



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

“Estudio del estrés oxidativo e inflamación a nivel celular previa exposición a ceniza volcánica”

Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth

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

Seqqat, Rachid, PhD

11 de marzo del 2021



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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Estudio del estrés oxidativo e inflamación a nivel celular previa exposición a ceniza volcánica**”, fue realizado por la señorita **Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth**, 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, 11 de marzo de 2021

Firma:

.....
Seqqat, Rachid, Ph.D.

C.C. 1756503221



Document Information

Analyzed document	Flores Nathaly_Trabajo de Titulacion.pdf (D97897040)
Submitted	3/10/2021 9:25:00 PM
Submitted by	Seqqat Rachid
Submitter email	rseqqat@espe.edu.ec
Similarity	1%
Analysis address	rseqqat.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Tesis unida 20210228 urkund.pdf Document Tesis unida 20210228 urkund.pdf (D96823451) Submitted by: mmtorres@espe.edu.ec Receiver: mmtorres.espe@analysis.arkund.com	 10
W	URL: https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/463082/2017_Tesis_Abad%20Garcia_ ... Fetched: 11/11/2019 5:12:13 AM	 2
SA	Mod 4 TOX 2016.docx Document Mod 4 TOX 2016.docx (D29757589)	 1
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	 4
SA	Tesis Dral Tatiana Arcos..pdf Document Tesis Dral Tatiana Arcos..pdf (D83735352)	 1

.....

Seqqat, Rachid, Ph.D.

C.C. 1756503221



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth**, con cedula de ciudadanía n°1717836645, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Estudio del estrés oxidativo e inflamación a nivel celular previa exposición a ceniza volcánica”**, 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, 11 de marzo de 2021

Firma:

.....

Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth

C.C. 1717836645



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

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth**, con cedula de ciudadanía n°1717836645, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Estudio del estrés oxidativo e inflamación a nivel celular previa exposición a ceniza volcánica**", en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 11 de marzo de 2021

Firma:



Flores Domínguez, Nathaly Elizabeth

C.C. 1717836645

Dedicatoria

“Si caminas solo, irás más rápido, si caminas acompañado, llegarás más lejos”

Proverbio chino.

Dedico el presente trabajo a mi amada madre, Rocío Domínguez,

ella fue la persona que siempre me inspiro

a ser una mujer fuerte e inteligente, y

me enseñó que jamás debo darme por vencida y

siempre luchar para cumplir mis objetivos.

Y aunque ya no esté conmigo para ver esta meta

cumplida, todas sus enseñanzas

se mantendrán para siempre en mi corazón.

- Nathaly Elizabeth Flores Domínguez -

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi abuelita, Amada Ramos, que fue la persona que me cuidó y me ayudó todos estos años, gracias por ser mi segunda mamá, y por apoyarme en esta etapa universitaria. También agradezco a mi padre, Ramiro Moreta, que, aunque no tengamos la misma sangre, me ha cuidado desde muy pequeña, siempre velando por mi bienestar y seguridad. Sin ustedes no hubiera podido culminar la universidad, ni ser la persona que soy ahora, los logros que he podido realizar son gracias a ustedes y siempre estaré agradecida por todo lo que me han brindado.

Agradezco a Rachid Seqqat, Ph.D., director de mi trabajo de titulación, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de este gran proyecto, y por siempre guiarme y ayudarme. Gracias por compartir todos sus conocimientos y orientarme para poder ser una gran investigadora en el futuro.

A Marbel Torres, Ph.D., por permitirme trabajar en el laboratorio de Inmunología y Virología, por siempre estar pendiente de todas las dudas que se presentaban en la realización del proyecto, y por brindarme su guía, apoyo, consejos y recomendaciones. Gracias por ser un ejemplo a seguir, inspirándome para algún día lograr ser una gran investigadora, y contribuir al conocimiento del país.

A la Ing. Fernanda Toscano, por haberme compartido todos sus conocimientos, y brindarme su apoyo incondicional en la realización del proyecto. Gracias por tu preocupación, tu paciencia, y por haber sido una de mis mentoras y amiga.

A Theofilos Toulkeridis, Ph.D. y al laboratorio de Microscopía Electrónica por su colaboración en la investigación.

A todas las personas que forman parte del laboratorio de Inmunología y Virología. Alex, Andre, Carlitos, Ari y Lucho, gracias por todos los momentos que compartimos, y por todo lo que me enseñaron y aconsejaron.

A Isaac, por siempre ayudarme en todos mis proyectos, brindándome su ayuda incondicional y apoyándome en los momentos más difíciles. Gracias por darme tantos momentos felices, y por siempre impulsarme a superar mis miedos.

A los pulpos, mi segunda familia: Pame, Daniel (Ñañiel), Cris, Paul P., Cesar y Emi, gracias por siempre ayudarme en todo, por enseñarme muchas cosas y por compartir tantos momentos maravillosos. En especial agradezco a Michu (Roja), Mauro y Paul E., ustedes hicieron que mi vida en la universidad fuera de lo mejor, gracias por todas las risas, los momentos divertidos, los paseos increíbles, y las traspasadas para estudiar y conversar. Gracias a todos ustedes, los años que pase en la carrera fueron increíbles. Los quiero demasiado y espero que este sea el primer logro de muchas más que vamos a cumplir, para ser grandes científicos.

Índice de Contenidos

Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice De Tablas.....	13
Índice De Figuras.....	14
Listado de Abreviaturas.....	17
Resumen.....	20
Abstract.....	21
CAPÍTULO I: Introducción.....	22
Antecedentes.....	22
Justificación.....	24
Objetivos.....	27
<i>Objetivo General.....</i>	<i>27</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>27</i>
CAPÍTULO II: Marco Teórico.....	28
Volcanes.....	28
Volcanes Del Ecuador.....	29
<i>Cotopaxi.....</i>	<i>31</i>
<i>Guagua Pichincha.....</i>	<i>32</i>
<i>Tungurahua.....</i>	<i>33</i>
Ceniza Volcánica.....	34

	10
<i>Ceniza Del Volcán Cotopaxi</i>	36
<i>Ceniza Del Volcán Guagua Pichincha</i>	37
<i>Ceniza Del Volcán Tungurahua</i>	37
Estructura Y Funciones Del Sistema Respiratorio	37
Efectos De La Ceniza Volcánica en el Sistema Respiratorio	39
Mecanismo Inmunitario Del Sistema Respiratorio	45
<i>Inmunidad Innata</i>	45
<i>Inmunidad Adaptativa</i>	50
Respuesta Inmunitaria Por Inhalación De Partículas	54
Estrés Oxidativo Del Sistema Respiratorio	58
Mecanismos Generadores de ROS y RNS	62
Especies Reactivas De Oxígeno (ROS)	66
<i>Metabolismo de Especies Reactivas de Oxígeno</i>	68
Especies Reactivas De Nitrógeno (RNS)	71
<i>Metabolismo de Especies Reactivas De Nitrógeno</i>	71
Interacción Metabólica Entre Especies Reactivas De Oxígeno y Nitrógeno (ROS/RNS) Y Sistemas Antioxidantes	74
<i>Antioxidantes Enzimáticos</i>	76
<i>Antioxidantes no Enzimáticos</i>	79
Modelos <i>in vitro</i>	82
<i>Línea celular A549</i>	82
Pruebas De Toxicidad	82

	11
<i>Ensayo MTT</i>	83
<i>Ensayo LDH</i>	85
Pruebas De Estrés Oxidativo	86
<i>Ensayo SOD</i>	87
<i>Ensayo de Griess</i>	88
Análisis Molecular	89
<i>ARN</i>	90
<i>Métodos De Extracción De ARN</i>	90
<i>Reacción en cadena de la Polimerasa</i>	92
CAPÍTULO III: Materiales y Métodos	94
Localización Geográfica	94
Recolección De Ceniza Volcánica	94
<i>Preparación De Ceniza Volcánica</i>	94
Cultivo <i>in vitro</i> De Líneas Celulares	95
Ensayo De Viabilidad Celular	95
Análisis Molecular	97
<i>Extracción De ARN</i>	97
<i>Retrotranscripción del ARN</i>	99
<i>Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)</i>	101
<i>Electroforesis En Gel De Agarosa</i>	104
Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad	104

	12
<i>Ensayo de Griess</i>	104
<i>Ensayo De La Superóxido Dismutasa (SOD)</i>	106
<i>Ensayo del lactato deshidrogenasa (LDH)</i>	107
Diseño Experimental y Análisis De Datos.....	108
CAPÍTULO IV: Resultados	109
Ensayo De Viabilidad Celular	109
Inflamación Celular	114
Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad.....	121
<i>Ensayo de Griess</i>	122
<i>Ensayo De La Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)</i>	124
<i>Ensayo del Lactato Deshidrogenasa (LDH)</i>	125
CAPÍTULO V: Discusión	128
Viabilidad Celular	130
Inflamación Celular	133
Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad.....	141
<i>Ensayo de Griess</i>	142
<i>Ensayo De La Superóxido Dismutasa (SOD)</i>	144
<i>Ensayo Del Lactato Deshidrogenasa (LDH)</i>	147
CAPÍTULO VI: Conclusiones	151
CAPÍTULO VII: Recomendaciones	153
Referencias.....	154

Índice De Tablas

Tabla 1 Tipos de magma.....	35
Tabla 2 Células del Tracto Respiratorio.....	44
Tabla 3 Lugares de depósito de partículas en el sistema respiratorio.....	55
Tabla 4 Enzimas involucradas en la producción de ROS en el pulmón.	64
Tabla 5 Enzimas involucradas en la producción de óxido nítrico (NO•) en el pulmón.....	65
Tabla 6 Principales mecanismos para la producción de ROS.	66
Tabla 7 Enzimas antioxidantes para eliminar ROS y RNS.	75
Tabla 8 Componentes por reacción para tratamiento con DNasa I.	99
Tabla 9 Componentes del Master Mix 1 para la retrotranscripción del ARN....	100
Tabla 10 Componentes del Master Mix 2 para la retrotranscripción del ARN..	100
Tabla 11 Componentes del Master Mix 3 para la retrotranscripción del ARN..	101
Tabla 12 Componentes para una reacción de (1X) para PCR Punto Final.	102
Tabla 13 Secuencias de Primers para PCR punto final.	102
Tabla 14 Programa de amplificación de la PCR punto final.....	103

Índice De Figuras

Figura 1 Ubicación de los volcanes en el mundo.....	28
Figura 2 Volcanes activos de Ecuador, que erupcionaron los últimos 17 años y generaron nubes de ceniza.	30
Figura 3 Volcán Cotopaxi.....	31
Figura 4 Volcán Guagua Pichincha.	32
Figura 5 Volcán Tungurahua.	33
Figura 6 Estructura del sistema respiratorio.....	39
Figura 7 Impacto de la ceniza volcánica en el sistema respiratorio.	40
Figura 8 Pulmones con masas fibróticas generadas por una silicosis complicada, debido a la inhalación de ceniza volcánica.....	41
Figura 9 Células alveolares tipo 1 y tipo 2.	43
Figura 10 Células del Sistema Inmunológico.	51
Figura 11 Enfermedades pulmonares relacionadas con estrés oxidativo.....	61
Figura 12 Generación de ROS ($O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet}) mediante la Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial.....	63
Figura 13 Factores internos y externos que producen la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	67
Figura 14 Anión superóxido y sus derivados (H_2O_2 y $\bullet OH$).....	69
Figura 15 Reacción para la formación del radical peroxilo lipídico (LOO^{\bullet}).	70
Figura 16 Reacciones de formación de nitrito y nitrato.....	72
Figura 17 Reacciones químicas del óxido nítrico para formar peroxinitrito y ácido peroxinitroso.....	73

