesta inflamatoria. En el caso de la proporción TNF- α /IL-10 no hubo diferencias significativas, sin embargo, en la proporción INF- γ /IL-4 se observó una tendencia marcada para la respuesta Th2 en los grupos asmáticos, en comparación con sus propios grupos controles (Figura 26). Cabe destacar que nuestro grupo de interés asmático+PM_{2.5}+O₃ (grupo rojo) presentó una de las respuestas más hiperreactoras, con un perfil eosinofílico y una respuesta Th2 marcada en comparación con su grupo contraparte control+PM_{2.5}+O₃ (grupo verde). Asimismo, el grupo asmático+O₃ (grupo café) presentó una respuesta hiperreactora, y al igual que el anterior, un marcado perfil de tipo Th2 en contraste con su grupo contraparte control+O₃ (grupo amarillo), el cual presentó una respuesta más hiporreactora. Sin embargo, este grupo presentó un perfil celular neutrofílico, lo que sugiere que, a pesar de presentar una respuesta inflamatoria similar, los mecanismos de acción de los contaminantes sobre el pulmón actúan de diferente manera según su combinación.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que los cobayos desarrollaron una respuesta inflamatoria por la exposición a ambos contaminantes a través de la secreción de citocinas del perfil Th2 principalmente, pero también se encontró la presencia de otras citocinas, como TNF- α , lo que corresponde con otros estudios de modelos de asma en murinos, en donde se han encontrado presentes los dos tipos de respuesta inflamatoria (Th1 y Th2) (Hansen et al., 1999).

Por lo que nuestro estudio aporta evidencia de la interacción del PM_{2.5} y el ozono en las vías respiratorias. Ambos contaminantes son capaces de agravar la sintomatología del asma, sin embargo, pocas investigaciones han evaluado su exposición simultánea y la posible variación estacional de sus efectos tóxicos. Esta nueva percepción ha contribuido a que el monitoreo atmosférico en varias ciudades de nuestro país y del resto del mundo incluya nuevos compuestos antes

no considerados. Actualmente existen muy pocos estudios en lo que se evalúen el efecto concomitante de la exposición simultánea a O₃ y PM_{2.5}, en el desarrollo temporal de la patogénesis del asma alérgica en tiempo real. Por lo que en este estudio se evaluaron las modificaciones fisiológicas, inmunológicas y toxicológicas inducidas por la exposición concomitante a O₃ y PM_{2.5} de la Ciudad de México con la finalidad de aportar evidencias científicas que permitan emitir recomendaciones que pudiesen modificar los criterios de la Norma oficial Mexicana de Calidad del Aire, tanto para O₃ como PM_{2.5}, que hasta hoy se basa en sus efectos individuales y no aditivos como suelen presentarse en la mezcla de contaminantes atmosféricos de nuestra Megalópolis

Conclusiones

La exposición a la contaminación del aire es un factor de riesgo para el desarrollo de cambios en el aparato respiratorio, especialmente la exposición a $PM_{2.5}$ y O_3 , que en conjunto exacerban la respuesta inflamatoria, favoreciendo la sensibilización alérgica en nuestro modelo de asma en cobayos.

El $PM_{2.5}$ y O_3 producen diferente tipo de respuesta, sin embargo, cuando ambos contaminantes son inhalados concomitantemente, pueden alterar la respuesta alérgica de los animales sensibilizados, es decir, asmáticos, lo que en este caso eleva el grado de reactividad de las vías aéreas, por el tipo de inflamación relacionada a la respuesta tipo Th2.

Es importante reconocer el papel central del proceso inmunológico del asma y sus cambios por la exposición a estos contaminantes. Asimismo, se deben reconocer los mecanismos inflamatorios en diferentes temporadas climáticas de la Ciudad de México, ya que la composición de las $PM_{2.5}$ es diferente, así como la interacción con el ozono.

Bibliografía

Abbas, A. K. (2002). *Inmunología celular y molecular*. McGraw-Hill Interamericana, p-426.

Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Bonner, J. C., Murray, J. C., Rosas, I., & Osornio-Vargas, Á. R. (2002). Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environmental health perspectives*, 110(7), 715.

Allen DL, Pollard KR, Hughes BL, Dorato MA, Wolff RK. Use of head dome system to compare i.v. methacholine-induced bronchoconstriction in conscious vs anesthetized rhesus monkeys. *J Appl Toxicol* 1995; 15:13-7.

