



Evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de 3 volcanes ecuatorianos en un modelo *in vivo* mediante qPCR.

Apunte Ramos, Michelle Priscila

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel, Ph.D

03 de marzo - 2021



Document Information

Analyzed document	Tesis unida 20210228 urkund.pdf (D96823451)
Submitted	3/1/2021 2:57:00 AM
Submitted by	Marbel
Submitter email	mmtorres@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	mmtorres.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis marcadores respaldo.pdf Document Tesis marcadores respaldo.pdf (D35753228) Submitted by: rseqqat@espe.edu.ec Receiver: rseqqat.espe@analysis.arkund.com		8
SA	TFG SANDRA GARCÍA NAÑEZ 2019-2020.pdf Document TFG SANDRA GARCÍA NAÑEZ 2019-2020.pdf (D76030009)		1
W	URL: https://1library.co/document/6zk63dey-analisis-de-la-participacion-del-receptor-cc ... Fetched: 10/21/2020 10:35:32 AM		1
W	URL: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/81265/CONICET_Digital_Nro.f5d1f17 ... Fetched: 11/17/2019 4:44:50 AM		1
W	URL: https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2019/im193i.pdf Fetched: 6/6/2020 9:40:36 PM		1

.....
Torres Arias, Marbel, Ph.D
DIRECTORA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de 3 volcanes ecuatorianos en un modelo in vivo mediante qPCR.**” fue realizado por la señorita **Apunte Ramos, Michelle Priscila** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 03 de marzo 2021

Firma:

.....

Torres Arias, Marbel, Ph.D

C. C.: 1802949154



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Apunte Ramos, Michelle Priscila**, con cédula de ciudadanía n°1717531485, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de 3 volcanes ecuatorianos en un modelo in vivo mediante qPCR**, es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 03 de marzo 2021

Firma:

Apunte Ramos, Michelle Priscila

C.C.: 1717531485



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Apunte Ramos, Michelle Priscila**, con cédula de ciudadanía n° 1717531485, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de 3 volcanes ecuatorianos en un modelo in vivo mediante qPCR.** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 03 de marzo 2021

Firma:

Apunte Ramos, Michelle Priscila

C.C.: 1717531485

Dedicatoria

A mis padres, Mery Ramos y Manolo Apunte, por ser los pilares de mi vida que me ayudaron a cumplir esta meta. Ustedes son los primeros en creer en mí, incluso antes que yo misma, son mi inspiración y mis ganas de seguir a delante.

- Michelle Priscila Apunte Ramos -

Agradecimientos

En primer lugar, a mis padres que gracias a ellos he llegado a ser la persona que soy, que con su amor incondicional y enseñanzas me han fomentado los valores con los que dirijo mi vida. Mamita gracias por absolutamente todo lo que ha hecho por mí, por ayudarme en cada pasito que he dado, siempre será mi superheroína. Papito gracias por todo su apoyo y consejos, por todos los momentos que disfrutamos juntos, es un ejemplo de carácter para mí. Todos mis logros son gracias a ustedes y se los dedico.

A Marbel Torres Ph.D, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por brindarme su apoyo, guía y consejos a lo largo de todo este proyecto. Por ayudarnos siempre en todo lo que está a su alcance y ser un ejemplo a seguir.

A Rachid Sqad Ph.D, por haberme permitido formar parte de este proyecto, por ayudarme y guiarme en la realización del mismo. Es un gran maestro, muchas gracias.

A la Ing. Fernanda Toscano, por haberme guiado y capacitado en este proyecto, por su paciencia e increíbles consejos. Te agradezco enormemente el haber compartido conmigo todos conocimientos y experiencias, aprendí muchísimo de ti.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología y Virología, por los bonitos momentos compartidos y por siempre estar abiertos a brindar su ayuda.

A la Dra. Jaramillo y al Laboratorio de Patología Clínica del Hospital de Especialidades "Eugenio Espejo", por ayudarme a realizar los cortes histológicos. A laboratorio de caracterización de materiales de la Universidad por su colaboración

A ti Alex por siempre creer en mí, por levantarme el ánimo cuando más lo necesitaba y por acompañarme en todo momento. Infinitamente gracias.

A los pulpiamigos: Nathy, Mauro, Paul, Pame, Cris, Karlita, Emy y Cesar, hemos vivido muchos momentos increíbles, los quiero demasiado. A Vane y Joshua que, a pesar de estudiar diferentes carreras, el cariño y el apoyo nunca ha cambiado.

Índice de Contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
Listado de Abreviaturas.....	14
Resumen	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción	18
<i>Antecedentes</i>	18
<i>Justificación e Importancia</i>	21
<i>Objetivos Generales y Específicos</i>	24
<i>Objetivo General:</i>	24
<i>Objetivos Específicos:</i>	24
Capítulo II: Marco Teórico.....	25
<i>Volcanes y Ceniza Volcánica</i>	25
<i>Volcán Cotopaxi</i>	28
<i>Volcán Tungurahua</i>	29
<i>Volcán Pichincha</i>	30
<i>Sistema Respiratorio</i>	31
<i>Pulmón</i>	33
<i>Estructura Celular del Sistema Respiratorio</i>	35
Células de las Vías Aéreas.	36

	9
Células de la Región Alveolar	39
Respuesta Inmunológica del Sistema Respiratorio	41
<i>Inmunidad Innata</i>	43
<i>Inmunidad Adaptativa</i>	50
<i>Respuesta Ante una Lesión Pulmonar</i>	54
Efecto Potencial Tóxico de la Ceniza Volcánica	57
Modelo Animal	61
Capítulo III: Metodología	65
Método Científico	65
Localización Geográfica	65
Modelo Animal	65
Ceniza Volcánica	66
Experimentación con Animales	66
<i>Preparación de la Ceniza Volcánica</i>	66
<i>Instilación Intratraqueal de la Ceniza Volcánica</i>	66
<i>Evaluación de Mortalidad y Peso Corporal del Modelo Animal</i>	69
<i>Sacrificio Animal y Observación Macroscópica de los Pulmones Murinos</i>	69
Evaluación a Nivel Celular: Histología del Tejido Pulmonar Murino	70
<i>Inclusión en Parafina y Corte Histológico</i>	70
<i>Desparafinado e Hidratación del Tejido Pulmonar</i>	71
<i>Tinción de Hematoxilina & Eosina</i>	71
Evaluación a Nivel Molecular: Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa	72
<i>Aislamiento de RNA de Tejido Pulmonar Murino</i>	72
<i>Retro-transcripción de RNA</i>	74

	10
<i>Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) Convencional</i>	75
<i>Análisis de Expresión Mediante PCR en Tiempo Real</i>	77
Cuantificación Absoluta de Marcadores de Inflamación y Receptores.	79
Cuantificación relativa de marcadores de inflamación y receptores.	79
<i>Cuantificación Comparativa Método del Cociente.</i>	80
<i>Análisis de datos</i>	80
Capítulo IV: Resultados	81
<i>Evaluación de mortalidad y peso corporal</i>	81
<i>Evaluación macroscópica de los pulmones de ratón</i>	85
<i>Tinción de hematoxilina & eosina de tejido pulmonar murino</i>	89
<i>Análisis de expresión génica de citoquinas</i>	94
Capítulo V: Discusión	99
<i>Evaluación de mortalidad y peso corporal</i>	99
<i>Evaluación macroscópica de los pulmones de ratón</i>	101
<i>Tinción de hematoxilina & eosina de tejido pulmonar murino</i>	103
<i>Análisis de expresión génica de citoquinas</i>	107
Capítulo VI: Conclusiones	120
Capítulo VII: Recomendaciones	122
Referencias	123

Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Células involucradas en la respuesta inmune innata.</i>	44
Tabla 2. <i>Células que participan en la Inmunidad Adaptativa.</i>	51
Tabla 3. <i>Diseño experimental para la exposición a ceniza volcánica en modelos in vivo.</i>	68
Tabla 4. <i>Secuencias y características de los cebadores de ratón diseñados para qPCR.</i>	75
Tabla 5. <i>Programa PCR convencional.</i>	77
Tabla 6. <i>Programa de amplificación de qPCR con Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.</i>	78
Tabla 7. <i>Características morfológicas de los pulmones expuestos a ceniza volcánica.</i>	87

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Distribución de volcanes continentales potencialmente activos y extintos.</i>	28
Figura 2. <i>Representación gráfica del sistema respiratorio.....</i>	32
Figura 3. <i>Estructuración del sistema respiratorio.....</i>	33
Figura 4. <i>Estructura de los pulmones.....</i>	34
Figura 5. <i>Estructura de las vías respiratorias.....</i>	34
Figura 6. <i>Estructura alveolar.....</i>	35
Figura 7. <i>Corte histológico de las células de las vías aéreas.....</i>	38
Figura 8. <i>Neumocitos tipo I y tipo II en cortes histológicos de alveolos.....</i>	41
Figura 9. <i>Diagrama de penetración de partículas en el pulmón.....</i>	42
Figura 10. <i>Respuesta inmune en las vías respiratorias.....</i>	46
Figura 11. <i>Distribución celular en el tracto respiratorio.....</i>	47
Figura 12. <i>Tipos de macrófagos pulmonares presentes en una región alveolar.....</i>	48
Figura 13. <i>Respuesta celular Th1 y Th2.....</i>	54
Figura 14. <i>Pulmón sano vs daño pulmonar en fase exudativa.....</i>	56
Figura 15. <i>Identificación mediante perforación en las orejas de ratones.....</i>	67
Figura 16. <i>Esquema de desparafinado e hidratación de tejido pulmonar murino.....</i>	71
Figura 17. <i>Esquema de extracción de RNA con TRIzol.....</i>	73
Figura 18. <i>Porcentaje de supervivencia post-exposición a ceniza volcánica.....</i>	82
Figura 19. <i>Curva de porcentaje de variación de peso corporal tras una corta exposición.</i>	83
Figura 20. <i>Curva de porcentaje de variación de peso corporal tras una larga exposición.</i>	84
Figura 21. <i>Efecto de la ceniza volcánica a nivel macroscópico en tejido pulmonar murino.....</i>	86

Figura 22. Efecto de la ceniza volcánica en la relación peso pulmón / peso corporal... 88	88
Figura 23. Cortes de tejido pulmonar murino sano..... 89	89
Figura 24. Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Cotopaxi. . 90	90
Figura 25. Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Pichincha. 92	92
Figura 26. Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Tungurahua. 93	93
Figura 27. Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi en concentraciones de 0.5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal... 96	96
Figura 28. Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Pichincha en concentraciones de 0.5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal. 97	97
Figura 29. Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Tungurahua en concentraciones de 0.5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal. 98	98

Listado de Abreviaturas

PM	Material particulado
PM ₁₀ y PM _{2.5}	Material particulado menor a 10 µm y menor a 2.5 µm
NLRP3	El dominio de pirina de la familia NLR 3
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-8	Interleucina 8
ASC	Sitio de reclutamiento y activación de caspasa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
INF- γ	Interferón gamma
SiO ₂	Oxido de silicio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
HF	Ácido Fluorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
CaO	Óxido de calcio
MgO	Óxido de magnesio
K ₂ O	Óxido de potasio
TiO ₂	Óxido de titanio
Na ₂ O	Óxido sodio
Al ₂ O ₃	Óxido de aluminio
Fe ₂ O ₃	Óxido férrico
P ₂ O ₅	Óxido fosforoso
SO ₃	Óxido de azufre
ATA1	Células alveolares tipo 1

ATA2	Células alveolares tipo 2
ARNm	ARN mensajero
DC	Célula dendrítica, por sus siglas en ingles Dendritic cell
APC	Célula presentadora de antígeno
TH	Linfocitos T auxiliares o helper
CTL	Linfocito citotóxico
NK	Asesinos naturales
NKT	Linfocito T asesinos naturales
AM	Macrófagos alveolares
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMP	Patrones moleculares asociados a peligro
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
LPS	Lipopolisacárido
cDNA	ADN complementario
TLR	Receptor tipo toll
H&E	Tinción hematoxilina y eosina
NFkB	Factor nuclear kappa beta
BALF	Fluido de lavado bronquioalveolar
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
PC	Peso corporal
PBS	Buffer fosfato salino
Ct	Ciclo umbral
SQ	Starting quantity – cantidad inicial
pb	Pares de bases

Resumen

Las erupciones volcánicas son sucesos sorprendentes del mundo natural que producen una importante carga de partículas en el ambiente y pueden generar afectaciones en la salud humana. Ecuador al encontrarse dentro del cinturón de fuego del pacifico por lo que se encuentra potencialmente afectado por los riesgos volcánicos, entre los que se incluye la exposición a ceniza volcánica. Varios estudios han informado de los efectos sobre la salud de algunos materiales volcánicos como minerales fibrosos, abestiformes y silíceos, entre los cuales están la inducción de un proceso inflamatorio hasta el desarrollo de fibrosis. Debido a la falta de estudios sobre los efectos de la ceniza de volcanes ecuatorianos en la salud y que los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua se encuentran entre los más activos dentro de los últimos años, el objetivo de este estudio fue valorar la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de los 3 volcanes ecuatorianos en un modelo *in vivo* mediante qPCR. Para ello se realizó la exposición de la ceniza en ratones BALB/c en tres concentraciones de 0.5, 1 y 3.75 mg / 100 g de peso corporal, al finalizar el periodo de exposición corto y largo, se obtuvieron cortes histológicos y mRNA de los pulmones murinos para analizar la expresión de TNF- α , IL-8, ASC y NLRP3 mediante qPCR. Los resultados obtenidos mostraron que la ceniza volcánica causa un proceso inflamatorio a concentraciones altas y dependiendo de la fuente de la ceniza puede incluso desarrollar ocasionar una lesión pulmonar que termina en un proceso fibrótico.

Palabras clave:

- ANÁLISIS HISTOLÓGICO
- MARCADORES DE INFLAMACIÓN
- LESIÓN PULMONAR

Abstract

Volcanic eruptions are surprising events in the natural world that produce a significant particle load in the environment and can affect human health. Ecuador is located within the Pacific Rim fire belt and is therefore potentially affected by volcanic hazards, including exposure to volcanic ash. Several studies have reported on the health effects of some volcanic materials such as fibrous, abestiform and siliceous minerals, among which are the induction of an inflammatory process until the development of fibrosis. Due to the lack of studies on the effects of ash from Ecuadorian volcanoes on health and that the Cotopaxi, Pichincha and Tungurahua volcanoes are among the most active within the last years, the objective of this study was to evaluate the inflammatory response induced by the exposure of ash from the 3 Ecuadorian volcanoes in an in vivo model using qPCR. For this purpose, ash exposure was performed in BALB/c mice in three concentrations of 0.5, 1 and 3.75 mg / 100 g of body weight. At the end of the short and long exposure period, histological and mRNA slides were obtained from the murine lungs to analyze the expression of TNF- α , IL-8, ASC and NLRP3 by means of qPCR. The results obtained showed that the volcanic ash causes an inflammatory process at high concentrations and depending on the source of the ash can even develop a lung lesion that ends in a fibrotic process.

Keywords:

- **HISTOLOGICAL ANALYSIS**
- **INFLAMMATORY MARKERS**
- **LUNG INJURY**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Varios estudios han informado de los efectos sobre la salud de algunos materiales volcánicos meteorizados (por ejemplo, minerales fibrosos y asbestiformes). No obstante, las investigaciones en laboratorios sobre los efectos de la exposición a ceniza volcánica en la salud de poblaciones potencialmente afectadas por erupciones volcánicas son limitadas (Claire J. Horwell & Baxter, 2006). El primer estudio relacionado con los efectos biológicos de la ceniza volcánica fue realizado y publicado por Horton & McCaldin (1964), en donde se evidenció que la caída de ceniza de 1963-1965 de Irazú, Costa Rica, podía exacerbar una enfermedad pulmonar preexistente; además se demostró que podía generar efectos irritantes agudos y transitorios en los ojos y el tracto respiratorio superior, durante las caídas de cenizas intensas y durante algunos días después. Horton y McCaldin también observaron que la ceniza estaba formada por 1% de sílice cristalina y que la ceniza volcánica fresca podía contener cantidades dañinas de sílice cristalina respirable (Claire J. Horwell & Baxter, 2006).

En 1979, Leus y West informaron sobre la bronquitis asmática después de la erupción del volcán La Soufrière, St. Vincent, West Indies, en un número de bebés previamente sanos (Claire J. Horwell & Baxter, 2006). Sin embargo, cuando el Monte St. Helens, en Estados Unidos, erupcionó violentamente el 18 de mayo de 1980, se comenzaron a llevar a cabo inmediatamente diversos estudios clínicos, epidemiológicos y toxicológicos. Varios laboratorios comenzaron a estudiar rápidamente los efectos de la ceniza volcánica en sistemas modelo *in vitro* e *in vivo*, mediante técnicas que utilizaban previamente para evaluar los efectos de varios minerales en la salud (Claire J. Horwell & Baxter, 2006; Thomas R Martin et al., 1986).

Los enfoques experimentales usados para medir los efectos biológicos de las cenizas volcánicas que se han utilizado son los estudios *in vitro*, estudios de inyección intratraqueal y estudios de inhalación. Los estudios *in vitro* que usan cultivos de tejidos han dotado de aproximaciones rápidas a los efectos tóxicos de minerales de prueba y de referencia en células que participan en la toxicidad *in vivo*, por ello se han llevado a cabo estudios *in vitro* en macrófagos alveolares, neumocitos y eritrocitos (Thomas R Martin et al., 1983). En los estudios *in vivo* se han utilizado dos enfoques que han permitido determinar los efectos de la exposición a ceniza volcánica en los pulmones como la inyección intratraqueal de ceniza volcánica y los estudios de inhalación que se han realizado en hámster, cobayos y principalmente en ratas (Thomas R Martin et al., 1983).

A partir de la erupción del Monte St. Helens se comenzaron a evaluar la toxicidad de la ceniza de varios volcanes. Hasta el 2004, se han registrado aproximadamente 9 estudios *in vivo* para evaluar la toxicidad de la ceniza emanada por el Monte St. Helens (Claire J. Horwell & Baxter, 2006). En uno de los primeros estudios realizados por Akematsu, Dodson, Williams, & Hurst (1982) se observó daño celular causado por la ceniza después de la instilación de cobayos después de 7 días de exposición, también se confirmó la presencia de fagocitos, tanto macrófagos como neutrófilos. Los efectos en la salud humana de varios volcanes como el monte Sakurajima en Japón, Soufrière Hills en Montserrat – Antillas, Pinatubo en Filipinas, Popocatepetl en México, Spurr en Alaska, Cerro Negro en Nicaragua y otros han sido estudiados (Claire J. Horwell & Baxter, 2006).

Incluso, Housley et al. (2002) evidenciaron la bioreactividad de la cristobalita, componente de algunas cenizas volcánicas, en ratas Sprague-Dawley. En este estudio se observó un aumento significativo en la relación peso pulmón: peso corporal lo cual

proporciona una medida de edema y, por lo tanto, aumentó la permeabilidad epitelial en pulmones. Se produjo un aumento el número de células libres en relación con el control, en su mayoría eran macrófagos. A pesar de que el daño pulmonar en la célula epitelial tipo 1 no fue significativo, se observó un aumento en la producción de tensioactivo. Los aumentos progresivos en la permeabilidad e inflamación, evidenció hiperplasia; se produjo daño de células tipo 2 y el inicio de una lipoproteinosis leve, caracterizada por la acumulación de surfactante superficial.

La caída de cenizas sustancial, especialmente el material fino, contribuye significativamente al material particulado (PM) ambiental por emisión directa y la resuspensión las mismas (Damby et al., 2017). El tamaño de grano de las partículas de ceniza es de importancia crítica y se define en términos del diámetro aerodinámico, el material particulado de menos de 10 μm de diámetro (PM_{10}) se clasifica como torácico y respirable si es inferior a 4 μm (Claire J. Horwell & Baxter, 2006). De acuerdo a la Organización mundial de la salud, PM_{10} no debe superar el promedio de 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ durante 24 horas y el promedio anual de 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; para material particulado menor a 2.5 μm de diámetro ($\text{PM}_{2.5}$) se recomienda no superar 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ en 24 horas y anualmente los 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, ya que altas exposiciones son adversas para la salud (WHO, 2005).

En el Ecuador los volcanes que han sido objeto de interés en un estudio sobre el efecto de la ceniza en la generación de radicales libre fueron el Tungurahua y el Reventador junto con otros volcanes de diferentes partes del mundo. Finalmente, se mostró que la ceniza volcánica genera radicales hidroxilos, especialmente en muestras que eran ricas en hierro y pobres en sílice como la ceniza basáltica. Con lo que se concluyó que este tipo de ceniza, que no se consideraba como un peligro por su bajo contenido de sílice, se debería considerar como un potencial tóxico (Claire J. Horwell &

Baxter, 2006). En el año 2018 se evaluaron los efectos tóxicos de la ceniza del volcán Pichincha en un modelo *in vitro* con células de cáncer de pulmón, macrófagos pulmonares, células McCoy y en un modelo *in vivo* con el uso de ratones, en este último se realizó una exposición de ceniza a 3 concentraciones. Los resultados concluyeron en que la ceniza inició la activación del complejo inflamasoma NRLP 3 y de una actividad proinflamatoria en el tejido pulmonar murino, en el caso de las células se evidenció una disminución en viabilidad de las mismas en función del tiempo de exposición y la concentración (Aguilera et al., 2018). Pese a las investigaciones mencionadas y algunas más, el número de estudios clínicos, epidemiológicos y toxicológicos son bajos y presentan una visión limitada sobre las consecuencias agudas y crónicas de la exposición a corto y largo plazo, por lo que aún faltan estudios sobre el impacto para la salud humana de las diferentes cenizas volcánicas (Claire J. Horwell & Baxter, 2006), especialmente las de nuestro país.

Justificación e Importancia

Vivir cerca de volcanes activos siempre ha representado un peligro, este hecho ya ha sido documentado desde la antigüedad con numerosas catástrofes volcánicas que ha matado a cientos de personas y en la actualidad con imágenes satelitales de erupciones volcánicas (Naumova et al., 2007). A pesar de ello aproximadamente 600 millones de personas viven dentro de los 100 km a la redonda de volcanes activos, áreas potencialmente afectadas por los riesgos volcánicos (Monick et al., 2013; Tesone et al., 2018). Las erupciones volcánicas explosivas generan altas columnas de cenizas y su caída puede afectar extensas áreas pobladas más allá de la de las cercanías de un volcán no solo con pérdidas económicas, también con posibles efectos adversos a la salud. Desde la erupción de 1980 del Monte St. Helens, EE. UU., se conoce que una fracción sustancial de dicha eyección de ceniza está constituida por partículas del

tamaño de micras o incluso de submicras y, por lo tanto, puede representar un peligro para la salud respiratoria humana (Damby et al., 2018; Tesone et al., 2018).

La ceniza volcánica está compuesta principalmente por cristales de sílice (sílice), conocida como dióxido de silicio (SiO_2) y se sabe que una exposición inhalatoria crónica a la sílice conduce a una inflamación pulmonar aguda, lo que resulta en una forma de fibrosis pulmonar llamada silicosis (Unno et al., 2014). Las emanaciones constantes de ceniza volcánica pueden generar concentraciones en aire de 10-35 mg/m^3 o incluso mayores y concluido el proceso eruptivo la concentración de ceniza podría descender a valores cercanos a 1 mg/m^3 , las cuales al encontrarse suspendidas y ser de pequeño tamaño pueden ingresar al tracto respiratorio y causar problemas (Monick et al., 2013). Los efectos agudos de la caída de cenizas volcánicas y gases en las condiciones respiratorias varían de no detectados a bien definidos. Se han observado efectos irritantes en las mucosas de tracto respiratorio, infecciones y otros problemas tanto por la fuerte caída de ceniza volcánica como por los gases que se deriva en una erupción. Esta situación se ha podido observar en erupciones recientes en Cerro Negro de Nicaragua, monte Sakura-jima en Japón y el volcán Tungurahua en Ecuador (Damby et al., 2018; Monick et al., 2013; Naumova et al., 2007).

La exposición a partículas que pueden ser inhaladas se ha correlacionado con el desarrollo de enfermedades pulmonares inflamatorias que en algunos casos conducen a cambios de tejido fibrótico en el pulmón. Estudios han demostrado que la exposición a partículas, tanto en células epiteliales alveolares humanas como de ratón puede inducir la expresión de una variedad de citoquinas inflamatorias (Thomas R Martin et al., 1983). La respuesta celular desencadenada por la presencia de estructuras sólidas, cristalinas, amorfas o fibrosas, como lo son los componentes de la ceniza volcánica lleva a la activación del inflammasoma, especialmente al inflammasoma NLRP3 para la producción de

IL-1 β (Shu & Shi, 2018). Estas citocinas de IL-1 son mediadores potentes de la inmunidad innata en respuesta a la exposición a la sílice cristalina, componente de la ceniza volcánica (Damby et al., 2018).

Los estudios experimentales realizados en modelos *in vitro* e *in vivo* en animales pueden proporcionar estimaciones relativamente rápidas de la toxicidad potencial de agentes respirables con niveles de exposición controlada y en varios periodos de exposición. Los ratones se han utilizado en muchos experimentos por su facilidad de manejo y bajo costo. Las técnicas para la inyección intratraqueal son reproducibles y permite medir parámetros similares entre estudios, los pulmones pueden evaluar por análisis macroscópico (Thomas R Martin et al., 1983).

El Ecuador tiene más de 250 volcanes continentales y casi 3000 volcanes en las islas Galápagos (Toulkeridis, 2013), de la gran cantidad de volcanes, 8 son considerados activos, de los cuales destacan el Pichincha por su cercanía a la ciudad de Quito, el Reventador por sus históricas erupciones, el Tungurahua con erupciones frecuentes y el Cotopaxi que en 1768 produjo una fuerte erupción con una gran nube de ceniza (Comunidad Andina, 2009). Las últimas erupciones de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua se produjeron en el 2015, 1999 y 2006 respectivamente. Los eventos eruptivos de estos volcanes implican grandes columnas de ceniza y poblaciones cercanas que podrían verse afectadas por estos eventos naturales causando la activación celular y la afectación de la inflamación crónica a nivel pulmonar.

En la actualidad aún no existe información suficiente sobre los efectos agudos y crónicos en la salud respiratoria de las emisiones volcánicas o su mecanismo de activación celular (Naumova et al., 2007). En el país hay pocas investigaciones del efecto que tiene la ceniza volcánica en la salud humana a pesar de tener varios volcanes activos con erupciones frecuentes. Un artículo publicado recientemente por

Aguilera et al. (2018) evaluó los riesgos de la exposición a la ceniza del Volcán Pichincha, sin embargo, para los volcanes Tungurahua y Cotopaxi no existe evidencia alguna de su inocuidad o su toxicidad. Por ello la presente investigación busca analizar si estas partículas de ceniza son perjudiciales para los seres humanos a través de un modelo animal y cuál es el mecanismo que podría estar causando el daño en el organismo.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General:

Evaluar la respuesta inflamatoria inducida por la exposición de ceniza de 3 volcanes ecuatorianos en un modelo *in vivo* mediante qPCR.

Objetivos Específicos:

- Realizar la exposición de ceniza volcánica de tres volcanes: Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua en ratones de 10 semanas y determinar la afección provocada *in vivo* mediante mortalidad y peso.
- Identificar lesiones histológicas en tejido pulmonar murino provocadas por la exposición a ceniza volcánica mediante tinción histoquímica.
- Determinar el nivel de expresión génica de la respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar murino mediante qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa).

Capítulo II: Marco Teórico

Volcanes y Ceniza Volcánica

Los volcanes son entornos geológicos en los que el magma es generado dentro de la corteza de la tierra y fluyen hacia la superficie; básicamente los volcanes se caracterizan por tres elementos ligados: magma, erupciones y edificios, estos últimos son las expresiones geomórficas de los volcanes (Borgia et al., 2010). Las características de los volcanes dictan su morfología: los estratovolcanes son conos altos con calderas característico de un hundimiento, los volcanes de escudos tienen un perfil amplio y bajo; y los volcanes pequeños se caracterizan por ser de tipo conos o anillos productos de una sola erupción (White & Ross, 2011).

El tipo de erupción depende de la cantidad y el comportamiento de contenido del magma: los magmas calientes y menos viscoso, los tipos basálticos, permiten que el gas se separe de manera más eficiente haciéndolos menos violentos; por otro lado, los magmas más viscosos y fríos, característicos de los dacíticos, andesíticos y riolíticos, pueden fragmentarse violentamente durante la erupción (Bernabé et al., 2015; Hansell, 2006). Junto con las erupciones volcánicas se producen otras amenazas como la caída de tetra y proyectiles balísticos, flujos piroclásticos, lahares, temblores, peligros asociados con domos de lava y emisiones de gases venenosos o corrosivos (Bernabé et al., 2015).

La ceniza volcánica es un conjunto de partículas con un diámetro menor a 2 mm, que pertenecen o se encuentran formando parte del material fragmentario emitido por los volcanes como resultado de la fragmentación de magma y roca, denominado tefra (Hansell, 2006; Zimanowski et al., 2003). En general la tefra genera varios riesgos para la salud, ya sea por inhalación, abrasión de la piel y la conjuntiva por la temperatura del material o por los impactos en los ambientes terrestres y acuáticos, por ejemplo, afectando la vegetación. Además, la tefra transporta gases volátiles eliminados como el

flúor, que pueden llegar a ser tóxico para los animales (Hansell, 2006). La fuerza de la erupción y dirección del viento controlan el transporte a larga distancia de la tefra y por lo tanto de la ceniza, así como su disposición (Mart & Ernst, 2005). Los fragmentos más grandes y pesados se sitúan más cerca del volcán mientras que los fragmentos más pequeños y ligeros tienden a dispersarse por acción del viento, por lo tanto la distribución del tamaño de partícula se irá reduciendo conforme la distancia aumenta desde el volcán (Jenkins et al., 2015).

La ceniza volcánica es un polvo mineral heterogéneo que generalmente está compuesto por una mezcla de fragmentos amorfos (vidrio) y cristalinos (minerales) (Damby et al., 2018), tiene diferentes características como la composición de la superficie, el tamaño de partícula, propiedades físicas y químicas que depende de la dinámica eruptiva y la composición del magma, por lo que las propiedades de la ceniza pueden variar entre erupciones (Jenkins et al., 2015). La ceniza volcánica está constituida principalmente por sílice cristalina (SiO_2), ya que SiO_2 es principal componente del magma y este puede cristalizarse a medida que el magma va ascendiendo. El contenido de sílice cristalina ha permitido diferenciar volcanes en función a su tipo de magma, los magmas dacíticos tienen una composición entre 63-70% en peso de SiO_2 , los riolíticos entre el 72-76% y los magmas hidratados de basalto y andesita entre el 50-60% SiO_2 , estos últimos son propensos a cristalizarse durante el ascenso. La forma de la ceniza volcánica es muy irregular y con formas aleatoria, incluso se ha determinado que mientras más disminuye su tamaño, las partículas se vuelven más irregulares (Cashman & Rust, 2016).

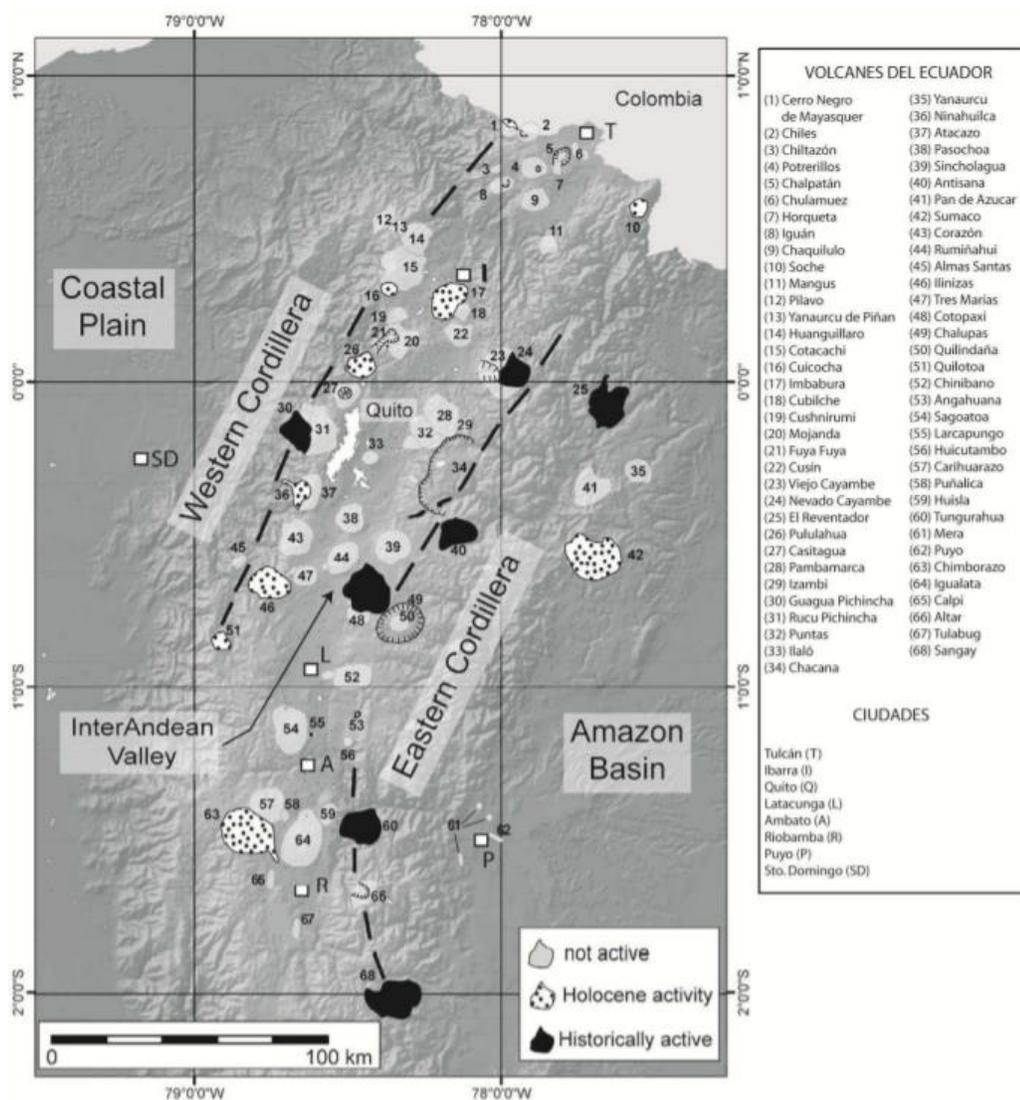
Además de la composición previa mostrada, se sabe que la ceniza puede tener otros minerales. Tal es el caso de los ácidos minerales fuertes como HCl , HF y H_2SO_4 que pueden recubrir fuertemente la superficie de las cenizas durante la formación del

penacho. Las interacciones complejas entre gases primarios y superficies minerales en la fragmentación del magma conducen a la presencia de sales fácilmente solubles en las superficies de cenizas que se liberan al entrar en contacto con el agua u otros fluidos corporales (Jenkins et al., 2015), representando un peligro para la salud.