Figura 18 Reacciones enzimáticas antioxidantes mediadas por la catalasa y el glutatión peroxidasa.....	78
Figura 19 Reacción enzimática de la PRDX5 en RNS.	80
Figura 20 Vías metabólicas por las cuales se generan y se eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS).	81
Figura 21 Ensayo MTT.	84
Figura 22 Ensayo LDH.....	85
Figura 23 Ensayo SOD	88
Figura 24 Ensayo de Griess	89
Figura 25 Diseño de placa para el ensayo MTT.	96
Figura 26 Diseño de placa P96 para el ensayo NO.....	105
Figura 27 Diseño de placa P96 para el ensayo SOD.	106
Figura 28 Diseño completamente aleatorizado.....	108
Figura 29 Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi.	110
Figura 30 Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Pichincha.....	111
Figura 31 Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Tungurahua.....	113
Figura 32 Expresión de los genes constitutivos HPRT y GAPDH.	115
Figura 33 Expresión de IL-1 β por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.	117
Figura 34 Expresión de IL-6 por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.	119
Figura 35 Expresión de IL-8 por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.	121

Figura 36 Concentración de nitritos generados por las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.....	122
Figura 37 Actividad enzimática de la SOD producida por las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.....	125
Figura 38 Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa de las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.....	126

Listado de Abreviaturas

PM	Material particulado
PM₁₀ 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
IL-6	Interleucina 6
SiO₂	Oxido de silicio
TiO₂	Oxido de titanio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	ADN complementario
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño celular
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
LPS	Lipopolisacárido
pb	Pares de bases
LDH	Lactato deshidrogenasa

NO[·]	Óxido nítrico
SOD	Superóxido dismutasa
SO₂	Dióxido de azufre
AT I	Células alveolares tipo 1
AT II	Células alveolares tipo 2
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
O₂^{·-}	anión superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
ETC	Cadena de transporte de electrones mitocondrial
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
NOX	NADPH Oxidasas
NOS	Sintasas de Óxido nítrico
·OH	Radical hidroxilo
O₂	Oxígeno molecular
LOO[·]	Radical Peroxilo Lipídico
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Dióxido de nitrógeno
ONOOH	Ácido peroxinitroso

CAT	Catalasa
GPX	Glutación Peroxidasa
PRDX	Peroxiredoxinas
GSH	Glutación
TRX	Tiorredoxinas
GST	Glutación-S-transferasas
UFC	Unidades formadoras de colonias
CoCl₂	Cloruro de cobalto
SBF	Suero bovino fetal
CO₂	Dióxido de carbono
HPRT	Hipoxantina Fosforribosiltransferasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
NED	1-naftiletildiamina
μL	Microlitro
mm	Milímetro
MTT	3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium bromuro
mL	Mililitro
mg	Miligramo
g	Gramo

Resumen

Los volcanes son aberturas dentro de la corteza terrestre que se forman en los bordes de las placas tectónicas de la Tierra, cuando estos erupcionan liberan ceniza, siendo este uno de los fenómenos volcánicos más peligrosos. Las erupciones de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, han generado un aumento en las visitas a las salas de emergencia, debido a la incidencia de infecciones respiratorias, y por problemas dérmicos, oculares y gastrointestinales. Sin embargo, en Ecuador se han reportado pocos estudios sobre la influencia de la ceniza volcánica en la salud de las personas, por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de tres cenizas volcánicas en una línea celular humana mediante ensayos de estrés oxidativo y PCR punto final. Para ello se expuso, células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549) a diferentes concentraciones de ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, durante 24 y 72 horas, para evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT, el estrés oxidativo y nitrosativo mediante los ensayos de la superóxido dismutasa (SOD) y el ensayo de Griess, el daño celular mediante el ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH), y la expresión de las citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL-6, e IL-8, mediante una PCR punto final. Los resultados obtenidos mostraron que la ceniza de los tres volcanes analizados, producen una disminución en la viabilidad de las células A549 y un aumento en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, desarrollándose un estrés oxidativo y nitrosativo, lo que provoca un incremento de la respuesta proinflamatoria.

Palabras clave:

- **VIABILIDAD CELULAR**
- **ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO**
- **MARCADORES INFLAMATORIOS**

Abstract

Volcanoes are openings in Earth's crust that form on the edges of the Earth's tectonic plates, when they erupt, they release ash, this being one of the most dangerous volcanic phenomena. The eruptions of the Cotopaxi, Pichincha and Tungurahua volcanoes have generated an increase in visits to emergency rooms, due to the incidence of respiratory infections, and skin, eye and gastrointestinal problems. However, in Ecuador few studies have been reported on the influence of volcanic ash on people's health, therefore, the objective of this research was to evaluate the effect of three volcanic ash on a human cell line using oxidative stress tests and endpoint PCR. For this, human adenocarcinoma alveolar epithelial cells (A549) were exposed to different concentrations of ash from the Cotopaxi, Pichincha and Tungurahua volcanoes, for 24 and 72 hours, to evaluate the cell viability by MTT assay, oxidative and nitrosative stress by the superoxide dismutase (SOD) assays and the Griess assay, cell damage by the lactate dehydrogenase (LDH) assay, and the expression of inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6, and IL-8, using an endpoint PCR. The results obtained showed that the ash from the three analyzed volcanoes produced a decrease in the viability of A549 cells and an increase in reactive oxygen and nitrogen species, developing oxidative and nitrosative stress, which causes an increase in the pro-inflammatory response.

Keywords:

- **CELLULAR VIABILITY**
- **OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS**
- **INFLAMMATORY MARKERS**

CAPÍTULO I: Introducción

Antecedentes

Un gran porcentaje de los volcanes activos se encuentran en Latinoamérica y el Caribe, mostrando su capacidad destructiva a través de la historia (González & Carranza, 2015). Horton & McCaldin (1964), documentaron el daño provocado por la ceniza de Irazú – Costa Rica, siendo el primer estudio que menciona que la ceniza proveniente de los volcanes, puede exacerbar enfermedades pulmonares preexistentes, e irritar de forma aguda, tanto el tracto respiratorio como los ojos. Y en 1979, posterior a la erupción del volcán La Soufrière – San Vicente, se informó la presencia de bronquitis asmática en bebés previamente sanos (Peter & Baxter, 2006).

La erupción del volcán Santa Helena – Estados Unidos, el 18 de mayo de 1980, atrajo la atención científica respecto a los efectos adversos producidos por las cenizas volcánicas en la salud de las personas, ya que la erupción ocurrió antes de que se hubieran elaborado planes de contingencia. Una de las principales preocupaciones era el desarrollo de asma y de silicosis, debido a una exposición prolongada de ceniza respirable que contenía sílice cristalina. Posterior a la erupción se realizaron estudios *in vitro* para establecer los posibles efectos adversos de la ceniza del monte St. Helena sobre la salud, encontrándose que la ceniza causaba toxicidad celular, pero era menos tóxica que el DQ12 o cuarzo, y similar a otros minerales de baja toxicidad (Peter & Baxter, 2006).

Estudios realizados por Buist et al., 1986, y Johnson et al., 1982, encontraron que la ceniza no era tóxica ya que no estimulaba a los macrófagos y no causaba una respuesta inflamatoria. Concluyéndose que la ceniza volcánica del monte St. Helena, era mucho menos tóxica que la sílice cristalina, pero podía producir fibrosis pulmonar cuando las personas estaban en contacto con grandes dosis y durante largos períodos de tiempo.

Vallyathan, Robinson, & Reasor (1984), publicaron el único estudio comparativo *in vitro* de cenizas de tres volcanes diferentes: el monte Santa Helena – Estados Unidos, Galunggung – Indonesia y El Chichón – México. En el cual, se realizaron pruebas de hemólisis y ensayos de citotoxicidad de macrófagos alveolares; encontrándose que todas las muestras fueron tóxicas para los macrófagos, pero la ceniza de Galunggung y El Chichón fueron más potentes que la del monte Santa Helena. La hemólisis fue menor para los tratamientos con ceniza que para el cuarzo y el nivel de toxicidad se correlaciona con el área de superficie de las muestras. Además, el contenido de sílice cristalina de las muestras (<10 μm) varió de 1.50–1.95%.

El monte Sakurajima – Japón, ha estado en erupción desde 1955; tiene frecuentes explosiones, por lo tanto, la población de la isla de Kagoshima está expuesta constantemente a ceniza volcánica. Las erupciones volcánicas son andesíticas/dacíticas, aproximadamente unas 1100 toneladas/km² de cenizas se depositan cada mes alrededor del monte Sakurajima, generando preocupación por el peligro potencial para la salud humana (Peter & Baxter, 2006). Yano et al., (1985), examinaron la citotoxicidad *in vitro* de la ceniza y su capacidad para provocar respuestas inflamatorias, demostrándose que la ceniza produjo poca citotoxicidad en los cultivos celulares y fue considerablemente menos tóxica que el óxido de titanio (TiO₂), que se usó como control.

Además del monte Santa Helena, los volcanes que han sido estudiados para determinar el peligro de sus cenizas en la salud de las personas, son: el monte Pinatubo - Filipinas, el monte Spurr - Alaska, el Popocatépetl - México, el Cerro Negro - Nicaragua, el Ruapehu - Nueva Zelanda y los montes Tungurahua, Guagua Pichincha y el Reventador - Ecuador (Peter & Baxter, 2006).

Sin embargo en Ecuador, solo se han realizado pocas investigaciones sobre el efecto de las cenizas en el bienestar de las personas (Cifuentes et al., 2017).

Justificación

La expulsión de material piroclástico (ceniza o piedras pómez), es uno de los fenómenos volcánicos más subestimados y uno de los más peligrosos, debido a que la ceniza puede dispersarse varios kilómetros desde el centro de emisión afectando a zonas alejadas del volcán (Toulkeridis & Zach, 2017). Además, los depósitos de ceniza pueden permanecer en el ambiente durante varios años o décadas y en las regiones áridas puede conservarse durante millones de años pudiendo dispersarse por las ventiscas y causar efectos similares a la erupción original (Ruggieri et al., 2011).

Las erupciones volcánicas producen nanopartículas respirables de forma natural (Cervini-Silva et al., 2014), pero la composición mineral y el tamaño de las partículas de ceniza varía entre volcanes y entre erupciones de un mismo volcán (Organización Panamericana de la Salud, 2005). Por lo tanto, se debe realizar más análisis de los efectos nocivos producidos por el contacto con ceniza en la salud humana, ya que existen asentamientos humanos junto a volcanes activos en todo el mundo y las poblaciones se siguen expandiendo rápidamente (Cervini-Silva et al., 2014).

En Ecuador la inhalación de ceniza volcánica ha sido un problema de salud importante; causando irritaciones en las membranas mucosas del tracto respiratorio superior y una exacerbación de enfermedades pulmonares durante y después de una gran caída de ceniza (Naumova et al., 2007).