Amador-Muñoz O., Vázquez Santiago J., Jazcilevich-Diamant A., Santos-Medina G.L., & B.L., V.-H. (2014). Dispositivo Integrado Por Múltiples Deflexiones Para La Recuperación De Compuestos Orgánicos Debido a La Evaporación De Disolventes Orgánicos Por Arrastre De Vapor. (Vol. 325625). México.

Aránguez, E., Ordóñez, J. M., Serrano, J., Aragonés, N., Fernández-Patier, R., Gandarillas, A., & Galán, I. (1999). Contaminantes atmosféricos y su vigilancia. *Revista española de salud pública*, 73(2), 123-132.

Baird C y M. Cann, *Environmental Chemistry*, Freeman, New York, 2008. Pag-773.

Barnes, P. J., Drazen, J. M., Rennard, S. I., & Thomson, N. C. (Eds.). (2009). *Asthma and COPD: basic mechanisms and clinical management*. Elsevier.

Basha, M. A., Gross, K. B., Gwizdala, C. J., Haidar, A. H., & Popovich, J. (1994). Bronchoalveolar lavage neutrophilia in asthmatic and healthy volunteers after controlled exposure to ozone and filtered purified air. *CHEST Journal*, 106(6), 1757-1765.

Barthel, S. R., Johansson, M. W., McNamee, D. M., & Mosher, D. F. (2008). Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *Journal of leukocyte biology*, 83(1), 1-12.

Bernal Gutiérrez, Ángel Alberto Relación entre la contaminación atmosférica en la Ciudad de México y la incidencia de enfermedades respiratorias agudas en su población general entre los años 2000 y 2007 / 2009.

BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., & Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*. Pag 311-318.

Borja-Aburto, V. H., Loomis, D. P., Bangdiwala, S. I., Shy, C. M., & Rascon-

Pacheco, R. A. (1997). Ozone, suspended particulates, and daily mortality in Mexico City. *American journal of epidemiology*, 145(3), 258-268.

Broeckaert, F., & Bernard, A. (2000). Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(4), 469-475.

Brunekreef, B., & Holgate, S. T. (2002). Air pollution and health. *The lancet*, 360(9341), 1233-1242.

Chand N, Nolan K, Pilar J, Lomask M, Diamantis W, Sofia RD. Aeroallergen-induced dyspnea in freely moving guinea pigs: quantitative measurement by bias flow ventilated whole body plethysmograph. *Allergy* 1993; 48:230-5.

Chung, K. F. (2001). Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 18(34 suppl), 50s-59s.

CONAGUA (Comisión Nacional del Agua) Servicio Meteorológico Nacional, 2015. <http://smn.cna.gob.mx/es/> [Accesado el día 09 de nov. De 15].

Del Rio Navarro, B. E., Ito-Tsuchiya, F. M., Berber, A., Zepeda-Ortega, B., Sienna-Monge, J. J. L., Garcia-Almaraz, R., & Baeza-Bacab, M. (2008). Study of the relationship between acetaminophen and asthma in Mexican children aged 6 to 7 years in 3 Mexican cities using ISAAC methodology. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18(3), 194.

Escamilla-Núñez, M. C., Barraza-Villarreal, A., Hernandez-Cadena, L., Moreno-Macias, H., Ramirez-Aguilar, M., Sienna-Monge, J. J., & Romieu, I. (2008). Traffic-related air pollution and respiratory symptoms among asthmatic children, resident in Mexico City: the EVA cohort study. *Respiratory research*, 9(1), 1.

Falcón Rodríguez C. I. (2012). *Caracterización de los diferentes subtipos de la célula Bronquiolar no Ciliada en el modelo Murino de inhalación de vanadio* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Falcon-Rodriguez, C. I., Osornio-Vargas, A. R., Sada, I., & Segura Medina, P. (2016). Aeroparticles, composition and lung diseases. *Frontiers in Immunology*, 7, 3.

Farina, F., Sancini, G., Mantecca, P., Gallinotti, D., Camatini, M., & Palestini, P. (2011). The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. *Toxicology letters*, 202(3), 209-217.

García, A. H., Moreno, D., Garmendia, J. V., & De Sanctis, J. B. (2013). Revisión de biomarcadores en asma y EPOC. *Neumol Cir Torax*, 72(4), 299-305.

Gartner, L. P. (2007). Et James L. L. *Hiatt: Color atlas of histology*. Pag 153-161.