El Ecuador se encuentra ubicado dentro del cinturón de fuego del Pacífico, al noroeste de América del Sur, por lo cual presenta una actividad volcánica importante (Aroca & Vásquez, 2019). En el país se han contabilizado 83 centros volcánicos entre extintos, potencialmente activos, activos y en erupción, de los cuales 27 son potencialmente activos (Valverde, 2014). Los volcanes ecuatorianos que han estado activos desde aproximadamente 1800 DC son el Antisana, Cayambe, Cotopaxi, Guagua Pichincha, Reventador y Tungurahua (Leonard et al., 2005), estos se ubican en la cordillera occidental, en la cordillera oriental, en el valle interandino y tras el arco de la cordillera, en la región amazónica como se puede observar en la Figura 1 (Leonard et al., 2005; Vallejo, 2011).

Figura 1

Distribución de volcanes continentales potencialmente activos y extintos.



Nota. Adaptado de *Distribución de los volcanes continentales en el Ecuador, en las dos cordilleras, valle interandino y tras arco*, Vallejo, 2011, Escuela Politécnica Nacional.

Volcán Cotopaxi

El volcán Cotopaxi es un estratovolcán cubierto por glaciares ubicado en la Cordillera Oriental de los Andes en Ecuador. Se encuentra localizado a 5897 m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar), cerca de las ciudades de Quito a 60 km, Latacunga a 45

km y Ambato a 70 km (Ettinger et al., 2007). Es el volcán más conocido de Ecuador y uno de los más activos en los últimos 5000 años (Leonard et al., 2005; Ruiz et al., 1996). El volcán tiene dos tipos de erupciones: las andesíticas que se caracteriza por ser erupciones de relativamente leve a moderada intensidad correspondiente a los tiempos históricos y actuales; y las riolíticas, las cuales son explosivas, de mayor magnitud y extensión que han afectado a grandes superficies y se han producido en la prehistoria (Cáceres et al., 2004). Las erupciones se producen periódicamente cada siglo, las más recientes se dieron en los años de 1903 a 1942 y las erupciones históricas más violentas se produjeron en 1744, 1768 y 1942. Desde los años cuarenta el volcán se ha encontrado en silencio hasta el 2015, cuando comenzó un nuevo proceso eruptivo, aunque hasta la actualidad no se ha producido un erupción a gran escala (Leonard et al., 2005).

Al reanudar su actividad volcánica en el 2015, se realizaron análisis de la ceniza emitida por el volcán, en donde se encontraron compuestos de fragmentos densos, diversos tipos de escoria, piedra pómez, cristales fracturados libres, vidrio volcánico y agregados. La ceniza volcánica del Cotopaxi tiene un tamaño de partícula que varía de gruesa a fina con una fracción respirable $PM_{2.5}$ del 1.4-7.9% (Gaunt et al., 2016). Se halló que su composición es basáltica-andesítica con aproximadamente el 55.67% en peso de SiO_2 , también existen altos valores de Al_2O_3 (17.64% en peso), CaO (6.99% en peso), bajos valores de MgO , K_2O y TiO_2 (Troncoso et al., 2017).

Volcán Tungurahua

El volcán Tungurahua con una altura de 5023 m.s.n.m. y 16 km de diámetro se encuentra ubicado en la cordillera oriental de los andes ecuatorianos a 120 km de Quito, a 33 km de Ambato y solo a 8 km de la ciudad de Baños (Hall et al., 1999). Este estratovolcán andesítico-dacítico es considerado uno de los volcanes más activos del Ecuador. El volcán Tungurahua se compone de tres grandes edificios volcánicos y el cono

activo denominado Tungurahua III se encuentra dentro de una gran caldera; toda la actividad volcánica ha ocurrido en el respiradero de la cumbre y se ha caracterizado por explosiones leves o fuertes acompañadas de flujos piroclásticos, lava y lahares que afectan a las poblaciones que se encuentran alrededor del volcán (Steffke et al., 2010). El volcán ha experimentado 17 erupciones desde su descubrimiento en 1532 hasta 1918 (Hall et al., 1999). Desde el año de 1918 a 1999 hubo una etapa de inactividad, la cual se ha reanudado y se ha caracterizado periodos actividad intermitentes hasta la actualidad (Steffke et al., 2010). En julio y agosto del 2006, se da por primera vez dos grandes erupciones explosivas durante este periodo eruptivo, lo cual llevo a una caída de ceniza considerable que afecto incluso a la ciudad de Guayaquil. Se han producido otras erupciones en el 2010, 2012 y 2013 (Instituto Geofísico - EPN, 2020).

Los análisis realizados a la ceniza procedente del volcán Tungurahua del 2014 mostraron una composición de grano muy fino con partículas de tamaño menor a 100 μm en su mayoría. La muestra se caracterizó por ser andesítica con un 59% SiO_2 en peso y 6% de $\text{Na}_2\text{O} + \text{K}_2\text{O}$, también se compone predominantemente por Al_2O_3 , CaO y Fe_2O_3 , en menor porcentaje por MgO , CaO y como componentes trazas en menos del 1% se encontró al TiO_2 , MnO , P_2O_5 y SO_3 (Müller et al., 2019).

Volcán Pichincha

El volcán Guagua Pichincha se encuentra formando parte del complejo volcánico Pichincha el cual consiste en un doble pico: el joven volcán antes mencionado que se encuentra a 4776 m.s.n.m. y el viejo y erosionado Rucu Pichincha que se encuentra a 4627 m.s.n.m. El volcan Guagua Pichincha es un estratovolcán andesítico-dacítico ubicado a 12 km al oeste de Quito, en la zona volcánica Central de los Andes sudamericanos y se ha encontrado activo durante los últimos 50000 años (Robin et al., 2010; H. M. N. Wright et al., 2007). En 1660 se produjo una erupción notable que afecto

severamente a la capital del Ecuador con fuertes caídas de tefra y flujos de escombros, hasta el año de 1981 hubo un periodo de calma, pero en dicho año el proceso eruptivo del volcán se reanuda y posteriormente se produjo una erupción que duro desde septiembre de 1999 hasta marzo del 2001 (Robin et al., 2010).

La ceniza volcánica originada en el Guagua Pichincha se caracteriza por tener partículas finas con morfologías superficiales variables (H. M. N. Wright et al., 2007). El análisis de la ceniza realizado por el Instituto Geofísico de la Politécnica Nacional determinó que la ceniza emitida en la erupción de 1999 contiene predominante mente SiO₂ en un 64% en peso aproximadamente, Al₂O₃ en un 16%, Fe₂O₃ y CaO en un 4%; en menores proporciones se puede encontrar MgO, Na₂O, K₂O, TiO₂, P₂O₅ y MnO (Alvarez & Avilés, 2005). En otro estudio, también determinaron que la composición mineral de la ceniza del volcán incluye feldespato de potasio, cuarzo, hornblenda, hipersteno, augita y biotita en trazas (Vallejo, 2011).

Sistema Respiratorio

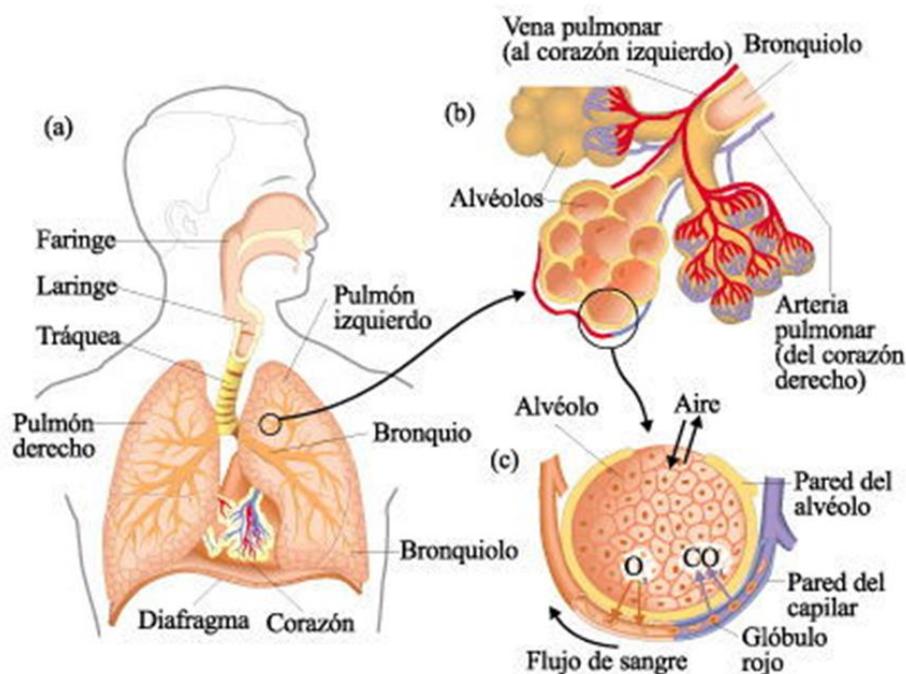
El sistema respiratorio está constituido por una serie de órganos que cumple una función vital ya permite tomar el oxígeno (O₂) del aire, inhalación, y eliminar el dióxido de carbono (CO₂) del cuerpo, exhalación; el principal órgano de este sistema son los pulmones (Pinkerton et al., 2015; Zimmermann, 2019). El sistema respiratorio trabaja con el sistema circulatorio conjuntamente para bombear sangre oxigenada a las células de todo el cuerpo para que realicen sus funciones metabólicas y posteriormente recolectar los desecho como el CO₂ que es expulsado durante la exhalación (Figura 2) (American Lung Association, 2018; Pinkerton et al., 2015; Zimmermann, 2019).

El sistema respiratorio está formado anatómicamente por el tracto respiratorio superior e inferior. El tracto respiratorio superior o región nasofaríngea, incluye a los órganos fuera del tórax como nariz, faringe y laringe funcionan funciona para

humedecer el aire inhalado, ajustar la temperatura y filtrar el aire antes de que llegue al sistema respiratorio inferior. El tracto respiratorio inferior formada por la región traqueobronquial y bronquioalveolar, se encuentra compuesto por los órgano que están dentro del tórax, entre ellos: tráquea, bronquios, bronquiolos, conducto alveolar y alvéolos que permiten transportar el aire a los pulmones donde se produce la respiración como tal (Patwa & Shah, 2015). En cuanto a función, el sistema respiratorio se divide en una zona conductora, que va de nariz a bronquiolos y se encarga transportar el aire desde el exterior al interior ; y una zona respiratoria que permite el intercambio gaseoso constituido por el conducto alveolar y los alvéolos (Figura 3) (Patwa & Shah, 2015; Sepúlveda, 2012).

Figura 2

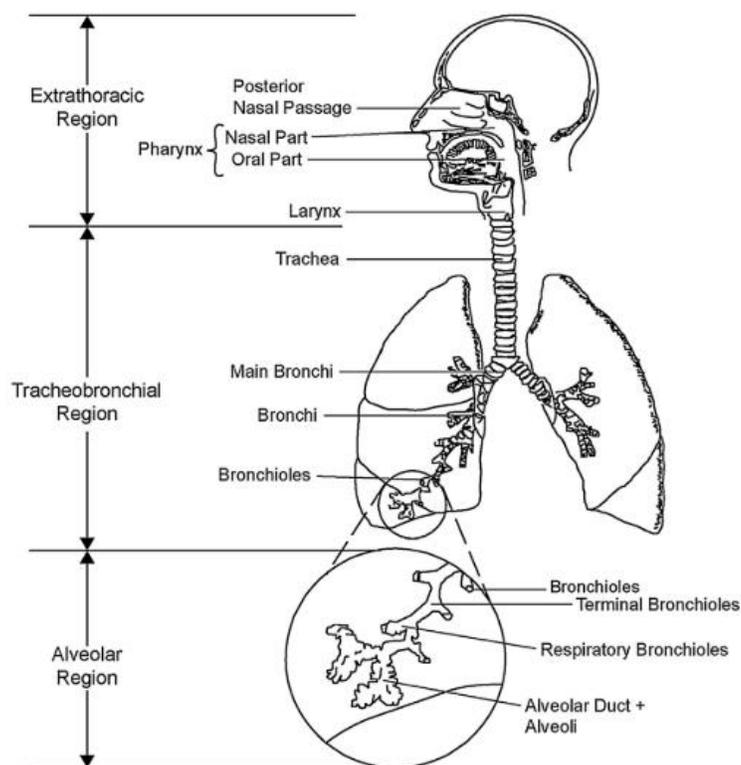
Representación gráfica del sistema respiratorio.



Nota. Adaptado de *¿Qué es el sistema respiratorio?*, por Portal Educativo, n.d., Portaleducativo (<https://www.portaleducativo.net/quinto-basico/14/Sistema-respiratorio>).

Figura 3

Estructuración del sistema respiratorio.



Nota. Adaptado de *Deposition of Particles*, J. S. Brown, 2015, Elsevier.

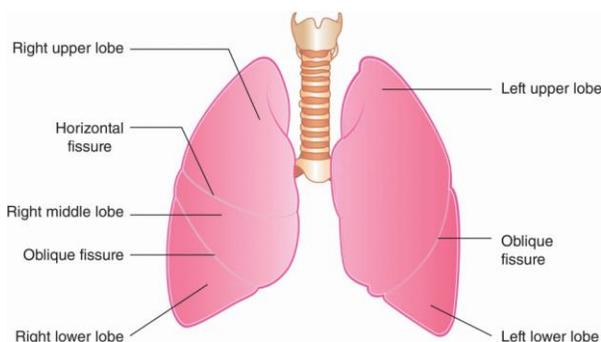
Pulmón

El pulmón se encarga del intercambio de gases, su función principal es permitir que el oxígeno se mueva del aire a la sangre venosa y que salga el dióxido de carbono. El pulmón también cumple otras funciones como metabolizar algunos compuestos, filtrar materiales no deseados de la circulación y puede actuar como reservorio de sangre (West, 2012). Los pulmones tienen forma cónica, se encuentran como un órgano par y se alojan dentro de la caja torácica sobre el diafragma. El pulmón derecho es el de mayor tamaño, posee 3 lóbulos (superior, medio e inferior) y el pulmón izquierdo posee 2 lóbulos (superior e inferior) (Figura 4) (Asenjo & Pinto, 2017). Además, los pulmones son blandos, ligeros y esponjosos, y tienen elasticidad para retraerse hasta en un tercio

de su volumen. El soporte fibroso pulmonar, formado por elastina y colágeno que permiten la distensibilidad y estabilidad (Sánchez & Concha, 2018).

Figura 4

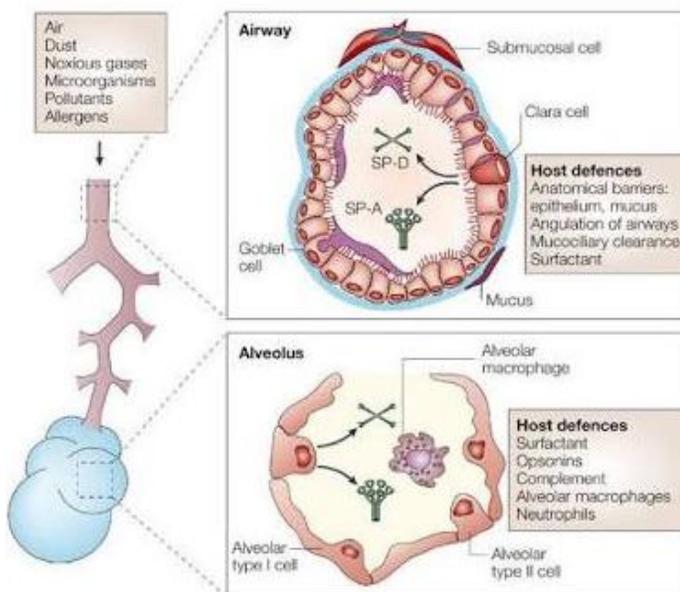
Estructura de los pulmones.



Nota. Adaptado de *Lobes and fissures of the lungs*, Thoracic Key, 2019, Thoracic Key (<https://thoracickey.com/2-embryology-anatomy-and-physiology-of-the-lung/>).

Figura 5

Estructura de las vías respiratorias.



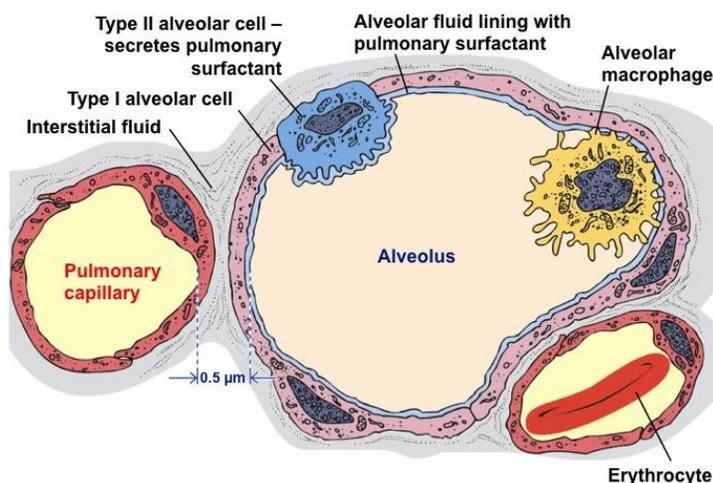
Nota. Adaptado de *What is surfactant ?*, Khan, 2018, Medium

(<https://medium.com/@imsimi90/what-is-surfactant-5aa0dc03ce63>)

Las vías respiratorias consisten en una serie de tubos ramificados, que se vuelven más estrechos, cortos y numerosos mientras más penetran en el pulmón. La tráquea se divide en bronquios principales derecho e izquierdo, que a su vez se dividen en lobular y luego bronquios segmentarios. Este proceso continúa hasta los bronquiolos terminales, que son las vías aéreas más pequeñas sin alvéolos y se consideran un espacio anatómico muerto. Los bronquiolos terminales se dividen en bronquiolos respiratorios, de los cuales brotan alvéolos de sus paredes de forma ocasional (Figura 5). Finalmente, los conductos alveolares están completamente revestidos de alvéolos (Figura 6), donde se produce el intercambio de gases y se conoce como zona respiratoria (West, 2012).

Figura 6

Estructura alveolar.



Nota. Adaptado de *Anatomy & Physiology II Project*, Jogpal et al., 2012, Pinterest (<https://www.pinterest.com/pin/397090892129860904/?autologin=true>).

Estructura Celular del Sistema Respiratorio

El epitelio pulmonar es una superficie mucosa que se compone de células ciliadas, células productoras de moco, células basales y progenitoras indiferenciadas.

Esta barrera epitelial va desde las vías respiratorias superiores hasta los alvéolos y está encargado de mantener la homeostasis en los pulmones (Hamacher et al., 2018). El epitelio inicia con una columna pseudoestratificada y ciliada que va disminuyendo hasta llegar a ser una columna ciliada simple en los bronquiolos. Las células del sistema respiratorio pueden dividirse en células de las vías aéreas (Figura 7) y células de la región alveolar (Figura 8).

Células de las Vías Aéreas.

- **Células ciliadas.** son células largas con un citoplasma pálido y contorno nuclear suave. Los cilios y microvellosidades están presentes en la superficie apical, los cilios tienen un tamaño aproximado 5 μm y un diámetro de 0.5 μm y hay entre 200-300 de ellos en cada célula. Poseen pequeñas proyecciones, las cuales se enganchan con la capa de moco de las vías respiratorias.
- **Células Serosas.** Son células largas con un citoplasma rico en retículo endoplásmico rugoso, tiene gránulos electrones densos ubicados en los ápices.
- **Células Clara.** Son células exocrinas bronquiolares, en apariencia son similares a las células serosas, con un aspecto granular que se relaciona con el abundante retículo endoplásmico liso presente en los ápices de las células. Esto es particularmente evidente en las vías respiratorias de los ratones, donde produce una apariencia de dientes de sierra. La presencia de grandes cantidades de citocromo p450 confiere a estas células un papel importante en la desintoxicación de los tóxicos inhalados. Además, están involucradas en función secretora que inicialmente se creía que era moco, pero más recientemente se ha sugerido es una fuente del surfactante pulmonar.
- **Células Calciformes.** Estas células son raras en las vías respiratorias, son células modificadas, simples, columnares, epiteliales y muy similares en

cualquier tejido que se encuentren. Tienen mucinas en unos gránulos que con la tinción de H&E se tiñen pálidamente.

- **Células neuroendocrinas (NEC).** Estas células tienen una gran cantidad de funciones dentro de los pulmones como detección de oxígeno en las vías respiratorias, regulación del flujo sanguíneo pulmonar, control del tono bronquial y modulación de las respuestas inmunitarias. Los NEC se encuentran en todo el epitelio respiratorio y pueden encontrarse agrupadas en las bifurcaciones de las vías respiratorias o en las uniones de los conductos bronquioalveolares. Son una rica fuente de aminas y péptidos. Estos grupos están innervados en sus bases y tienen microvellosidades apicales.
- **Células basales.** Están próximas a la lámina basal subyacente. Son una característica común del epitelio pseudoestratificado, como el que se observa en la conducción de las vías respiratorias del pulmón. Comprenden entre el 6% y el 30% de las células epiteliales, según su ubicación a lo largo de las vías respiratorias. Las células basales de las vías respiratorias son una población de células madre multipotentes que impulsan tanto la homeostasis del epitelio normal como su regeneración ordenada después de una lesión y es probable también contribuyan a la susceptibilidad, el inicio y la progresión de la enfermedad.
- **Células Brush.** Son células poco comunes. Son de forma columnar con vesículas apicales y aunque se ven a lo largo de la vía aérea, son más numerosos en la región del bronquiolo terminal y forman parte del revestimiento alveolar. Tienen microvellosidades achaparradas de alrededor de 0,5-1 μm de largo, 150-180 nm de ancho y se encuentran alrededor de 120-140 por célula. En la actualidad, se desconoce la función precisa de las células del cepillo

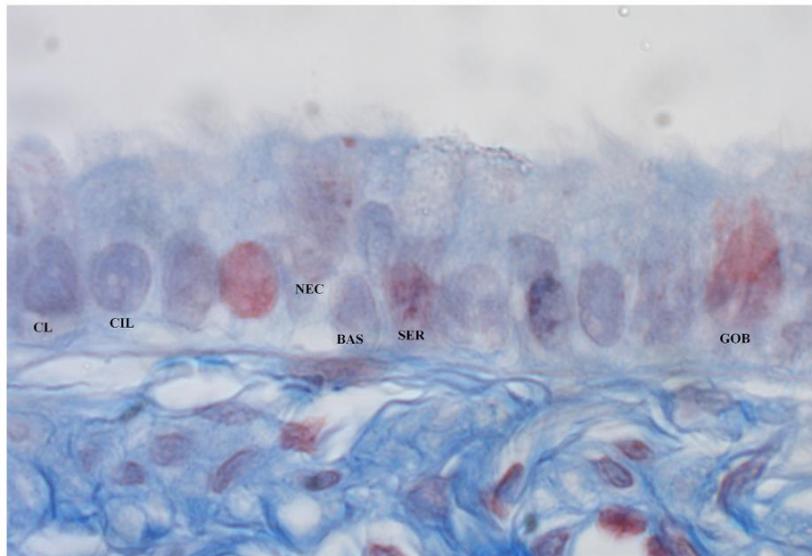
pulmonar, aunque se cree que tiene una función de absorción o una función de quimiorreceptor para desintoxicación, vigilancia inmunitaria o como sensor para el líquido alveolar o la tensión del aire alveolar. Incluso puede tener papel en la regeneración celular.

- **Células intermedias.** Son células no ciliadas, con proyecciones filiformes de la superficie apical. Posiblemente sean una forma intermedia entre las células basales y las células ciliadas.

(Maynard & Downes, 2019).

Figura 7

Corte histológico de las células de las vías aéreas.



Nota. (CIL, células ciliadas; SER, células serosas; CL, células Clara; BAS: células basales; GOB: células calciformes; and NEC, células neuroendocrinas). Adaptado de "The Lung" (p. 130), por Maynard & Downes, 2019, *In Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*, 100(7).

Células de la Región Alveolar. Los alveolos son las estructuras esenciales para el intercambio de gases, miden aproximadamente 300 μm de diámetro en los seres humanos, el doble que en ratas. La pared alveolar es delgada, los septos entre los alveolos adyacentes son de tipo sándwich, con dos capas de epitelio alveolar y una única capa de capilares con tejido conectivo de soporte que proporciona el relleno. La barrera a la difusión es aún más delgada, el epitelio alveolar, está separado del endotelio capilar solo por las membranas basales fusionadas del epitelio y el endotelio. El capilar pulmonar está fusionado por la membrana basal a las células alveolares tipo I y a tejido conectivo del intersticio, que contiene los componentes fibrosos y celulares del tejido conectivo laxo: colágeno, fibras elásticas y de reticulina, fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y leucocitos (Maynard & Downes, 2019). El epitelio alveolar (Figura 6 y 8), cuyo tamaño varía entre 0,1-0,2 μm cubre el 99% de la superficie aérea del pulmón y está constituida por algunos tipos de células importantes (Hamacher et al., 2018):

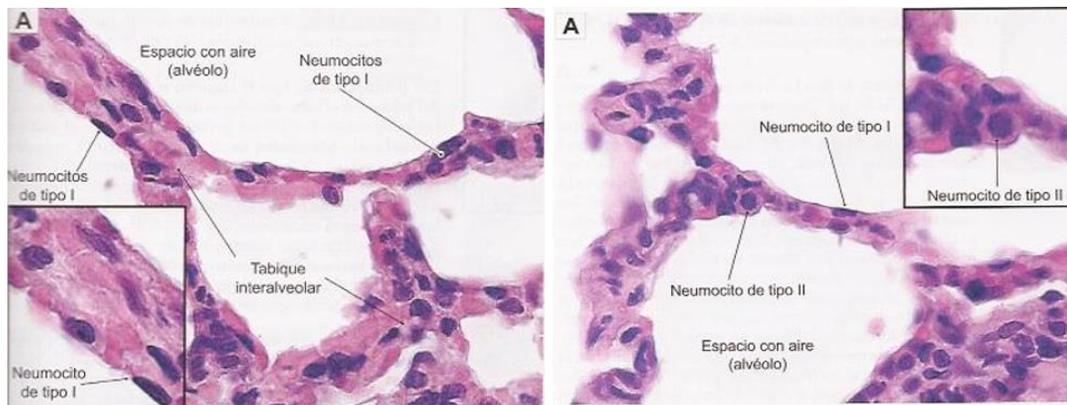
- **Células alveolares de tipo I (AT1).** También llamados neumocitos tipo I cubren la gran mayoría de la superficie alveolar, al menos el 95%, son células con una gran extensión de citoplasma delgado y un núcleo central. Estas células no pueden dividirse y son reemplazadas lentamente por las células de tipo II que se diferencian en células de tipo I. Tras un daño a las AT1 por sustancias inhaladas, se desencadena una gran expansión poblacional de las células tipo II y los alvéolos se recubren con un epitelio cuboidal hasta su diferenciación en epitelio normal de las células de tipo I. Las AT1 son la convergencia entre el epitelio alveolar y el endotelio vascular. Esto proporciona una barrera hermética que facilita el intercambio eficiente de gases y el movimiento de líquidos y proteínas.

- **Células alveolares tipo II (AT2).** También llamadas neumocitos tipo II, cubren aproximadamente el 5% de la superficie alveolar, tienen una forma cubica y se encuentran a menudo en grupos de dos o tres en las esquinas de los alveolos. Las AT2 son conocidas especialmente por su función clave en la secreción de surfactante y en el transporte de Na^+ que permite la eliminación de líquido del espacio alveolar. El surfactante reduce la tensión superficial de la película de revestimiento, reduciendo el "tirón" en el intersticio y previniendo la inundación alveolar, manteniendo los alvéolos relativamente secos.
- **Macrófagos alveolares.** Estas células patrullan la superficie alveolar. Estas células grandes eliminan las bacterias y partículas del espacio alveolar. Cuando ya han cumplido su función, los macrófagos alveolares salen de los alvéolos hacia los conductos alveolares y se unen a la escalera mecánica del moco en el bronquiolo terminal. Algunos mamíferos tienen una población residente significativa de macrófagos dentro de la circulación pulmonar, pero las ratas parecen tener solo unas pocas de ellas.

(Hamacher et al., 2018; Maynard & Downes, 2019).

Figura 8

Neumocitos tipo I y tipo II en cortes histológicos de alveolos.



Nota. Adaptado de *Aparato Respiratorio*, UJAP, 2017, Microbiota Infantil (<http://microbiotainfantil.blogspot.com/2017/05/aparato-respiratorio.html>).

Respuesta Inmunológica del Sistema Respiratorio

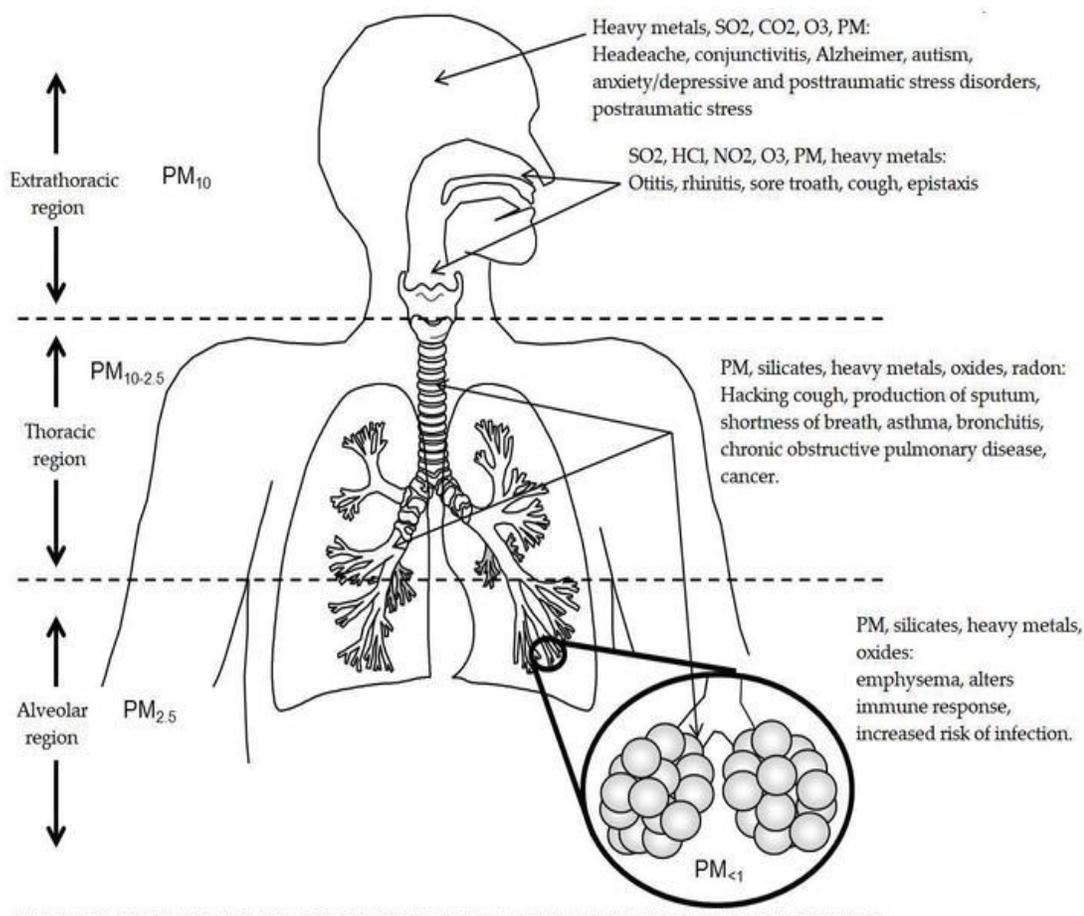
El sistema respiratorio está expuesto constantemente a microorganismos (virus, bacterias, esporas), partículas (polvo, asbesto) y gases (humo, tabaco, etc), los cuales son inhalados durante la respiración. Los componentes de los sistemas respiratorios superior e inferior actúan juntos para realizar dos funciones principales y complementarias: intercambio de gases y la defensas físicas e inmunológicas (Burlison & Schlesinger, 2015; Sánchez & Concha, 2018).

El destino de las partículas depende de su tamaño; las partículas grandes ($>10 \mu\text{m}$) se eliminan inicialmente al impactar con el exterior de la nariz, al ingresar se quedan atrapadas en la mucosa húmeda y al alcanzar la faringe debido a que no pueden girar rápidamente no ingresan a mayor profundidad. Las partículas con un tamaño medio ($4-8 \mu\text{m}$) se quedan en las pequeñas vías respiratorias debido a su peso, se depositan en gran cantidad en la tráquea, bronquios y los bronquiolos terminales. Las partículas más pequeñas o muy finas ($<1-3 \mu\text{m}$) consiguen llegar a los alveolos, en

donde pueden ser exhaladas con la siguiente respiración o depositarse en las paredes alveolares (Figura 9) (Jenkins et al., 2015; Thomas, 2013; West, 2012). Una vez depositados, estas partículas pueden ser eliminadas en la mucosidad al ser tragadas o expectoradas cuando se quedan en las paredes bronquiales; cuando se depositan en los alveolos las partículas son envueltas por macrófagos que salen a través de la sangre o los vasos linfáticos (West, 2012).

Figura 9

Diagrama de penetración de partículas en el pulmón.



Nota. Adaptado de Health Impact of Volcanic Emissions (p. 270), Sierra-Vargas et al., 2018, InTech.

El sistema inmune en general se compone de una complicada red de células linfoides y no linfoides que se comunican para proteger al individuo contra agentes extraños y enfermedades. El sistema inmune pulmonar participa en funciones inmunológicas localizadas y también puede comunicarse con el sistema inmune adaptativo, los mecanismos son eficientes y mantienen al tracto respiratorio inferior libre de microorganismos infecciosos y con la microbiota en balance (Burleson et al., 2015; Ramírez-Labrada et al., 2020). La activación del sistema inmune pulmonar tiene como objetivo prevenir enfermedades a pesar de la exposición continua a antígenos, para ello actúan varios subconjuntos de células que protegen y controlan la enfermedad en este compartimento como los macrófagos alveolares, células dendríticas (DC), linfocitos T auxiliares (Th), linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos de memoria, asesinos naturales (NK), células B, linfocitos T asesinos naturales (NKT), eosinófilos, mastocitos y neutrófilos (Burleson et al., 2015).