El volcán Tungurahua erupcionó en 1999, produciendo emisiones constantes de ceniza (Instituto Geofísico, 2014) lo que provocó la evacuación de 26000 personas ubicadas en el área rural a sotavento del volcán (Organización Panamericana de la Salud, 2005). En el mismo año erupcionó el Guagua Pichincha (Peter & Baxter, 2006) liberando ceniza (Grob et al., 2012) de grano muy fino en sus alrededores (Aguilera et al., 2018). El Reventador, erupcionó sin previo aviso en el 2002 (Toulkeridis & Zach, 2017) generando una columna de ceniza de 15000 metros que se dispersó en las provincias de Pichincha, Napo y Sucumbíos (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, 2005). Y en el año 2015 el volcán Cotopaxi comenzó su nuevo periodo eruptivo, expulsando una elevada cantidad de ceniza la cual se esparció por 48 km² afectando a las localidades del cantón Mejía y el sur de Quito (Global Volcanism Program, 2016).

Después de estos eventos eruptivos, aumentaron las visitas a las salas de emergencia, principalmente de niños (Sierra et al., 2018) debido a la incidencia de infecciones respiratorias en las vías aéreas superiores como rinofaringitis, faringitis, amigdalitis, laringitis, otitis y rinitis; de las vías aéreas inferiores como bronquitis, neumonía, tuberculosis y asma bronquial; de los sistemas dérmico (dermatitis), ocular (conjuntivitis) y gastrointestinal al comparar con datos de años anteriores (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2000).

La ceniza del estratovolcán Tungurahua está compuesta principalmente por óxido de silicio (SiO_2) (58%) (Alvarez & Avilés, 1999), el cual desencadena una reacción inflamatoria pulmonar (Maldonado et al., 2018) denominada silicosis, esta afección se ha encontrado en poblaciones que viven alrededor del volcán Tungurahua y han tenido contacto prolongado con su ceniza (Organización Panamericana de la Salud, 2005).

Además la sílice puede aumentar el riesgo de desarrollar tuberculosis (Organización Panamericana de la Salud, 2005) ya que produce una sequedad de las mucosas del aparato respiratorio facilitando el crecimiento bacteriano (Maldonado et al., 2018).

Una de las preocupaciones del gobierno es que entre el 33% y 48% de las personas que viven cerca de los volcanes dentro de las zonas de riesgo afectadas por la ceniza volcánica, tienen poca información sobre las consecuencias de la erupción y sobre su propia seguridad (Loaiza, 2019).

En Ecuador pocos estudios se han reportado sobre la influencia de la ceniza volcánica del Guagua Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua en la salud humana (Cifuentes et al., 2017), por lo que esta investigación contribuirá al entendimiento del estrés oxidativo y expresión de factores inflamatorios en células pulmonares humanas cancerígenas después de haber sido expuestas a ceniza volcánica.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de tres cenizas volcánicas en una línea celular humana mediante ensayos de estrés oxidativo y PCR punto final.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de tres cenizas volcánicas en células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549) mediante el ensayo MTT (bromuro de [3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).

Analizar el daño a nivel celular después de la exposición a tres cenizas volcánicas mediante los ensayos de lactato deshidrogenasa (LDH), óxido nítrico (NO) y superóxido dismutasa (SOD).

Determinar la expresión de marcadores inflamatorios expresados en las células después de su exposición a tres cenizas volcánicas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

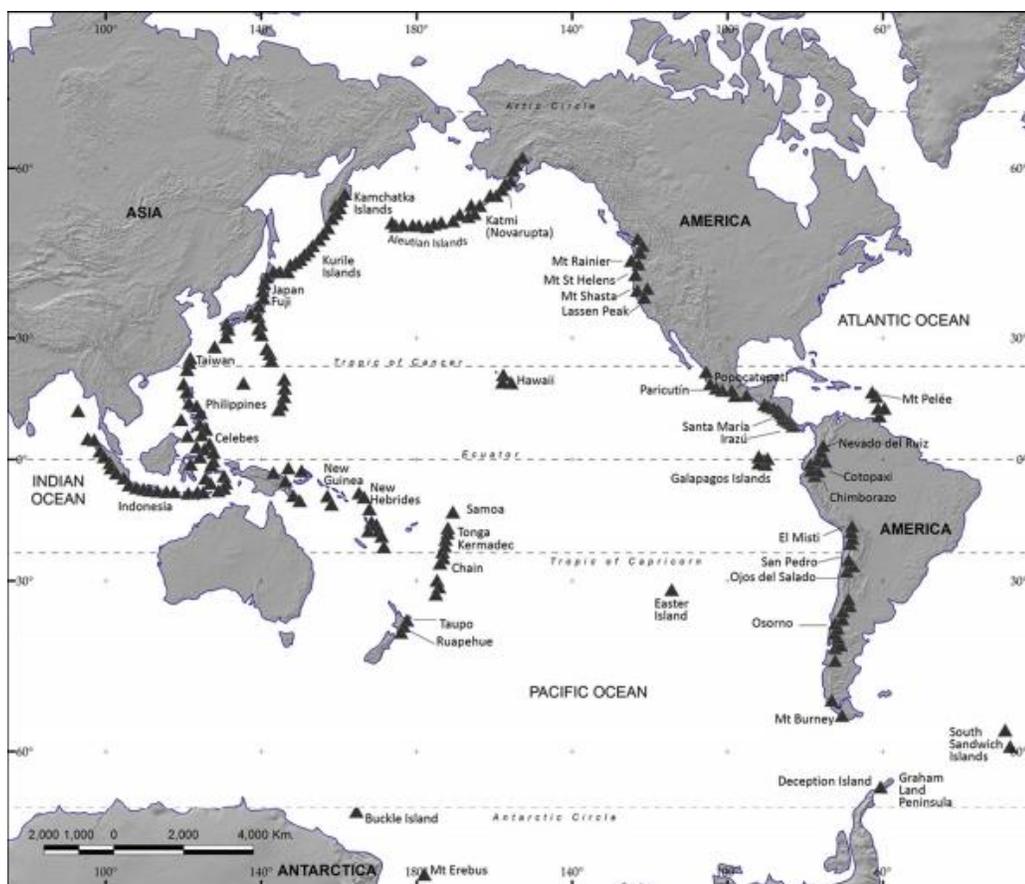
CAPÍTULO II: Marco Teórico

Volcanes

Los volcanes son aberturas dentro de la corteza terrestre que se forman en los bordes de la placa tectónica de la Tierra, permiten que roca fundida o magma llegue desde debajo de la corteza a la superficie. Cuando ocurre la erupción se libera lava, gases, rocas y cenizas (Donald, 2016).

Figura 1

Ubicación de los volcanes en el mundo.



Nota. Tomado de Lipid peroxidation and cytotoxicity induced by respirable volcanic ash (p. 239), por Cervini-Silva et al, 2014, Journal of Hazardous Materials.

Actualmente existen 500 a 600 volcanes activos distribuidos por todo el planeta (J. Cano, 1994), de los cuales 50 erupcionan cada año (P. Baxter, 2004). El 62% de los volcanes se encuentran dispuestos en el borde del océano Pacífico (Figura 1).

Alrededor de 400 a 500 volcanes se encuentran en áreas de subducción, en donde las placas tectónicas están sujetas a una comprensión (P. Baxter, 2004), esto sucede con América Central y la costa oeste del continente sudamericano situadas dentro del “Cinturón de Fuego”, un camino ubicado a lo largo del Océano Pacífico que se extiende desde México hasta Chile en la región Americana (OCHA, 2019). Estos volcanes suelen tener erupciones violentas con una liberación de elevadas cantidades de ceniza (P. Baxter, 2004).

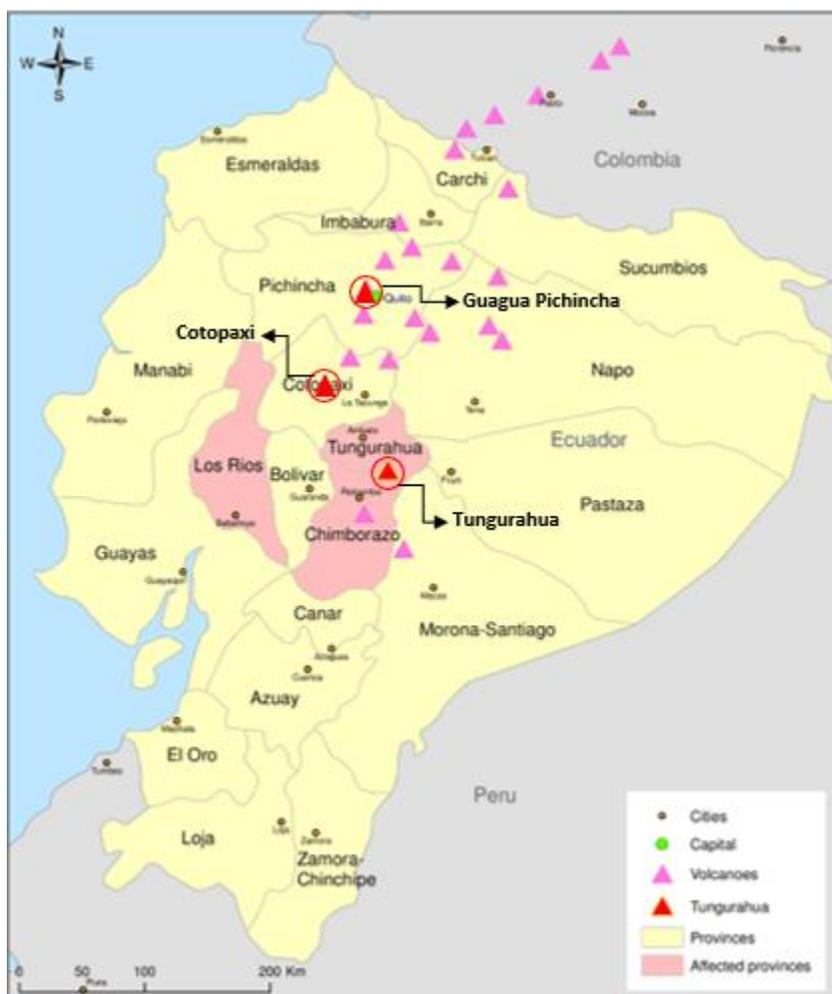
Volcanes Del Ecuador

Existen 250 volcanes distribuidos en todo el Ecuador, alrededor de 20 volcanes estuvieron activos en el siglo pasado los cuales pertenecen a la Zona Volcánica Norte de los Andes que es parte del Cinturón de Fuego del Pacífico (Toulkeridis & Zach, 2017).

La cordillera de los Andes atraviesa de norte a sur en el territorio ecuatoriano presentando tanto volcanes activos como inactivos (Plasencia, 2015), el registro de las erupciones volcánicas data de hace 6000 años (Leonard et al., 2005; Toulkeridis & Zach, 2017) siendo el segundo fenómeno natural más importante en Ecuador (Biass & Bonadonna, 2013). Las erupciones más frecuentes en el país ocurren por volcanes andesíticos (volcanes de cono), producen muchos flujos de lava y sus erupciones son explosivas produciendo caída de ceniza y flujos piroclásticos. En los últimos 17 años, cinco volcanes han presentado actividad volcánica con miles de erupciones, estos son: Cotopaxi, Reventador, Guagua Pichincha, Sangay y Tungurahua (Figura 2) (Leonard et al., 2005; Toulkeridis & Zach, 2017).

Figura 2

Volcanes activos de Ecuador, que erupcionaron los últimos 17 años y generaron nubes de ceniza.



Nota. Tomado de Ecuador: Volcanic eruption – Situation map, por International Federation of Red Cross and Red Crescent Societies, 2006, OCHA Services.