Gerlofs-Nijland M. E., Boere, A. J. F., Leseman, D. L., Dormans, J. A., Sandström, T., Salonen, R. O., ... & Cassee, F. R. (2005). Effects of particulate matter on the pulmonary and vascular system: time course in spontaneously hypertensive rats. *Particle and fibre toxicology*, 2(1), 1.

Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2016. Disponible en: www.ginasthma.org

Guyton Arthur C. (1994), *Fisiología y Fisiopatología*, Interamericana, McGraw-Hill, México. Pag. 722

Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G. L., Irvin, C. G., & Gelfand, E. W. (1997). Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(3), 766-775.

Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H., & Umetsu, D. T. (1999). Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 103(2), 175-183.

Holgate, S. T., Church, M. K., Broide, D. H., & Martinez, F. D. (2012). *Allergy*, Edinburgh: Elsevier Saunders.

IMCO (Instituto Mexicano para la Competitividad) La contaminación del aire un problema que daña la salud y la economía, 2016. Disponible en: http://imco.org.mx/medio_ambiente/la-contaminacion-del-aire-un-problema-que-dana-la-salud-y-la-economia/ [Accesado el día 13 de abr. De 16].

IMCO (Instituto Mexicano para la Competitividad) Comunicado de Prensa, 2012. Disponible en: <http://imco.org.mx/wp-content/uploads/2014/10/Comunicado-de-Prensa.pdf> [Accesado el día 13 de abr. De 16].

INECC (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático), Cuarto almanaque de datos y tendencias de la calidad del aire en 20 ciudades mexicanas (2000-2009). Disponible: http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_publicacion=652

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) 2015. <http://www.inegi.org.mx> [Accesado el día 09 de nov. De 15].

Ishii, H., Hayashi, S., Hogg, J. C., Fujii, T., Goto, Y., Sakamoto, N., ... & Van Eeden, S. F. (2005). Alveolar macrophage-epithelial cell interaction following exposure to atmospheric particles induces the release of mediators involved in monocyte mobilization and recruitment. *Respiratory research*, 6(1), 1.

Johansson, S. (2008). *CC16 in allergy and allergic inflammation*. Inst of Clinical Sciences. Dept of Pediatrics.

Kafoury, R. M., & Kelley, J. (2005). Ozone Enhances Diesel Exhaust Particles (DEP)-Induced Interleukin-8 (IL-8) Gene Expression in Human Airway Epithelial Cells through Activation of Nuclear Factors- κ B (NF- κ B) and IL-6 (NF-IL6). *International journal of environmental research and public health*, 2(3), 403-410.

Kim, S., Shim, J. J., Burgel, P. R., Ueki, I. F., Dao-Pick, T., Tam, D. C. W., & Nadel, J. A. (2002). IL-13-induced Clara cell secretory protein expression in airway epithelium: role of EGFR signaling pathway. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(1), L67-L75.

Koenig Jane Q., Health effects of ambient air pollution : how safe is the air we breathe?, New York, Springer Science+Business Media, 2000.

Kotses, H. (2010). *Asthma, Health and Society*. H. K. A. Harver (Ed.). Springer US.

Landis, W., Sofield, R., Yu, M. H., & Landis, W. G. (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*. Crc Press. Pag-390.

Li, N., Harkema, J. R., Lewandowski, R. P., Wang, M., Bramble, L. A., Gookin, G. R., & Nel, A. E. (2010). Ambient ultrafine particles provide a strong adjuvant effect in the secondary immune response: implication for traffic-related asthma flares. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(3), L374-L383.

Lingappa, V. R., & Ganong, W. F. (2000). *Pathophysiology of disease: an introduction to clinical medicine*. J. D. Lange (Ed.). Lange Medical Books/McGraw-Hill.

López, J. G. H., del Olmo Téllez, H., & Corro, S. C. (2013). Biopsia bronquial y lavado bronquioalveolar en el diagnóstico del asma persistente severa en niños. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 22 (1), 19-28.

López, J. H., Gutiérrez, C. J., del Olmo Téllez, H., & López, M. M. (2009). Remodelación de la vía aérea en asma. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 18 (2), 60-78.

Madden, M. C., Richards, J. H., Dailey, L. A., Hatch, G. E., & Ghio, A. J. (2000). Effect of ozone on diesel exhaust particle toxicity in rat lung. *Toxicology and applied pharmacology*, 168(2), 140-148.