Inmunidad Innata

La inmunidad innata es la primera respuesta línea de defensa que ocurre de forma temprana, es decir a horas o días después de la estimulación por sustancias extrañas o agentes infecciosos. La inmunidad innata es inespecífica e incluye barreras físicas como la que proporciona la mucosa de las vías respiratorias y está encabezada por macrófagos, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, células asesinos naturales (NK) y células T asesinas naturales (NKT) (Tabla 1) (Burleson et al., 2015). La respuesta inmune innata en la vía aérea conductora dependen de su estructura ramificada y de las múltiples barreras creadas por las capas de moco, la abundancia de fluidos y moléculas antimicrobianas que permiten el aclaramiento mucociliar (Whitsett & Alenghat, 2015).

Tabla 1

Células involucradas en la respuesta inmune innata.

Células	Función y propiedades
Macrófagos	Los macrófagos son fagocitos importantes para la eliminación de material exógeno y pueden funcionar como células presentadoras de antígeno. Los mecanismos por los cuales los macrófagos eliminan el material extraño son la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y digestión proteolítica.
Neutrófilos	Los neutrófilos son los leucocitos que en mayor cantidad se encuentran, aunque están entre los más efímeros, son células polimorfonucleares y son las primeras de las células inmunes reclutadas en los sitios de infección y daño tisular ya que permiten eliminación de patógenos microbianos a través de fagocitosis, desgranulación, explosión respiratoria y liberación de especies reactivas de oxígeno.
Mastocitos	Los mastocitos son destacados por su participación en las respuestas alérgicas y su activación se produce por la unión de IgE a la célula. Este entrecruzamiento genera una cascada de señalización intracelular llevando a la desgranulación y la liberación de mediadores como la histamina (sustancia química responsable de aumentar la permeabilidad vascular y el edema).
Eosinófilos	Los eosinófilos son células que expresan gránulos citoplasmáticos que en su interior contienen enzimas lesivas que permiten destruir las paredes celulares de los parásitos, pero que de igual forma pueden desencadenar daños en los tejidos del huésped. Algunas de estas células están presentes en los tejidos periféricos, como las mucosas de las vías respiratoria y pueden aumentar su número durante la inflamación.
Células NK	Estas células son críticas en la respuesta inmune, tienen propiedades citotóxicas rápidas producidas por la liberación de gránulos líticos o mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de

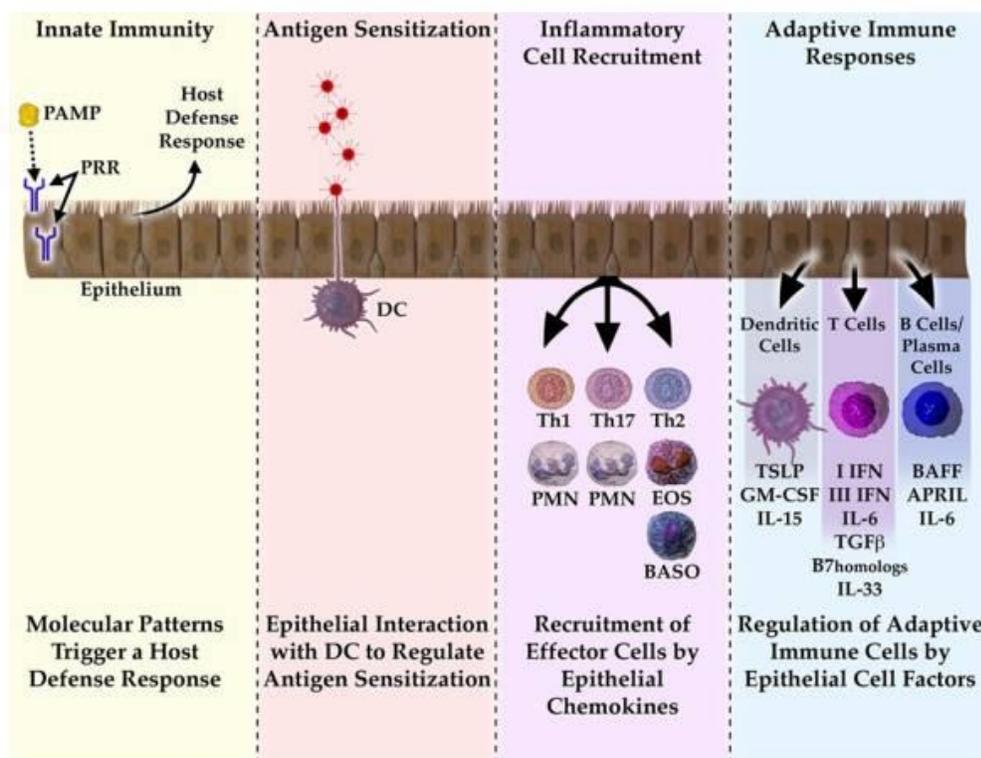
Células	Función y propiedades
Células TNK	anticuerpos y tiene la capacidad de producir una gran variedad de citocinas, quimiocinas y mediadores. Además, pueden reclutarse en el pulmón a los pocos días u horas después de la infección o activación.
Células TNK	Las células TNK comparten algunas cualidades de las células NK, como la capacidad citotóxica natural y una participación en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Sin embargo, a diferencia de las células NK, estas células también expresan un receptor de células T. Estas células expresan un fenotipo activado o de memoria y son reconocidas por su capacidad para secretar rápida y fuertemente varias citocinas TH1 y TH2, inducir citotoxicidad y activar o influir en macrófagos, células NK, DC, células T y células B.
Basófilos	Son granulocitos similares a los mastocitos. Normalmente estas células no se encuentran en los tejidos, pero pueden reclutarse durante un proceso inflamatorio.

Nota. Adaptado de Burleson et al. (2015) y Abbas et al. (2015).

La inmunidad innata actúa a través de la señalización de varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos receptores reconocen numerosos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como lipopolisacáridos (LPS), ARN bacteriano y viral, además de patrones moleculares asociados a peligro (DAMP) que se generan ante un daño celular como por ejemplo especies reactivas de oxígeno (ROS), ATP y DNA mitocondrial ocasionando una alteración en la homeostasis y provocando una respuesta inflamatoria (Theofani et al., 2019). Estos mecanismos de reconocimiento van a iniciar una cascada de señalización que desencadena la producción de citocinas y quimiocinas para la defensa inicial del huésped y para la preparación de la inmunidad adaptativa (Figura 10) (Burleson et al., 2015).

Figura 10

Respuesta inmune en las vías respiratorias.



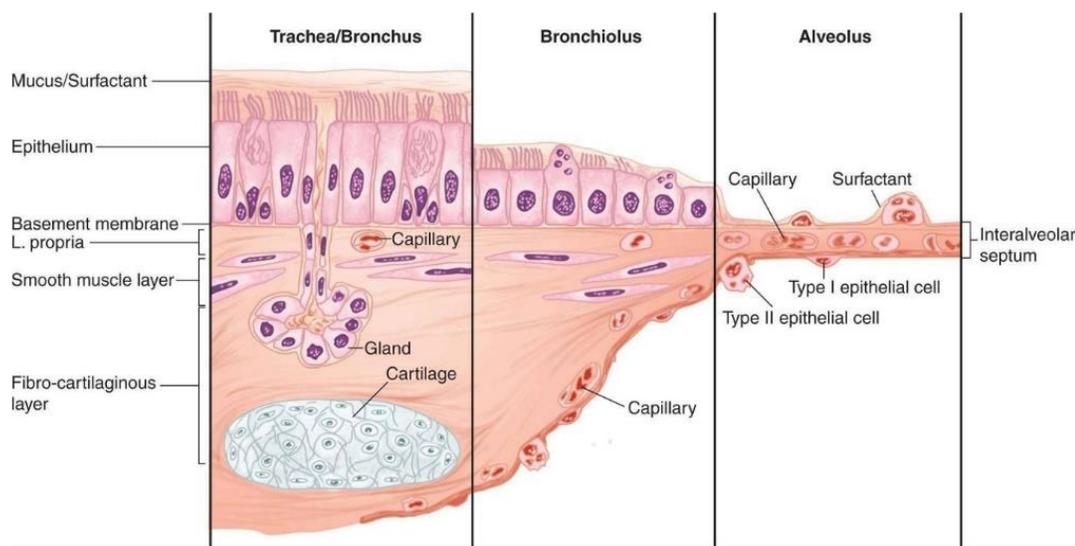
Nota. Adaptado de "Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses" (p. 1280), Schleimer et al., 2007, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6).

Las primeras barreras a la que se enfrentan las partículas como el polvo y los microorganismos son las diversas células epiteliales de las vías respiratorias (Figura 11), las cuales se encuentran rodeadas por abundantes de glándulas submucosas que secretan fluidos, mucinas y otras proteínas de defensa del huésped como enzimas (lisozima, fosfolipasas, peroxidasa y componentes del complemento), péptidos permeabilizantes (defensinas, catelicidinas), proteína que aumenta la permeabilidad bacteriana y colectinas. La producción estas sustancias es iniciada por PRR incluidos los receptores tipo Toll (TLR; TLR1 a TLR10), receptores de la familia de receptores

NLR, RIG- I, MDA5 y otros. Además, las células epiteliales tienen la capacidad de liberar mediadores, entre ellos las citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8 inducidas por la respuesta a agresiones ambientales y citocinas relacionadas con él asma. Estas citocinas juegan un papel importante en la inflamación aguda en el sistema respiratorio al estimular los linfocitos, inducir el reclutamiento de neutrófilos y regular la secreción de mucina (Honda et al., 2014; Schleimer et al., 2007; Whitsett & Alenghat, 2015).

Figura 11

Distribución celular en el tracto respiratorio.



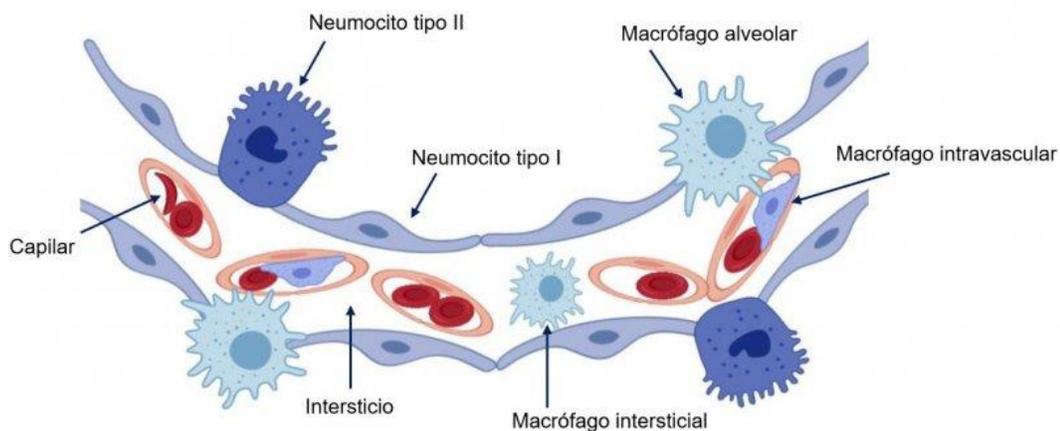
Nota. Adaptado de Ganong's Review of Medical Physiology, Barrett et al., 2012, McGraw Hil.

Los macrófagos pulmonares secuestran el antígeno y protegen a los tejidos locales de lesiones, además poseen una actividad de APC, aunque menor a las células dendríticas (DC). Los macrófagos pulmonares se desarrollan desde los monocitos derivados de la médula ósea que se diferencian al entrar al tejido pulmonar. Los macrófagos pulmonares pueden clasificarse como macrófagos alveolares (AM), macrófagos intersticiales (IM) o macrófagos intravasculares pulmonares (PIM), cada

uno con diferentes funciones (Figura 12). Los macrófagos pulmonares también pueden clasificarse como M1 o M2, según el compromiso inflamatorio (Burleson et al., 2015; Wei & Tang, 2018). Los IM, se encuentran en el intersticio, interactúan con los linfocitos intersticiales y participan en mayor grado en la presentación de antígenos. Los AM son abundantes, habitan en los alvéolos pulmonares y participan en la fagocitosis del material exógeno o patógenos que invaden los alveolos. Los PIM son en gran parte fagocíticos y se encuentran dentro de la vasculatura pulmonar. Por otro lado, los macrófagos pulmonares M1 despliegan más efectos proinflamatorios en respuesta a antígenos intracelulares y los macrófagos M2 están implicados principalmente en las funciones antiinflamatorias y de reparación de tejidos (Burleson et al., 2015; Wei & Tang, 2018).

Figura 12

Tipos de macrófagos pulmonares presentes en una región alveolar.



Nota. Adaptado de *Esquema de la pared del alveolo pulmonar*, Pallarés et al., 2020, 3tes3 - Comunidad profesional porcina (https://www.3tres3.com/articulos/aparato-respiratorio-del-cerdo-y-sus-mecanismos-de-defensa_44457/).

Los macrófagos tisulares que se encuentran en las paredes alveolares fagocitan activamente las partículas atrapadas, las digieren y finalmente liberan el material resultante, libre o encapsulado en el sistema linfático o, más a menudo, saliendo de las vías aéreas a través de una escalera mecánica mucociliar (Singal, 2015). En algunas ocasiones los macrófagos también activan la inmunidad adaptativa al presentar el antígeno a los linfocitos de los ganglio linfáticos junto con moléculas co-estimuladoras (Wei & Tang, 2018). Las células dendríticas (DCs) seleccionan y secuestran partículas y patógenos inhalados, son consideradas las células presentadoras de antígenos (APC) más potentes del sistema inmunológico y se las considera como el vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. Estudios han demostrado que los macrófagos son los primeros en fagocitar a los patógenos inhalados antes que las DCs, ya que estas últimas son reclutadas al pulmón desde la sangre periférica en respuesta a los estímulos en el tejido pulmonar, incluidos alérgenos y material particulado (Matthews et al., 2016; Wei & Tang, 2018)

Las respuestas celulares e inflamación mediadas por estructuras sólidas/amorfas/cristalinas/fibrosas se deben en mayor parte al inflamasoma NLRP3, el cual se activa por la producción de ROS, la ruptura de lisosomas, el flujo de salida de K^+ y la entrada de Ca^{2+} (Shu & Shi, 2018). El inflamasoma de dominio de la oligomerización de unión a nucleótidos similar al receptor de pirina que contiene 3 (NLRP3) es un sensor intracelular que detecta ligandos microbianos y señales de peligro endógeno como ATP, urato monosódico, cristales de colesterol, entre otros, y representa un componente clave de la respuesta inmune innata en las vías respiratorias y en la regulación de la homeostasis en muchas enfermedades inflamatorias (Theofani et al., 2019; Wang et al., 2020). El ensamblaje del inflamasoma NLRP3 conduce a la liberación dependiente de caspasa 1 de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18, así

como a la piroptosis. La activación de NLRP3 se ha vinculado con la patogénesis del asma. A pesar de que NLRP3 facilita la eliminación de patógenos en las vías respiratorias, su activación persistente por irritantes inhalados y / o alérgenos ambientales inocuos puede provocar inflamación pulmonar y exacerbación de asma (Theofani et al., 2019).

Inmunidad Adaptativa

Las defensas inmunológicas adaptativas comienzan cuando el sistema linfático y circulatorio se involucra en la destrucción de materiales extraños inhalados y dependen de la liberación de mediadores químicos de los macrófagos alveolares y las células epiteliales alveolares (Singal, 2015). La respuesta pulmonar adaptativa involucrar no solamente células innatas, también se incluye a numerosas células dendríticas (DC). Cuando los alérgenos ingresan a las vías respiratorias, los AMs y DC atrapan el antígeno/alérgeno o partículas infecciosas y migra a los tejidos linfoides secundarios, en donde impulsan la inmunidad adaptativa al sensibilizar y activar a las células naive para que se diferencien en células T y B efectoras (Tabla 2) (Dekruyff et al., 2014; Honda et al., 2014). Tanto, los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos, así como las células epiteliales que liberan muchas quimiocinas y mediadores inflamatorios, están involucrados en la respuesta adaptativas ya que se ocupan de amplificar o proporcionar actividad celular efectora adicional (Dekruyff et al., 2014). Incluso, se ha reconocido que una respuesta fagocítica alterada o la producción de citocinas inapropiadas por los macrófagos pulmonares puede provocar problemas de salud que se manifiestan por una enfermedad infecciosa pulmonar más frecuente y grave, neumoconiosis por polvo inhalado (como silicosis por inhalación de sílice) o fibrosis pulmonar (Burleson et al., 2015).

Tabla 2

Células que participan en la Inmunidad Adaptativa.

Células	Función y propiedades.
Linfocitos T	Los linfocitos T son mediadores de la inmunidad celular que maduran en el Timo, tiene un receptor de antígeno de células T (TCR) que les permite reconocer péptidos cortos.
• <i>T CD4+</i>	Este subgrupo de linfocitos T, se los conoce como linfocitos T colaboradores (Th) y promueven la diferenciación de los linfocitos B, la activación de macrófagos, así como la inflamación. Los linfocitos T CD4+ reconocen los epítopos antigénicos presentados por las moléculas del MHC II. Tras la activación por APC, las células T CD4 proliferan y se diferencian en varios subtipos, cada uno con capacidades funcionales específicas como las células Th1, Th2 y Th17.
• <i>T CD8+</i>	Las células T CD8+, también llamados linfocitos citotóxicos (CTL), pueden producir citocinas (IFN- γ , TNF- α y linfotóxina- α), pero su principal función es la de eliminar células que han sido infectas por patógenos intracelulares mediante apoptosis al liberar gránulos citoplásmicos llenos de proteínas citotóxicas (perforina y granzimas) que matan a las células reconocidas por los CTL. La expresión de CD8 permite el reconocimiento de antígenos a través del MHC I. La activación de las células T CD8 requiere señales coestimuladoras adicionales como los linfocitos Th.
• <i>T_{Reg}</i>	Las células T reguladoras (<i>T_{Reg}</i>) están encargadas de inhibir la función de otros linfocitos T con el objetivo de regular la respuesta inmune y mantener cierta tolerancia. Se desarrollan principalmente a partir de timocitos que tienen una autorreactividad intermedia, pero puede suprimir las respuestas de tipo 1 o tipo 2 mediadas por células T CD4+ o CD8+ mediante un mecanismo indefinido dependiente del contacto. El mecanismo efector estas células pueden implicar la apoptosis de la diana y es independiente de IL-10 y TGF- β .

Células	Función y propiedades.
Linfocitos B	Los linfocitos B participan en la inmunidad humoral, son las células productoras de anticuerpos (IgM, IgG, IgA o IgE). Los ab son moléculas efectoras solubles, las cuales al unirse al patógeno lo neutralizan e impiden que infecte a las células. Después de la exposición al antígeno, los anticuerpos pueden llegar por aumento de la permeabilidad o por migración de las células B al pulmón, incluso las células B de memoria pueden residir dentro de las áreas localizadas del pulmón donde se produjo la inflamación inicial.

Nota. Adaptado de Abbas et al. (2015), Actor (2014), Curtis (2005) y Moore et al. (2001).

Los linfocitos CD4+, T helper, colaboradores o axiliares (Th) son células importantes para la respuesta inmunitaria, tienen funciones clave como células auxiliares, pero también pueden desempeñar una función patógena al impulsar enfermedades autoinmunes y alergias. Las células T CD4+ cuentan con una población heterogénea de células, incluyen células efectoras, que se dedican a la protección contra patógenos y las células T reguladoras (T_{Reg}), estos subconjuntos de células T CD4+ son Th1, Th2, Th17, Th 9, Th 22, células T auxiliares foliculares (Tfh) y células T reguladoras (Hirahara & Nakayama, 2016), que se muestran a continuación:

- Las células T auxiliares tipo 1 (Th1) son células T CD4+ efectoras que se diferencian cuando se administra IL-12, producen altos niveles de IL-2 y TNF- α , aunque principalmente producen IFN- γ y son responsables de la activación de los fagocitos como los macrófagos, de la producción de anticuerpos opsonizantes y de fijación del complemento; está relacionado con la protección contra los patógenos intracelulares, es decir están involucrados en una respuesta proinflamatoria (Figura 13).
- Las células T auxiliares tipo 2 (Th2) son células T CD4+ efectoras que se diferencian en presencia de IL-4 y producen grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-

6, IL-10 y IL-13. Estas células desempeñan un papel importante en la inmunidad humoral ya que promueven la producción de anticuerpos y pueden inducir el cambio de clase a IgE por los linfocitos B permitiendo la sensibilización de los mastocitos y basófilos. Son efectivas en la protección contra helmintos y alérgenos. Las células Th2 median la respuesta humoral antiinflamatoria mediante la inhibición de la producción de citocinas Th1 (Figura 13). Las citocinas Th2 participan en la inflamación de las vías respiratorias, la eosinofilia, la hiperproducción de moco, la fibrosis, etc.

- El subconjunto de células T auxiliares 17 (Th17) se diferencian en TGF- β 1 e IL-6 y se caracterizan por la producción de IL-17, IL-8, IL-21, IL-22 e IL-26. Estas células juegan un papel crítico en el reclutamiento, activación y migración de granulocitos a través de la producción de IL-8 y cuya función es la eliminación de patógenos extracelulares. También se ha revelado que juegan un papel crucial en la patogénesis de enfermedades autoinmunes.
- Existen otras células T colaboradoras: Th9 y Th22. Estas células controlan facetas únicas de la respuesta inmune. Por ejemplo, Th9 que secreta IL-9 está involucrada en la inflamación de las vías aéreas y Th22 parece que están comprometidos en la patología y en la homeostasis de la piel.

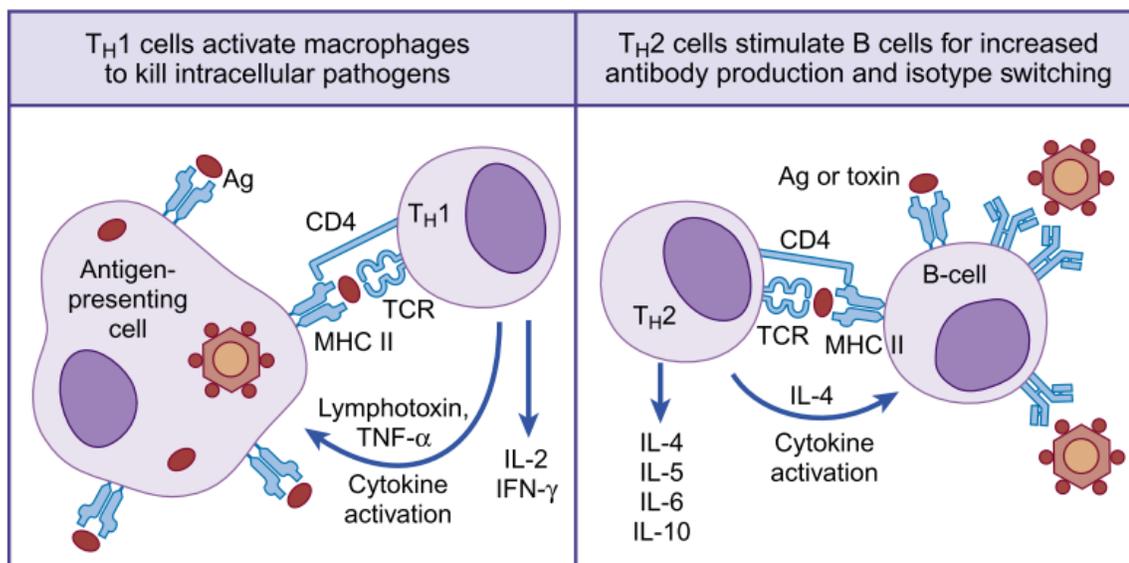
(Actor, 2014; Hirahara & Nakayama, 2016; Pazmiño & Navarrete Jiménez, 2014; Rhodus et al., 2007; Santarlasci et al., 2013).

Por lo general las PM_{2.5} conducen principalmente a una regulación positiva de respuesta Th2 mediada por las citocinas liberados por células epiteliales y DC. Las células T disponibles en el parénquima pulmonar, son candidatos potenciales para mediar las respuestas inflamatorias crónicas. Las células T CD8 + fueron vistas como

células inflamatorias predominantes en la mediación de las respuestas inflamatorias pulmonares inducidas por extractos de polvo orgánico (Wei & Tang, 2018).

Figura 13

Respuesta celular Th1 y Th2.



Nota. Adaptado de *T Lymphocytes* (p. 51), por Actor, 2014, Elsevier.

Respuesta Ante una Lesión Pulmonar

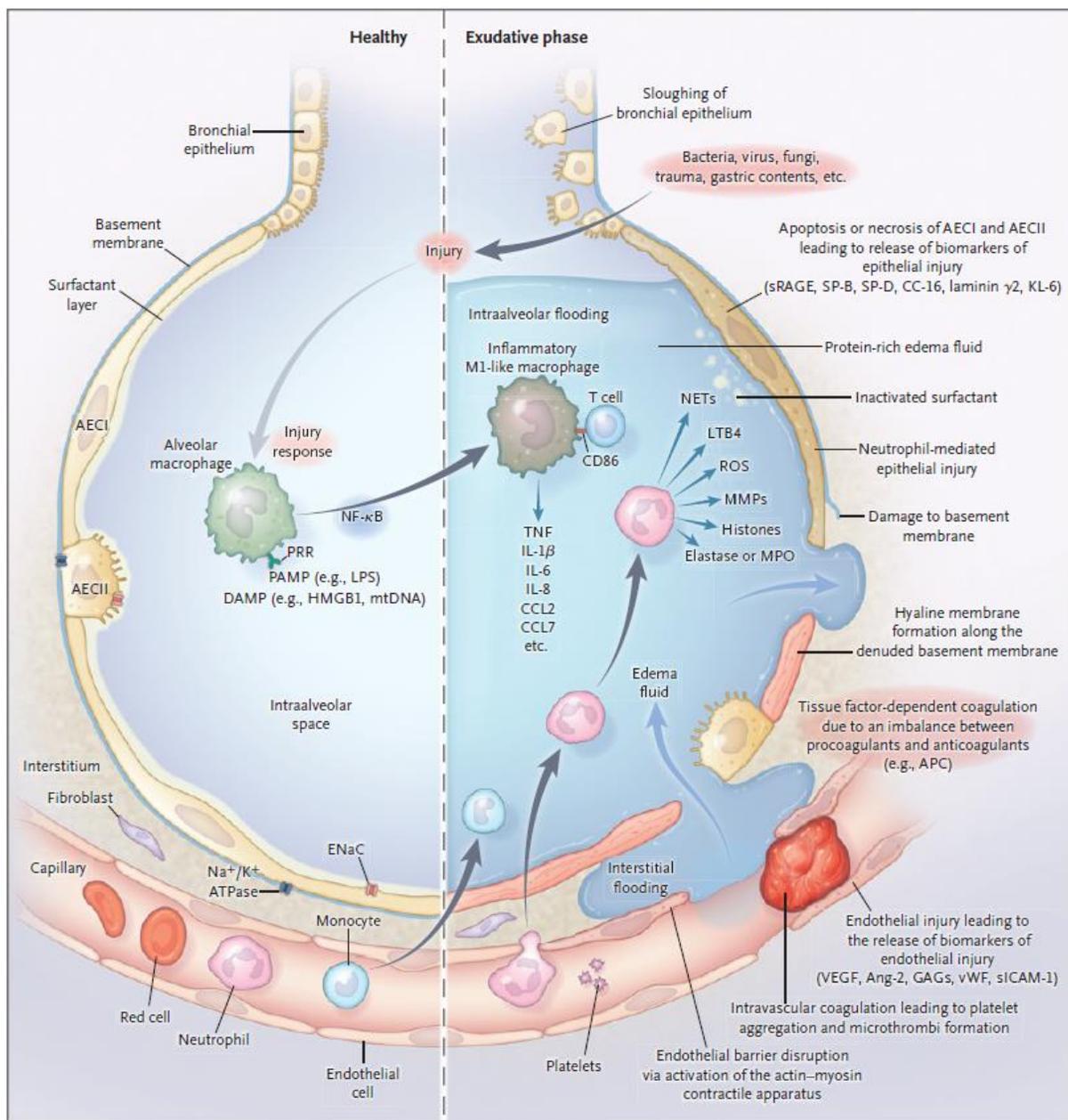
Una vez que se han producido daños directos o indirectos en la delicada estructura alveolar del pulmón distal y la microvasculatura asociada (Thompson et al., 2017), se da como resultado una respuesta celular característica, independientemente del agente dañino. Las células de tipo I, por su área de superficie relativamente grande y el citoplasma atenuado, son bastante sensibles a diferentes tóxicos por lo que son las primeras en evidenciar daño (Miller & Hook, 1990). La primera respuesta al daño alveolar es conocida fase exudativa (Figura 14) y está caracterizada por el levantamiento de la respuesta inmune innata que ya se mencionó anteriormente y la acumulación de un líquido rico en proteínas dentro del intersticio y el alveolo, conocido como edema. Los AMs residentes comienzan a secretar citocinas proinflamatorias que

permitirá el reclutamiento de neutrófilos, monocitos o macrófagos y posteriormente la activación de células epiteliales alveolares y células T efectoras que promoverán la inflamación y lesión en el tejido pulmonar. En la segunda fase de la lesión pulmonar se inicia la reparación y es conocida como fase proliferativa, tiene el objetivo de restablecer la integridad epitelial, absorber el edema y restaurar la arquitectura y función alveolar. La última fase se distingue por ser fibrótica, no ocurre en todos los casos, pero aumenta la mortalidad de quien lo padece (Thompson et al., 2017).

Durante una inflamación persistente en las vías respiratorias se producen cambios estructurales de las paredes definidas como remodelación, este mecanismo es característico del asma y de inflamaciones alérgicas. La remodelación consiste cambios estructurales principalmente en los bronquios principales junto con bronquios y bronquiolos más pequeños, para lo cual se da un engrosamiento de la pared involucrando a todos los componentes: el epitelio, la membrana basal (BM), la capa subepitelial y el músculo liso. La respuesta inflamatoria de los linfocitos T tipo 2 (Th2) permiten el reclutamiento, la activación celular, la síntesis de anticuerpos IgE, la liberación de IL-4, IL-5 e IL-13, incrementa la producción mucosa y la hiperplasia, estos dos últimos son fenómenos de la remodelación (Guida & Riccio, 2019).

Figura 14

Pulmón sano vs daño pulmonar en fase exudativa.



Nota. Tomado de "Acute Respiratory Distress Syndrome" (p. 567), por Thompson et al., 2017, *New England Journal of Medicine*, 377(6).

Efecto Potencial Tóxico de la Ceniza Volcánica

Tras una erupción volcánica, los seres humanos están expuestos a la ceniza en el tracto respiratorio, gastrointestinal y en la piel, siendo el sistema respiratorio el más susceptible. El impacto de las cenizas volcánicas depende de las características físicas y químicas de las sustancias tóxicas que forman parte de la ceniza (metales pesados, sales, óxidos metálicos, carbonos inorgánicos, silicatos, plásticos u orgánicos) (Sierra-Vargas et al., 2018). El tamaño de las partículas volcánicas es una de las características físicas de gran importancia, ya que las más pequeñas se transportan a favor del viento desde el respiradero y son capaces de penetrar aberturas más pequeñas, como en el tracto respiratorio ($< 10 \mu\text{m}$), que las partículas más grandes ($> 10 \mu\text{m} - 2 \text{mm}$). La penetración de partículas de cenizas en el tracto respiratorio depende del tamaño de las partículas, siendo aquellas $> 10 \mu\text{m}$ de diámetro las que se alojan en las vías respiratorias superiores, las de $4-10 \mu\text{m}$ en la tráquea y los bronquios, y las $< 4 \mu\text{m}$ las que llegan más profundo (Figura 10) (Jenkins et al., 2015).

La sílice es una sustancia natural que se presenta en muchas formas diferentes, principalmente: sílice cristalina y amorfa (Singal, 2015). La exposición ambiental a la sílice puede ocurrir durante tormentas de arena, durante la inhalación de partículas muy finas de suelo arrastrado por el viento y después de erupciones volcánicas (Zelko et al., 2016). La sílice cristalina se puede encontrar en la naturaleza como cuarzo, granito, areniscas o arena y/o tierra; mientras que la cristobalita y la tridimita son formas que se encuentran en las rocas volcánicas. La sílice amorfa se encuentra en la naturaleza como sílice biogénica y como vidrio de sílice de origen volcánico (Singal, 2015).

La cristobalita compuesta de partículas más grandes y gruesas que la sílice amorfa ha demostrado ser capaz de producir una afección inflamatoria crónica que precede al desarrollo de la enfermedad pulmonar fibrótica y tiene un potencial

carcinogénico conocido (Claire J. Horwell & Baxter, 2006; Singal, 2015). La sílice amorfa es una nanopartícula ultrafina (las nanopartículas se definen como una partícula que tiene al menos una dimensión <100 nm) con un diámetro de aproximadamente 12 nm, aunque no se considera como un riesgo primario para la salud, ya que es menos biopersistente que la cristobalita y no se ha demostrado que cause silicosis, sin embargo, exposición *in vitro* a altas dosis de sílice amorfa parece inducir una muerte celular. Anteriores estudios han determinado que al exponer sílice cristalina a una línea celular epitelial alveolar murina tipo II se induce la expresión de citocinas proinflamatorias y ARNm (Singal, 2015).

La silicosis es una enfermedad pulmonar crónica, producida por la exposición a sílice cristalina, en la que se produce inflamación y posterior fibrosis en el tejido pulmonar. Las partículas de sílice son rápidamente fagocitadas por los macrófagos alveolares que en respuesta liberan mediadores inflamatorios, por lo que la alta exposición a la sílice también se ha asociado con tuberculosis, bronquitis crónica, EPOC y cáncer de pulmón, además de ser un factor de riesgo para el desarrollo de esclerosis sistémica (ES). Durante la silicosis experimental en animales, las células Th1 y Th2 estaban involucradas en el desarrollo de silicosis con un papel un papel marcado y predominante de la respuesta innata en esta patogenia (Esmail et al., 2014). La silicosis al ser una neumoconiosis fibrótica se caracteriza por cambios granulomatosos y fibróticos no neoplásicos en el pulmón. Los individuos expuestos constantemente a sílice se mantienen asintomáticos durante largos periodos de tiempo, décadas, hasta que se les diagnostica mediante radiografía o tomografía. Se puede producir silicosis aguda o varias formas crónicas dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición (Zelko et al., 2016).