Cotopaxi

El Cotopaxi es el estratovolcán activo más alto del mundo (5897 m) (Plasencia, 2015) y uno de los volcanes más conocidos del Ecuador (Leonard et al., 2005; Plasencia, 2015), ubicado a 50 km del sureste de Quito (Naranjo, 2007) en la parte Oriental de la Cordillera de los Andes (Biass & Bonadonna, 2013). Se formó hace 5000 años atrás y ha tenido varias erupciones: 32 en 1800, de las cuales 3 fueron las más violentas; también se produjeron erupciones en 1903 a 1914, 1922, 1926, 1931, 1939, 1940 y 1942 (Leonard et al., 2005); en el 2015 se registró nuevamente actividad del volcán Cotopaxi después de casi 70 años de permanecer inactivo (Figura 3) (Secretaria de Gestión de Riesgos, 2015).

Su actividad volcánica representa un peligro, debido a sus frecuentes erupciones (Plasencia, 2015), caída de lava, la expulsión de piroclastos y ceniza hacia las zonas rurales alrededor del volcán (Leonard et al., 2005), pudiendo afectar una parte muy significativa de la Sierra y la Costa del Ecuador (Plasencia, 2015).

Figura 3

Volcán Cotopaxi.



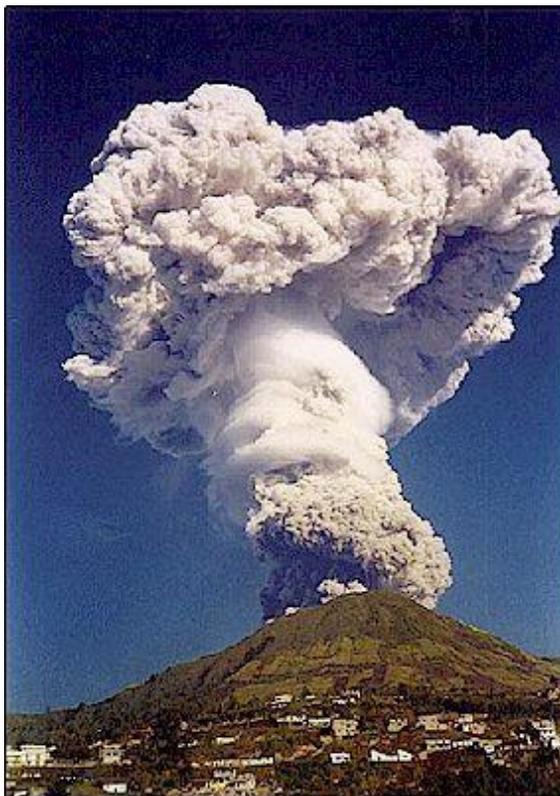
Nota. Tomado del Instituto Geofísico – EPN. <https://www.igepn.edu.ec/>.

Guagua Pichincha

El estratovolcán Guagua Pichincha, está ubicado en la cordillera de los Andes a 20 km al oeste de Quito (Leonard et al., 2005). La erupción más grande de este volcán se desarrolló en el año 1660, las cenizas se esparcieron en un radio de 1000 km formando una capa con un espesor de 30 cm en la ciudad de Quito (Global Volcanism Program, 1993). Se han producido erupciones posteriores en: 1800, 1930, 1939, 1968, 1981, 1985, 1990, 1993 y 1998-2001; esta última afectó a Quito y zonas aledañas debido a la expulsión de piroclastos y la dispersión de la ceniza por el viento (Figura 4) (Leonard et al., 2005).

Figura 4

Volcán Guagua Pichincha.



Nota. Tomado del Instituto Geofísico – EPN. <https://www.igepn.edu.ec/>.

Tungurahua

El estratovolcán Tungurahua se encuentra a 33 km de Ambato y a 8 km de la ciudad de Baños, posee una altura de 5023 m con forma de cono (Le-Pennec et al., 2005). Se han producido varias erupciones en los años: 1857, 1885-1888, 1900, 1916-1925, 1944 y 1999; esta última erupción se caracterizó por fuertes, violentas y repentinas explosiones, flujos de lava, lahares, piroclastos y expulsiones de ceniza que afectó a Baños y zonas rurales (Leonard et al., 2005).

En 2011 se produjo una actividad esporádica del Tungurahua la cual continuo hasta marzo de 2016, registrándose explosiones múltiples, columnas de ceniza de 3 a 8 km², bloques incandescentes y emisiones de dióxido de azufre (SO₂); afectando a varias comunidades como: Cotaló, El Manzano, Bilbao, Pillate, Ambato, Tisaleo, Riobamba y Quero (Figura 5) (Global Volcanism Program, 2018).

Figura 5

Volcán Tungurahua.



Nota. Tomado del Instituto Geofísico – EPN. <https://www.igepn.edu.ec/>.

Ceniza Volcánica

La ceniza volcánica es un producto importante en las erupciones (Langmann, 2013); cuando se produce la actividad volcánica se emite roca, que por la fuerza a la que es expulsada se convierte en arena o polvo, con un tamaño entre los 0.004 a 2 mm de diámetro (Sierra, 2012), estas partículas finas provenientes de roca volcánica fragmentada es la ceniza volcánica (Red Internacional de Riesgos para la Salud Volcánica, 2019); la cual está conformada por una combinación de fragmentos magmáticos heterogéneos cristalinos (minerales) y amorfos (vidrio) (Damby et al., 2018).

Generalmente, se distinguen tres mecanismos mediante los cuales se forma la ceniza volcánica (Langmann, 2013; Vallejo, 2011), estos son:

- **Erupciones Magmáticas.** Se produce cuando el magma que contiene volátiles disueltos sube por el conducto, disminuyendo la presión y generando una erupción volcánica explosiva (Langmann, 2013; Vallejo, 2011).
- **Erupciones Freatomagmáticas.** Se produce cuando el magma interacciona con agua o hielo externos, generando una fragmentación violenta originando cenizas volcánicas de grano fino, siendo el tipo de erupción más poderosa (Hickson et al., 2013; Langmann, 2013; Vallejo, 2011).
- **Erupciones Freáticas.** Se produce cuando el magma entra en contacto con vapor o agua caliente, eyectando las partículas desde las paredes del cráter (Langmann, 2013; Vallejo, 2011).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que las condiciones de la erupción pueden variar con el tiempo, por lo que todos los procesos de formación de la ceniza se pueden producir simultáneamente (Langmann, 2013).

La composición química de la ceniza volcánica, está determinada primordialmente por el tipo de magma a partir del cual se produce, como se puede observar en la tabla 1.

Tabla 1

Tipos de magma.

Tipo de magma	SiO₂ (%P/P)	T_{fusión} (°C)	Viscosidad y contenido de gas
Basáltico	45–52	1000–1200	Bajo
Andesítico	52–63	800–1000	Intermedio
Dacítico	63–68	840–900	Alto
Riolítico	68–75	650–1000	Alto

Nota. Tomado de Volcanic Ash versus Mineral Dust: Atmospheric Processing and Environmental and Climate Impacts (p. 3), por Langmann, B. 2013. Hindawi Publishing Corporation., & de Processes and time scales of dacite magma assembly and eruption at Tauhara volcano, Taupo Volcanic Zone, New Zealand, por Millet et al. 2014. Geochemistry, Geophysics, Geosystems.

Los distintos tipos de magma varían en sus viscosidades, puntos de fusión y contenido volátil (Langmann, 2013). Pero principalmente el contenido de óxido de silicio (SiO₂), puede variar entre un 45–75%, permitiendo clasificar el tipo de ceniza expulsada (Sierra et al., 2018).

Dentro de la composición química de la ceniza también se ha encontrado óxidos de hierro (Fe), aluminio (Al) (Sierra, 2012), magnesio (Mg), sodio (Na), calcio (Ca), plomo (Pb), y potasio (K), además de metales pesados como zinc (Zn), cromo (Cr), mercurio (Hg), vanadio (V), níquel (Ni) y cobalto (Co) (Sierra, 2012), cloruros y fluoruros de hidrogeno (HCl, HF), helio (He), bromuro (Br), y radón (Rn) (Sierra et al., 2018).

En cuanto al tamaño de la ceniza volcánica, este depende de su mecanismo de formación, siendo las partículas que tienen un diámetro menor a 1 mm las que contribuyen con un 55–97% del peso total de la ceniza (Langmann, 2013). Sin embargo, son las partículas que presentan un diámetro menor a los 10 μm las que se desplazan grandes distancias antes de precipitar, y pueden penetrar en el pulmón (Sierra, 2012).

Por consiguiente, la toxicidad de la ceniza volcánica depende los siguientes factores: composición fisicoquímica, concentración, tamaño y su capacidad de dispersión (Sierra, 2012), características que pueden variar entre volcanes y entre erupciones de un mismo volcán (Plumlee & Ziegler, 2007).

Ceniza Del Volcán Cotopaxi

La ceniza emitida por el Cotopaxi en el 2015 era de grano fino y extremadamente fino, presentando un diámetro de 30 μm – 2 mm. Las partículas al inicio de la erupción fueron densas con una forma angular vesicular, con el paso del tiempo, estas se volvieron irregulares a sub-redondeadas mostrando una superficie lisa y bordes fracturados. La composición química de la ceniza fue: SiO_2 (66%), TiO_2 (1.2%), Al_2O_3 (14%), FeO (7%), MnO (1.5%), MgO (1.8%), CaO (4.3%), Na_2O (3.3%), K_2O (3%), Cl (0.07%) y P_2O_5 (0.6%) (Gaunt et al., 2016; Troncoso et al., 2017).

Ceniza Del Volcán Guagua Pichincha

La ceniza proveniente del volcán Guagua Pichincha emitida en 1999 (Sociedad Ecuatoriana de Pediatría, 2007) es una ceniza andesítica cálcica-alkalina (Alvarez & Avilés, 1999) de color blanco (Sociedad Ecuatoriana de Pediatría, 2007). Compuesta por: SiO₂ (64%), TiO₂ (0.4%), Al₂O₃ (16%), Fe₂O₃ (4.8%), MnO (0.08%), MgO (2.3%), CaO (4.7%), Na₂O (4%), K₂O (1.7%) y P₂O₅ (0.2%) (Alvarez & Avilés, 1999).

Ceniza Del Volcán Tungurahua

La ceniza proveniente del estratovolcán Tungurahua tiene un color gris (Sociedad Ecuatoriana de Pediatría, 2007), con una densidad de 1.4 g/cm³ y una textura arenosa (Guevara et al., 2009). Compuesta por: SiO₂ (58%), TiO₂ (0.8%), Al₂O₃ (17%), Fe₂O₃ (7%), MnO (0.10%), MgO (4%), CaO (6.5%), Na₂O (4%), K₂O (1.7%) y P₂O₅ (0.33%) (Alvarez & Avilés, 1999).

Estructura Y Funciones Del Sistema Respiratorio

La oxigenación de la sangre es la principal función del sistema respiratorio, gracias a la interrelación que existe con su estructura. La vía aérea de este sistema se clasifica en superior (vía extratorácica) o inferior (vía intratorácica) (Figura 6) (Trinidad & Concha, 2018).