Manzano-León, N., Serrano-Lomelin, J., Sánchez, B. N., Quintana-Belmares, R., Vega, E., Vázquez-López, I., ... & Perez, I. R. (2016). TNF α and IL-6 responses to particulate matter in vitro: variation according to PM size, season, and polycyclic

aromatic hydrocarbon and soil content. *Environmental health perspectives*, 124(4), 406.

Marshall, J. C., Charbonney, E., & Gonzalez, P. D. (2008). The immune system in critical illness. *Clinics in chest medicine*, 29(4), 605-616.

Medina-Ramón, M., Zanobetti, A., & Schwartz, J. (2006). The effect of ozone and PM10 on hospital admissions for pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease: a national multicity study. *American journal of epidemiology*, 163(6), 579-588.

Molfino, N. A., Wright, S. C., Katz, I., Tarlo, S., Silverman, F., McClean, P. A., & Raizenne, M. (1991). Effect of low concentrations of ozone on inhaled allergen responses in asthmatic subjects. *The Lancet*, 338(8761), 199-203.

Murdoch, J. R., & Lloyd, C. M. (2010). Chronic inflammation and asthma. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 690(1), 24-39.

Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2008). Janeway's immunology. *Garland science*.

Nel, A. (2005). Air pollution-related illness: effects of particles. *Science*, 308(5723), 804-806.

Neote, K., Letts, L. G., & Moser, B. (Eds.). (2007). *Chemokine Biology-Basic Research and Clinical Application: Vol. 2: Pathophysiology of Chemokines*. Springer Science & Business Media.

Newcomb, D. C., & Peebles, R. S. (2013). Th17-mediated inflammation in asthma. *Current opinion in immunology*, 25(6), 755-760.

Oettgen, H., & Broide, D. H. (2011). Introduction to mechanisms of allergic. *Allergy*, 1.

O'Shea, J. J., Ma, A., & Lipsky, P. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 2(1), 37-45.

Osornio-Vargas, Á. R., Bonner, J. C., Alfaro-Moreno, E., Martínez, L., García-Cuellar, C., Rosales, S. P. D. L., & Rosas, I. (2003). Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environmental health perspectives*, 111(10), 1289.

Paredes Gómez A. (2014) *Influencia de la circulación atmosférica sobre el transporte de biopartículas como indicadores de contaminación ambiental en la Zona Metropolitana del Valle de México* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Pope III, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9), 1132-1141.

Ramos-Ramírez, P., Campos, M. G., Martínez-Cordero, E., Bazán-Perkins, B., & García-Zepeda, E. (2013). Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Experimental lung research*, 39(3), 136-145.

Riedl, M. A. (2008). The effect of air pollution on asthma and allergy. *Current allergy and asthma reports*, 8(2), 139-146.

Rosas-Pérez I., Serrano J., Alfaro-Moreno E., Baumgardner D., García-Cuellar, C., Del Campo J. M. M., & Osornio Vargas A. R. (2007). Relations between PM 10 composition and cell toxicity: a multivariate and graphical approach. *Chemosphere*, 67(6), 1218-1228.

Ross, M., & Pawlina, W. (2007). *Histología. 5ta. Edición. Bs. As.: Editorial Médica Panamericana*. Pag 662-685.

Samuelsen, M., Nygaard, U. C., & Løvik, M. (2008). Allergy adjuvant effect of particles from wood smoke and road traffic. *Toxicology*, 246(2), 124-131.

Sánchez Caraballo, J. M. (2012). Physicochemical characteristics of gaseous and particulate air pollutants. Their impact on asthma. *Iatreia*, 25(4), 369-379.

Schreiber, N., Ströbele, M., Kopf, J., Hochscheid, R., Kotte, E., Weber, P., ... & Müller, B. (2013). Lung alterations following single or multiple low-dose carbon black nanoparticle aspirations in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76(24), 1317-1332.

SEDEMA (Secretaria del Medio Ambiente) Calidad del aire, 2015. Disponible: <http://www.aire.df.gob.mx/> [Accesado el día 09 de nov. De 15].

SEDEMA (Secretaria del Medio Ambiente) Calidad del aire en la ciudad de México Informe 2014. Disponible: http://www.sedema.df.gob.mx/flippingbook/informe_anual_calidad_aire_2014/#p=1

Segura L. M. S., & Arriaga, J. A. L. (2003). *Principios básicos de contaminación ambiental*. UAEM.