Similar a lo que sucede con una lesión pulmonar producida por cualquier inhalante, en la progresión de la silicosis se da dos etapas principales. Primero, una etapa inflamatoria en la cual se liberan mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6, TNF- α . El estado fibrótico se caracteriza por una gran deposición de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina. Generalmente, se produce un ciclo recurrente de activación de macrófagos y muerte celular debido a la sílice que conduce el influjo de células inflamatorias y la producción de citocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Zelko et al., 2016).

La exposición repetida a partículas de ceniza volcánica aumenta la posibilidad de que se produzcan síntomas de silicosis y otros efectos. En Montserrat, cuyas partículas contenían alrededor del 20% de cristales de cristobalita (SiO₂) se ha estimado que la exposición a alrededor de 0.5 mg/m³ durante 24 horas podría conducir a casos graves de silicosis en dos o tres años, de forma similar, la exposición a concentraciones más bajas (0,1 mg/m³) conduciría al mismo resultado con una exposición de 8 a 10 años. Los efectos agudos y crónicos de la ceniza volcánica sobre la salud dependen del tamaño de las partículas (en particular, la proporción de material respirable), la composición mineralógica (incluido el contenido de sílice cristalina) y las propiedades fisicoquímicas de su superficie (composición química, forma de la partícula, área de superficie, reactividad). Todas estas propiedades varían entre volcanes e incluso entre erupciones del mismo volcán y contribuyen a la reactividad biológica de las partículas de ceniza que se traduce en el efecto sobre la salud (Demichela et al., 2013; C. J. Horwell et al., 2013).

Entre los efectos respiratorios agudos que se producen a corto plazo se encuentran ataques de asma y bronquitis, aumento de episodios de tos, disnea, tirantez y sibilancias por la irritación del revestimiento de las vías respiratorias, e incluso puede

exacerbar una enfermedad previamente presente (bronquitis crónica o problemas cardíacos avanzados). Dentro de los efectos crónicos producidos a largo plazo más preocupantes esta la silicosis, fibrosis nodular difusa (cicatrización) de los pulmones, pero para que se produzca esta debe existir (1) una alta proporción de partículas finas en la ceniza; (2) una alta concentración de sílice cristalina (cuarzo, cristobalita o tridimita); (3) exposición a cantidades significativas de cenizas, generalmente durante un período de años a décadas. De forma temprana no se evidencian síntomas, pero la afección puede progresar incluso después de que haya cesado la exposición y puede provocar una muerte prematura. No se han informado casos humanos de silicosis u otros trastornos pulmonares crónicos debidos a la ceniza volcánica en ninguno de los artículos de la literatura examinados, pero muy pocos de los estudios incluyen las consecuencias para la salud a largo plazo de la exposición (Demichela et al., 2013).

La ceniza volcánica no solo representa un peligro para el sistema respiratorio, también puede causar daños en la superficie ocular, que esta permanentemente expuesto a los contaminantes ambientales, como malestar ocular e inestabilidad de la película lagrimal. La exposición a ceniza volcánica en células epiteliales conjuntivales humanas desencadena una respuesta citotóxica una expresión diferencial de la mucina transmembrana MUC1; una respuesta proinflamatoria mediada por IL-6 e IL-8; y un desequilibrio del entorno redox que conduce al daño oxidativo de las proteínas (Tesone et al., 2018).

De la misma forma, la ceniza volcánica puede estar afectado a la Tiroides ya que se ha observado un aumento marcado en la incidencia de cáncer de tiroides especialmente de microcarcinomas (Vigneri et al., 2017). Este aumento de cáncer de tiroides puede deberse a la deficiencia de selenio causada por la competencia que hay entre azufre, transportado por las cenizas producidas en una erupción, y el selenio en la

absorción de las plantas lo que resulta en una menor disponibilidad. En el cuerpo humano, el Se se incorpora en forma de selenoproteínas, las cuales cumplen un papel crucial en la función de la glándula tiroidea (desyodinasas) y en el estado redox (glutación peroxidasas, GPX y tiorredoxina, TRX), por lo tanto, la disminución de Se puede provocar un plegamiento incorrecto de proteínas e inflamación, incluso puede desencadenar la producción intratiroidea de TRX favoreciendo el crecimiento de las células cancerosas (Duntas, 2016). Así mismo, los metales pesados presentes en una erupción volcánica pueden provocar un efecto tóxico a la zona contaminada circundante con altos niveles de estos. Los metales pesados como As, Cd, Cr y Cu pueden reducir los niveles de hormona tiroidea con o sin aumento de TSH, al interrumpir la síntesis / secreción de la hormona o influir en su metabolismo e interacción con el receptor. Debido a una retroalimentación negativa, el aumento de TSH puede ser consecuencia de los metales y la hipersecreción crónica de TSH puede predisponer a la hiperplasia de células tiroideas y al cáncer de tiroides (Vigneri et al., 2017).

Modelo Animal

Los modelos animales se están utilizando de manera efectiva para estudiar la fisiopatología y los mecanismos involucrados en una enfermedad. El uso de modelos permite regular las condiciones para determinar los efectos de las lesiones o daños. Además, los animales pueden estar expuestos a concentraciones exactas de una sustancia conocida y, por lo tanto, se puede rastrear el curso temporal de la enfermedad y la magnitud del daño que producirá alteraciones fisiológicas, bioquímicas o patológicas. Cada elección de un modelo animal (especie o cepa) tiene sus propios beneficios y deficiencias (J. L. Wright & Churg, 2008).

A pesar de las grandes similitudes, 95% de los genes son homólogos para ratones y humanos, también existen grandes diferencias en miembros de las familias de

genes, en la redundancia de genes y en la regulación del nivel de expresión génica. Estas diferencias genéticas resultan en diferencias fisiológicas. Aun así, la reproducibilidad de los resultados y el poder estadístico consiguiente hace a estos modelos animales una potente herramienta para la investigación biomédica y su analogía al ser humano (Barré-Sinoussi & Montagutelli, 2015).

Los ratones de laboratorio conocidos como ratones domésticos (*Mus musculus* L.) pertenecen a la familia *Muridae* (Hedrich, 2012). El ratón doméstico es un mamífero de sangre caliente con hábitos nocturnos y con un comportamiento influenciado por feromonas, es una especie que se adapta a diferentes condiciones ambientales. Los ratones tienen un pequeño tamaño que varía de 12 a 15 cm desde la punta de la nariz a la punta de la cola cuando son adultos, el tamaño de su cola es igual al largo del cuerpo y generalmente su peso rodea los 30 g. Debido a su tamaño son susceptibles a los cambios ambientales afectando su temperatura corporal y fisiología. El tiempo de vida de estos animales es de 10 a 12 meses, en los que se pueden obtener de 8 a 10 camadas. Las relaciones sociales de estos animales depende de la densidad de la población, aunque por lo general viven en grandes colonias y son muy dóciles (Fuentes et al., 2008).

Entre las cepas más utilizadas de ratas y ratones para la investigación científica se encuentran los ratones C57BL/6, ratones BALB/c, ratas Sprague-Dawley y ratas Wistar. La cepa de ratones BALB/c es una cepa endogámica albina inmunodeficiente de uso común que se originó en un stock de ratones albinos mantenidos por Halsey Bagg en el Hospital Memorial. Los ratones BALB/c tienen una reproducción fácil y variaciones mínimas de peso entre machos y hembras. Esta cepa sirve como modelo animal de propósito general, aunque se usa ampliamente para la producción de anticuerpos

monoclonales y para investigaciones en terapia de cáncer e inmunología (Johnson, 2012).

El manejo de animales de laboratorio debe realizarse en una estructura física y organizacional, llamado bioterio, que garantice la procedencia de animales sanos para que no interfieran en los trabajos científicos, por lo que se deben realizar evaluaciones periódicas de la sanidad del animal. Los animales se ubicarán de acuerdo con la necesidad del investigador, pero se debe asegurar que dicho lugar cuente con las condiciones ambientales y de manejo optimas que aseguren la salud y bienestar de los animales a modo que su metabolismo y comportamiento sea normal y estable, por lo tanto, siempre deben tener comida y agua a su disposición, el lugar debe ser adecuado en cuanto a espacio, ventilación y limpieza. En los bioterios se deben aplicar medidas de bioseguridad que no solo protegerán a los animales, sino que también estén destinadas a la protección del personal encargado. En cuanto a la experimentación los científicos deben tener respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento del animal, se debe considerar como objetivo el minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. Una investigación éticamente aceptable sigue el principio de las tres R: **Reducir** al máximo el número de animales, **Reemplazar** a los animales siempre que sea posible por otro modelo experimental y **Refinar** los métodos y técnicas usadas para disminuir al máximo el sufrimiento del animal (Fuentes et al., 2008).

Al trabajar con animales se debe considerar su comportamiento y agresividad, Endo y ectoparásitos naturales, susceptibilidad a zoonosis y la posible diseminación de alergenos, por ello se debe respetar las características de cada especie e incorporar recomendaciones de expertos, como para su manejo. Por seguridad del personal y de los animales, estos últimos deben estar alojados en salas independientes de tal forma que se evite las áreas públicas del laboratorio (Organización mundial de la

Salud, 2005). La Organización mundial de la Salud proporciona orientación sobre las mejores prácticas para las instalaciones de contención de animales que pueden clasificarse en 4 niveles de bioseguridad. El trabajo con animales debe ser regulado por los Comités de Ética en ensayos con animales que están encargados de la evaluación ética de los proyectos y por lo general están constituidos por un veterinario, un científico, un investigador, un cuidador de animales y una persona que no participa en actividades de investigación, con el fin de resguardar el bienestar de los animales, evitar el uso y el sufrimiento innecesario de los mismos (Varga, 2013).

Capítulo III: Metodología

Método Científico

El presente estudio cuenta con un diseño de investigación cuantitativo experimental, que permitió evaluar y comparar los niveles de expresión de citocinas de inflamación y receptores (TNF- α , NLRP3, ASC, IL-8) en el tejido pulmonar murino, entre diferentes grupos experimentales como la concentración de la ceniza volcánica (0.5, 1.0 y 3.75 mg/100 g de peso corporal) y la fuente de ceniza volcánica (Cotopaxi, Tungurahua y Pichincha).

Localización Geográfica

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, que se ubica en Autopista General Rumiñahui S/N y Ambato, Sangolquí 171103. En el laboratorio se realizaron tanto los análisis de las muestras como el manejo del modelo animal, el cual que se llevó a cabo en el bio-modulo del laboratorio.

El procesamiento de los tejidos pulmonares murinos para histología, como su inclusión en parafina y los cortes en secciones mediante un microtomo se realizó en el área de Patología Clínica del Hospital de Especialidades Eugenio Espejo gracias a la colaboración de la Dra. Gabriela Jaramillo.

Modelo Animal

Los animales que se utilizaron en esta investigación fueron ratones machos y hembras del género *Mus musculus* cepa BALB/c, con una edad aproximada de 10 semanas y con un peso de alrededor de 30 - 40 g. Los animales se alojaron en un entorno controlado a una temperatura cercana a 25°C con un ciclo de luz de 12/12 horas, se colocaron en jaulas convencionales (1264C, Iufransa) con no más de 5

individuos, con comida y agua a su disposición. En total se utilizaron 125 ratones para los diferentes tratamientos de corto y largo plazo.

Ceniza Volcánica

La ceniza volcánica fue provista por Theofilos Toulkeridis, Ph.D del Departamento de Seguridad y Defensa de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE con la colaboración de Vicente Nicanor Varela Guevara del museo “Volcán Tungurahua” en Baños - Ecuador. Las muestras de ceniza volcánica que se usaron son de Cotopaxi, la cual fue tomada durante la erupción del 2015; de Pichincha procedente de la erupción de 1999 y la ceniza de Tungurahua procedente de la erupción del año 2006, las cuales demuestran toxicidad relacionada con su composición.

Experimentación con Animales

Preparación de la Ceniza Volcánica

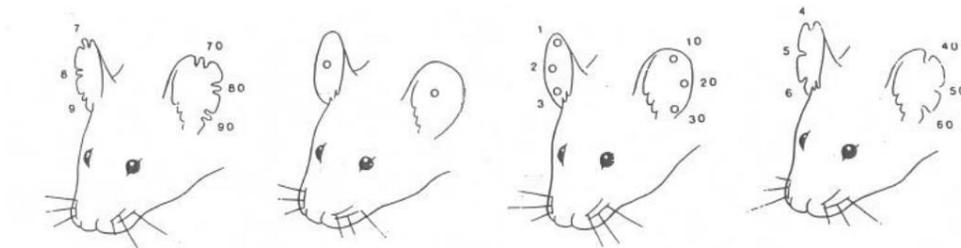
Las cenizas volcánicas de Cotopaxi, Pichicha y Tungurahua se pesaron en diferentes tubos de 0.2 mL en una balanza analítica de acuerdo con el número de ratones expuestos a la ceniza y en función de la concentración que se requería 0.5, 1.0 y 3.75 mg/100 g de peso corporal (PC). La ceniza volcánica pesada se diluyó en PBS 1X en un volumen equivalente a 100 μ L por individuo. Posteriormente la ceniza fue sonicada en baño de ultrasonidos a 40 kHz durante 1 hora a 37°C en el equipo Branson B-Series Ultrasonic Cleaners (B1510MTH, Branson), previa exposición en los ratones BALB/c.

Instilación Intratraqueal de la Ceniza Volcánica

Los ratones se etiquetaron mediante una pinza perforadora de orejas de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 15 para su posterior identificación. El peso inicial de los ratones fue registrado junto con su respectiva identificación numérica.

Figura 15

Identificación mediante perforación en las orejas de ratones.



Nota. Adaptado de *Guidelines on Rodent Identification*, Michigan State University, 2018, Animal Care (<https://animalcare.msu.edu/guidelines/CAR5.pdf>).

Los ratones fueron anestesiados por vía intraperitoneal con aproximadamente 30 μ L de KET-A-XYL® (AgrovetMarket Animal Health, 0.5-1 mL/10 Kg) diluido en PBS 1X en una proporción 1:1, de acuerdo con el peso corporal y se dejó actuar por aproximadamente 10 minutos.

La ceniza volcánica diluida en PBS 1X fue administrada por vía intratraqueal en un volumen de 100 μ L como se muestra a continuación (Tabla 3). Para el procedimiento se colocó al ratón anestesiado sobre una superficie inclinada sujetándolo por los dientes con una liga, con una pinza pequeña se jaló con cuidado la lengua del animal hacia afuera para visualizar la tráquea y se dispensaron los 100 μ L de la ceniza volcánica homogeneizada o del PBS mediante una micropipeta de forma rápida y evitando que el animal respire por la nariz durante unos segundos para asegurar que el líquido ingrese a los pulmones. Se dejó reposar a los animales hasta que los mismos recobre sus reflejos antes de introducirlos en sus jaulas.

Se utilizaron 2 grupos controles negativos uno al que no se administró nada y otro al que se administró PBS 1X estéril por la misma vía intratraqueal. Los experimentos se realizaron durante dos periodos de exposición: uno corto plazo con

duración de una semana y uno de larga exposición, el cual duró 9 semanas con una segunda exposición a la ceniza volcánica a la sexta semana después de la primera exposición.

Tabla 3

Diseño experimental para la exposición a ceniza volcánica en modelos in vivo.

Periodo de exposición	Ceniza volcánica	Concentración	Numero de ratones	
Corto plazo	Control positivo	0.5 mg LPS / kg PC	2	
	Cotopaxi	0.5 mg/100 g PC	6	
		1.0 mg/100 g PC	6	
		3.75 mg/100 g PC	6	
		0.5 mg/100 g PC	6	
	Pichincha	1.0 mg/100 g PC	6	
		3.75 mg/100 g PC	6	
		0.5 mg/100 g PC	6	
	Tungurahua	1.0 mg/100 g PC	6	
		3.75 mg/100 g PC	6	
		Control negativo	Sin tratamiento	5
	Control negativo	100 µL PBS	5	
	Largo plazo	Cotopaxi	0.5 mg/100 g PC	5
			1.0 mg/100 g PC	5
3.75 mg/100 g PC			5	
Pichincha		0.5 mg/100 g PC	5	
		1.0 mg/100 g PC	5	
		3.75 mg/100 g PC	5	
Tungurahua		0.5 mg/100 g PC	5	
		1.0 mg/100 g PC	5	
		3.75 mg/100 g PC	5	
Control negativo		Sin tratamiento	6	
Control negativo		100 µL PBS	8	

Evaluación de Mortalidad y Peso Corporal del Modelo Animal

Se realizó un seguimiento de la mortalidad y el peso corporal de cada ratón para los dos periodos de exposición. En la exposición a corto plazo, el peso del animal fue medido diariamente durante los 7 días después de la exposición. De la misma forma, para la exposición evaluada a largo plazo se tomó el peso corporal del ratón en los días 2, 5, 9, 20, 44 y 68 después de la inoculación hasta el día del sacrificio.

Sacrificio Animal y Observación Macroscópica de los Pulmones Murinos

Después de haber transcurrido 1 y 9 semanas después de las exposiciones de ceniza respectivamente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se confirmó la muerte del ratón mediante la observación de sus reflejos. Se desinfectó la zona ventral del animal con alcohol al 70%. Se realizó la necropsia del ratón y se recuperaron los pulmones, los cuales se lavaron en PBS 1X estéril, se pesaron y se observaron las características macroscópicas para evidenciar algún daño macroscópico visible como edemas y se obtuvieron imágenes de los pulmones. Posteriormente se tomaron las medidas longitudinales y transversales de las imágenes de los pulmones murinos mediante la plataforma de análisis de imágenes biológicas "Fiji".

Posteriormente los pulmones murinos se dividieron en 3 fragmentos, con un bisturí, se colocaron en nitrógeno líquido por unos 20 segundos, 2 de los fragmentos se colocaron en un tubo estéril de 1.5mL y el otro fragmento en otro tubo del mismo volumen para almacenarlos a -80°C y procesarlos en análisis posteriores.

De cada grupo experimental, se tomó un solo fragmento fresco de los pulmones divididos y se lo colocó en un tubo de 2.0 mL que contenía formol buferizado al 10%, lo que permitió fijar el tejido y mantener las estructuras morfológicas para análisis de histología. Los tejidos inmersos en formol buferizado se almacenaron a 4° C.

Evaluación a Nivel Celular: Histología del Tejido Pulmonar Murino

Inclusión en Parafina y Corte Histológico

Los tejidos fijados en formol buferizado fueron incluidos en parafina para que obtuviesen consistencia y dureza que permitan cortar y obtener secciones delgadas y transparentes. El proceso de inclusión en parafina y los cortes se lo realizó en el Laboratorio de Patología Clínica del Hospital de Especialidades “Eugenio Espejo”.

Las secciones de tejidos se colocaron en cassettes universales con tapa y se sumergieron en formol buferizado al 10%. La deshidratación del tejido y su inclusión en parafina se realizó automáticamente en el equipo “Spin Tissue Processor Microm STP 120”. En el equipo, los tejidos fueron sumergidos dos veces en formol buferizados al 10% durante 1h30min cada vez, lo que permitió fijar los tejidos y sus estructuras. Para la deshidratación del tejido, las muestras fueron sumergidas cuatro veces en una mezcla de metanol:isopropanol en una proporción 3:1 durante 1 hora cada vez, luego se sumergieron dos veces en isopropanol por 1 hora cada uno y finalmente se sumergieron dos veces en xilol durante 1h30min cada vez. La inclusión del tejido en parafina se realizó al sumergir el tejido en parafina caliente a 60°C por 2 veces durante 1h cada vez.

El bloque de parafina se formó en el equipo Leica EG1150 modular tissue embedding center. El tejido embebido en parafina se colocó en una cubeta molde, en el módulo caliente del centro inclusión de parafina Leica EG1150H se dispuso parafina líquida sobre el tejido y se colocó encima cassette universal para el manejo del bloque de parafina. En la placa fría del sistema modular Leica EG1150C, el bloque de parafina se enfrió y se solidificó durante al menos 15 minutos.

Mediante un microtomo LEICA RM 2245, se procedió a exponer el tejido al cortar aproximadamente 1 mm del bloque de parafina, proceso denominado desbaste.

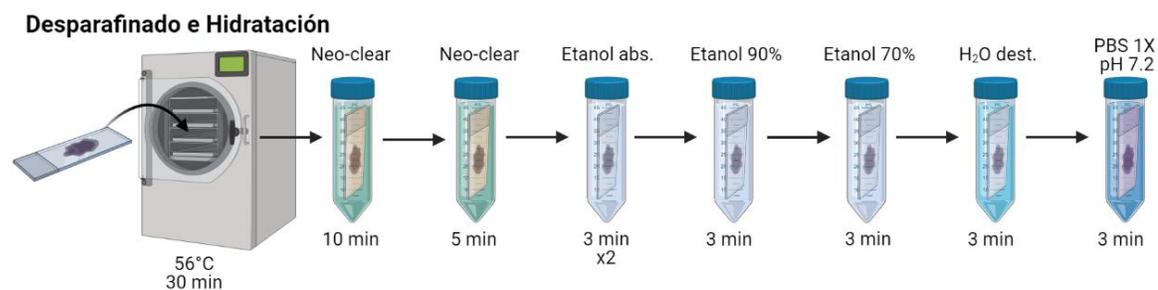
Cada bloque se colocó sobre la superficie de hielo al menos unos 3 minutos, posteriormente se situó en el microtomo y se cortaron secciones de 4 μm de la parte dorsal del bloque. Las láminas obtenidas se extendieron en un baño de flotación a 45°C y se pescaron en portaobjetos “double frosted” al sumergir la placa en el baño de flotación y retirando el corte pegado al portaobjetos. Las placas se almacenaron en un protaplas a - 4 °C.

Desparafinado e Hidratación del Tejido Pulmonar

Todo el proceso de desparafinado e hidratación del tejido se puede observar en la Figura 16 y se realizó en un rotor para mejorar el contacto de las diferentes soluciones con el tejido. Cada solución se encontraba en tubos de 50 mL en un volumen de aproximadamente 35 mL para sumergir completamente el tejido.

Figura 16

Esquema de desparafinado e hidratación de tejido pulmonar murino.



Nota. Creado en BioRender.com

Tinción de Hematoxilina & Eosina

Para esta tinción se procede a colocar Hematoxilina (115938, Certistain®) de Harris modificada (variante sin óxido de mercurio) sobre el tejido de tal forma que lo cubra completamente durante 6 minutos a temperatura ambiente, lo que permite teñir sustancias como la cromatina del núcleo, se lavó por 1 minuto con agua corriente y después en agua destilada por 1 minuto. Se adicionó agua acidificada (0.5mL ácido

acético 100% en 100 mL de agua destilada) sobre el tejido por unos 30 segundos para diferenciar la tinción y se lavó con agua corriente por 30 segundos. Se cubrió el tejido con la solución acuosa de eosina amarillenta (Eosina A, 1159350025, C.I. 45380 Certistain® MERCK) al 0,5 % durante 5 min para la tinción del citoplasma de un color rosado, se lavó el exceso con agua corriente por unos 30 segundos y se procedió a colocar el medio de montaje (5570-0005, Sera Care). Finalmente, con el tejido teñido se procedió a tomar fotografías en el microscopio invertido Micros Austria Sundew MCXI600 en campo claro mediante el software Visual Studio.

Evaluación a Nivel Molecular: Reacción en Cadena de Polimerasa Cuantitativa

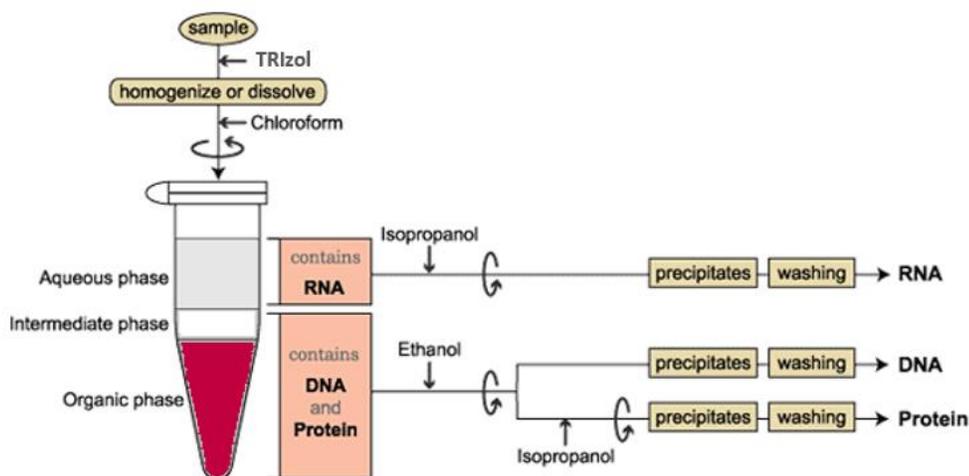
Aislamiento de RNA de Tejido Pulmonar Murino

El área de extracción, así como los equipos se limpió con sablón, alcohol al 70% y un inhibidor de RNAsas (R2020, Sigma-Aldrich). Se adicionó 200 µL de TRIzol (15596018, Thermo Fisher Scientific) a las muestras de tejido pulmonar murino y se almacenaron a – 80°C. Para la extracción de RNA se siguió el protocolo de inserto TRIzol™ Reagent de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, 2020), las muestras de tejido pulmonar murino con TRIzol se trituraron y homogeneizaron con un pistilo estéril en los mismos tubos de 1.5 mL mediante giros repetitivos del pistilo triturando el tejido contra el fondo del tubo. Se agregaron 500 µL de TRIzol faltante para cumplir la relación de 1 ml de TRIzol por cada 100 mg de tejido y dado que todos los tejidos tuvieron un peso de 70 miligramos, el TRIzol total necesario fue 700 µL. Se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para lograr disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se centrifugó a 12000 g por 10 min a temperatura ambiente (Hettich, MIKRO200R), se recuperó el sobrenadante en otro tubo de 1.5 mL y se descartó el pellet. Se adicionó 140 µL de cloroformo (0.2 mL por 1 mL de TRIzol), se mezcló por inversión y se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente. Las muestras se

centrifugaron a 12000 g por 15 min a 4°C (Eppendorf-5804R) y se produjo una separación en 3 fases: una fase orgánica que contiene proteínas (fenol/cloroformo color rosa), una interfase que contiene DNA (color blanco), y una fase acuosa que contiene RNA (incolora). Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. Posteriormente se agregó 350 µL de isopropanol (67-63-0, Merck) a la fase acuosa (500 µl por cada 1 mL de TRIzol), se agitó vigorosamente por inversión y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4°C produciendo la precipitación del RNA en forma de un pellet de color blanco. Para lavar el pellet, se adicionó 700 µL de etanol al 75% frío (1mL de etanol al 75% por mL de TRIzol), se centrifugó a 7500 g por 10 min a 4°C y se descartó todo el etanol. Los pellets se secaron al aire dentro de una Sorbona y sobre hielo durante 15 min. El RNA se resuspendió en 50 µL de agua DEPC (R0601, Thermo Fisher Scientific). Todo el proceso de extracción se realizó a 4°C.

Figura 17

Esquema de extracción de RNA con TRIzol.



Nota. Adaptado de *ISOGEN and ISOGEN-LS: Isolation of total RNA*, NIPPON GENE, 2011, nippongene (<https://www.nippongene.com/english/product/extraction/isogen.html>).

El RNA extraído se cuantificó mediante un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se analizó la lectura de radio 260/280 y 260/230, los cuales se encontraban ~2.0 y 2.0-2.2 respectivamente y son indicadores de la pureza del RNA. Para determinar la calidad del RNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, con 1 µg del RNA total a 100 voltios por 1 hora, el gel se revelará mediante el equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (1708370, Bio-Rad).

Retro-transcripción de RNA

El RNA se purificó mediante un tratamiento con DNAsas, para lo cual se tomó 1 µL del RNA extraído (~1000 ng) en un tubo de 0.2 mL, se adicionó 0.5 µL de 10X DNase I Reaction Buffer (Y02340, Invitrogen) y 0.5 µL de DNase I (18068015, Invitrogen). Se agregó 3.5 µL de agua DEPC (R0601, Thermo Fisher Scientific) para alcanzar un volumen de 5.5 µL de reacción y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 13 minutos. Para detener la reacción se adicionó 0.5 µL de EDTA 25 Mm (pH 8.0) (Y02353, Invitrogen) inmediatamente y se incubó a 65°C por 10 min en un termociclador Proflex (4483636, Thermo Fisher Scientific). Después de la incubación, las muestras se colocaron en hielo, se homogenizaron y se cuantificaron en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) con 1 µL de RNA puro, los radios 260/280 y 260/230 se encontraban ~2.0 y 2.0-2.2, respectivamente.

La retrotranscripción del RNA (RT-PCR) purificado se realizó mediante la enzima M-MLV (28025021, Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo de su inserto, para lo cual se agregó 1 µL Oligo (dT)12-18 Primer (500 µg/mL) (18418012, Invitrogen), 1 µL de dNTP Mix 10 mM (10 mM cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) (18427-088, Invitrogen) y 5 µL de Agua DEPC (R0601, Thermo Fisher Scientific) a los 5 µL del RNA (1 ng a 5 µg) tratado con DNAsas para obtener un volumen de 12 µL. La mezcla homogeneizada mediante un spin, se incubó a 65°C durante 10 minutos y luego se

colocó en hielo por 2 minutos. A la mezcla se adicionó 4 μL de 5X First-Strand Buffer y 2 μL de 0.1 M DTT, se homogeneizó y se incubó a 37°C por 2 minutos. Finalmente, se agregó 0.8 μL de la enzima M-MLV RT (200 unidades) (28025021, Thermo Fisher Scientific) y 1.2 μL de agua DEPC (R0601, Thermo Fisher Scientific) para obtener un volumen final de reacción de 20 μL . La mezcla se incubó a 37°C durante 50 minutos para sintetizar la primera cadena de cDNA y posteriormente, la reacción se inactivó a 70°C por 15 min. Las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), se diluyeron a 100 ng/ μL y se almacenaron a -20 °C.

Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) Convencional

Los cebadores que se utilizaron estaban diseñados y sintetizados para ratón, se los puede observar en la tabla 4, cada uno con su secuencia, temperatura de alineamiento de los cebadores (temperatura de annealing) y el tamaño de los productos que generan.

Tabla 4

Secuencias y características de los cebadores de ratón diseñados para qPCR.

Proteína	Cebadores Forward y Reverse	Tamaño	%CG	T_a(°C)	Longitud Producto
IL-8	Forward: GGCAAACGAAAATGTGGATGGG	22	50.00	60,93	125
	Reverse: TCAGAACGTGGCGGTATCTCT	21	52.38	60,95	
ASC	Forward: GTGAGCTTCAGGGCCATTCT	20	55.00	60.03	119
	Reverse: GCTTCGTTCCACCCTGGTTTTG	21	52.38	60.27	
NRLP 3	Forward: TCTGCACCCGGACTGTAAAC	20	55.00	59.97	111

Proteína	Cebadores Forward y Reverse	Tamaño	%CG	T _a (°C)	Longitud Producto
TNF- α	Reverse: TTCCGAAGGCTGTGGTTGTG	20	55.00	60.82	
	Forward: AGCCGATGGGTTGTACCTTG	20	55.00	60.04	136
	Reverse: GACGGCAGAGAGGAGGTTG	19	63.16	59.78	
	Forward: TGCTCTAGACTTCGAGCAGGAGATG	25	52,00	63,66	124
B actina	Reverse: AGCCTCAGGGCATCGGAA	18	61,11	60,96	

Nota. T_a (Temperatura de annealing)

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) que permite la amplificación de millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula (Serrato et al., 2014), se realizó previo a la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR) para observar si existía expresión de los marcadores de inflamación. La PCR convencional o de punto final se realizó con la enzima GoTaq® Green Master Mix (M7123, Promega) de acuerdo al inserto de la misma. Para una reacción de 25 μ L, en un tubo de 0.2 mL se agregó 12.5 μ L GoTaq® Green Master Mix, 2X (M7123B, Promega), 2 μ L de cada cebador 1X forward y reverse para alcanzar una concentración final en la reacción de 0.1–1.0 μ M, 6.5 μ L de agua DEPC (R0601, Thermo Fisher Scientific) y 2 μ L de ADNc (100 ng/ μ L) de la primera cadena obtenida por RT-PCR. La mezcla se colocó en el termociclador Proflex (4483636, Thermo Fisher Scientific) y se establecieron las condiciones de PCR que se observan en la Tabla 5.

Tabla 5*Programa PCR convencional.*

Ciclo	Paso	T (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	3 minutos
	Desnaturalización	95	30 segundos
35	Annealing	61	30 segundos
	Extensión	72	30 segundos
1	Extensión Final	72	7 minutos
1	Enfriamiento	4	∞

La reacción de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, los cuales se corrieron a 100 voltios por 1 hora y se revelaron en el mediante el equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (1708370, Bio-Rad).

Análisis de Expresión Mediante PCR en Tiempo Real

El nivel de expresión de los marcadores de inflamación en el tejido pulmonar murino expuesto a ceniza volcánica se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), para la cual se ocupó el reactivo Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (K0221, Thermo Fisher Scientific). Las reacciones de qPCR se realizaron en placas de 96 pocillos de 0.2 mL. Para la reacción individual se ocupó 2 µL de ADNc, 0.75 µL de cada cebador 1X (Tabla 2), 7.5 µL del máster mix de la enzima y 4 µL de agua libre de nucleasas. Para cada ensayo de qPCR se estableció una la gama realizando diluciones seriadas (1, 1/10, 5/100, 1/100, 5/1000, 1/1000) de la muestra control positivo (RNA de ratones tratados con LPS) que da como resultado una curva estándar, se realizó un control negativo de la reacción en la cual se reemplazó el cDNA con agua libre de nucleasas y se realizaron duplicados todas muestra. La configuración en el sistema de

detección de PCR en tiempo real (CFX 96 Real-Time System, Bio-Rad) se ajustó como se muestra en la Tabla 6 finalizando con un análisis de curva de fusión y un paso de enfriamiento. Los datos fueron procesados por el software del propio equipo y expresados en función del doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Monick et al., 2013).

Tabla 6

Programa de amplificación de qPCR con Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix.

Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Tratamiento UDG	50	2 min
1	Activación de la polimerasa e inactivación UDG	95	10 min
	Desnaturalización	95	15 seg
35	Annealing	62	15 seg
	Extensión	60	45 seg
1	Curva de Melting	60-95 (incremento de 0.5°C)	5 seg/paso
1	Enfriamiento	4°C	2 min

Cuantificación Absoluta de Marcadores de Inflamación y Receptores. La cuantificación absoluta permitió determinar el número de copias reales del gen de interés en la muestra. Con la gama realizada (1, 1/10, 5/100, 1/100, 5/1000, 1/1000) se generó una curva estándar en el CFX Manager™ Software (1845000, Bio-Rad) en la que cada concentración de las diluciones se representa gráficamente frente al valor de Ct resultante. El umbral se modificó manualmente hasta obtener el mejor ajuste de la curva estándar en la que los parámetros de eficiencia, slope y R2 se aproximen al 100%, al -3.32 y al 1 respectivamente. Los valores de Ct de muestra se compararon con la curva estándar y se interpolaron automáticamente en el software para determinar la concentración inicial (Starting Quantity - SQ) de ácido nucleico expresado de los marcadores de inflamación de cada muestra (Thermo Fisher Scientific, 2014). Para interpolar se utiliza la siguiente ecuación.

$$y = mx + b$$

En donde:

y= Ct; m= slope; b= y-intercept; x= número de copias

Además, la eficiencia de la reacción vino dada por la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/slope} - 1$$

Cuantificación relativa de marcadores de inflamación y receptores. La cuantificación comparativa relativa, analiza los cambios en la expresión génica en relación con otra muestra de referencia o control (calibrador) (Thermo Fisher Scientific, 2014).

Cuantificación Comparativa Método del Cociente. Con este método se compararon los resultados de muestras experimentales con un calibrador (Muestra no tratada) y un normalizador (Gen endógeno, en este caso β -actina). Para ello se empleó el valor Starting quantity (SQ), una vez obtenido el mejor ajuste de la curva estándar se dividió el SQ del gen de interés (COI) sobre el SQ del gen endógeno (norm) y se obtuvo el primer cociente (Ratio-R1). A continuación, se procedió a sacar el cociente o ratio 2 (R2), para lo cual los cocientes de cada grupo de tratamiento ($R1_{tratado}$) se dividió para el promedio del cociente del grupo calibrador ($R1_{mcalibrador}$), como se muestra a continuación:

$$R1 = \frac{SQ_{COI}}{SQ_{norm}}$$

$$R2 = \frac{Tratado}{Calibrador} = \frac{R1_{tratado}}{R1_{mcalibrador}}$$

Análisis de datos

Los datos se procesaron en el software GraphPad prism, para el análisis estadístico se realizó un Anova de dos vías para determinar si los grupos de tratamientos son distintos entre sí, para comparaciones entre pares se utilizó la prueba post hoc de Dunnet. Los resultados fueron considerados significativos cuando * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las imágenes de los resultados histológicos obtenidas con software VisualStudio se describieron y comparando entre los tejidos de los tratamientos.

Capítulo IV: Resultados

Evaluación de mortalidad y peso corporal

Todos los ratones Balb/c tras una semana desde la exposición a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua en sus diferentes concentraciones de 0.5, 1 y 3.75 mg / 100 g de peso corporal no sucumbieron, alcanzando el 100% de supervivencia; sin embargo, al séptimo día los ratones fueron sacrificados. De la misma forma los ratones que tuvieron un largo periodo de exposición con una segunda dosificación de ceniza al día 47 después de la primera presentaron un 100% de supervivencia hasta su sacrificio al día 68 (Figura 18).

El peso corporal de los ratones evaluados en un periodo de corta exposición a la ceniza volcánica fue registrado en días 0, 1, 3, 5, 6 y 7 post exposición. El grupo expuesto solo a la solución vehículo (PBS) muestra una reducción del peso corporal inmediatamente después de la exposición, para en los siguientes días mantener un peso constante alcanzando una reducción de peso neta del 7.23%.

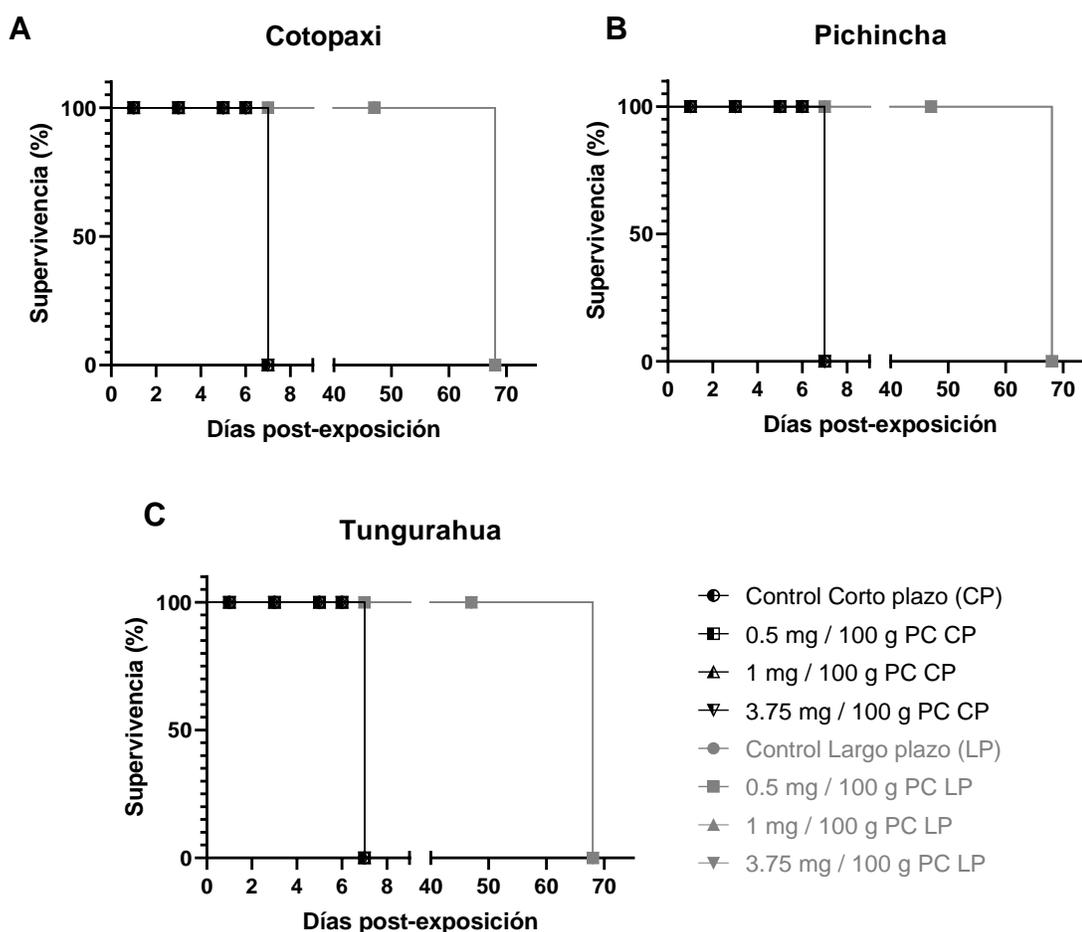
Los individuos inoculados con ceniza de Cotopaxi manifiestan una reducción del peso corporal inmediatamente después de la dosificación de la ceniza volcánica para en días posteriores mantener un peso variable. El último día de evaluación, los pesos corporales se han reducido de forma notable en comparación con el peso inicial del ratón alcanzando un mayor porcentaje de reducción (7.95%) con la concentración más alta de 3.75 mg y reducciones de 3.15 y 2.87 % para las concentraciones de 0.5 y 1 mg (Figura 19 A).

Los ratones expuestos a ceniza del volcán Pichincha en una concentración de 0.5 y 1 mg / 100 g peso corporal aumentaron su peso, el cual se mantuvo constante a lo largo del tiempo. Por el contrario, el grupo expuesto a la dosis de 3.75 mg de ceniza mostro una reducción del 5.4% de peso corporal. El aumento de peso corporal

observado alcanzó el 104.3% con respecto al peso inicial del grupo para la concentración de 0.5 mg; no obstante, para la concentración de 1 mg el aumento de peso no fue considerable llegando a un 100.5% (Figura 19 B).

Figura 18

Porcentaje de supervivencia post-exposición a ceniza volcánica.

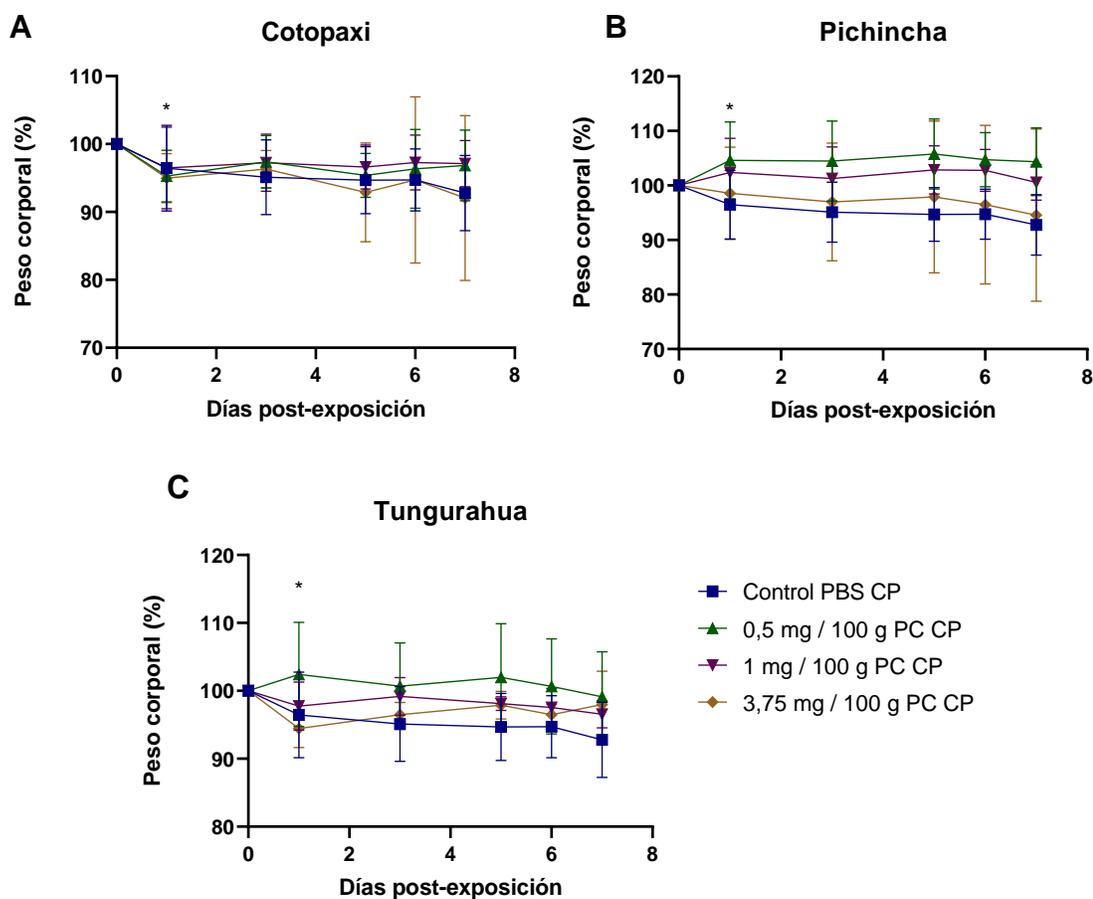


La exposición a la concentración de 0.5 mg de ceniza del volcán Tungurahua produjo un aumento de peso que posteriormente fue disminuyendo hasta el séptimo día en donde se observó que hubo una pérdida total del 0.87% en el peso corporal. Por el contrario, para las concentraciones de 1 y 3.75 mg, el peso corporal de los ratones disminuyó de forma visible tras la exposición para luego aumentar ligeramente. Al final

del periodo de evaluación los grupos expuestos a 1 y 3.75 mg mostraron una reducción de peso del 3.46 y 2.02% respectivamente (Figura 19 C).

Figura 19

Curva de porcentaje de variación de peso corporal tras una corta exposición.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=5 experimentos independientes.

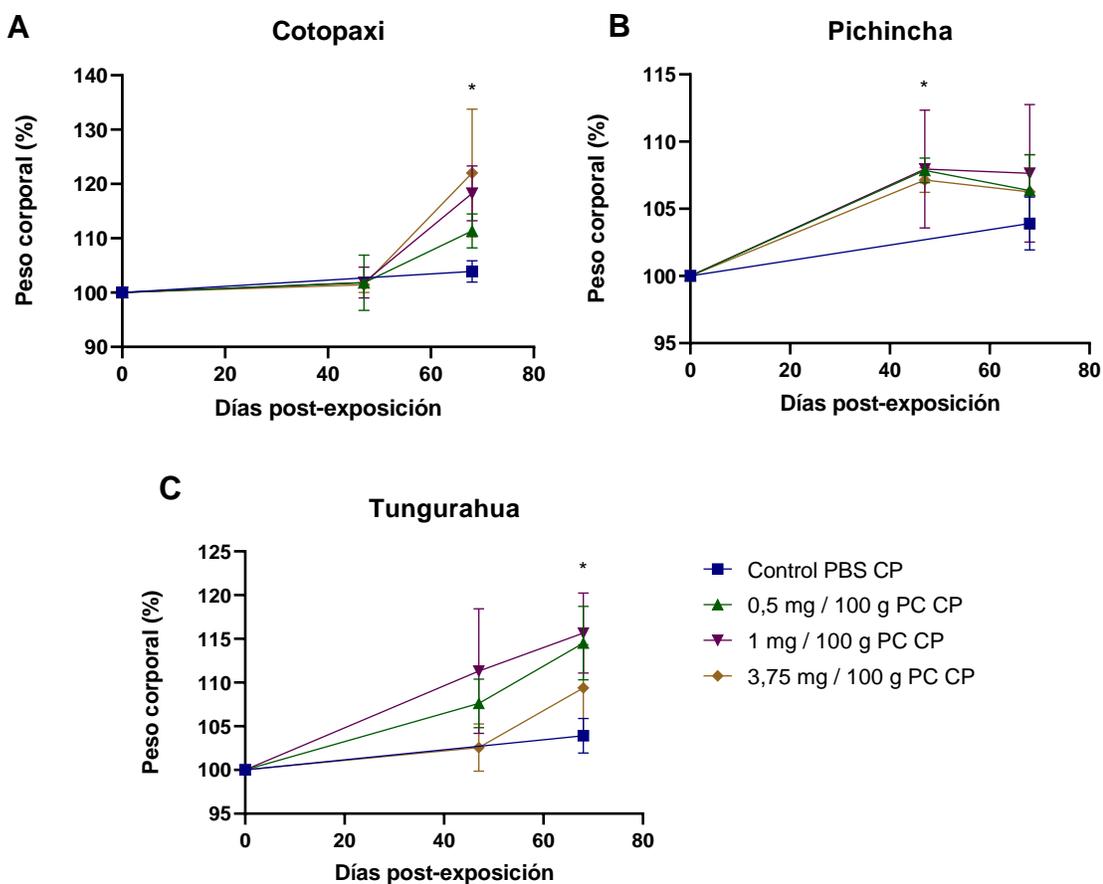
Los animales que se evaluaron en un periodo de larga exposición tuvieron una segunda administración de ceniza al día 47 después a la primera y muestran un apreciable aumento de peso corporal con respecto su peso inicial (Figura 20). El grupo expuesto a la ceniza de Cotopaxi no muestra un incremento antes de la segunda

exposición, sin embargo, después de esta los valores aumentan en un 11, 18 y 22% para la concentración de 0.5, 1 y 3.75 mg respectivamente (Figura 20 A).

En el caso de los ratones expuestos a ceniza del volcán Pichincha se observa una disminución leve del peso corporal tras la segunda exposición independientemente de la concentración. Al final del tiempo de apreciación alcanzaron un aumento del 6.4, 7.7 y 6.3 % con respecto al peso inicial del grupo para las concentraciones de 0.5, 1 y 3.75 mg (Figura 20 B).

Figura 20

Curva de porcentaje de variación de peso corporal tras una larga exposición.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=5 experimentos independientes.

De forma similar, el grupo expuesto a la ceniza volcánica de Tungurahua manifiestan un considerable aumento de peso corporal que se sostiene durante todo el periodo de evaluación alcanzando valores de incremento del 14.5 y 15.7 % las concentraciones de 0.5 y 1 mg respectivamente. Por el contrario, la concentración de 3.75 mg se mantiene casi constante hasta que, tras la segunda exposición, el peso corporal aumenta en un 9% en comparación con el peso inicial (Figura 20 C).

Evaluación macroscópica de los pulmones de ratón

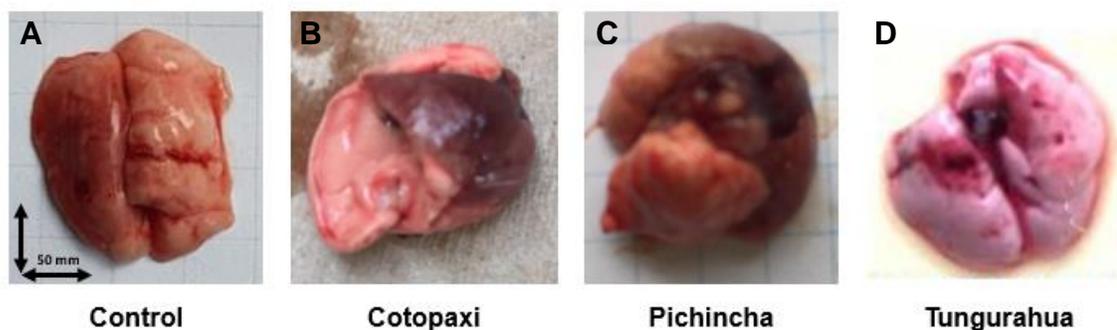
Los pulmones obtenidos al final del periodo de evaluación se pueden observar en la Figura 21. Las cenizas de los volcanes de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua indujeron cambios morfológicos en el tejido pulmonar murino al administrarse en una concentración de 3.75 mg / 100 g de peso corporal, se puede observar que a diferencia del grupo control los pulmones aumentaron su tamaño (Tabla 7) para las cenizas del volcán Cotopaxi y Pichincha a la concentración de 3.75 mg. A diferencia del grupo control, cuyos pulmones presenta un color rosa en todo del tejido (Figura 21 A), los pulmones expuestos a ceniza volcánica evidencian un cambio color en ciertas regiones.

Con la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi (Figura 21 B), el tamaño del órgano aumenta en comparación al control no solamente en dimensiones, ya que también se puede apreciar un aumento en el peso promedio de los pulmones de todo el grupo (Tabla 7). En el pulmón se puede observar una lesión en uno de los lóbulos de forma elevada con respecto al resto del pulmón que afecta a todo el lóbulo cranial derecho. La forma de la lesión es triangular dada por la forma del lóbulo afectado y con una coloración rojiza oscura producido por una congestión. En lo que respecta a la textura del pulmón como de la zona afecta, esta es sólida ya que mantiene la estructura normal del órgano, sin embargo, en la zona de la lesión se puede observar una consistencia blanda producida de igual forma por la congestión.

Tras la exposición a ceniza volcánica de Pichincha (Figura 21 C), el pulmón manifiesta características similares a las observadas en el pulmón expuesto a ceniza de Cotopaxi. En cuanto al tamaño del órgano, se puede observar un aumento en el tamaño, de igual forma, tanto en extensión como en peso; cómo se puede observar en la Tabla 7, la ceniza del volcán Pichincha indujo una diferencia estadística (p -valor ≤ 0.1) en el peso medio del grupo expuesto en comparación con el grupo control. Se puede identificar una lesión lobar en el lóbulo cranial derecho y una lesión focal en la parte superior de lóbulo izquierdo por la coloración rojiza que presentan, con un leve engrosamiento de las áreas afectadas. El tamaño de las lesiones no son uniformes ya que es mucho menor en el lóbulo izquierdo a comparación del lóbulo derecho, muestran una textura solididad en todo el pulmón y una consistencia firme en las lesiones.

Figura 21

Efecto de la ceniza volcánica a nivel macroscópico en tejido pulmonar murino.



Nota. Fotos de pulmones murinos expuestos a ceniza volcánica en una concentración de 3.75 mg / 100 g de peso corporal durante un período de corta exposición.

Por el contrario, el tejido pulmonar expuesto a ceniza del volcán Tungurahua (Figura 21 D) a pesar de que muestra un aumento de tamaño no hay un aumento en el peso pulmonar medio de este grupo tratado. Se observan pequeñas lesiones circulares de color rojizo en el lóbulo izquierdo como en los lóbulos cranial y medio. Estas lesiones

son planas y no tienen un tamaño uniforme, la lesión presente en el lóbulo izquierdo es de mayor tamaño que las de los lóbulos derechos. La textura y consistencia de este tejido es sólida y blanda característica de los pulmones.

Tabla 7

Características morfológicas de los pulmones expuestos a ceniza volcánica.

Características	Tratamiento			
	Control	Cotopaxi	Pichincha	Tungurahua
Tamaño	158x121 mm	163x152 mm	169x159 mm	177x173 mm
Peso	220 ± 46 mg	332 ± 150 mg	351 ± 266 mg ^{ns}	238 ± 34 mg
Color	Rosado uniforme	Rosado con secciones rojo oscuro	Rosado con secciones rojo oscuro	Rosado con manchas rojizas

Nota. Los resultados son las medias ± SD de n=6 experimentos independientes.

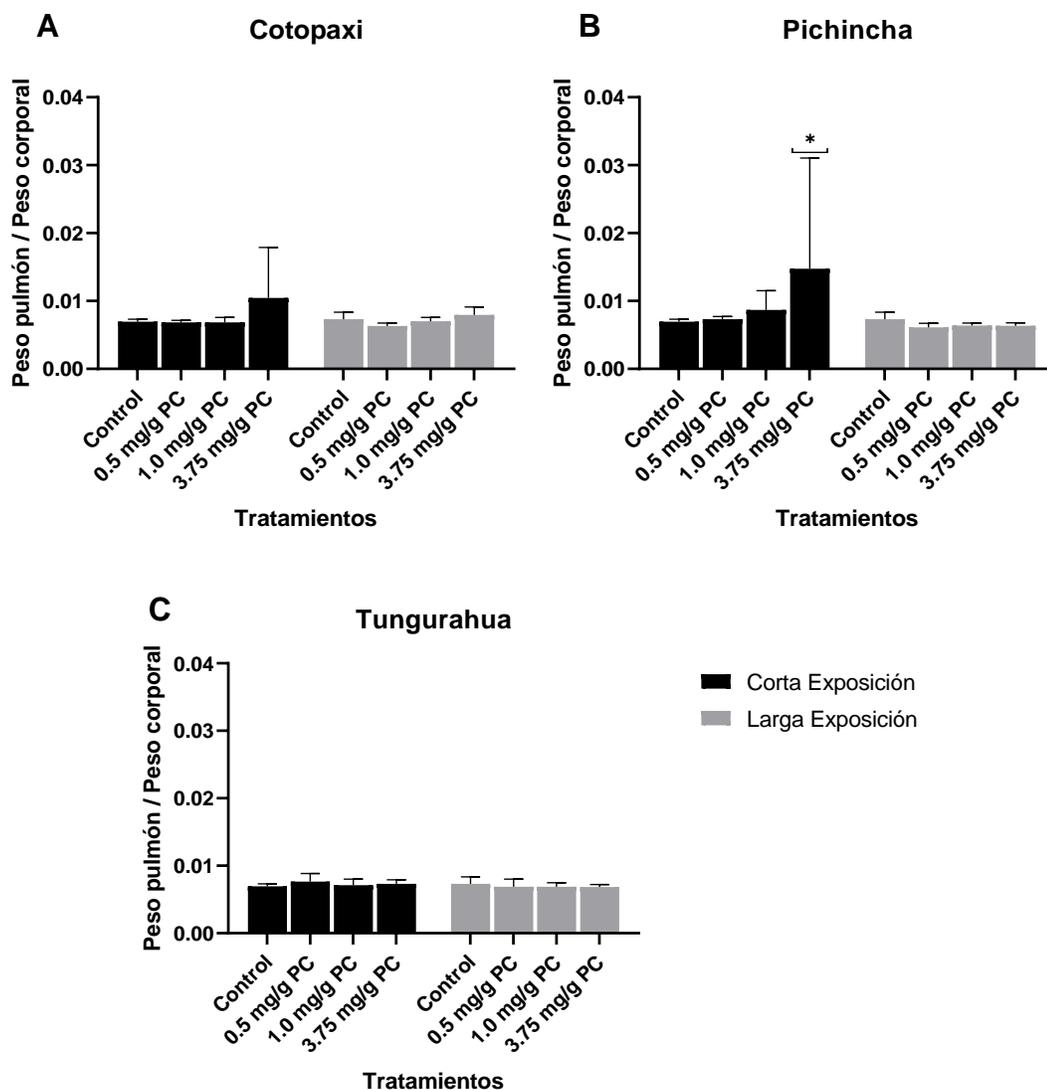
Diferencia estadísticamente significativa para ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de comparación múltiple Dunnett: ns ≤ 0.1, * p ≤ 0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparado con el control no tratado.

En lo que respecta al peso pulmonar, en la figura 22 se puede observar que las proporciones de peso pulmón: peso corporal de los animales, en donde el grupo control alcanzó un valor de 0.007. Para el grupo expuesto a la ceniza de Cotopaxi no existe diferencia estadística entre las diferentes concentraciones con respecto al grupo control tanto para la exposición a corto y largo plazo, a pesar de que se observa un ligero aumento en la concentración de 3.75 mg (Figura 22 A). La relación aumento significativamente (p <0,05) para los animales expuestos a la concentración de 3.75 mg de ceniza del volcán Pichincha en un corto periodo de exposición (Figura 22 B), sin embargo, para el periodo exposición largo no se evidencio diferencia entre los grupos. La ceniza del volcán Tungurahua no indujo una variación en la relación peso pulmón:

peso corporal, ya que no se observa diferencia entre los tratamientos evaluados (Figura 22 C).

Figura 22

Efecto de la ceniza volcánica en la relación peso pulmón / peso corporal.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de $n=5$ experimentos independientes.

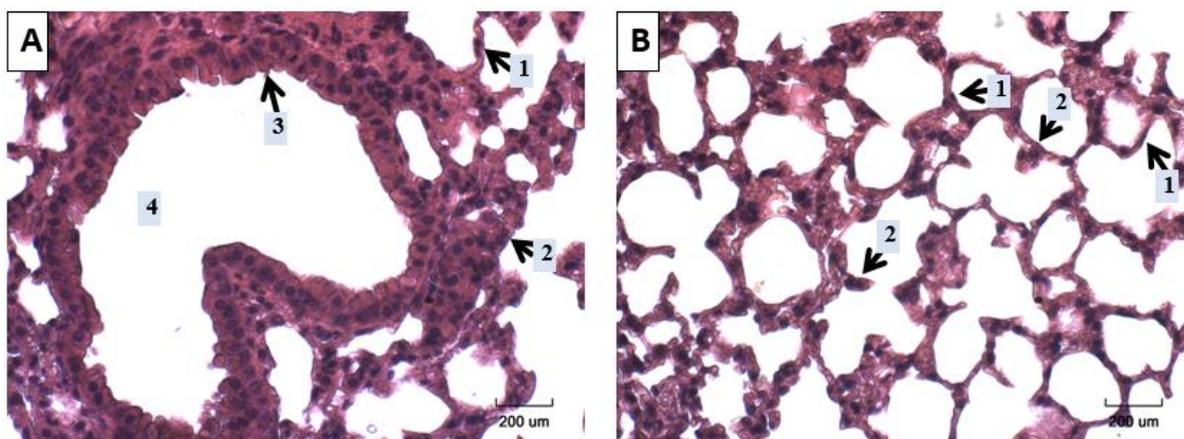
Diferencia estadísticamente significativa Kruskal-Wallis seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunn: * $p \leq 0.05$, comparado con el control no tratado.

Tinción de hematoxilina & eosina de tejido pulmonar murino

El análisis de la morfología y estructura pulmonar tras la exposición a ceniza volcánica de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua se realizó en cortes transversales de 4 μm mediante la tinción de Hematoxilina & Eosina (H & E). El tejido del grupo control sano que no fue expuesto se puede observar en la Figura 23, en el cual, tanto las estructuras bronquiolares como alveolares se encuentran bien definidas. En el bronquiolo terminal (Figura 23 A) está compuesto por las células clara que se rodean por las estructuras alveolares. Cada uno de los alveolos (Figura 23 B) están delimitado por los tabiques alveolares que se observa como una fina pared entre los espacios aéreos que se encuentran despejados, formando parte de la pared alveolar se encuentran las células epiteliales (Neumocitos tipo I y tipo II).

Figura 23

Cortes de tejido pulmonar murino sano.



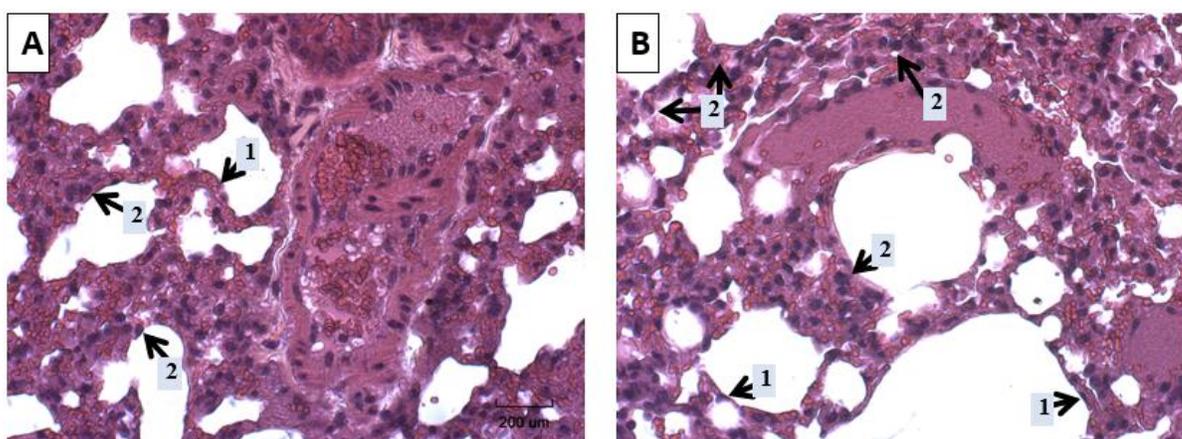
Nota. Secciones de tejido pulmonar de 4 μm de grosor embebidos en parafina.

Magnificación 400X. Tinción H & E. A) Bronquiolos terminales [4] en las que se puede observar a las células de clara [3] junto a los espacios alveolares. B) Estructuras alveolares en donde se observar neumocitos tipo I [1] y neumocitos tipo II [2].

Los tejidos expuestos a ceniza del volcán Cotopaxi a una concentración de 0.5 mg (Figura 24 A) no evidencian un cambio morfológico en los bronquiolos, pero los alveolos presentan un leve engrosamiento de los tabiques en comparación con el grupo control (Figura 23). En el tejido expuesto a una concentración de 1 mg (Figura 24 B) se comienza a observar una reducción de los espacios aéreos por la deformación de las estructuras alveolares y el colapso de estas, además los tabiques se encuentran engrosados; por otro lado, en ciertas regiones se ha producido aumento anómalo del espacio aéreo por la destrucción de los tabiques alveolares.

Figura 24

Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Cotopaxi.



Nota. Secciones de tejido pulmonar de 4μm de grosor embebidos en parafina.

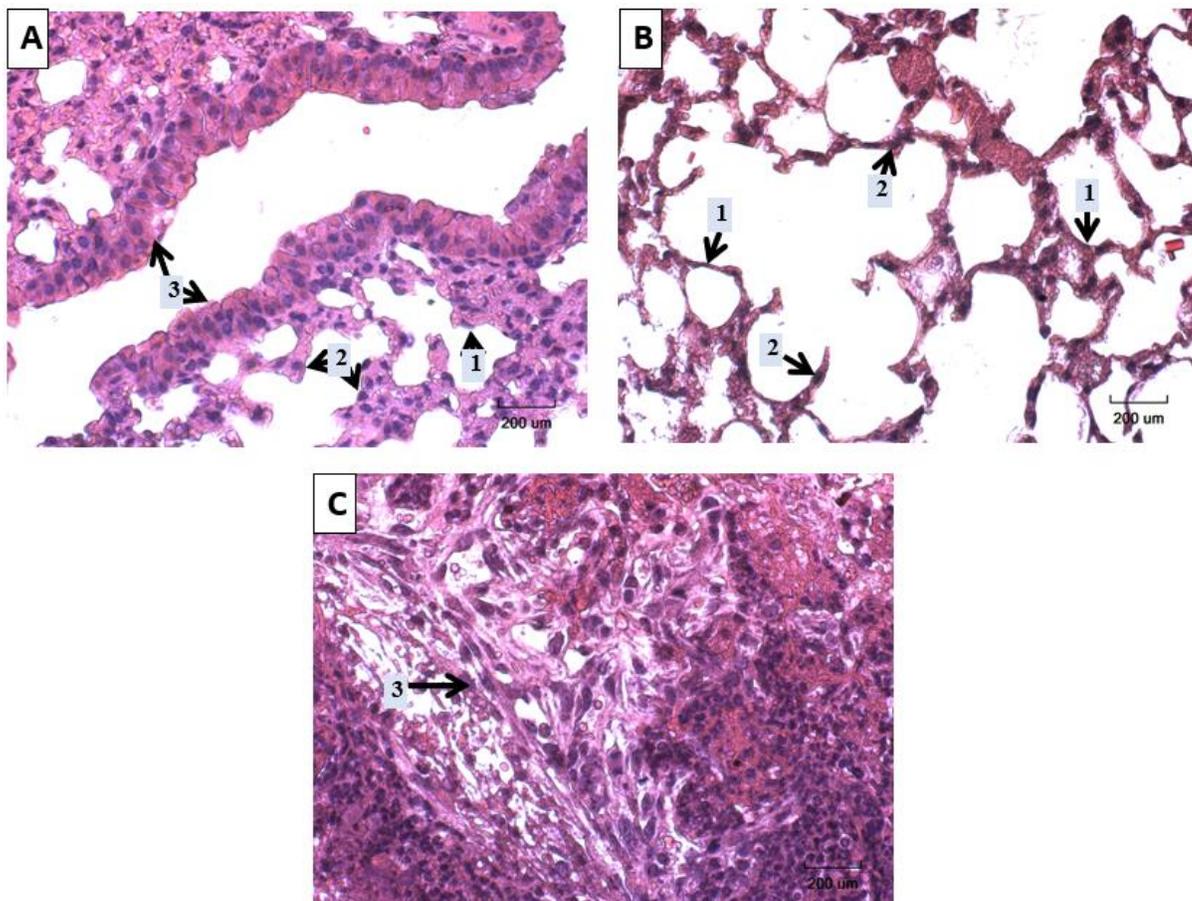
Magnificación 400X. Tinción H & E. **A)** Tejido pulmonar expuesto a 0,5 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: Alveolos pulmonares con sus neumocitos tipo I [1] y neumocitos tipo II [2] con paredes ligeramente engrosadas. **B)** Tejido pulmonar expuesto a 1 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: Espacios alveolares colapsados en la parte superior en donde también se observan aumento de células epiteliales y aumento de espacio aéreo por un probable enfisema en la parte inferior.