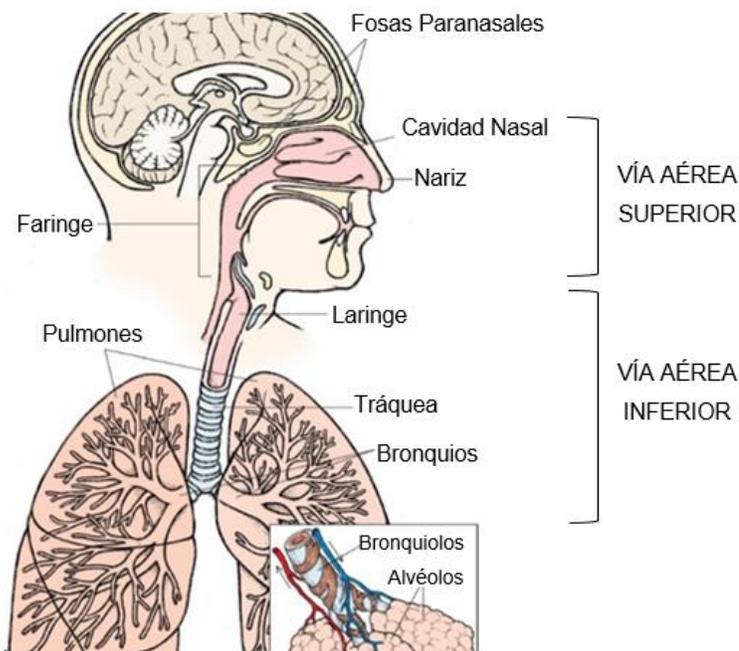
El tracto respiratorio superior está formado por: (1) nariz y fosas nasales, que filtran y acondicionan el aire inhalado; (2) senos paranasales; (3) boca; (4) faringe, que constituye el extremo común superior entre el tubo respiratorio y el digestivo, ya que conduce los alimentos al esófago y el aire hacia la laringe y los pulmones; (5) laringe, es la estructura encargada de coordinar la respiración y la fonación; y (6) tráquea, el cual es un tubo ancho formado por cartílagos, que brindan la rigidez en la estructura de la vía aérea e impide el colapso durante la respiración (Reiriz, 2014; Trinidad & Concha, 2018).

Y el tracto respiratorio inferior está conformado por: (1) bronquios, que son dos tubos formados por cartílago que se dirigen a cada pulmón; (2) bronquiolos, que son divisiones adicionales de la tráquea, esenciales para limpiar, humedecer y calentar el aire inhalado; (3) pulmones, los cuales son los principales órganos para la respiración; y (4) alveolos, que son sacos pequeños de aire, formados por una sola capa de células alveolares de tipo I y tipo II (neumocitos) para asegurar el intercambio gaseoso (Hakim & Usmani, 2014; Trinidad & Concha, 2018).

Dentro de las funciones del sistema respiratorio, la obtención de oxígeno desde el exterior para su distribución en los tejidos y la generación de energía (Trinidad & Concha, 2018), es de vital importancia para el ser humano. Así como la posterior eliminación del dióxido de carbono (CO_2) al exterior, generado por el metabolismo celular (Reiriz, 2014). Este sistema también interviene en el equilibrio ácido-base al remover el CO_2 ; en el metabolismo y procesamiento de materiales bioactivos en los pulmones; y en la fonación, que es la producción de sonidos debido al movimiento del aire a través de las cuerdas vocales (Trinidad & Concha, 2018).

Figura 6

Estructura del sistema respiratorio.



Nota. Tomado de Anatomy of the Respiratory System, por BrainKart. 2018.

<http://www.brainkart.com/>

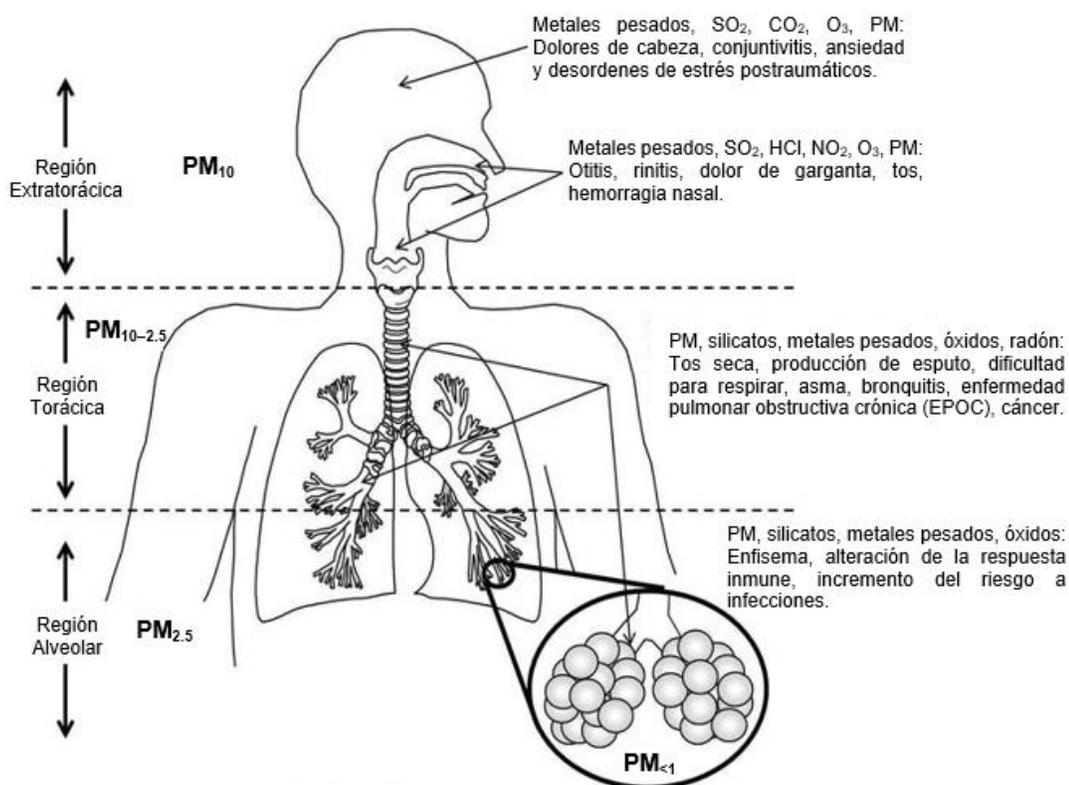
Efectos De La Ceniza Volcánica en el Sistema Respiratorio

Las emisiones de ceniza pueden ocasionar diversas condiciones patológicas, las cuales dependen de factores como: proporción de partículas menores a $10\ \mu\text{m}$ de diámetro aerodinámico (Material particulado – PM_{10}), concentración de partículas en suspensión (Grob et al., 2012), características químicas, patrón respiratorio (Sierra et al., 2018), edad, sexo (Naumova et al., 2007), presencia de gases volcánicos mezclados con la ceniza, condiciones meteorológicas, frecuencia, duración de la exposición, estado de salud de la persona expuesta y uso de materiales de protección respiratoria (Grob et al., 2012).

Los efectos producidos por la ceniza volcánica se pueden clasificar como (Sierra et al., 2018): (1) agudos, causados por partículas entre los 10–4 μm de diámetro (fracción torácica) y (2) crónicos, causados por partículas finas menores a 4 μm de diámetro (fracción respirable) (Horwell, 2007). Las patologías desarrolladas por tener contacto con la ceniza volcánica se producen principalmente en personas susceptibles, como niños y personas con enfermedades pulmonares previas (Grob et al., 2012) (Figura 7).

Figura 7

Impacto de la ceniza volcánica en el sistema respiratorio.



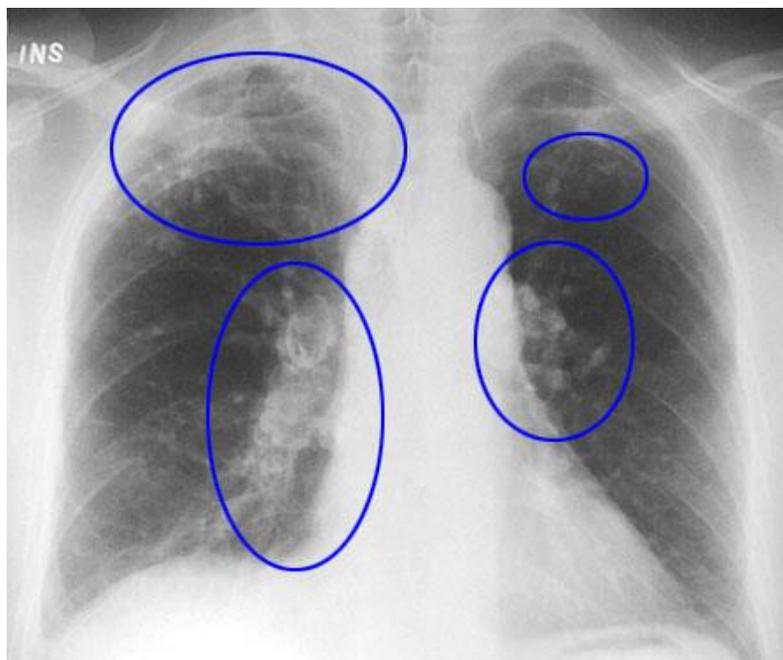
Nota. PM : Material particulado. Tomado de Health Impact of Volcanic Emissions, (p. 270), por Sierra et al. 2018. Volcanoes - Geological and Geophysical Setting.

Efectos agudos. Irritación ocular y faríngeo, secreción nasal, tos seca, disnea, sibilancias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Sierra et al., 2018), bronquitis (Horwell, 2007), enfermedades cardiovasculares o modificaciones en la función pulmonar y exacerbaciones de enfermedades respiratorias preexistentes (Sierra et al., 2018), ya que pueden ingresar a los bronquiolos (Horwell, 2007).

Efectos crónicos. Son las patologías que provocan una mayor tasa de mortalidad debido a que se producen enfermedades respiratorias graves (Sierra et al., 2018) como la silicosis (tipo nodular de fibrosis pulmonar) (Figura 8), cáncer de pulmón (Horwell, 2007), fibrosis, bronquitis crónica, edema o neumoconiosis (Sierra, 2012).

Figura 8

Pulmones con masas fibróticas generadas por una silicosis complicada, debido a la inhalación de ceniza volcánica.



Nota. Tomado de Volcanic Ash: More Than Just A Science Project, por Williams, 2012, Geology and Human Health.

Además, los compuestos que forman la ceniza pueden disolverse en el líquido de revestimiento del pulmón pudiendo pasar por la membrana alveolar–capilar (Sierra et al., 2018), las partículas de ceniza pueden ingresar a la región alveolar de los pulmones (Horwell, 2007) y las partículas de grano fino ($< 0.1 \mu\text{m}$) pueden translocarse a otros órganos (Sierra et al., 2018).

Células Del Sistema Respiratorio

El tracto respiratorio está conformado por aproximadamente 40 tipos de células, agrupadas como: células del epitelio, células del tejido conectivo intersticial, células de los vasos sanguíneos, células de la pleura, células del tejido hematopoyético y linfoide (Tabla 2) (Franks et al., 2008).

Las vías respiratorias conducen a la región alveolar, en donde pequeños sacos (alvéolos) altamente vascularizados y de delgadas paredes (Hogan & Tata, 2019), están cubiertos principalmente por células alveolares tipo 1 (AT I) (Figura 9) (Whitsett et al., 2019), las cuales son células escamosas aplanadas, no replicativas y diferenciadas que recubren cerca del 95% de la superficie alveolar (Cooper et al., 2016).

Las células alveolares tipo 2 (AT II) recubren el 5% del espacio alveolar restante (Figura 9), tienen una morfología compacta y expresan cuerpos multilamelares (MLB) que tienen dipalmitoilfosfatidilcolina (DPCC) el cual es un tensioactivo pulmonar. Estas células son conocidas como “defensoras del alveolo”, ya que tienen una función en la respuesta inmunitaria innata debido a que los tensioactivos pulmonares reducen la inflamación y tienen un efecto contra microorganismos (Cooper et al., 2016).