Sierra-Vargas, M. P., Guzman-Grenfell, A. M., Blanco-Jimenez, S., Sepulveda-Sanchez, J. D., Bernabe-Cabanillas, R. M., Cardenas-Gonzalez, B., & Hicks, J. J. (2009). Airborne particulate matter PM. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(1).

Silva Martínez J. A. (2013). *Efecto de la contaminación atmosférica de la ciudad de México en las vías conductoras pulmonares: evaluación de la composición del moco y otros cambios morfológicos epiteliales* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Solís Iniesta P. (2010) *Epidemiología del asma en México* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Stampfli, M. R., Cwiartka, M., Gajewska, B. U., Alvarez, D., Ritz, S. A., Inman, M. D., & Jordana, M. (1999). Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 21(5), 586-596.

Thornton, D. J., Rousseau, K., & McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu. Rev. Physiol.*, 70, 459-486.

Torres, R., Picado, C., & De Mora, F. (2005). Descubriendo el asma de origen alérgico a través del ratón. Un repaso a la patogenia de los modelos de asma alérgica en el ratón y su similitud con el asma alérgica humana. *Archivos de Bronconeumología*, 41(3), 141-152.

Trasande, L., & Thurston, G. D. (2005). The role of air pollution in asthma and other pediatric morbidities. *Journal of allergy and clinical immunology*, 115(4), 689-699.

Valavanidis, A., Loridas, S., Vlahogianni, T., & Fiotakis, K. (2009). Influence of ozone on traffic-related particulate matter on the generation of hydroxyl radicals through a heterogeneous synergistic effect. *Journal of hazardous materials*, 162(2), 886-892.

Vallejo, M., Jáuregui-Renaud, K., Hermsillo, A. G., Márquez, M. F., & Cárdenas, M. (2003). Efectos de la contaminación atmosférica en la salud y su importancia en la Ciudad de México. *Gac Med Mex*, 139, 57-63.

Vargas B., M. H. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 68, S2.

Vargas Marcos, F. (2005). La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. *Revista española de salud pública*, 79(2), 117-127.

Vega Campa M. (2015). *Factores que inciden en el deterioro ambiental en México: el caso de la contaminación atmosférica* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colín, Z., Gómez-Arroyo, S., Frías-Villegas, A. (2006). Mutagenicity and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Extractable Organic Matter from

Airborne Particles \leq 10 μ m in Southwest Mexico City. *Atmos. Environ*, 40(30), 5845-5857.

Wenzel, S. E., Schwartz, L. B., Langmack, E. L., Halliday, J. L., Trudeau, J. B., Gibbs, R. L., & Chu, H. W. (1999). Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160(3), 1001-1008.

Zhao, Y., Yang, J., Gao, Y. D., & Guo, W. (2009). Th17 immunity in patients with allergic asthma. *International archives of allergy and immunology*, 151(4), 297-307.

Anexos

1.- Carta del Comité Ético y Científico del INER para la aprobación de este proyecto.

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INER INSTITUTO NACIONAL
DE ENFERMEDADES
RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D. F. a 19 de Agosto de 2015
INER/CI/185/15

Dra. Patricia Segura Medina
Investigador Responsable

**Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.
1RA. RENOVACIÓN DE APROBACIÓN.**

Protocolo: ¿LA CONTAMINACIÓN GENERA ASMA?; EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN CONCOMITANTE A DOS CONCOMITANTES, OZONO Y PARTÍCULAS SUSPENDIDAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA EN COBAYOS.

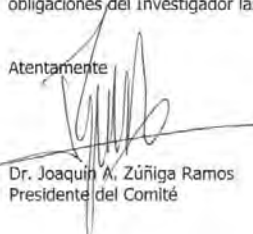
Código asignado por el Comité: **B21-13**

Respecto a su solicitud y de acuerdo a su reporte de progreso del proyecto citado, se renueva la vigencia a partir de esta fecha.

Le recordamos que esta aprobación estará vigente de agosto 2015 a agosto 2016.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de caducidad anterior. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente


Dr. Joaquín A. Zúñiga Ramos
Presidente del Comité

Carretera de Tlalpaq No. 4902, Col. Sección XVI, Deleg. Tlalpaq, México, D.F. C.P. 06000
(Tel.) (55) 54 87 17 00 • www.iner.salud.gob.mx