El tejido expuesto a la ceniza del volcán Pichincha muestra un daño proporcional a la concentración utilizada (Figura 25). A la concentración de 0.5 mg (Figura 25 A), el bronquiolo terminal no presenta un cambio morfológico respecto al control, sin embargo, las estructuras alveolares aparecen con paredes gruesas y espacio aéreo reducido por el aumento de células epiteliales. A la concentración de 1 mg (Figura 25 B), se observa una leve dilatación de los espacios alveolares, denominado enfisema, producido por la ruptura de tabiques alveolares sin engrosamiento de paredes. En el tejido expuesto a la concentración de 3.75 mg (Figura 25 C), se puede observar una morfología pulmonar distorsionada, en la que los espacios alveolares se encuentran colapsados con la presencia de neumocitos hiperplásicos y probable exudado linfocitario, además se puede observar un foco fibroblástico característico de la fase final de una lesión pulmonar.

Tras la exposición a la ceniza volcánica de Tungurahua, los tejidos pulmones expuestos a la concentración más baja, de 0.5 mg, manifiestan estructuras alveolares un poco deformadas con incremento de neumocitos tipo II que engrosan las paredes alveolares (Figura 26 A). Con la concentración de 1 mg, se produjo una reducción del espacio aéreo por el colapso y engrosamiento de paredes alveolares dejando algunas regiones con superficies muy pequeñas, sin embargo (Figura 26 B). La exposición a una concentración de 3.75 mg en el tejido pulmonar murino (Figura 26 C) ocasionó un colapso alveolar que se pueden observar alrededor del bronquiolo terminal, con la aglomeración de células epiteliales por lo cual los espacios alveolares han perdido su forma característica que se puede observar en el grupo control (Figura 23 B).

Figura 25

Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Pichincha.



Nota: Secciones de tejido pulmonar de 4µm de grosor embebidos en parafina.

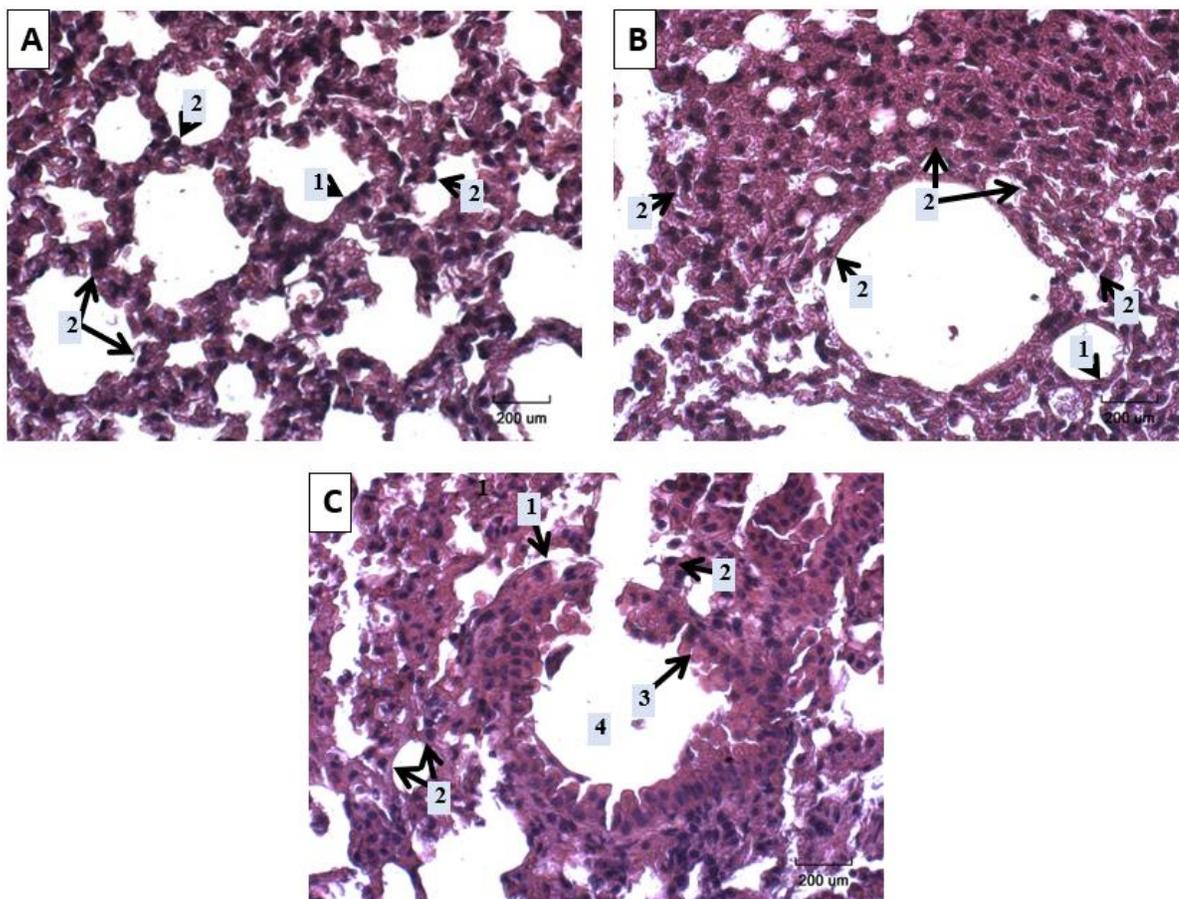
Magnificación 400X. Tinción H & E. **A)** Tejido pulmonar expuesto a 0,5 mg de ceniza/ 100 g de peso corporal: Bronquiolo terminal, alrededor hay presencia de estructuras alveolares con un ligero aumento de células epiteliales. Neumocitos tipo I [1].

Neumocitos tipo II [2]. Células de clara [3] **B)** Tejido pulmonar expuesto a 1 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: Estructuras alveolares en las que se observa una leve dilatación de los espacios alveolares (enfisema) en la parte central izquierda. **C)** Tejido pulmonar expuesto a 3,75 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: Neumonía intersticial

en tejido pulmonar murino, en la que se puede observar un foco fibroblástico [3] y presencia de neumocitos hiperplásicos.

Figura 26

Cortes de tejido pulmonar murino expuesto a ceniza del volcán Tungurahua.



Nota: Secciones de tejido de 4µm de grosor embebidos en parafina. Magnificación 400X. Tinción H & E. **A)** Tejido pulmonar expuesto a 0,5 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: espacios alveolares un tanto colapsados con la presencia de numerosos neumocitos tipo II [2]. Neumocito tipo I [1]. **B)** Tejido pulmonar expuesto a 1 mg de ceniza / 100 g de peso corporal: Estructura alveolares con aumento del espacio aéreo por un probable enfisema irregular junto al engrosamiento de paredes alveolares alrededor. **C)** Tejido pulmonar expuesto a 3,75 mg de ceniza / 100 g de peso corporal:

Bronquiolo terminal [4] compuesta por células de clara [3], se pueden observar alveolos pulmonares colapsados y aumento de células epiteliales.

Análisis de expresión génica de citoquinas

La expresión génica de los marcadores de inflamación (TNF- α , IL-8, NLRP3 y ASC) son dependiente de la concentración de ceniza volcánica dependiendo del marcador. Al comprar los tiempos de exposición no se observa alguna diferencia marcada para ninguna de las interleucinas. Al exponer a ceniza del volcán Cotopaxi (Figura 26), la expresión de TNF- α aumenta de forma dependiente a la concentración; sin embargo, los valores de expresión no varían estadísticamente entre las concentraciones para ambos periodos de exposición a excepción de la concentración 3.75 mg a una larga exposición que si evidencia una diferencia a comparación del grupo control ($p \leq 0.1$). Por el contrario, los niveles de IL-8 disminuyen inversamente proporcional a la concentración con respecto al control para los dos periodos de exposición ($p \leq 0.05$). En lo que respecta a ASC, existe una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de sus niveles para la concentración de 0.5 y 1 mg durante una larga exposición, para el resto de las concentraciones no se evidencia diferencia estadística con el grupo control. Los valores de expresión de NLRP3 aumentan comparado con el control, tras una corta exposición se dio una respuesta heterogénea a las diferentes concentraciones, pero tras una larga exposición se puede observar un aumento dependiente de la dosis, aunque solo a la concentración de 3.75 mg tiene un incremento significativo ($p < 0.01$).

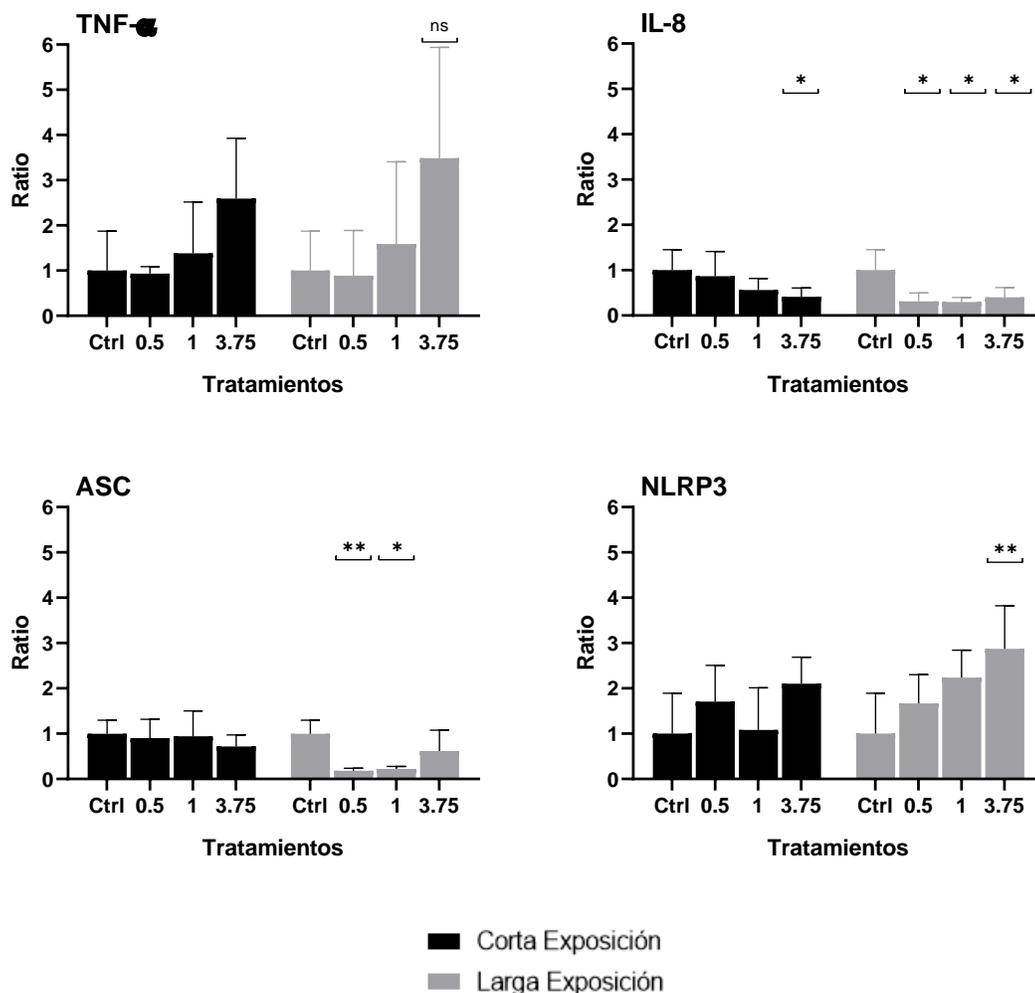
La exposición a ceniza volcánica de Pichincha (Figura 19) indujo la expresión de TNF- α solamente a la concentración 3.75 mg tras una corta exposición ($p \leq 0.1$) para el resto de los tratamientos no se observa diferencia con el grupo control. No obstante, la expresión de IL-8 se ve reducida ($p < 0.001$) para todas las concentraciones en

comparación con el grupo control de forma inversamente proporcional a la concentración de ceniza, es decir a mayor concentración se registró una menor cantidad de esta citocina. De la misma manera, el nivel de ASC se redujo significativamente ($p \leq 0.05$) en función al aumento de la concentración de ceniza volcánica. Los valores de expresión de NLRP3 mostraron un aumento, en el periodo de corta exposición los ratones expuestos a la concentración de 3.75 mg produjeron mayor cantidad de esta citocina en comparación con el grupo no tratado ($p \leq 0.05$); por el contrario, durante una larga exposición a la ceniza volcánica se observó mayor cantidad de NLRP3 a la concentración de 0.5 mg ($p < 0.01$).

Tras la exposición a ceniza del volcán Tungurahua existe un aumento de TNF- α , en el tratamiento a corta exposición a la concentración de 3.75 mg ($p \leq 0.1$) y a larga exposición a las concentraciones más altas de 1 y 3.75 mg ($p \leq 0.1$) con respecto al control. Los niveles de expresión de IL-8 no difieren del grupo control a pesar de observarse un ligero aumento en los ratones expuesto a 1 mg en un corto periodo de exposición. El grupo expuesto a concentración de 0.5 y 3.75 mg durante un largo periodo de exposición mostraron una disminución en los valores de ASC ($p \leq 0.1$) pero tras una corta exposición no hay diferencia entre los niveles de expresión de esta citocina. Por el contrario, la expresión de NLRP3 durante una corta exposición no es significativa, pero si se observa que la esta citocina aumentó significativamente ($p \leq 0.01$) para todas las concentraciones tras una exposición larga.

Figura 27

Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi en concentraciones de 0.5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal.

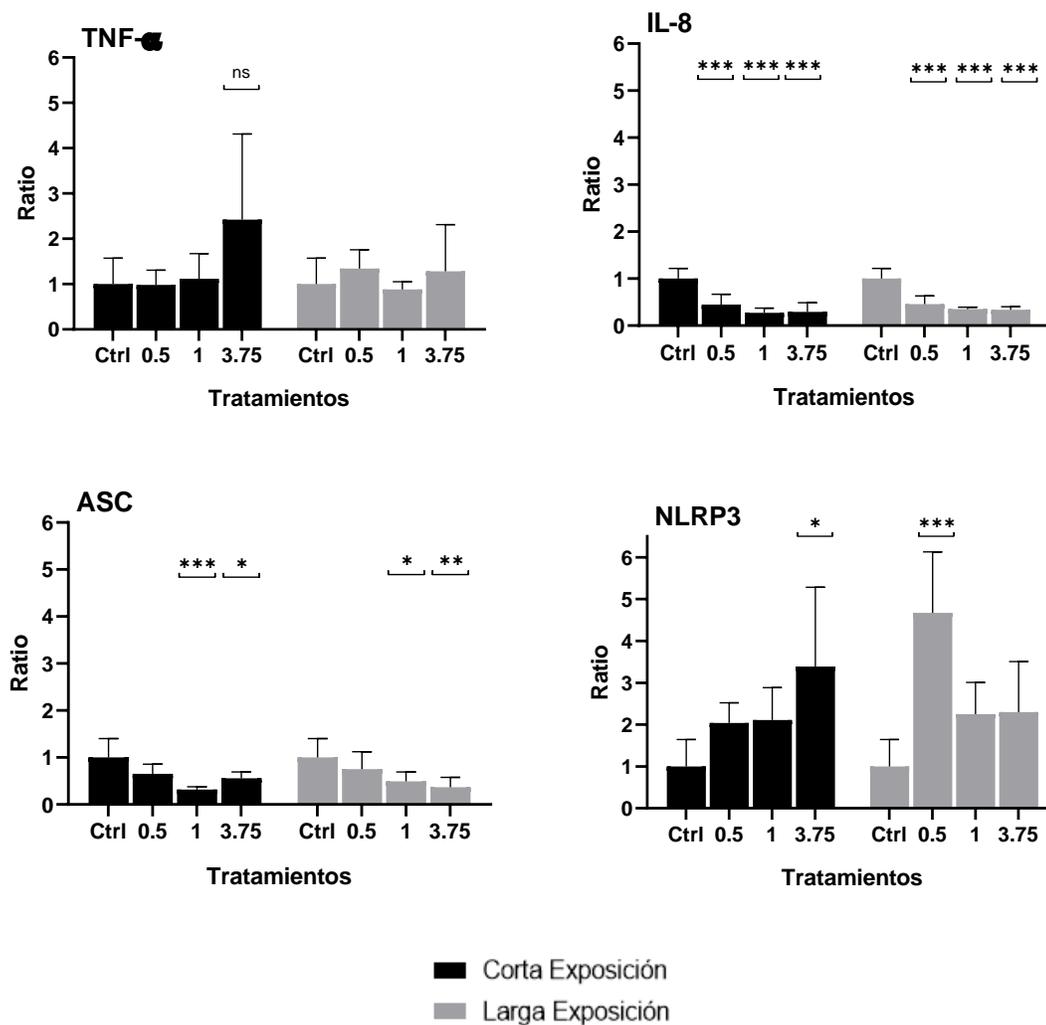


Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=5 experimentos independientes.

Diferencia estadísticamente significativa para ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de comparación múltiple Dunnett: ns \leq 0.1, * $p \leq$ 0.05, ** $p \leq$ 0.01, *** $p \leq$ 0.001, comparado con el control no tratado.

Figura 28

Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Pichincha en concentraciones de 0,5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal.

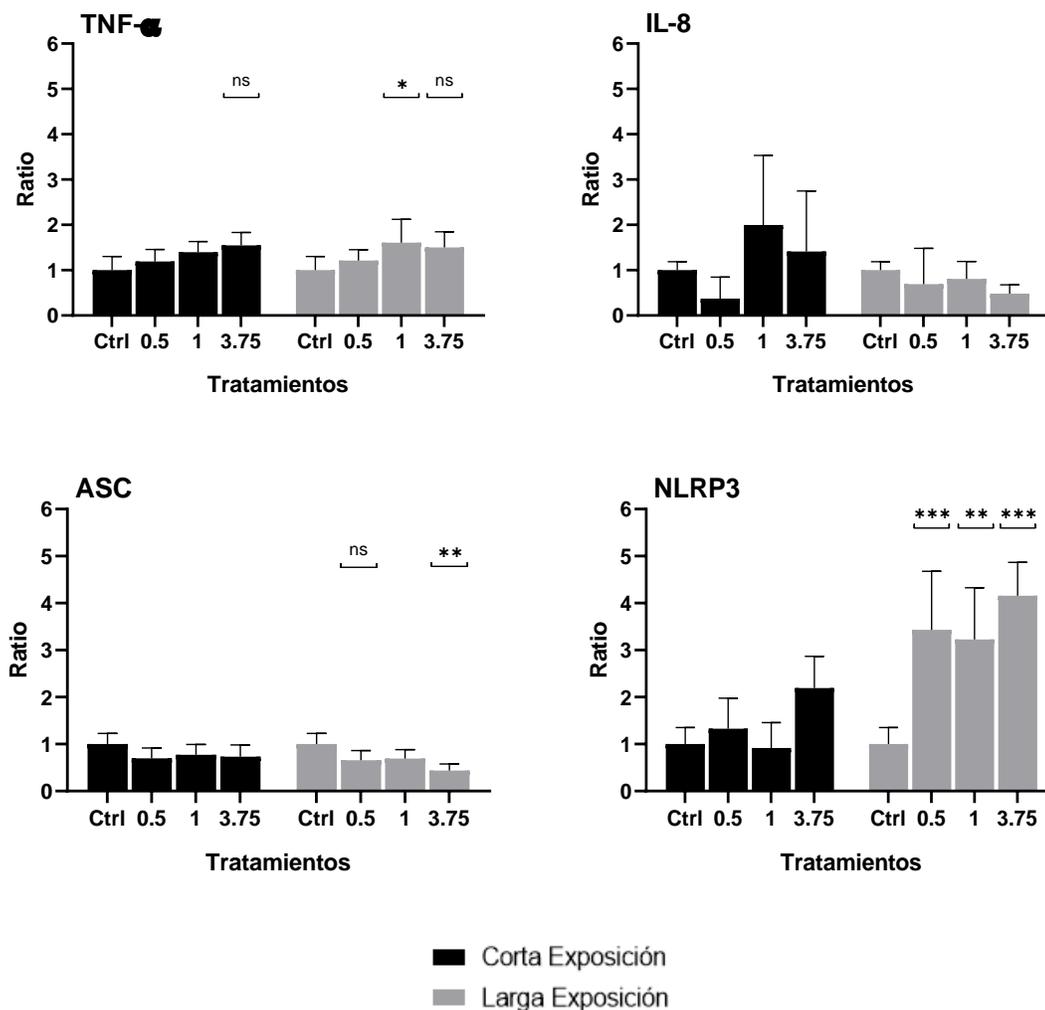


Nota: Los resultados son las medias \pm SD de n=5 experimentos independientes.

Diferencia estadísticamente significativa para ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de comparación múltiple Dunnett: ns \leq 0.1, * $p \leq$ 0.05, ** $p \leq$ 0.01, *** $p \leq$ 0.001, comparado con el control no tratado.

Figura 29

Expresión génica de marcadores de inflamación tras la exposición a ceniza del volcán Tungurahua en concentraciones de 0.5, 1 y 3,75 mg/100 g de peso corporal.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=5 experimentos independientes.

Diferencia estadísticamente significativa para ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de comparación múltiple Dunnett: ns \leq 0.1, * $p \leq$ 0.05, ** $p \leq$ 0.01, *** $p \leq$ 0.001, comparado con el control no tratado.

Capítulo V: Discusión

Evaluación de mortalidad y peso corporal

Para el uso de animales en la investigación se garantizando el bienestar de los mismos siguiendo los principios de experimentación animal conocidos como las "3R": reemplazo, reducción y refinamiento (Couto & Cates, 2019). Los ratones de laboratorio son de gran importancia en la investigación biomédica, por lo que los principios de buena cría de animales, atención veterinaria adecuada, mantenimiento de las instalaciones animales, monitoreo ambiental y capacitación del personal garantizan el buen manejo de los animales lo cual se refleja en las investigaciones (Donovan & Brown, 2013).

De acuerdo a Moberg (2000), el estrés se define como “la respuesta biológica que exhibe un animal en un intento de hacer frente a las amenazas a su homeostasis”. Esta interferencia homeostática generada por factores estresantes que puede incluir una infección, o en el caso del presente estudio, la exposición a ceniza volcánica, puede causar cambios en el comportamiento y fisiología del animal generando un indicativo de mal bienestar (Isbn et al., 1991). El bienestar de los animales puede medirse a través del costo o respuesta que ocasiona el factor estresante y entre los indicadores de bienestar que se manifiestan en animales se encuentran los cambios en las características biológicas como el peso corporal e incluso puede involucrar cambios inmunológicos, entre otros (M. J. Brown & Winnicker, 2015; Damián & Ungerfeld, 2013). El tipo y nivel de respuesta va a depender de fuerza, severidad, intensidad y duración de los factores estresantes (M. J. Brown & Winnicker, 2015). Este estudio nuestros factores estresantes se representaron en 3 tipos de cenizas volcánicas, en 3 concentraciones y en dos periodos de exposición.

A pesar de que no se observó mortalidad en el presente estudio, la exposición a ceniza volcánica indujo cambios en el peso corporal de los individuos. Inmediatamente después de la exposición la mayoría los grupos evidenciaron una reducción de peso corporal, excepto Pichincha 0.5 y 3.75 mg/g PC y Tungurahua 0.5 mg/g PC. Después del corto periodo de exposición a ceniza volcánica, la disminución del peso corporal se manifestó principalmente en el grupo expuesto a una concentración de 3.75 mg/g PC con una reducción del 7.95 %, 5.4% y 2% para Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua respectivamente. La disminución del peso corporal en los animales expuestos a ceniza volcánica puede explicarse en parte por la disponibilidad reducida de oxígeno, reducción de la respiración aeróbica basal, aumento del estrés agudo, reducción de la ingesta de alimentos y uso de reservas sistémicas de glucógeno a través de la respiración anaeróbica (Stueckle et al., 2018), lo que indicaría una interferencia en la homeostasis y por ende una disminución del bienestar animal.

A diferencia del grupo expuesto solo a PBS, que también muestran una reducción en el peso corporal, todos los grupos expuestos la ceniza volcánica evaluados en un corto periodo evidencian una oscilación a lo largo del tiempo de evaluación. Esto puede deberse a que el mantenimiento del peso corporal depende de la interacción de procesos, que incluyen factores homeostáticos, ambientales y de comportamiento. En la regulación homeostática, el hipotálamo juega el papel principal en la integración de las señales relacionadas con la ingesta de alimentos, el equilibrio energético y el peso corporal (Greenway, 2015). En los grupos evaluados en un largo periodo de exposición a ceniza volcánica, se produjo un notable aumento de peso al término del periodo hasta llegar a alcanzar un 122% con respecto al peso inicial de los animales. La recuperación del peso, así como el aumento del mismo puede ser

provocada por la alimentación *ad libitum* (Rosenbaum et al., 2019) con la que fueron mantenidos todos los grupos experimentales de este estudio.

Evaluación macroscópica de los pulmones de ratón

El peso de los órganos internos ha resultado de utilidad para determinar el estado patológico de los mismos y demostrar que el órgano no se encuentra en un estado normal (Mubbunu et al., 2018). El cambio de peso pulmonar, principalmente el aumento, se correlaciona con eventos histopatológicos de lesiones inflamatorias. El valor del peso pulmonar como biomarcador para predecir la histopatología pulmonar tiene una sensibilidad de aproximadamente 86%, pero es menos sensible para la detección de lesiones leves o focales. Las variaciones individuales y grupales del peso pulmonar pueden ocultar un cambio leve en el peso pulmonar, especialmente cuando el número de animales en cada grupo es pequeño (Wahlström et al., 2013). Los tejidos pulmonares expuestos a ceniza volcánica en concentraciones de 3.75 mg / 100 g de peso corporal (PC) muestran un aumento al compararlos con el grupo control, siendo la diferencia más relevante el grupo expuesto a ceniza del volcán Pichincha con un aumento del 59.85% con respecto al grupo control (Tabla 7), en el cual también se puede observar un aumento de tamaño con coloraciones oscuras, lo cual, se correlaciona con el análisis histológico que muestra inflamación en el tejido (Figura 25 C). Esto resultados concuerdan con el estudio de Porter et al. (2004), en el que los pesos pulmonares de ratas expuestas a sílice aumentaron de 1.13 -1.47 veces en comparación con sus controles de aire tras 20 – 60 días de exposición respectivamente, lo que reflejan el influjo de células inflamatorias, el edema y el aumento de la deposición de colágeno en respuesta a la inhalación de sílice. Por el contrario, los pulmones expuestos a ceniza de los volcanes Cotopaxi y Tungurahua a la concentración de 3.75mg, no muestra un aumento significativo del peso de los pulmones con respecto al

grupo control, lo que sugeriría que las lesiones son leves, ya que si se observa un ligero incremento y la presencia de coloraciones rojizas (Figura 21).

Lesiones pulmonares como sepsis, traumatismos, quemaduras, aspiración e inhalación química, entre otros, pueden causar un daño agudo al endotelio vascular del tejido pulmonar (Bajwa & Kulshrestha, 2012), lo que provocaría aumento en la permeabilidad vascular pulmonar y epitelial contribuyendo a la formación de edema pulmonar no cardiogénico (Matthay, 2014). El reclutamiento de células inflamatorias, como neutrófilos y macrófagos, en las zonas afectadas está relacionada con el aumento de la permeabilidad (El-Kashef, 2018). La acumulación de líquido de edema en los alveolos ocurre después de un aumento extravascular en más del 35% y se produce de forma heterogénea en todo el pulmón. (Parker & Townsley, 2004). La proporción del peso pulmonar húmedo/peso corporal es un indicativo de la formación de edema en los pulmones (Katira et al., 2017) y por lo tanto permite evaluar la lesión pulmonar (Parker & Townsley, 2004).

En el presente estudio se observó que la relación de peso pulmonar húmedo: peso corporal no aumentaba en relación con el grupo control para la mayoría de las concentraciones de las cenizas volcánicas. Sin embargo, para el grupo de Pichincha 3.75 mg durante un periodo de exposición corto, se muestra una diferencia significativa contra el grupo control encontrándose que el valor de esta relación se duplico (Figura 22 B). En estudios en los que se ha inducido la formación de edema se ha observado un aumento mayor al doble en la relación peso pulmonar/peso corporal en comparación con sus líneas bases o controles (Parker & Townsley, 2004). Esto se correlaciona con los resultados obtenidos, por lo que se puede deducir que la formación de edema en el grupo de Pichincha 3.75 mg se produjo tras la exposición a la ceniza. Según Sharplin & Franko (1986), el aumento del peso húmedo de los pulmones murinos tras una lesión es

de interés porque podría estar relacionado con los mecanismos responsables de la neumonitis o fibrosis posteriores.

A pesar de que la evaluación macroscópica pulmonar tras la exposición a ceniza volcánica es prácticamente inexistente en las investigaciones, si se han realizado algunos estudios basados en la exposición a sílice, uno de los principales componentes de la ceniza volcánica. Uno de los cuales, ha mostrado que la inhalación de nanopartículas de sílice amorfa produce cambios transitorios en los parámetros de respiración, aumento de peso pulmonar, células y proteínas de lavado bronco alveolar total (BAL), inflamación aguda inducida y daño tisular (Yu et al., 2013). De igual forma, según El-Kashef (2018), la instilación de sílice aumento significativamente el edema pulmonar y el recuento de células totales en el líquido BAL.

Tinción de hematoxilina & eosina de tejido pulmonar murino

La tinción de hematoxilina y eosina (H&E) es el estándar utilizado para el análisis histológico de tejidos que se han fijado, procesado, incrustado y seccionado. En los tejidos teñidos con estos colorantes, los ácidos nucleicos y otros elementos celulares ácidos se tiñen de azul oscuro o azul-violeta y el citoplasma se tiñen de rojo a rosa o naranja (Cardiff et al., 2014; Feldman & Wolfe, 2014) y puede ser útil para identificar cambios estructurales como la fibrosis (Cavazza et al., 2010).

Durante la aspiración de agentes tóxicos, si estos pasan al nivel de las vías aéreas conductoras se produce daño a las células epiteliales y aumento de la permeabilidad de la mucosa a otras sustancias, lo que influye en la inflamación y puede provocar broncoconstricción, edema peribronquial y desprendimiento de la mucosa bronquial con un desarrollo de atelectasia. Las sustancias con baja solubilidad y partículas pequeñas de menos de 5 μm de diámetro pueden penetrar en el tracto respiratorio inferior. En las vías respiratorias distales y alvéolos, la lesión epitelial y

endotelial produce edema inducido por permeabilidad, que puede manifestarse desde edema intersticial leve hasta insuficiencia pulmonar. Esto resulta en una disminución de la distensibilidad pulmonar, un mayor gradiente de oxígeno alveolar-arterial y una mayor resistencia vascular pulmonar (Valente, 2016).

La ceniza volcánica es un conjunto de rocas pulverizadas, minerales y vidrio volcánico producidos durante una erupción volcánica y cuyo diámetro es menor a 2mm (Djobo et al., 2017), a pesar de que su composición difiere entre volcanes y proceso eruptivo, está principalmente constituida en mayor proporción por sílice (SiO_2), seguida de compuestos minerales como hierro (Fe), Magnesio (Mg), calcio (Ca), potasio (K), sodio (Na) y en menor proporción por otros metales pesados (Djobo et al., 2017; Vigneri et al., 2017). Según Horwell et al. (2013) algunas erupciones volcánicas generan cenizas con abundante sílice cristalina, lo que puede representar un peligro crónico de enfermedad pulmonar fibrótica como silicosis o fibrosis de polvo mixto ante una exposición continua e intensa. La silicosis es una inflamación severa en donde se manifiesta una pérdida de arquitectura alveolar y fibrosis marcada a nivel pulmonar acompañada de infiltración de células inflamatorias, incluidos eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. Tras la exposición a partículas de sílice, los macrófagos fagocitan estas partículas y se activan para liberar numerosos mediadores que comprenden histamina y serotonina, que se retienen en los pulmones durante la inflamación y median una cascada de eventos que conducen a una respuesta fibrótica. La inflamación y la lesión tisular estimulan el aumento de fibroblastos y con ellos se estimula la producción de colágeno y fibronectina esencial para la progresión de la fibrosis (El-Kashef, 2018).