Otro tipo de células que se ubican en el aparato respiratorio son: los fibroblastos que apoyan la homeostasis epitelial y las funciones pulmonares (Hogan & Tata, 2019); los eritrocitos que absorben oxígeno dentro de los vasos (Whitsett et al., 2019); y las células inmunes, como los basófilos, macrófagos alveolares, células dendríticas, eosinófilos y células linfoides, que ayudan a proteger a los pulmones de las infecciones y promueven la reparación (Hogan & Tata, 2019).

Figura 9

Células alveolares tipo 1 y tipo 2.

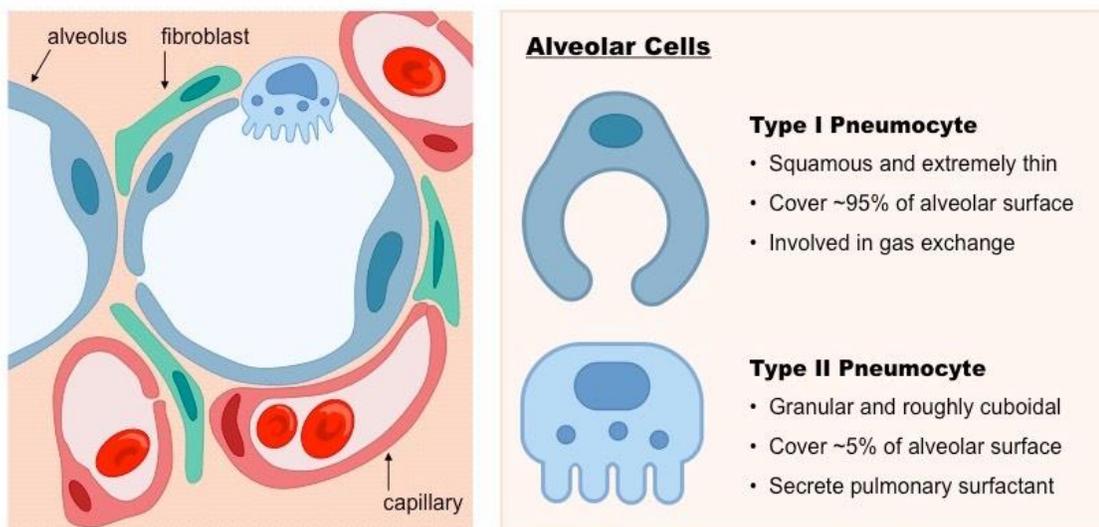


Tabla 2*Células del Tracto Respiratorio.*

Células epiteliales de las vías respiratorias	Tejido hematopoyético y linfoide	Arterias y Venas
Células caliciformes	Linfocitos	Células endoteliales
Células ciliadas epiteliales	Células de plasma	Células del músculo liso
Células basales	Megacariocitos	Fibroblastos
Células parabasales	Macrófagos	Pericitos
Células de cepillo	Células de Langerhans	Miofibroblastos
Oncocitos	Mastocitos, Neutrófilos	
Células metaplásicas	Eosinófilos y Basófilos	
Células de las glándulas salivales (en bronquios)	Tejido Linfático	Tejido conectivo intersticial
Células serosas	Células endoteliales	Fibroblastos
Células mucosas	Células del músculo liso	Miofibroblastos
Células ductales	Fibroblastos	Células meningoteliales
	Miofibroblastos	Células neurales
Pleura	Células alveolares	
Células mesoteliales	Neumocitos Tipo 1	
Fibroblastos submesoteliales	Neumocitos Tipo 2	
pleuripotentes		
Células adiposas		

Nota. Tomado de Resident Cellular Components of the Human Lung (p. 764), por

Franks et al. 2008. National Institutes of Health.

Mecanismo Inmunitario Del Sistema Respiratorio

Debido a que los humanos respiramos aproximadamente 10000 L de aire por día, los pulmones se encuentran en constante contacto con agentes patógenos, alérgenos y toxinas. Para evitar infecciones o lesiones que estas partículas podrían ocasionar, el pulmón posee mecanismos de defensa encargados de mantener la vía aérea protegida, como son las barreras anatómicas descritas anteriormente, pero si las partículas logran superar estos elementos, el sistema respiratorio empleara las defensas inmunitarias innatas y adaptativas. Estas defensas deben reconocer, reaccionar ante microorganismos y compuestos no deseados, para mantener la estructura pulmonar normal (Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Por lo que conocer la respuesta inmunitaria del pulmón permite comprender la fisiopatología de varias enfermedades pulmonares, como las que produce la inhalación de ceniza volcánica (Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Inmunidad Innata

El sistema inmune innato de los pulmones es la principal respuesta de defensa frente a patógenos, después de las barreras anatómicas. Y su función es proporcionar una respuesta inmunitaria rápida: al reconocer patógenos, independientemente de si ha existido una previa exposición; eliminando infecciones y células dañadas; realizando procesos de reparación tisular; y estimulando la respuesta inmunitaria adaptativa. Estas acciones se producen gracias a los distintos factores humorales y celulares de la inmunidad innata, siendo fundamentales para mantener la vía aérea estéril (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Principalmente la inmunidad innata presenta dos tipos de respuestas: (1) Inflamación, proceso por el cual los leucocitos y las proteínas del plasma llegan a los lugares de infección donde son activados, para que eliminen células muertas, dañadas o sustancias extrañas acumuladas; y (2) Defensa antivírica, que implica cambios celulares para impedir la replicación viral (Abbas et al., 2015).

Factores Celulares. El componente celular del sistema inmunitario innato está conformado por diferentes tipos de células que utilizan una variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que identifican patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), estas son estructuras comunes en el metabolismo de los microorganismos y no están presentes en el huésped, y patrones moleculares asociados a daño (DAMP), que son moléculas endógenas liberadas por células dañadas (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013; Turvey & Broide, 2010).

Cuando los PRR interactúan con los PAMP, se puede producir la fagocitosis de los patógenos, la producción de citoquinas inflamatorias, la inducción de genes antimicrobianos o un incremento de moléculas de adhesión y moléculas coestimuladoras (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013; Turvey & Broide, 2010).

Los principales tipos de PRR son:

Receptores del tipo Toll – TLR. Reconocen productos de varios microorganismos o moléculas liberadas de células estresadas. Dentro del sistema respiratorio las células que más expresan TLRs son los macrófagos, las células epiteliales de la vía aérea y las células dendríticas (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013; Herrero, 2010).

Receptores del tipo RIG – RLR. Son sensores citoplasmáticos de ácidos nucleicos virales, que inducen la producción de interferón (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Receptores similares al dominio de oligomerización de nucleótidos – NLR. Reconocen señales de estrés, DAMPs y PAMPs bacterianos. La subfamilia NLRP forma un complejo multiproteico denominado inflamasoma que activa la caspasa-1 la cual procesa citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- α). Este complejo multiproteico es fundamental para una respuesta inmunitaria eficaz contra varias enfermedades metabólicas, autoinmunes e inflamatorias (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013; Turvey & Broide, 2010; Vega, 2008).

Receptores de lectina tipo C – CLR. Reconocen una amplia variedad de PAMPs, y están implicados en la endocitosis, fagocitosis, adhesión y reparación celular (Dela Cruz & Kof, 2015).

Los componentes celulares del sistema inmunitario innato realizan diversas funciones para defender al organismo de patógenos (Figura 10), las células involucradas son (Dela Cruz & Kof, 2015):

Células epiteliales de la vía aérea. Estas células son el primer punto de contacto con las sustancias inhaladas, formando una interfaz entre el ambiente interno y externo. Crean una barrera mecánica frente a patógenos, ya que reconocen diversos PAMPs eliminándolos mediante el movimiento de sus cilios, e incrementando la producción de citocinas, quimiocinas y proteínas antimicrobianas, produciendo una reacción inflamatoria que recluta fagocitos y células dendríticas (Bals & Hiemstra, 2004; Garcia & Sibila, 2013).

Macrófagos. Son células fagocíticas mononucleares, mantienen la homeostasis tisular y actúan como células presentadoras de antígeno (APC). Los macrófagos se pueden diferenciar en: (1) Macrófagos alveolares (MA), estos macrófagos residen mayoritariamente en los pulmones (85%), dentro del espacio alveolar. Su principal función es generar una respuesta antiinflamatoria al fagocitar partículas inhaladas y células moribundas. Sin embargo, algunos patógenos y partículas ambientales como la sílice son resistentes a la función de los MA y no son fagocitadas; y (2) Macrófagos intersticiales (MI), los cuales representan una pequeña población de macrófagos que residen en el parénquima de los pulmones, con funciones inmunorreguladoras (Ardain et al., 2020; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Células dendríticas (DC). Son células fagocíticas ubicadas en la membrana basal, en donde extienden sus dendritas entre las células epiteliales entrando en contacto con agentes infecciosos, siendo mejores APC que los macrófagos (Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013; Melo et al., 2010).

Estas células detectan, absorben y procesan patógenos, migrando a los ganglios linfáticos para la presentación de antígenos a las células T, constituyendo el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Además, expresan moléculas accesorias (CD80, CD86, CD40) y receptores de prostaglandinas, que afectan el comportamiento migratorio y la maduración celular (Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013; Melo et al., 2010).

Neutrófilos. Son células polimorfonucleares que se movilizan desde la médula ósea, al torrente sanguíneo y a los lugares de inflamación, para eliminar a los patógenos invasores, mediante el proceso de fagocitosis, la producción de radicales libres y enzimas proteolíticas, y la secreción de gránulos. Siendo los primeros fagocitos en reclutarse en las enfermedades pulmonares agudas y crónicas (Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Células Natural killer. Son células linfoides innatas que desempeñan funciones citolíticas, mediante la liberación del contenido de sus gránulos; y producen citocinas inflamatorias, que contribuyen a trastornos inflamatorios crónicos pulmonares. Estas células son predominantemente recirculantes, en lugar de residentes dentro del pulmón (Ardain et al., 2020; Garcia & Sibila, 2013; Sepúlveda & Puente, 2000).

Eosinófilos/ Basófilos/Mastocitos. Los eosinófilos son células no invasivas que defienden al organismo contra parásitos. Mientras que la función de los basófilos y los mastocitos, es liberar sustancias químicas (histamina) durante las reacciones alérgicas y anafilácticas (Garcia & Sibila, 2013; Melo et al., 2010).

Factores Humorales. Los factores humorales de la inmunidad innata del pulmón, son moléculas efectoras solubles presentes en la sangre y líquidos extracelulares, como en las secreciones mucosas de la superficie epitelial de la vía aérea. Estos compuestos se unen a patógenos para facilitar su reconocimiento, tienen actividad bactericida o propiedades antivirales (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013).