La lesión pulmonar aguda (LPA) comprende una gama de lesiones pulmonares endoteliales y epiteliales que pueden deberse a diversas etiologías (Kumar et al., 2013), como la inhalación de sustancias tóxicas como el sílice o la ceniza volcánica. LPA se

caracteriza por una fase exudativa temprana y una fase proliferativa tardía. Durante la fase exudativa, se produce un daño mediado por células inmunitarias innatas de las barreras endotelial y epitelial alveolar, los alveolos contienen líquido proteico, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos producto de un aumento de la permeabilidad endotelial y epitelial pulmonar que se acumulan en el intersticio y en los conductos alveolares se forman las membranas hialinas; también se producen microatelectasias, inflamación y destrucción focal de células endoteliales. Tras una o dos semanas, la fase exudativa evoluciona a la fase proliferativa con el objetivo de permitir la reparación del pulmón lesionado, en la cual, se produce hiperplasia de las células epiteliales de tipo II, reabsorción del edema alveolar, acumulación de fibroblastos y monocitos en el intersticio pulmonar. Además, en algunos casos la arquitectura acinar se destruye y es remplazada por tejido fibrótico que obstruyen los espacios alveolares, lo que contribuye a una restricción pulmonar e insuficiencia respiratoria (Rocco et al., 2001, 2003; Thompson et al., 2017). Esta etapa fibrótica se caracteriza por ser una enfermedad pulmonar intersticial crítica, cuyos cambios patológicos se manifiestan como una remodelación distributiva y progresiva del parénquima pulmonar junto con la formación de cicatrices irreversibles (Xu et al., 2019). La última fase de la lesión pulmonar se puede observar en el tejido expuesto por corta duración a ceniza del volcán Pichincha en concentración de 3.75 mg, en el cual se evidencia la pérdida de la arquitectura alveolar con hiperplasia de las células epiteliales tipo II, además de la acumulación de fibroblastos y algunas células inflamatorias, lo que denota una etapa de proliferación tras una lesión pulmonar aguda con principios de fibrosis pulmonar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede deducir que los pulmones expuestos por una corta duración a ceniza del volcán Cotopaxi y Tungurahua sufrieron una lesión pulmonar no agresiva, ya que a pesar de que no se observó la presencia de

membranas hialinas característica de una fase exudativa, si se evidencia un ligero aumento de células endoteliales tipo II que engrosan los tabiques alveolares por un posible proceso de reparación, algo similar a lo que ocurre con la concentración 0.5 mg del volcán Pichincha. De acuerdo a Wallace et al. (2007), tras una inflamación intensa el pulmón puede regresar a un estado preinflamatorio por un proceso denominado resolución. El epitelio alveolar no sufre grandes daños, reteniendo la membrana basal, por lo que se produce una rápida reepitelización conducida por los neumocitos tipo II. Estos casos se producen debido a una reacción inflamatoria de duración limitada en donde no hay una inflamación y lesión crónica sostenida y que por lo tanto no resultan en remodelación y fibrosis. En el caso de las concentraciones de 1 mg del volcán Pichincha se reconoce la ruptura de los tabiques alveolares y por lo tanto el aumento del espacio aéreo, conocido como enfisema. En estos casos se puede hablar de un enfisema irregular, ya que el ácino está afectado de forma irregular, lo que se relaciona principalmente a cicatrices, producidas de forma secundaria a enfermedades inflamatorias curadas, es la forma más frecuente de enfisema y es clínicamente es asintomático (Kumar et al., 2013).

Los resultados obtenidos concuerdan con un trabajo realizado por Akematsu et al. (1982) en cobayos, en el cual se demostró que la ceniza volcánica produce una acumulación intraalveolar de fagocitos, principalmente macrófagos aunque al aumentar la concentración de ceniza se aumentaba el número de neutrófilos. No se encontró efectos citotóxicos en los fagocitos que ingirieron partículas de ceniza. También observaron cambios degenerativos en algunos neumocitos tipo I, cambio en la permeabilidad y en ciertas superficies alveolares la citología típica fue remplazada por neumocitos tipo II, confirmando las respuestas iniciales y la posibilidad de complicaciones adicionales.

Incluso en estudios con lesión pulmonar aguda inducida por Paraquat, un químico bien establecido para generar un modelo de lesión pulmonar (Han et al., 2015), dio como resultado la alteración de células epiteliales alveolares y de células clara, engrosamiento de las paredes alveolares con una estructura alveolar desorganizada, deterioro de la producción de surfactante, hemorragia, edema, hipoxemia e infiltración de células inflamatorias en los espacios intersticiales y alvéolos (Han et al., 2015; Novaes et al., 2012); estos resultados son comparables a los obtenidos en el presente trabajo indicando que si se produjo un lesión pulmonar, especialmente a la concentración más alta del volcán Pichincha. Algunas lesiones menos características como cambios edematosos no se detectan fácilmente en una sección de H&E de rutina (Wahlström et al., 2013), lo que también podría explicar porque no se observa edema en los tejidos expuestos a ceniza volcánica además del conjunto de células originadas en la etapa de proliferación que se mencionó anteriormente.

Análisis de expresión génica de citoquinas

Las partículas ambientales como patógenos, alérgenos y otros irritantes menor a 2.5 micras ($PM_{2.5}$) llegan al tracto respiratorio inferior y entran en contacto en primer lugar con las células epiteliales bronquiales pudiendo alterar la función de las mismas e incluso después llegan a interactuar con las superficies alveolares (Theofani et al., 2019; Tripathi et al., 2018). El epitelio de las vías respiratorias modera la inflamación producida en los pulmones a través de la expresión de genes de respuesta inmune ante los estímulos ambientales, los cuales regulan la señalización e interacción de la células inmunitarias (Øvrevik et al., 2009). Según Tripathi et al. (2018), los $PM_{2.5}$ inducen la síntesis de una variedad de citocinas y quimiocinas proinflamatorias incluidas IL-6, IL-8 y TNF- α , además de genes involucrados en la proliferación, inflamación y respuesta inmune.

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una potente citocina proinflamatoria que se encarga de regular varios procesos como la supervivencia celular, apoptosis, proliferación y migración en diferentes tejidos (Yamaoka et al., 2019). Además, TNF- α se considera un biomarcador y mediador del estrés oxidativo y la disfunción endotelial (Zelko et al., 2016). El aumento en su expresión juega un papel clave en infecciones graves y en una variedad de enfermedades inflamatorias. La señalización de TNF- α activa la vía del factor proinflamatorio nuclear kappa B (NF κ B), lo que conduce a una inflamación persistente y mejorada conjuntamente a una mayor apoptosis (Ehrhardt et al., 2016).

La expresión de la citocina TNF- α en los animales expuestos a la ceniza volcánica de Cotopaxi y Pichincha no vario en comparación con el grupo control para los periodos de exposición de corto y largo plazo respectivamente (Figura 26 y 27). Estos resultados pueden compararse a los obtenidos por Tomašek et al. (2016), en el cual, la exposición a ceniza de Soufrière Hills en un modelo celular provoco una respuesta proinflamatoria limitada sin producción significativa de esta citocina, además de citotoxicidad y potencial oxidativo bajo. De igual forma, en otro estudio realizado por Samukawa et al., (2003), en modelos *in vivo* se observó que el nivel de TNF- α en los ratones aumentó 1 hora después de la exposición a ceniza del Mt. Sakurajima, aunque no de forma significativa, y se fue reduciendo hasta alcanzar un valor constante similar al del grupo control.

Sin embargo, tras la exposición a la ceniza del volcán Cotopaxi y Pichincha a la concentración más alta tras un periodo de largo y corto plazo, respectivamente; y con la exposición a Tungurahua tras un tiempo corto a la concentración de 3.75 y tras un periodo de evaluación largo a las concentraciones de 1 y 3.75 mg, la expresión de TNF- α aumenta en relación con el control (Figuras 27, 28 y 29). El aumento en la secreción

de TNF- α se detecta en un proceso de lesión pulmonar, en el cual, esta citocina promueve moléculas de adhesión, activación y migración de células endoteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos e induce la secreción de otras citocinas (Tang et al., 2014). En un estudio realizado por Camarinho et al. (2019), los ratones expuestos a contaminación volcánica crónica aumentaron la cantidad de macrófagos, infiltrados mononucleares y enfisema en los análisis histológicos conjuntamente con una mayor producción en TNF- α , colágeno y elastina.

El TNF- α induce una exacerbación de las respuestas inflamatorias, lo cual es importante en la patogenia de diversos trastornos pulmonares, como bronquitis crónica, EPOC, lesión pulmonar aguda, entre otros (Camarinho et al., 2019). Esto sustenta los análisis realizado por Maldonado Cajiao et al. (2018) y Paladines & Zamora (2011) en los cuales encontraron que la población cercana al volcán Tungurahua tras un exposición frecuente aumentaron la incidencia de signos de daño respiratorio acompañado de cambios bronquíticos y otros problemas no respiratorios como enfermedades diarreicas, dérmicas y oftalmológicas durante los años del proceso eruptivo que va desde 1999 a 2010.

La interleucina (IL) -8 es una potente quimiocina que activa y recluta neutrófilos en condiciones *in vitro* como *in vivo* y forma parte del exudado inflamatorio producido en una infección. La expresión de IL-8 requiere la activación de NF- κ B, así como MAP quinasas y puede regularse por distintos constituyentes de ese medio inflamatorio como LPS, flagelina, IL-1 β y TNF- α (H. Cao et al., 2005; Pease & Sabroe, 2002). Esta quimiocina se origina en varios tipos de células inmunitarias como monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y macrófagos alveolares, pero también se expresa en otras células como fibroblastos, células epiteliales bronquiales, células endoteliales

microvasculares pulmonares y células del músculo liso de las vías respiratorias (Pease & Sabroe, 2002).

Se observó una desregulación de IL-8 tras la exposición a ceniza de los 3 volcanes. Sin embargo, la exposición a ceniza del volcán Tungurahua no mostró diferencias estadísticas en comparación con el grupo control. Con la exposición a ceniza volcánica de Cotopaxi los niveles de esta citocina redujeron hasta 3 veces su valor para la concentración de 3.75 mg tras el periodo de exposición corto y para todas las concentraciones durante el largo intervalo de exposición. Por otra parte, la ceniza de Pichincha disminuyó los valores de esta citocina en el homogeneizado pulmonar de forma inversamente proporcional a las concentraciones de ceniza para ambos periodos de exposición. Los resultados obtenidos sugieren que no hay un proceso inflamatorio en curso, ya que esta citocina juega un papel importante en la inflamación y cicatrización (Qazi et al., 2011). Existen estudios contradictorios sobre la expresión de IL-8 tras la exposición a cenizas, ya que en algunas investigaciones se evidencia un aumento en la producción de esta citocina después del contacto con ceniza volcánica (Damby et al., 2013, 2016; C. J. Horwell et al., 2013), mientras que en otros no se observó una diferencia en comparación con el grupo no tratado. Dentro de estos últimos, estudios realizados por Tomašek et al. (2016, 2019) en cultivos multicelulares concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que el nivel del mediador proinflamatorio, IL-8, no aumentó en comparación con sus controles no expuestos tras la exposición a ceniza volcánica por 24h e incluso se llegó a observar una reducción en los niveles de expresión pero sin significancia estadística. Damby et al., (2016) mostró que la expresión de IL-8 depende de la muestra de ceniza volcánica y que con las muestras obtenidas de algunos volcanes no se evidencia un aumento significativo en la expresión de esta citocina. Estas diferencias entre investigaciones se

basan no solamente en las características fisicoquímicas de las partículas de la ceniza volcánica, sino que además puede verse afectada por los diseños experimentales usados y los parámetros medidos (Tomašek et al., 2016).

NOD-like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3) es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) intracelular que detecta motivos microbianos, señales de peligro endógenas e irritantes ambientales, e induce la formación y activación de una plataforma multiproteica, el inflamasoma, que provoca la defensa en el huésped. El inflamasoma además de liberar citocinas proinflamatorias se encarga de un proceso de muerte celular conocida como piroptosis en la cual se produce la hinchazón celular, ruptura de membranas y liberación de contenidos celulares proinflamatorios. Se han identificado 5 principales inflamasomas: NLRP1, NLRC4, RIG-I, AIM2 y NLRP3, que están conformados por un receptor NLRP activo, la proteína adaptadora del inflamasoma, la proteína tipo mota asociada a apoptosis que contiene CARD (ASC) y la caspasa-1, la proteína efectora (Theofani et al., 2019).

La proteína asociada a apoptosis (ASC) es una molécula adaptadora que media las señales inflamatorias y apoptóticas, tiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasa (CARD) y se expresa predominantemente en macrófagos y células epiteliales de la mucosa. Esta proteína es conocida como un constituyente del inflamasoma, que interviene en la activación de la caspasa-1. ASC se considera un factor crítico del inflamasoma ya que vincula las señales de peligro exógenas y endógenas a la activación de la caspasa-1 (Ren & Chen, 2013). La activación del inflamasoma NLRP3 está estrictamente regulado y es un proceso que requiere de dos señales o pasos: una señal de cebado y una señal de activación (F. Cao et al., 2020; Theofani et al., 2019). La primera señal de cebado se realiza por un PAMP o DAMP y es necesaria para la transcripción de los componentes del inflamasoma: proteína

NLRP3, Casp-1 y genes de IL-1 β e IL-18. La segunda señal de activación lleva al ensamblaje del complejo NLRP3, la activación de la caspasa, y la liberación de las formas maduras de IL-1 β y IL-18. Los mecanismos por los cuales se desencadena la activación del inflamasoma se debe a los niveles iónicos del citosol, desestabilización lisosómica, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disfunción mitocondrial (Theofani et al., 2019).

Los resultados obtenidos muestran un aumento en los niveles de expresión de NLRP3 para todas las concentraciones y periodos de exposición. Sin embargo, tras la exposición a la ceniza del volcán Cotopaxi, la concentración de 3.75 mg en un periodo de larga exposición es el único tratamiento que muestra un aumento significativo. Por el contrario, en la exposición a ceniza de Pichincha se evidencia un aumento estadísticamente relevante a la concentración más alta y a la concentración más baja para los lapsos de corta y larga exposición respectivamente. Por otro lado, los niveles de NLRP3 en el tejido expuesto a ceniza volcánica de Tungurahua, aumentaron para la concentración más alta en la evaluación a corto plazo y se observa niveles constantes para las 3 concentración de tras un largo periodo de exposición. De acuerdo a Damby et al., (2018), el inflamasoma NLRP3 detecta señales de peligro cristalinas que pueden ocurrir durante enfermedades auto inflamatorias, como gota o aterosclerosis, y enfermedades ambientales, como silicosis o asbestosis, lo cual es congruente con los resultados obtenidos ya que la ceniza volcánica al ser un polvo heterogéneo, compuesto principalmente por sílice, va a desencadenar la activación de NLRP3 como se ha observado. Al mismo tiempo el estudio de Damby et al., (2018), demostró que la ceniza volcánica induce la expresión de IL-1 β dependiente de la expresión y activación de NLRP3, lo que se asemeja a otros estudios en donde la ceniza volcánica y la sílice

incrementa la expresión de IL-1 β (Damby et al., 2016; Øvrevik et al., 2009; Unno et al., 2014).

A diferencia de NLRP3, el nivel de expresión de ASC se redujo de forma heterogénea, exhibiendo una desregulación de esta proteína después de la exposición a ceniza volcánica. Con la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi, se observó una reducción de la expresión de esta proteína para la concentración de 0.5 y 1 mg tras un largo lapso de exposición, mientras que para el resto de los tratamientos no hubo diferencia. De la misma forma, la exposición a ceniza volcánica de Tungurahua solo manifiesta niveles de expresión más bajos que el control de forma significativa para la concentración mayor tras una larga exposición. Tal no fue el caso para Pichincha, en donde se evidencia una disminución significativa para las dos concentraciones más altas en ambos periodos de exposición y en la cual, en la exposición a largo plazo la reducción de los niveles de expresión es inversamente proporcionales al aumento de las concentraciones. Dado que la proteína ASC permite la interacción entre NLRP3 con procaspasa-1, esta proteína es necesaria para formación de las citocinas proinflamatorias IL-1 β y IL-18 (Man et al., 2014). Muchos estudios evalúan la expresión y función de ASC a través de análisis de western blot, microscopia y principalmente por de la expresión de IL-1 β (Damby et al., 2018; Shiohara et al., 2002; Taniguchi & Sagara, 2007). La proteína ASC al ser una molécula integradora importante, parte de la vía canónica del inflamasoma y por lo tanto responsable de la activación de caspasa-1; su inhibición se traduce a una gran reducción en los niveles de caspasa-1 y IL-1 β (Damby et al., 2018; Taniguchi & Sagara, 2007). De la misma forma tras la exposición a un inductor de inflamasoma como LPS, los análisis de western blot mostraron un aumento en los niveles de ASC (Shiohara et al., 2002) y de caspasa-1 para demostrar que ASC es capaz de regular positivamente la producción IL-1 β (Ren & Chen, 2013). Por otro

lado, al analizar la expresión relativa de esta proteína mediante ARNm, los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con los presentados por Awad et al., (2017) que mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de ASC tras la exposición a LPS en monocitos y macrófagos conjuntamente con un aumento en la expresión de NLRP3 en macrófagos alveolares tipo 1 que se encargan de la respuesta proinflamatoria. Así mismo, F. Cao et al. (2020), evidenció que los niveles de expresión de ARNm y proteínas de pro-caspasa-1 y ASC no difirieron entre el grupo control y el grupo expuesto a LPS pero si hubo un marcado aumento para NLRP3 confirmando los resultados obtenidos en este estudio.

La cascada NLRP3 > Caspasa-1 > IL-1 β , se considera uno de los responsables de los efectos proinflamatorios de la sílice cristalina, el asbesto y las sales de aluminio en los macrófagos y otras células inmunes fagocíticas, por lo que NLRP3 se considera esencial para el desarrollo de silicosis (Øvrevik et al., 2015). Man et al. (2014) han demostrado que solo se forma una mota de ASC por célula, independientemente del estímulo utilizado y comprobaron que diferentes NLR pueden estar presentes en la misma ASC para coordinar las funciones del inflammasoma e incluso una sola molécula de ASC puede contener múltiples efectores de caspasa (caspasa-1 y caspasa-8) al mismo tiempo para controlar la producción de IL-1 β . Esta situación llevaría a mantener estables los niveles de expresión de esta proteína como muestran algunos resultados, no a una sobreexpresión, e incluso como se puede observar, una disminución en los niveles de mRNA de ASC, probablemente por una traducción de ese mRNA. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que NLRP3 puede proveer una acción protectora independiente de inflammasoma (Fang et al., 2019), lo cual también podría explicar los bajos y altos niveles de expresión de ASC y NLRP3, respectivamente, que se pueden observar tras la exposición a ceniza volcánica. En estudios realizado por

Unno et al. (2014), sugieren que la inhalación de sílice puede causar inflamación en la vía aérea independiente del inflamasoma, al inducir la muerte de células epiteliales, lo que resulta en liberación pasiva, pro-IL-1 β . De acuerdo a Fang et al., (2019), NLRP3 protege la barrera epitelial pulmonar al aumentar la adherencia de las células alveolares independientemente de ASC, caspasa-1 e IL-1 β / IL-18, al igual que permite la expresión de factores de defensa de la mucosa de las vías respiratorias. En células T CD4 + se ha demostrado que NLRP3 puede actuar como un factor de transcripción que apoya la diferenciación del linaje de células Th2 de una manera independiente del inflamasoma (Chenery et al., 2019), además, juega un papel en limitación de la neutrofilia inicial, así como la eosinofilia que resulta de las respuestas de tipo 2 (Chenery et al., 2019; Periasamy et al., 2016). Sin embargo, el inflamasoma además de proveer protección, está involucrado en la regulación de la proliferación celular y en los procesos de reparación de tejidos; pero una sobre activación puede desencadenar una inflamación excesiva, daño tisular y conducir a enfermedades inflamatorias crónicas (Theofani et al., 2019).

Los diferentes resultados obtenidos están correlacionados entre si. Con la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi se pudo observar que a corto plazo la concentración más alta (3.75 mg) tuvo la mayor disminución del peso corporal en comparación con el resto de las concentraciones, Sin embargo, no se observó de forma significativa un aumento de peso pulmonar, la manifestación de edema, el aumento de las citocinas TNF- α , ASC y NLRP3, pero si hubo una reducción pronunciada de IL-8. Tras una larga exposición al igual que con el resto de las concentraciones, el peso corporal aumento, no hubo manifestación de posible edema a pesar de que los niveles de las citocinas a la concentración más alta difirieron estadísticamente del control, para

TNF- α y NLRP3 se evidencio un aumento proporcional a la concentración, pero para IL-8 y ASC se produjo una disminución no necesariamente proporcional.

Tras la exposición a la ceniza del volcán Pichincha, el peso corporal de los animales expuestos a la concentración de 3.75 mg a corto plazo fue el único en mostrar una disminución, pero en este caso si se observó un aumento del peso pulmonar, así como la manifestación de edema, lo que no se observa con el resto de las concentraciones. El análisis histológico se muestra acorde a los resultados mencionado anteriormente ya que en las concentraciones de 0.5 y 1 mg no se observa aumento de células o liquido en las estructuras alveolares, pero a la concentración de 3.75 se puede evidenciar claramente la hiperplasia de las células epiteliales tipo II e incluso estructuras similares a las observadas durante un proceso de fibrosis, lo que también explicaría el aumento de peso pulmonar. En lo que respecta a la expresión de los marcadores de inflamación se observa un aumento de TNF- α y NLRP3 a la mayor concentración, pero se observa una reducción para la expresión de IL-8 y ASC para todas las concentraciones. Con una exposición a largo plazo el peso corporal aumento igual al resto de concentraciones tampoco hay indicio de edema, no hay diferencia en la producción de TNF- α con respecto al control y a pesar de que hay un aumento de NLRP3 para la concentración de 0.5 mg, el resto de las concentraciones no evidencian una diferencia estadística. No es el caso para IL-8 y ASC que igual a corto plazo tienen una reducción en sus niveles de expresión.

Se conoce que TNF- α tiene actividad sobre el desarrollo de la inflamación y la posterior fibrosis e incluso en el desarrollo de cáncer de pulmón inducido por polvo (Huaux, 2007), lo que se correlaciona con los resultados obtenidos de la ceniza de Pichincha a la concentración más alta y durante un corto periodo de tiempo, que mostró aumento de TNF- α conjuntamente a un aumento de células epiteliales y la presencia

de un foco fibroblástico en el análisis histológico. Sin embargo, la inflamación pulmonar exacerbada no siempre va seguida de un aumento paralelo de la fibrosis pulmonar (Huaux, 2007), como se puede observar para Tungurahua que si tuvo un aumento de expresión de esta citocina pero sin un proceso fibrótico.

La sílice cristalina en forma de cristobalita por lo general induce una respuesta inflamatoria progresiva, pero también puede tener una interacción y competencia con otros elementos que lo enmascaran y reducen su toxicidad. La cristobalita pura cambia la permeabilidad pulmonar e induce inflamación principalmente a las 13 semanas después de la instilación, aunque, estas respuestas disminuyen con el tiempo (Lee & Richards, 2004). Esto también se puede observar en el presente estudio al ver como la relación de peso pulmón y peso corporal se reducen y se mantiene a mismo nivel que el grupo control mostrando un regreso al estado normal de los animales, esto también se puede observar en la expresión de algunas citocinas ante la exposición de cierta ceniza ya que se reducen en los niveles en una exposición a largo plazo como por ejemplo Pichicha con TNF- α . Sin embargo, hay otras que muestran un aumento a largo plazo, lo que sugeriría que la constante exposición a esa ceniza desencadena la liberación del marcador de inflamación como es el caso de TNF- α en Cotopaxi.

La exposición a sílice es caracterizada por causar inflamación con la liberación de mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α que pueden seguir siendo liberados en un etapa fibrótica posterior (Zelko et al., 2016). Por lo que la ceniza volcánica también tendría estos patrones de expresión y al igual que la cristobalita, su toxicidad puede verse encubierta por el resto de los elementos que la acompañan durante una erupción volcánica. En un estudio realizado por T. R. Martin et al. (1984), se observó que la ceniza volcánica causó menos toxicidad directa a todos los tipos de células y provocó una menor liberación de actividad quimiotáctica de los neutrófilos de

los macrófagos alveolares que el cuarzo y sugirió que la ceniza volcánica tiene poco potencial para iniciar una respuesta inflamatoria con el posterior reclutamiento de neutrófilos a los espacios aéreos del pulmón. Esto respalda la baja expresión de IL-8 que se observa tras la exposición a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua. O de otra forma dicha desregulación puede deberse a la represión del promotor para la expresión de IL-8 debido a una falta de estimulación (Jundi & Greene, 2015) en el área alveolar ya que el sacrificio se realizó a los 7 y 24 días después de la exposición a dosis puntuales.

Una respuesta TH2 se caracteriza por producir una inflamación alérgica con liberación de citocinas como IL-4, IL -5, IL-9 e IL-13 y causar características del asma (Schuijs et al., 2013) también se ha observado que la producción de IL-1 α y IL-1 β están estrechamente relacionadas con una respuesta TH2. Una respuesta TH1 produce altos niveles de IL-2, INF- γ y TNF, son responsables de la activación de fagocitos, producción de anticuerpos opsonizantes y fijadores del complemento (Santarlaschi et al., 2013; Shibuya et al., 1998).; y una respuesta TH17 caracterizada por la expresión de IL-17A, IL-17F, IL-8, IL-21 e IL-22 participa en el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos (Santarlaschi et al., 2013). De acuerdo con los resultados observados, la expresión elevada de NLRP3 que desencadenaría la secreción de IL1- β nos indica que la ceniza volcánica tendría una respuesta inflamatoria TH2.

Se supone que la fibrosis pulmonar tiene una prevalencia de citocinas Th2. Las propiedades inmunomoduladoras de los factores biológicos de cicatrización de heridas, como algunas citocinas y sus receptores pueden ser responsables de la patogénesis de esta enfermedad. Tras una lesión pulmonar, la transición a la fibrosis está regulada por las citocinas y quimiocinas de tipo Th2 y profibróticas. Se ha planteado que el mecanismo de fibro-producción que inicia con la activación alternativa de los

macrófagos alveolares (MA) bajo la influencia de citocinas de tipo Th2, los AM activados inducen un aumento de la producción de colágeno por los fibroblastos, este proceso parece estar mediado por CCL18, que se sobre expresa en presencia de IL-10, IL-4 e IL-13. Con lo mencionado anteriormente se confirmaría que la ceniza del volcán Pichincha induce una respuesta tipo TH2, ya que no solo estaría expresando la IL-1 β , además desencadena un proceso fibrótico.

Capítulo VI: Conclusiones

La exposición a ceniza volcánica de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua a las concentraciones de 0.5, 1 y 3.75 mg / 100 g de peso corporal mostraron una supervivencia del 100% al ser expuestas a ratones BALB/c de 10 semanas de edad, por lo que se las considera no letales. Sin embargo, la exposición a ceniza volcánica en un corto periodo de exposición (7 días) afectó el bienestar del animal manifestando una disminución del peso corporal de 7.95, 5.4 y 2.02% para Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua a la concentración más alta (3.75 mg). Por el contrario, los animales expuestos durante un largo periodo de exposición (68 días) mostraron un aumento en el peso corporal de hasta un 22% sobre el peso inicial.

Los análisis macroscópicos e histológicos en el tejido pulmonar murino revelaron que la ceniza volcánica a altas concentraciones puede inducir un aumento del peso pulmonar, cambios en la morfología pulmonar microscópica como hemorragias o edemas visibles y ciertos cambios estructurales a nivel alveolar. No obstante, la ceniza del volcán Pichincha durante un corto periodo de exposición y a la concentración de 3.75 mg induce hiperplasia de células epiteliales tipo II y el desarrollo de un foco fibroblástico caracterizado de un proceso de reparación tisular, que no se evidencia con la ceniza de Cotopaxi y Tungurahua.

Los marcadores de inflamación que mostraron un aumento en su nivel de expresión tras la exposición a ceniza volcánica fueron TNF- α y NLRP3. La ceniza del volcán Cotopaxi mostro un aumento de TNF- α a la concentración más alta a largo plazo, Pichincha tuvo un aumento de esta citocina durante una corta exposición y Tungurahua indujo la expresión de TNF- α a corto como a largo plazo, por lo que se puede deducir que con la ceniza de Tungurahua se produce un proceso inflamatorio

que depende de la concentración pero que aumenta con el tiempo de exposición. NLRP3 tuvo una tendencia de incremento para todas las cenizas y en ambos periodos de exposición. Los marcadores inflamatorios de IL-8 y ASC se vieron disminuidos para todos los volcanes. La expresión de ASC fue menor especialmente tras una larga exposición en oposición a NLRP3 ya que forma parte del complejo inflamasoma como única molécula o que probablemente que su desregulación sea debido a que NLRP3 está involucrado en procesos independientes de inflamasoma. En lo que respecta a IL-8, la desregulación observada ante todas las cenizas volcánicas probablemente se deba a que la ceniza volcánica al igual que la sílice no desencadena la atracción de neutrófilo al sitio de infección y por lo tanto no induce la expresión de esta citocina, también puede deberse a que el proceso inflamatorio como tal ya tuvo lugar antes del sacrificio animal y al momento de recolectar las muestras, los animales ya habían llegado a un nuevo estado de equilibrio.

La ceniza del volcán Cotopaxi no indujo toxicidad ni inflamación marcada en el tejido pulmonar murino. Sin embargo, Pichincha mostro tener un potencial fibrótico, aunque sin un proceso inflamatorio marcado y perdurable. Finalmente, la ceniza de Tungurahua evidencio ser la que más inflamación produjo con una expresión de TNF- α agravada tras un periodo de larga exposición.

Capítulo VII: Recomendaciones

Con el fin de simular la exposición natural a ceniza volcánica que se presenta para los seres vivos se recomienda realizar ensayos en los que la ceniza volcánica sea inhalada mediante cámaras de gas o sistemas análogos y que la exposición sea de forma frecuente.

Realizar lavados bronco-alveolares para determinar la población de células presentes en el tejido pulmonar, así como su número y también para analizar las proteínas que se están secretando ya pueden servir para al evaluar el grado y la naturaleza de la infección.

Realizar la tinción de tricrómico de Masson o red picrosirus en tejidos pulmonares expuestos a ceniza para observar y confirmar la deposición de anormal y aumentada de colágeno y determinar si las cenizas tienen el potencial de inducir el desarrollo de fibrosis.

Analizar la expresión de otros marcadores inflamación característicos de las respuestas TH1, TH2 y TH17 para determinar de forma más rigurosa que vía inflamatoria esta desencadenando la exposición a ceniza volcánica.

Determinar la vía de muerte celular que se está produciendo en el tejido alveolar tras la exposición a ceniza volcánica mediante análisis de marcadores apoptóticos como Caspasa 8 y 9, Caspasa 3/7, citocromo C, glutatión, entre otros y marcadores no apoptóticos como MLKL, caspasa 1, LDH, entre otros.

Referencias

- Abbas, A. K., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (8th ed.). Elsevier Inc.
- Actor, J. K. (2014). T Lymphocytes. In *Introductory Immunology* (Vol. 319, Issue 8275, pp. 42–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420030-2.00004-4>
- Aguilera, C., Viteri, M., Seqqat, R., Ayala Navarrette, L., Toulkeridis, T., Ruano, A., & Torres Arias, M. (2018). Biological Impact of Exposure to Extremely Fine-Grained Volcanic Ash. *Journal of Nanotechnology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7543859>
- Akematsu, T., Dodson, R. F., Williams, M. G., & Hurst, G. A. (1982). The short-term effects of volcanic ash on the small airways of the respiratory system. *Environmental Research*, 29(2), 358–370. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(82\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0013-9351(82)90037-8)
- Alvarez, M., & Avilés, J. (2005). *Ceniza volcanica: Un nuevo agente de contaminación Química*.
- American Lung Association. (2018, October 15). *How Lungs Work* . <https://www.lung.org/lung-health-and-diseases/how-lungs-work/>
- Aroca, J. L., & Vásquez, R. (2019). Análisis de riesgos durante el reemplazo de aisladores sísmicos de la pila 12 del puente “los caras”, ecuador. *Aroca, J. L., & Vásquez, R. (2019). Análisis de Riesgos Durante El Reemplazo de Aisladores Sísmicos de La Pila 12 Del Puente “Los Caras”, Ecuador. 4(8July), 65–106., 4(8July), 65–106.*
- Asenjo, C. A., & Pinto, R. A. (2017). Características Anátomo-Funcional Del Aparato Respiratorio Durante La Infancia. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.01.002>

- Awad, F., Assrawi, E., Jumeau, C., Georjin-Lavialle, S., Cobret, L., Duquesnoy, P., Piterboth, W., Thomas, L., Stankovic-Stojanovic, K., Louvrier, C., Giurgea, I., Grateau, G., Amselem, S., & Karabina, S. A. (2017). Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE*, *12*(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175336>
- Bajwa, Sjs., & Kulshrestha, A. (2012). Diagnosis, prevention and management of postoperative pulmonary edema. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, *2*(2), 180. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.105668>
- Barré-Sinoussi, F., & Montagutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Science OA*, *1*(4), fso.15.63. <https://doi.org/10.4155/fso.15.63>
- Barrett, K., Boitano, S., Barman, S., & Brooks, H. (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology* (24th ed.). McGraw Hil. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000200015>
- Bernabé, M. A., Baile Simon, D., Carreón, D., Cerca, M., Culqui, J., González, M. E., González, M., Gutiérrez, C., Gutiérrez, R., Herrera, G., Padilla, O., Pauker, F., Rodriguez, F., Rodríguez, G., Salazar, R., Toulkeridis, T., Vasco, C., & Zacarías, S. (2015). *Amenazas de origen natural* (T. Toulkeridis & D. A. Aguirre (eds.); Editorial). <https://es.slideshare.net/GonzaloCamus/drogas-de-origen-natural>
- Borgia, A., Aubert, M., Merle, O., & Van Wyk De Vries, B. (2010). What is a volcano? *Special Paper of the Geological Society of America*, *470*(May 2007), 1–9. [https://doi.org/10.1130/2010.2470\(01\)](https://doi.org/10.1130/2010.2470(01))
- Brown, J. S. (2015). Deposition of Particles. In R. Parent (Ed.), *Comparative Biology of the Normal Lung* (Second Edi, Issue 2, pp. 513–536). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00027-8>

- Brown, M. J., & Winnicker, C. (2015). Animal Welfare. In *Laboratory Animal Medicine* (pp. 1653–1672). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00039-0>
- Burleson, G. R., Burleson, S. C. M., & Burleson, F. G. (2015). Pulmonary Immunology of Infectious Disease. In R. Parent (Ed.), *Comparative Biology of the Normal Lung* (Second Edi, pp. 581–600). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00030-8>
- Burleson, G. R., & Schlesinger, R. B. (2015). Comparative Defense Capability of the Respiratory System. In R. Parent (Ed.), *Comparative Biology of the Normal Lung* (Second Edi, pp. 511–512). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00026-6>
- Cáceres, B., Ramírez, J., Francou, B., Eissen, J.-P., Taupin, J.-D., Jordan, E., Ungerechts, L., Maisincho, L., Barba, D., Cadier, E., Bucher, R., Peñafiel, A., Samaniego, P., & Mothes, P. (2004). *Determinación del volumen del casquete de hielo del volcán Cotopaxi*.
- Camarinho, R., Garcia, P. V., Choi, H., & Rodrigues, A. S. (2019). Overproduction of TNF- α and lung structural remodelling due to chronic exposure to volcanogenic air pollution. *Chemosphere*, *222*, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.138>
- Cao, F., Tian, X., Li, Z., Lv, Y., Han, J., Zhuang, R., Cheng, B., Gong, Y., Ying, B., Jin, S., & Gao, Y. (2020). Suppression of NLRP3 Inflammasome by Erythropoietin via the EPOR/JAK2/STAT3 Pathway Contributes to Attenuation of Acute Lung Injury in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00306>
- Cao, H., Wang, A., Martin, B., Koehler, D. R., Zeitlin, P. L., Tanawell, A. K., & Hu, J. (2005). Down-regulation of IL-8 expression in human airway epithelial cells through helper-dependent adenoviral-mediated RNA interference. *Cell Research*, *15*(2),

111–119. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290275>

Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6), 655–658.