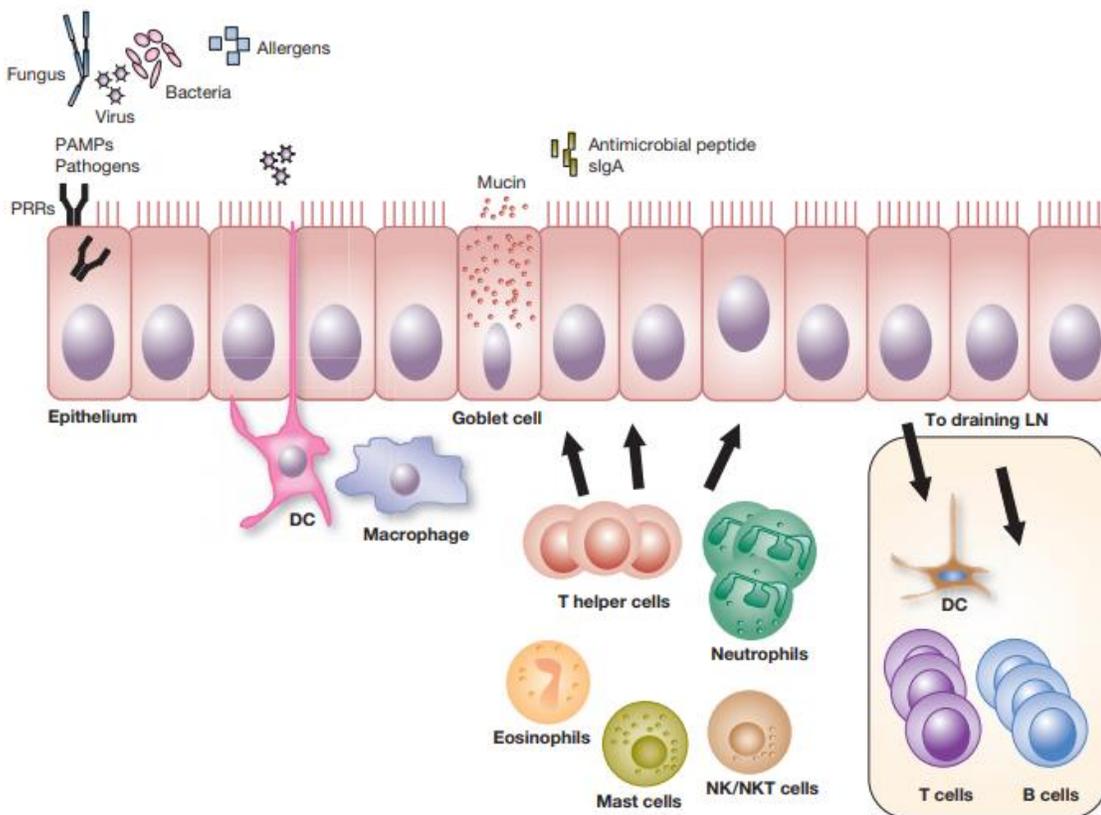
Esta rama humoral está compuesta por el sistema del complemento, colectinas, lactoferrinas, mucinas, entre otros. (1) El sistema de complemento, es un grupo de más de 20 proteínas, el cual se induce por 3 vías: clásica, alternativa y de lectina, convergiendo a nivel de la proteína C3, y promoviendo el reclutamiento de fagocitos en el lugar de infección, la opsonización de microbios, inflamación del tejido y la interacción con anticuerpos; (2) Mucinas, es una proteína glicosilada, siendo el principal componente del moco. Las mucinas secretadas forman la fase gel del moco, dándole las propiedades viscoelásticas, y las mucinas asociadas a la membrana, actúan como receptores de superficie celular para patógenos; (3) Péptidos antimicrobianos, poseen acciones antibióticas y son mediadores en la inflamación; (4) Lactoferrina; y (5) Colectinas, que son proteínas que se pueden ligar a PAMPs e inducir la fagocitosis mediante los macrófagos alveolares (Abbas et al., 2015; Garcia & Sibila, 2013; Melo et al., 2010; Strickler P. et al., 2006).

Inmunidad Adaptativa.

La inmunidad adaptativa es el sistema de defensa frente a antígenos específicos, caracterizada por tener una respuesta inmunitaria específica. Puede combatir de forma eficaz las infecciones repetidas por el mismo patógeno (memoria), incrementar el número de linfocitos específicos frente a un determinado antígeno e impedir daños en el organismo durante la respuesta a antígenos extraños. Existen dos respuestas inmunitarias adaptativas, la inmunidad humoral y la inmunidad celular (Abbas et al., 2015; Ahmed et al., 2009; Dela Cruz & Kof, 2015).

Figura 10

Células del Sistema Inmunológico.



Nota. Tomado de Lung Immunology, (p. 247), por Dela Cruz & Kof. 2015. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Inmunidad Celular. Las principales células del sistema inmune adaptativo son los linfocitos B y los linfocitos T, los cuales pueden encontrarse en la membrana basal o entre las células epiteliales de la mucosa del sistema respiratorio (Trinidad & Concha, 2018). Estas células pueden reconocer varios antígenos, ya que, debido a procesos de translocación y recombinación de genes, se obtiene la generación de 10^{11} receptores diferentes. Además, el cuerpo humano puede producir 10^7 clones de linfocitos T y B (Dela Cruz & Kof, 2015).

Linfocitos T. Estas células reconocen a los antígenos por medio del receptor específico de células T (TCR), eliminando patógenos intracelulares y células infectadas. Sin embargo, los linfocitos T presentan una especificidad restringida, ya que para que reconozcan epítomos antigénicos a través del TCR, estos deben estar unidos a proteínas propias llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), las cuales se expresan en las superficies de las APC (células dendríticas). Tras el reconocimiento del antígeno, los linfocitos activados proliferan rápidamente produciendo grandes poblaciones clonales (Abbas et al., 2015; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Existen diversas poblaciones de linfocitos T que difieren en sus funciones y productos proteicos, como los: (1) Linfocitos T citotóxicos o citolíticos (T CD8⁺), que eliminan a las células infectadas por virus y bacterias intracelulares; (2) Linfocitos T reguladores (Treg), secretan TGF- β e IL-10, que regulan y suprimen las respuestas inmunitarias y (3) Linfocitos T cooperadores o helper (T CD4⁺, Th), que secretan citocinas, responsables de la proliferación y diferenciación de los propios linfocitos T y de la activación de macrófagos, linfocitos B y otros leucocitos (Abbas et al., 2015; L. E. Cano & Lopera, 2013; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Dependiendo del antígeno que se presente y de la señal del TCR, las APC dirigen el desarrollo de diferentes linajes de linfocitos cooperadores (Th), esta diferenciación está asociada a la producción de factores de transcripción que producen diferentes citocinas. El subconjunto Th se divide en: Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 y Tfh (Dela Cruz & Kof, 2015).

Linfocitos B. Las células B reconocen tanto antígenos solubles extracelulares como los de la superficie celular, a través del receptor específico de células B (BCR). Estas células son las únicas que producen anticuerpos, siendo su principal función. Y encontrándose abundantemente en el árbol bronquial (Abbas et al., 2015; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013).

Inmunidad Humoral. Esta inmunidad se basa en la fabricación de anticuerpos (inmunoglobulinas) que se unen a una porción específica del antígeno, llamada epítipo; neutralizando los agentes patógenos que ingresan en la vía aérea, y marcándolos para su eliminación; siendo el principal sistema de defensa contra microbios extracelulares (Abbas et al., 2015; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013; Twigg, 2015).

Los anticuerpos se encuentran principalmente en sangre y mucosas, y las inmunoglobulinas A y G son las más frecuentes en el aparato respiratorio (Abbas et al., 2015; Dela Cruz & Kof, 2015; Garcia & Sibila, 2013; Twigg, 2015). Todas las inmunoglobulinas (Ig) comparten las mismas características estructurales básicas, pero tienen gran variabilidad en las regiones donde se unen los antígenos. Las Ig están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (κ y λ) (Abbas et al., 2015; Twigg, 2015). Las cadenas pesadas tienen una región variable, la cual se une al antígeno, y una región constante que se une a los receptores Fc celulares y al complemento. Los anticuerpos se dividen en clases o isotipos y pueden ser: IgG, IgA, IgM, IgE, e IgD (Abbas et al., 2015; Twigg, 2015).

Respuesta Inmunitaria Por Inhalación De Partículas

Una de las principales funciones del sistema respiratorio, es activar mecanismos de defensa contra microorganismos, gases y polvos que han sido inhalados, ya que se deben preservar sus delicadas estructuras anatómicas. Además, se debe mantener un equilibrio en el organismo, al tolerar patógenos no ambientales y al producir una respuesta eficaz contra organismos nocivos (Chiu & Openshaw, 2015; Trinidad & Concha, 2018).

Se conoce que la ceniza puede inducir problemas respiratorios, pero el mecanismo por cual se producen aún no ha sido bien definido. Por lo tanto, la etiología básica de la respuesta inmunitaria frente a la aspiración de agentes nocivos se presenta a continuación (Naumova et al., 2007).

La respuesta inmunitaria en los diferentes compartimentos del sistema respiratorio se produce debido al depósito de partículas de ceniza en los diferentes niveles, estas se ubican dependiendo del patrón respiratorio (frecuencia respiratoria y tasa de ventilación) (Grob et al., 2012), la morfología ramificada de las vías aéreas (Naumova et al., 2007) y tamaño de los gránulos de ceniza (Tabla 3) (Grob et al., 2012(Trinidad & Concha, 2018)). El vasto suministro vascular del sistema respiratorio, asegura el paso constante de células inmunitarias a través de los pulmones (Lloyd, 2014).

Tabla 3

Lugares de depósito de partículas en el sistema respiratorio.

Tamaño (μm)	Lugar de depósito
≥ 11	Nasofaringe
4.7 – 7	Faringe
3.3 – 4.7	Tráquea y bronquios primarios
2.1 – 3.3	Bronquios secundarios
1.1 – 2.5	Bronquios terminales
0.65 – 1.1	Alvéolos

Nota. Tomado de Estructura y funciones del sistema respiratorio (p. 105), por Trinidad, S. & Concha, I. 2018. Neumología Pediátrica.

En la vía aérea central la nariz y las vías nasales, filtra el aire inspirado, gracias a su recubrimiento con pelos gruesos y cortos capturan las partículas inhaladas mayores a 11 μm . Mientras que los gránulos más pequeños son atrapados por el barrido del sistema mucociliar, la cual es transportada a la faringe para posteriormente ser deglutida en el estómago, o eliminada mediante el reflejo de la tos o estornudos (García & Sibila, 2013; Grob et al., 2012; Martín & Frevert, 2005; Reiriz, 2014; Trinidad & Concha, 2018).

Sin embargo, los elementos $<1 \mu\text{m}$ pueden eludir la barrera de la mucosa, transportándose a la superficie alveolar, en donde el sistema inmune responderá con una serie de células que atacaran la amenaza, neutralizando y limpiando los restos para evitar una lesión tisular (Dela Cruz & Kof, 2015; Martín & Frevert, 2005).

En la vía aérea periférica (bronquiolos) los gránulos de ceniza serán removidas por macrófagos alveolares y capilares linfáticos (Grob et al., 2012). Mientras, que las APC (células dendríticas), pueden extender sus proyecciones entre las células epiteliales de la vía respiratoria, para tomar muestras del entorno, reconocer patógenos y activar vías de señalización, las cuales producirán: (1) quimiocinas, que reclutarán células hematopoyéticas (macrófagos, células NK) necesarias para iniciar la inflamación. Y (2) citocinas (IL-10, TNF- α) que activarán a las células efectoras y ayudarán en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa en el pulmón (Dela Cruz & Kof, 2015).

El epitelio pulmonar es una barrera física y su interacción con las células del sistema inmunológico mantienen la homeostasis respiratoria. Las células del epitelio de la vía respiratoria producen diversas citocinas (IL-1 β , IL-6), sin embargo, la pérdida de su integridad después de una exposición a sustancias químicas (contaminación atmosférica), provocará una inflamación en individuos susceptibles, como las personas que tienen asma (Lloyd, 2014; Martin & Frevert, 2005).