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot073411>

Cashman, K., & Rust, A. (2016). Volcanic Ash: Generation and Spatial Variations. In *Volcanic Ash* (pp. 5–22). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100405-0.00002-1>

Cavazza, A., Rossi, G., Carbonelli, C., Spaggiari, L., Paci, M., & Roggeri, A. (2010). The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: An update. *Respiratory Medicine*, 104(SUPPL. 1), S11–S22. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.03.013>

Chenery, A. L., Alhallaf, R., Agha, Z., Parkinson, J. E., Cooper, M. M., Brian, H., Chan, K., Eichenberger, R. M., Dent, L. A., Robertson, A. B., Kupz, A., Brough, D., Sutherland, T. E., Allen, J. E., Paul, R., Eichenberger, R. M., Dent, L. A., Robertson, A. A. B., Kupz, A., & Giacomini, P. R. (2019). Inflammasome-Independent Role for NLRP3 in Controlling Innate Antihelminth Immunity and Tissue Repair in the Lung. *J Immunol*, 203(10), 2724–2734.

<https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900640>

Comunidad Andina. (2009). El fuego interno de los Andes. In *Smithsonian* (pp. 96–107).

Couto, M., & Cates, C. (2019). Laboratory Guidelines for Animal Care. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1920, pp. 407–430). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9009-2_25

Curtis, J. L. (2005). Cell-mediated Adaptive Immune Defense of the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(5), 412–416.

<https://doi.org/10.1513/pats.200507-070JS>

Damby, D. E., Horwell, C. J., Baxter, P. J., Delmelle, P., Donaldson, K., Dunster, C.,

- Fubini, B., Murphy, F. A., Natrass, C., Sweeney, S., Tetley, T. D., & Tomatis, M. (2013). The respiratory health hazard of tephra from the 2010 Centennial eruption of Merapi with implications for occupational mining of deposits. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 261, 376–387.
<https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2012.09.001>
- Damby, D. E., Horwell, C. J., Baxter, P. J., Kueppers, U., Schnurr, M., Dingwell, D. B., & Duewell, P. (2018). Volcanic ash activates the NLRP3 inflammasome in murine and human macrophages. *Frontiers in Immunology*, 8(JAN), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02000>
- Damby, D. E., Horwell, C. J., Larsen, G., Thordarson, T., Tomatis, M., Fubini, B., & Donaldson, K. (2017). Assessment of the potential respiratory hazard of volcanic ash from future Icelandic eruptions: a study of archived basaltic to rhyolitic ash samples. *Environmental Health*, 16(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0302-9>
- Damby, D. E., Murphy, F. A., Horwell, C. J., Raftis, J., & Donaldson, K. (2016). The in vitro respiratory toxicity of cristobalite-bearing volcanic ash. *Environmental Research*, 145, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.020>
- Damián, J. P., & Ungerfeld, R. (2013). Indicadores de bienestar animal en especies productivas : una revisión crítica. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 21(2), 103–113.
- Dekruyff, R. H., Yu, S., Kim, H. Y., & Umetsu, D. T. (2014). Innate immunity in the lung regulates the development of asthma. *Immunological Reviews*, 260(1), 235–248.
<https://doi.org/10.1111/imr.12187>
- Demichela, M., Maschio, G., Milazzo, M. F., & Salzano, E. (2013). Vulnerability assessment for human targets due to ash fallout from Mt. Etna. *Chemical*

Engineering Transactions, 32(January), 445–450.

<https://doi.org/10.3303/CET1332075>

Djobo, J. N. Y., Elimbi, A., Tchakouté, H. K., & Kumar, S. (2017). Volcanic ash-based geopolymer cements/concretes: the current state of the art and perspectives.

Environmental Science and Pollution Research, 24(5), 4433–4446.

<https://doi.org/10.1007/s11356-016-8230-8>

Donovan, J., & Brown, P. (2013). Care and Handling of Laboratory Mice. In *Current Protocols in Microbiology* (Issue SUPPL.31, p. A.3N.1-A.3N.18). John Wiley &

Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ns31>

Duntas, L. H. (2016). Volcanic environments: “biomonitoring” their links to thyroid cancer. *Endocrine*, 53(2), 343–346. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0977-7>

Ehrhardt, H., Pritzke, T., Oak, P., Kossert, M., Biebach, L., Förster, K., Koschlig, M., Alvira, C. M., & Hilgendorff, A. (2016). Absence of TNF- α enhances inflammatory response in the newborn lung undergoing mechanical ventilation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310(10), L909–L918.

<https://doi.org/10.1152/ajplung.00367.2015>

EI-Kashef, D. H. (2018). Nicorandil ameliorates pulmonary inflammation and fibrosis in a rat model of silicosis. *International Immunopharmacology*, 64(July), 289–297.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.017>

Esmail, N., Gharagozloo, M., Rezaei, A., & Grunig, G. (2014). Dust events, pulmonary diseases and immune system. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 3(1), 20–29.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24660118>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3960758>

Ettinger, S., Mothes, P., Paris, R., & Schilling, S. (2007). The 1877 lahar deposits on the

- eastern flank of Cotopaxi volcano. *Géomorphologie : Relief, Processus, Environnement*, 13(3), 271–280. <https://doi.org/10.4000/geomorphologie.4022>
- Fang, R., Uchiyama, R., Sakai, S., Hara, H., Tsutsui, H., Suda, T., Mitsuyama, M., Kawamura, I., & Tsuchiya, K. (2019). ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. *Mucosal Immunology*, 12(5), 1092–1103. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0181-1>
- Feldman, A. T., & Wolfe, D. (2014). Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In C. E. Day (Ed.), *Histopathology: Methods and Protocols* (Vol. 1180, p. 31). Springer Science. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1050-2>
- Fuentes, F., Mendoza, M., Rosales, A., & Cisneros, A. (2008). Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio:Raton. In Instituto Nacional de Salud (Ed.), *Instituto nacional de salud* (Issue 0511). www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
- Gaunt, H. E., Bernard, B., Hidalgo, S., Proaño, A., Wright, H., Mothes, P., Criollo, E., & Kueppers, U. (2016). Juvenile magma recognition and eruptive dynamics inferred from the analysis of ash time series: The 2015 reawakening of Cotopaxi volcano. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 328, 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2016.10.013>
- Greenway, F. L. (2015). Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *International Journal of Obesity*, 39(8), 1188–1196. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.59>
- Guida, G., & Riccio, A. M. (2019). Immune induction of airway remodeling. *Seminars in Immunology*, 46(May), 101346. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101346>
- Hall, M. L., Robin, C., Beate, B., Mothes, P., & Monzier, M. (1999). Tungurahua Volcano,

- Ecuador: Structure, eruptive history and hazards. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 91(1–2), 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0377-0273\(99\)00047-5](https://doi.org/10.1016/S0377-0273(99)00047-5)
- Hamacher, J., Hadizamani, Y., Borgmann, M., Mohaupt, M., Männel, D. N., Moehrlen, U., Lucas, R., & Stammberger, U. (2018). Cytokine–Ion Channel Interactions in Pulmonary Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 8(JAN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01644>
- Han, J., Ma, D., Zhang, M., Yang, X., & Tan, D. (2015). Natural Antioxidant Betanin Protects Rats from Paraquat-Induced Acute Lung Injury Interstitial Pneumonia. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/608174>
- Hansell, A. L. (2006). The health hazards of volcanoes and geothermal areas. *Occupational and Environmental Medicine*, 63(2), 149–156. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.022459>
- Hedrich, H. (2012). *The Laboratory Mouse* (2nd ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382008-2.00001-5> ORIGINS
- Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4 + T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T_H1/T_H2 paradigm. *International Immunology*, 28(4), 163–171. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>
- Honda, A., Matsuda, Y., Murayama, R., Tsuji, K., Nishikawa, M., Koike, E., Yoshida, S., Ichinose, T., & Takano, H. (2014). Effects of Asian sand dust particles on the respiratory and immune system. *Journal of Applied Toxicology*, 34(3), 250–257. <https://doi.org/10.1002/jat.2871>
- Horton, R. J., & Mccaldin, R. O. (1964). Observations on Air Pollution Aspects of Irazú Volcano, Costa Rica. *Public Health Reports*, 79(10), 925–929. <https://doi.org/10.2307/4592281>

- Horwell, C. J., Baxter, P. J., Hillman, S. E., Calkins, J. A., Damby, D. E., Delmelle, P., Donaldson, K., Dunster, C., Fubini, B., Kelly, F. J., Le Blond, J. S., Livi, K. J. T., Murphy, F., Natrass, C., Sweeney, S., Tetley, T. D., Thordarson, T., & Tomatis, M. (2013). Physicochemical and toxicological profiling of ash from the 2010 and 2011 eruptions of Eyjafjallajökull and Grímsvötn volcanoes, Iceland using a rapid respiratory hazard assessment protocol. *Environmental Research*, *127*, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.08.011>
- Horwell, Claire J., & Baxter, P. J. (2006). The respiratory health hazards of volcanic ash: A review for volcanic risk mitigation. *Bulletin of Volcanology*, *69*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00445-006-0052-y>
- Housley, D. G., Bérubé, K. A., Jones, T. P., Anderson, S., Pooley, F. D., & Richards, R. J. (2002). Pulmonary epithelial response in the rat lung to instilled Montserrat respirable dusts and their major mineral components. *Occupational and Environmental Medicine*, *59*(7), 466–472. <https://doi.org/10.1136/oem.59.7.466>
- Huax, F. (2007). New developments in the understanding of immunology in silicosis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, *7*(2), 168–173. <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e32802bf8a5>
- Instituto Geofísico - EPN. (2020). *TUNGURAHUA*. <https://www.igepn.edu.ec/tungurahua>
- Isbn, C., Pdf, T., Press, N. A., Press, N. A., Academy, N., Academy, N., & Press, N. A. (1991). Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. *ILAR Journal*, *33*(4), 71–74. <https://doi.org/10.1093/ilar.33.4.71>
- Jenkins, S. F., Wilson, T., Magill, C., Miller, V., Stewart, C., Blong, R., Marzocchi, W., Boulton, M., Bonadonna, C., & Costa, A. (2015). Global volcanic hazards and risk. In S. C. Loughlin, S. Sparks, S. K. Brown, S. F. Jenkins, & C. Vye-Brown (Eds.), *Global Volcanic Hazards and Risk* (Issue August). Cambridge University Press.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781316276273>

Jogpal, V., Gufpa, J., & Virmani, T. (2012). *Anatomy & Physiology II Project* .

<https://www.pinterest.com/pin/397090892129860904/?autologin=true>

Johnson, M. (2012). Laboratory Mice and Rats. *Materials and Methods*, 2, 113.

<https://doi.org/10.13070/mm.en.2.113>

Jundi, K., & Greene, C. M. (2015). Transcription of interleukin-8: How altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules*, 5(3), 1386–1398.

<https://doi.org/10.3390/biom5031386>

Katira, B. H., Giesinger, R. E., Engelberts, D., Zabini, D., Kornecki, A., Otulakowski, G., Yoshida, T., Kuebler, W. M., McNamara, P. J., Connelly, K. A., & Kavanagh, B. P. (2017). Adverse Heart–Lung Interactions in Ventilator-induced Lung Injury.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 196(11), 1411–1421.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201611-2268OC>

Khan, S. (2018, August 18). *What is surfactant ?* Medium.

<https://medium.com/@imsimi90/what-is-surfactant-5aa0dc03ce63>

Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2013). Pulmón. In *Patología Humana de Robbins* (9th ed.). Elsevier España S.L.

Lee, S. H., & Richards, R. J. (2004). Montserrat volcanic ash induces lymph node granuloma and delayed lung inflammation. *Toxicology*, 195(2–3), 155–165.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2003.09.013>

Leonard, G. S., Johnston, D. M., Williams, S., Cole, J. W., Finnis, K., & Barnard, S. T. (2005). Impacts and management of recent volcanic eruptions in Ecuador: lessons for New Zealand. In *Institute of Geological & Nuclear Sciences science* (Vol. 20). Institute of Geological & Nuclear Sciences Limited.

<https://www.civildefence.govt.nz/assets/Uploads/publications/GNS-SR2005-20->

Ecuador-volcano-impacts.pdf

- Maldonado Cajiao, F., Maldonado Coronole, F., Maldonado Coronel, K., & Silva, J. (2018). Enfermedades respiratorias restrictivas-obstructivas y ceniza del volcán Tungurahua en el año 2007. *La Ciencia Al Servicio de La Salud y La Nutrición*, 9(2), 7–13. <http://revistas.esPOCH.edu.ec/index.php/cssn>
- Man, S. M., Hopkins, L. J., Nugent, E., Cox, S., Gluck, I. M., Turlomousis, P., Wright, J. A., Cicuta, P., Monie, T. P., & Bryant, C. E. (2014). Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(20), 7403–7408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402911111>
- Mart, J., & Ernst, G. (2005). *Volcanoes and the Environment* (J. Mart & G. Ernst (eds.)). Cambridge University Press.
- Martin, T. R., Ayars, G., Butler, J., & Altman, L. C. (1984). The comparative toxicity of volcanic ash and quartz. Effects on cells derived from the human lung. *American Review of Respiratory Disease*, 130(5), 778–782. <https://doi.org/10.1164/arrd.1984.130.5.778>
- Martin, Thomas R, Wehner, A. P., & Butler, J. (1983). Pulmonary toxicity of Mt. St. Helens volcanic ash. A review of experimental studies. *The American Review of Respiratory Disease*, 128(1), 158–162. <https://doi.org/10.1164/arrd.1983.128.1.158>
- Martin, Thomas R, Wehner, A. P., & Butler, J. (1986). Evaluation of physical health effects due to volcanic hazards: The Use of Experimental Systems to Estimate the Pulmonary Toxicity of Volcanic Ash. *American Journal of Public Health*, 76(SUPPL. 3), 59–65. <https://doi.org/10.2105/ajph.76.suppl.66>
- Matthay, M. A. (2014). Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(11), 1301–1308.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201403-0535OE>

Matthews, N. C., Pfeffer, P. E., Mann, E. H., Kelly, F. J., Corrigan, C. J., Hawrylowicz, C. M., & Lee, T. H. (2016). Urban Particulate Matter–Activated Human Dendritic Cells Induce the Expansion of Potent Inflammatory Th1, Th2, and Th17 Effector Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *54*(2), 250–262.

<https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0084OC>

Maynard, R. L., & Downes, N. (2019). The Lung. In *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research* (Vol. 100, Issue 7, pp. 129–146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811837-5.00012-5>

Michigan State University. (2018). *Guidelines on Rodent Identification*. 2–5.

<https://animalcare.msu.edu/guidelines/CAR5.pdf>

Miller, B. E., & Hook, G. E. R. (1990). Hypertrophy and Hyperplasia of Alveolar Type II Cells in Response to Silica and Other Pulmonary Toxicants. *Environmental Health Perspectives*, *85*, 15. <https://doi.org/10.2307/3430661>

Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. (1st ed., pp. 1–21). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851993591.0001>

Monick, M. M., Baltrusaitis, J., Powers, L. S., Borchering, J. a, Caraballo, J. C., Mudunkotuwa, I., Peate, D. W., Walters, K., Thompson, J. M., Grassian, V. H., Gudmundsson, G., & Comellas, A. P. (2013). Effects of Eyjafjallajökull Volcanic Ash on Innate Immune System Responses and Bacterial Growth in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, *121*(6), 691–698. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206004>

Moore, B. B., Moore, T. A., & Toews, G. B. (2001). Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences. *European Respiratory Journal*, *18*(5), 846–856.

<https://doi.org/10.1183/09031936.01.00229001>

- Mubbunu, L., Bowa, K., Petrenko, V., & Silitongo, M. (2018). Correlation of Internal Organ Weights with Body Weight and Body Height in Normal Adult Zambians: A Case Study of Ndola Teaching Hospital. *Anatomy Research International*, 2018, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2018/4687538>
- Müller, D., Kueppers, U., Hess, K. U., Song, W., & Dingwell, D. B. (2019). Mineralogical and thermal characterization of a volcanic ash: Implications for turbine interaction. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 377, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2019.04.005>
- Naumova, E. N., Yepes, H., Griffiths, J. K., Sempértegui, F., Khurana, G., Jagai, J. S., Játiva, E., & Estrella, B. (2007). Emergency room visits for respiratory conditions in children increased after Guagua Pichincha volcanic eruptions in April 2000 in Quito, Ecuador Observational Study: Time Series Analysis. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 6(21), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-6-21>
- NIPPON GENE. (2011, September 21). *ISOGEN and ISOGEN-LS: Isolation of total RNA*. <https://www.nippongene.com/english/product/extraction/isogen.html>
- Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., Cupertino, M. C., Marques, D. C. S., Rosa, D. D., Peluzio, M. do C. G., Neves, C. A., & Leite, J. P. V. (2012). Bark extract of *Bathysa cuspidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces mortality in rats. *International Journal of Experimental Pathology*, 93(3), 225–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2012.00808.x>
- Organizacion mundial de la Salud. (2005). Manual De Bioseguridad En El Laboratorio. In *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. (3rd ed.). OMS.
- Øvrevik, J., Låg, M., Holme, J. A., Schwarze, P. E., & Refsnes, M. (2009). Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components

characteristic of particulate air pollution. *Toxicology*, 259(1–2), 46–53.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.01.028>

Øvrevik, J., Refsnes, M., Låg, M., Holme, J. A., & Schwarze, P. E. (2015). Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms. *Biomolecules*, 5(3), 1399–1440. <https://doi.org/10.3390/biom5031399>

Paladines, E. J. L., & Zamora, R. C. P. (2011). *Impacto Provocado Por El Volcan Tungurahua En La Salud De Los Pobladores De Penipe Durante El Periodo Eruptivo Comprendido Entre El Año 2003-2010*. [Pontificia Universidad Católica del Ecuador].

<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/4447/TESIS.pdf?sequence=3>

Pallarés, F., Sánchez, J., Rodríguez, I., Carrasco, L., Ruedas, I., Larenas, F., & Gómez, J. (2020, March 16). *Aparato respiratorio del cerdo y sus mecanismos de defensa*. https://www.3tres3.com/articulos/aparato-respiratorio-del-cerdo-y-sus-mecanismos-de-defensa_44457/

Parker, J. C., & Townsley, M. I. (2004). Evaluation of lung injury in rats and mice.

American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 286(2 30-2). <https://doi.org/10.1152/ajplung.00049.2003>

Patwa, A., & Shah, A. (2015). Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian Journal of Anaesthesia*, 59(9), 533–541.

<https://doi.org/10.4103/0019-5049.165849>

Pazmiño, F. A., & Navarrete Jiménez, M. L. (2014). Mecanismos inmunológicos implicados en la patología del asma alérgica. *Revista de La Facultad de Medicina*, 62(2), 265–277. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v62n2.45417>

Pease, J. E., & Sabroe, I. (2002). The Role of Interleukin-8 and its Receptors in

- Inflammatory Lung Disease. *American Journal of Respiratory Medicine*, 1(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/BF03257159>
- Periasamy, S., Le, H. T., Duffy, E. B., Chin, H., & Harton, J. A. (2016). Inflammasome-Independent NLRP3 Restriction of a Protective Early Neutrophil Response to Pulmonary Tularemia. *PLOS Pathogens*, 12(12), e1006059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006059>
- Pinkerton, K. E., Van Winkle, L. S., & Plopper, C. G. (2015). Overview of Diversity in the Respiratory System of Mammals. In *Comparative Biology of the Normal Lung: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00001-1>
- Portal Educativo. (n.d.). *Sistema respiratorio*. Retrieved February 27, 2021, from <https://www.portaleducativo.net/quinto-basico/14/Sistema-respiratorio>
- Porter, D. W., Hubbs, A. F., Mercer, R., Robinson, V. A., Ramsey, D., McLaurin, J., Khan, A., Batelli, L., Brumbaugh, K., Teass, A., & Castranova, V. (2004). Progression of lung inflammation and damage in rats after cessation of silica inhalation. *Toxicological Sciences*, 79(2), 370–380. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh110>
- Qazi, B. S., Tang, K., & Qazi, A. (2011). Recent Advances in Underlying Pathologies Provide Insight into Interleukin-8 Expression-Mediated Inflammation and Angiogenesis. *International Journal of Inflammation*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/908468>
- Ramírez-Labrada, A. G., Isla, D., Artal, A., Arias, M., Rezusta, A., Pardo, J., & Gálvez, E. M. (2020). The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy. *Trends in Cancer*, 6(2), 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.12.007>

- Ren, S., & Chen, H. (2013). Regulatory effects of apoptosis-associated speck-like protein on cytokines in the P388D1 macrophage-like cell line. *Molecular Medicine Reports*, 7(1), 166–170. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1124>
- Rhodus, N. L., Cheng, B., & Ondrey, F. (2007). Th1/Th2 Cytokine Ratio in Tissue Transudates from Patients with Oral Lichen Planus. *Mediators of Inflammation*, 2007, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2007/19854>
- Robin, C., Samaniego, P., Le Pennec, J. L., Fornari, M., Mothes, P., & van der Plicht, J. (2010). New radiometric and petrological constraints on the evolution of the Pichincha volcanic complex (Ecuador). *Bulletin of Volcanology*, 72(9), 1109–1129. <https://doi.org/10.1007/s00445-010-0389-0>
- Rocco, P. R. M., Negri, E. M., Kurtz, P. M., Vasconcellos, F. P., Silva, G. H., Capelozzi, V. L., Romero, P. V., & Zin, W. A. (2001). Lung tissue mechanics and extracellular matrix remodeling in acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(6), 1067–1071. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.6.2007062>
- Rocco, P. R. M., Souza, A. B., Faffe, D. S., Pássaro, C. P., Santos, F. B., Negri, E. M., Lima, J. G. M., Contador, R. S., Capelozzi, V. L., & Zin, W. A. (2003). Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168(6 I), 677–684. <https://doi.org/10.1164/rccm.200302-256OC>
- Rosenbaum, J. L., Frayo, R. S., Melhorn, S. J., Cummings, D. E., & Schur, E. A. (2019). Effects of multiple cycles of weight loss and regain on the body weight regulatory system in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(5), E863–E870. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00110.2019>
- Ruiz, M., Chatelain, J. L., Guillier, B., & Segovia, M. (1996). Non-clustered activity of “long period” events in Cotopaxi volcano, Ecuador. *Third ISAG, St Malo*, 9, 231–

234. https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers4/010008566.pdf

Samukawa, T., Arasidan, K., Hori, H., Hirano, H., & Arima, T. (2003). c-jun mRNA Expression and Profilin mRNA Amplification in Rat Alveolar Macrophages Exposed to Volcanic Ash and Sulfur Dioxide. *Industrial Health*, 41(4), 313–319.

<https://doi.org/10.2486/indhealth.41.313>

Sánchez, T., & Concha, I. (2018). Estructura Y Funciones Del Sistema Respiratorio.

Neumol Pediatr, 13(3), 101–106. http://www.neumologia-pediatrica.cl/wp-content/uploads/2018/10/3_estructura.pdfhttps://www.neumologia-pediatrica.cl/wp-content/uploads/2018/10/3_estructura.pdf

Santarasci, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., & Annunziato, F. (2013). IL-1 and T Helper Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, 4(JUL), 1–7.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00182>

Schleimer, R. P., Kato, A., Kern, R., Kuperman, D., & Avila, P. C. (2007). Epithelium: At the interface of innate and adaptive immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(6), 1279–1284. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.046>

Schuijs, M. J., Willart, M. A., Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2013). Cytokine targets in airway inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(3), 351–361.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.03.013>

Sepúlveda, J. (2012). *Texto Atlas de Histología: Biología Celular y Tisular* (1st ed.).

McGraw Hil.

Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: Reaccion en cadena de la Polimerasa. *INECC*, 35(2), 53–73.

<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>

Sharplin, J., & Franko, A. J. (1986). Pulmonary oedema during the latent period after

- irradiation of murine lung. *British Journal of Cancer*, 53(SUPPL. 7), 336–339.
- Shibuya, K., Robinson, D., Zonin, F., Hartley, S. B., Macatonia, S. E., Somoza, C., Hunter, C. A., Murphy, K. M., & O'Garra, A. (1998). IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(4), 1708–1716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469428>
- Shiohara, M., Taniguchi, S., Masumoto, J., Yasui, K., Koike, K., Komiyama, A., & Sagara, J. (2002). ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(5), 1314–1318. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00384-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00384-4)
- Shu, F., & Shi, Y. (2018). Systematic Overview of Solid Particles and Their Host Responses. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01157>
- Sierra-Vargas, M. P., Vargas-Domínguez, C., Bobadilla-Lozoya, K., & Aztatzi-Aguilar, O. G. (2018). Health Impact of Volcanic Emissions. In *Volcanoes - Geological and Geophysical Setting, Theoretical Aspects and Numerical Modeling, Applications to Industry and Their Impact on the Human Health* (Vol. 395, pp. 116–124). InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73283>
- Singal, M. (2015). The Effect of Particle Deposition on Immunological Response as Measured by Cytokine Production. In R. Parent (Ed.), *Comparative Biology of the Normal Lung* (Second Edi, pp. 601–627). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404577-4.00031-X>
- Steffke, A. M., Fee, D., Garces, M., & Harris, A. (2010). Eruption chronologies, plume heights and eruption styles at Tungurahua Volcano: Integrating remote sensing

- techniques and infrasound. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 193(3–4), 143–160. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2010.03.004>
- Stueckle, T. A., Davidson, D. C., Derk, R., Kornberg, T. G., Battelli, L., Friend, S., Orandle, M., Wagner, A., Dinu, C. Z., Sierros, K. A., Agarwal, S., Gupta, R. K., Rojanasakul, Y., Porter, D. W., & Rojanasakul, L. (2018). Short-Term Pulmonary Toxicity Assessment of Pre- and Post-incinerated Organomodified Nanoclay in Mice. *ACS Nano*, 12(3), 2292–2310. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07281>
- Tang, M., Tian, Y., Li, D., Lv, J., Li, Q., Kuang, C., Hu, P., Wang, Y., Wang, J., Su, K., & Wei, L. (2014). TNF- α mediated increase of HIF-1 α inhibits VASP expression, which reduces alveolar-capillary barrier function during Acute Lung Injury (ALI). *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102967>
- Taniguchi, S., & Sagara, J. (2007). Regulatory molecules involved in inflammasome formation with special reference to a key mediator protein, ASC. *Seminars in Immunopathology*, 29(3), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0082-3>
- Tesone, A. I., Lasagni Vitar, R. M., Tau, J., Maglione, G. A., Llesuy, S., Tasat, D. R., & Berra, A. (2018). Volcanic ash from Puyehue-Cordón Caulle Volcanic Complex and Calbuco promote a differential response of pro-inflammatory and oxidative stress mediators on human conjunctival epithelial cells. *Environmental Research*, 167, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.013>
- Theofani, E., Semitekolou, M., Morianos, I., Samitas, K., & Xanthou, G. (2019). Targeting NLRP3 Inflammasome Activation in Severe Asthma. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1615. <https://doi.org/10.3390/jcm8101615>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). Real-time PCR handbook. In *Life Journals* (Vol. 4, Issue 2). Life Technologies.
<http://www.nature.com/doi/10.1038/tp.2014.12>
<http://www.pubmedcentral>

l.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4055049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nnano.2015.148%5Cnhttp://www.nature.com/doi/finder/10.1038

- Thermo Fisher Scientific. (2020). *TRIZol™ Reagent User Guide* (Vol. 0, Issue 15596026, pp. 2–5).
- Thomas, R. J. (2013). Particle size and pathogenicity in the respiratory tract. *Virulence*, 4(8), 847–858. <https://doi.org/10.4161/viru.27172>
- Thompson, B. T., Chambers, R. C., & Liu, K. D. (2017). Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 562–572. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1608077>
- Thoracic Key. (2019, June 4). *Embryology, anatomy, and physiology of the lung*. Fastest Thoracic Insight Engine. <https://thoracickey.com/2-embryology-anatomy-and-physiology-of-the-lung/>
- Tomašek, I., Damby, D. E., Horwell, C. J., Ayris, P. M., delmelle, P., Ottley, C. J., Cubillas, P., Casas, A. S., Bisig, C., Petri-Fink, A., Dingwell, D. B., Clift, M. J. D., Drasler, B., & Rothen-rutishauser, B. (2019). Assessment of the potential for in-plume sulphur dioxide gas-ash interactions to influence the respiratory toxicity of volcanic ash. *Environmental Research*, 179(September), 108798. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108798>
- Tomašek, I., Horwell, C. J., Damby, D. E., Barošová, H., Geers, C., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., & Clift, M. J. D. (2016). Combined exposure of diesel exhaust particles and respirable Soufrière Hills volcanic ash causes a (pro-)inflammatory response in an in vitro multicellular epithelial tissue barrier model. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0178-9>

- Toulkeridis, T. (2013). *Volcanes activos: Ecuador*. ESPE.
- Tripathi, P., Deng, F., Scruggs, A. M., Chen, Y., & Huang, S. K. (2018). Variation in doses and duration of particulate matter exposure in bronchial epithelial cells results in upregulation of different genes associated with airway disorders. *Toxicology in Vitro*, 51(2017), 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.05.004>
- Troncoso, L., Bustillos, J., Romero, J. E., Guevara, A., Carrillo, J., Montalvo, E., & Izquierdo, T. (2017). Hydrovolcanic ash emission between August 14 and 24, 2015 at Cotopaxi volcano (Ecuador): Characterization and eruption mechanisms. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 341, 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2017.05.032>
- UJAP. (2017, May 19). *Aparato Respiratorio*. Microbiota Infantil. <http://microbiotainfantil.blogspot.com/2017/05/aparato-respiratorio.html>
- Unno, H., Futamura, K., Morita, H., Kojima, R., Arae, K., Nakae, S., Ida, H., Saito, H., Matsumoto, K., & Matsuda, A. (2014). Silica and double-stranded RNA synergistically induce bronchial epithelial apoptosis and airway inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(3), 344–353. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0281OC>
- Valente, T. (2016). *Airway Disease* (pp. 213–258). https://doi.org/10.1007/174_2016_39
- Vallejo, S. (2011). *Distribución de Cenizas Volcánicas Holocénicas-Tardías en la costa del Ecuador*. Escuela Politécnica Nacional.
- Valverde, V. (2014). *Los Depósitos de Avalancha de Escombros Provenientes del Volcán Sangay: Caracterización Petrográfica - Geoquímica* [Escuela Politecnica Nacional]. bibdigital.epn.edu.ec
- Varga, O. (2013). Critical analysis of assessment studies of the animal ethics review process. *Animals*, 3(3), 907–922. <https://doi.org/10.3390/ani3030907>

- Vigneri, R., Malandrino, P., Gianì, F., Russo, M., & Vigneri, P. (2017). Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.027>
- Wahlström, E., Ollerstam, A., Sundius, L., & Zhang, H. (2013). Use of Lung Weight as Biomarker for Assessment of Lung Toxicity in Rat Inhalation Studies. *Toxicologic Pathology*, 41(6), 902–912. <https://doi.org/10.1177/0192623312470763>
- Wallace, W. A. H., Fitch, P. M., Simpson, A. J., & Howie, S. E. M. (2007). Inflammation-associated remodelling and fibrosis in the lung - A process and an end point. *International Journal of Experimental Pathology*, 88(2), 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00515.x>
- Wang, Z., Zhang, S., Xiao, Y., Zhang, W., Wu, S., Qin, T., Yue, Y., Qian, W., & Li, L. (2020). NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4063562>
- Wei, T., & Tang, M. (2018). Biological effects of airborne fine particulate matter (PM 2.5) exposure on pulmonary immune system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60(2010), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.004>
- West, J. B. (2012). *Respiratory Physiology: The Essentials* (C. Taylor (ed.); 9th ed.). Wolters Kluwer.
- White, J. D. L., & Ross, P.-S. (2011). Maar-diatreme volcanoes: A review. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 201(1–4), 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2011.01.010>
- Whitsett, J. A., & Alenghat, T. (2015). Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunology*, 16(1), 27–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3045>
- WHO. (2005). WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update 2005. Summary of risk assessment. In *Revue*

d'Epidemiologie et de Sante Publique.

- Wright, H. M. N., Cashman, K. V., Rosi, M., & Cioni, R. (2007). Breadcrust bombs as indicators of Vulcanian eruption dynamics at Guagua Pichincha volcano, Ecuador. *Bulletin of Volcanology*, 69(3), 281–300. <https://doi.org/10.1007/s00445-006-0073-6>
- Wright, J. L., & Churg, A. (2008). Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 21(5), 696–698. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2008.01.007>
- Xu, Z., Li, Z., Liao, Z., Gao, S., Hua, L., Ye, X., Wang, Y., Jiang, S., Wang, N., Zhou, D., & Deng, X. (2019). PM 2.5 induced pulmonary fibrosis in vivo and in vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171(October 2018), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.061>
- Yamaoka, T., Arata, S., Homma, M., Homma, T., Kusumoto, S., Ando, K., Manabe, R., Kishino, Y., Ohba, M., Tsurutani, J., Takimoto, M., Ohmori, T., & Sagara, H. (2019). Blockade of EGFR activation promotes TNF-induced lung epithelial cell apoptosis and pulmonary injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20164021>
- Yu, Y., Li, Y., Wang, W., Jin, M., Du, Z., Li, Y., Duan, J., Yu, Y., & Sun, Z. (2013). Acute Toxicity of Amorphous Silica Nanoparticles in Intravenously Exposed ICR Mice. *PLoS ONE*, 8(4), e61346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061346>
- Zelko, I. N., Zhu, J., Ritzenthaler, J. D., & Roman, J. (2016). Pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice exposed to crystalline silica. *Respiratory Research*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0478-5>
- Zimanowski, B., Wohletz, K., Dellino, P., & Büttner, R. (2003). The volcanic ash problem. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 122(1–2), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0377-0273\(02\)00471-7](https://doi.org/10.1016/S0377-0273(02)00471-7)

Zimmermann, K. A. (2019, August 23). *Respiratory System: Facts, Function and Diseases*. Live Science. <https://www.livescience.com/22616-respiratory-system.html>