Dentro de las células hematopoyéticas, los macrófagos alveolares actúan como centinelas para mantener la homeostasis del sistema inmunológico, fagocitando todo tipo de partículas inhaladas que llegan a los alveolos (Lloyd, 2014; Martin & Frevert, 2005). Por lo que estas células son cruciales en el comienzo y el desarrollo de la inflamación en los pulmones (Damby et al., 2016); además, producen varios compuestos que destruyen las partículas exógenas, como: el FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), TNF- α (factor de necrosis tumoral), iL-1, iL-6, e iL-8 (citocinas proinflamatorias). Sin embargo, esos compuestos también ocasionan daño tisular en el sistema respiratorio y una exacerbación del proceso inflamatorio (Grob et al., 2012; Naumova et al., 2007).

A corto plazo estos efectos se manifiestan como disnea e infecciones pulmonares, pero a largo plazo pueden producir carcinogénesis y fibrosis. Estas patologías suelen generarse debido a que la ceniza daña la autofagia de los macrófagos, disminuyendo la destrucción de los gránulos de ceniza inhaladas. Además, si una partícula se aloja en el epitelio alveolar, estas no se eliminarán, por lo que podrán llegar al drenaje profundo de los ganglios linfáticos pulmonares (Naumova et al., 2007).

De igual manera, la inspiración de ceniza volcánica compuesta por sílice cristalina puede inducir inflamación, al estimular el inflamasoma NLRP 3 y activar la caspasa-1 que procesa la forma inactiva de las citocinas inflamatorias iL-18 e iL-1 β (Damby et al., 2018; Kang et al., 2017).

A la par de la respuesta celular se produce una respuesta humoral, los péptidos antimicrobianos, como las catelicidinas y defensinas, son producidos por las células epiteliales debido a la activación de los PRR. Estos péptidos además de su actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos, parásitos y virus, también están implicados en la inducción de la inflamación (Dela Cruz & Kof, 2015). Además, al entrar en contacto con la ceniza volcánica se produce una disminución en los niveles séricos de proteínas del complemento C3 y C4, reduciendo la fagocitosis y activación de las células (Naumova et al., 2007).

Mientras que, en la inmunidad adaptativa, se ha encontrado que cuando se produce infecciones pulmonares, Th1 regula el daño pulmonar. Mientras que Th2 está involucrada en el proceso de cicatrización de laceraciones, sin embargo, si esta respuesta es descontrolada y prolongada, puede agravar la lesión y producir fibrosis. Por lo tanto, las células Th influyen en la respuesta inmunitaria de muchas enfermedades pulmonares (Dela Cruz & Kof, 2015).

Las inmunoglobulinas IgA, IgG y albumina pueden proteger al sistema respiratorio de la ceniza, pero estos gránulos pueden producir alteraciones en la inmunidad humoral, disminuyendo los niveles en el suero de IgG (Grob et al., 2012) y pudiendo dañar la respuesta y proliferación de las células T (Naumova et al., 2007). Por lo tanto, el pulmón debe realizar las acciones de la respuesta inmunitaria de manera selectiva, para evitar la inflamación innecesaria (Twigg, 2015).

Estrés Oxidativo Del Sistema Respiratorio

El oxígeno molecular es un requisito necesario para la vida de los organismos aerobios, el pulmón humano tiene una gran área superficial debido a su principal función, que es el intercambio gaseoso (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015). El oxígeno puede formar moléculas químicamente reactivas, denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales en concentraciones bajas y moderadas, desempeñan diversas funciones fisiológicas, como la homeostasis y señalización intracelular (Jovanović et al., 2010; Katerji et al., 2019).

Sin embargo, elevadas concentraciones de estos compuestos, pueden ocasionar daño en la célula y contribuir al desarrollo de enfermedades (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015).

Otra molécula gaseosa importante en el sistema respiratorio, es el óxido nítrico (NO[•]), ya que actúa como molécula de señalización en varios procesos fisiológicos. Una producción regulada de NO[•] es fundamental para mantener la homeostasis (regulación) de la vía respiratoria, en el proceso de vasorrelajación y en el control del sistema inmunitario durante los procesos inflamatorios en los pulmones (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015; Martínez & Andriantsitohaina, 2009).

Sin embargo, si se produce la reacción de NO^{\bullet} con $\text{O}_2^{\bullet-}$, se formarían especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el peroxinitrito (ONOO^-), que contribuye al desarrollo de patologías pulmonares (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015; Martínez & Andriantsitohaina, 2009).

Dependiendo de sus características químicas, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, se pueden dividir en dos clases, radicales libres y no radicales (L. Zhang et al., 2019).

Los radicales libres son especies químicas que tienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales, dichos electrones generan una elevada reactividad, pudiendo desencadenar reacciones químicas que dañen los componentes celulares. Sin embargo, si dos radicales libres con electrones desapareados se unen, se generan especies no radicales de menor reactividad, sin electrones desapareados (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014; L. Zhang et al., 2019).

Los radicales libres son más inestables y reactivos que los no radicales, siendo las formas más dañinas de ROS y RNS (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015). La interacción entre estos compuestos y las moléculas diana producen reacciones en cadena, que consisten en un paso de iniciación, uno de propagación y uno de terminación. En el paso de iniciación, se producen los radicales libres mediante procesos térmicos o de transferencia de electrones (redox). Posteriormente se produce la propagación, que consiste en que una vez formado el radical de partida, este puede reaccionar con una molécula sin electrones desapareados, entonces esta molécula pierde un electrón y se convierte en la nueva especie de radical. La propagación continua hasta que los radicales formados reaccionan con antioxidantes o con otros radicales libres, disminuyendo así su concentración, este paso es la terminación (L. Zhang et al., 2019).

En condiciones fisiológicas normales, el equilibrio entre la eliminación y generación de ROS y RNS, permite: (1) Mantener la integridad funcional de las cascadas de señalización que regulan los fenotipos celulares; (2) Regular la proliferación, diferenciación y supervivencia celular; (3) Inactivar enzimas e inducir apoptosis, y (4) Modular el sistema inmunitario inflamatorio en el aparato respiratorio, a través de la estimulación de factores de transcripción, vías de proteína quinasa, y mediante la producción de genes mediadores de la inflamación (Burton & Jauniaux, 2011; Deshane & Thannickal, 2015; Katerji et al., 2019; Pizzino et al., 2017).

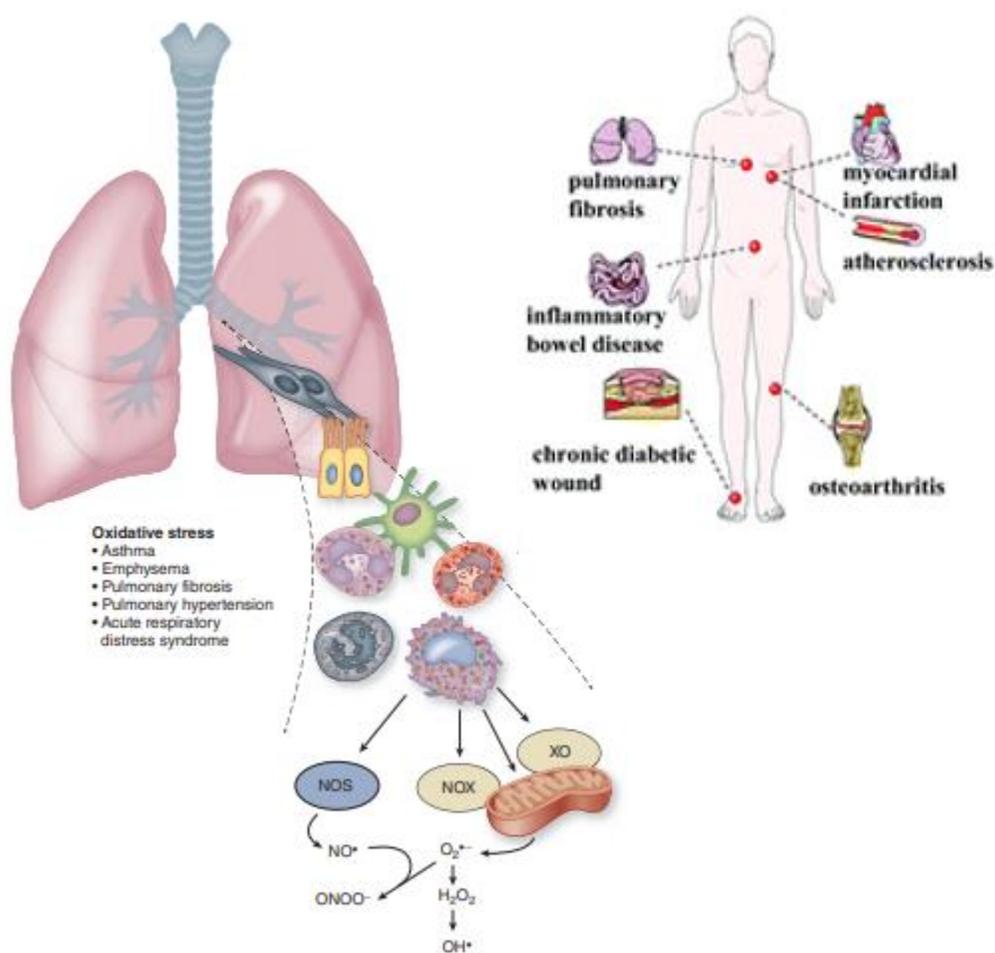
El equilibrio con los ROS y RNS, se mantiene debido a la producción regulada de antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión, superóxido dismutasa, catalasa o peroxidasa). Sin embargo, si se produce un incremento en la cantidad de oxidantes por encima de la capacidad de las células para eliminarlos (antioxidantes), se produce estrés oxidativo, provocando daño a los componentes celulares de manera indiscriminada, teniendo un papel primordial en el inicio, amplificación y persistencia de la inflamación en enfermedades pulmonares, como asma, enfisema, y fibrosis pulmonar (Figura 11). Así como en los procesos citotóxicos, genotóxicos y en la carcinogénesis (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014; Jovanović et al., 2010; Katerji et al., 2019; Ma et al., 2018; Martínez & Andriantsitohaina, 2009).

También, se ha determinado que en condiciones fisiopatológicas los RNS pueden provocar oxidación, nitrificación y peroxidación de proteínas, inactivación de enzimas, necrosis celular (Deshane & Thannickal, 2015), modificaciones postraduccionales de proteínas (Martínez & Andriantsitohaina, 2009), y disfunción mitocondrial (Czaja, 2017).

El estrés oxidativo producido por ROS y RNS, puede acelerarse en presencia de metales (Fe, Cu), xenobióticos, monooxigenasas, o por las defensas del sistema inmune en respuesta a microorganismos invasores (inflamación), induciendo la vía NF- κ B que regula la supervivencia celular y el efecto antiinflamatorio (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014; Ma et al., 2018).

Figura 11

Enfermedades pulmonares relacionadas con estrés oxidativo.



Nota. Tomado de Lung Immunology, (p. 347), por Dela Cruz & Kof. 2015. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Mecanismos Generadores de ROS y RNS

Los procesos mediante los cuales se producen las especies reactivas de oxígeno incluyen, las reacciones de transferencia de electrones en las mitocondrias y el retículo endoplasmático (RE), y la acción de enzimas metabólicas que catalizan reacciones de oxidación. Mientras que las especies reactivas de nitrógeno solo se pueden formar por medio de acción enzimática (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014).

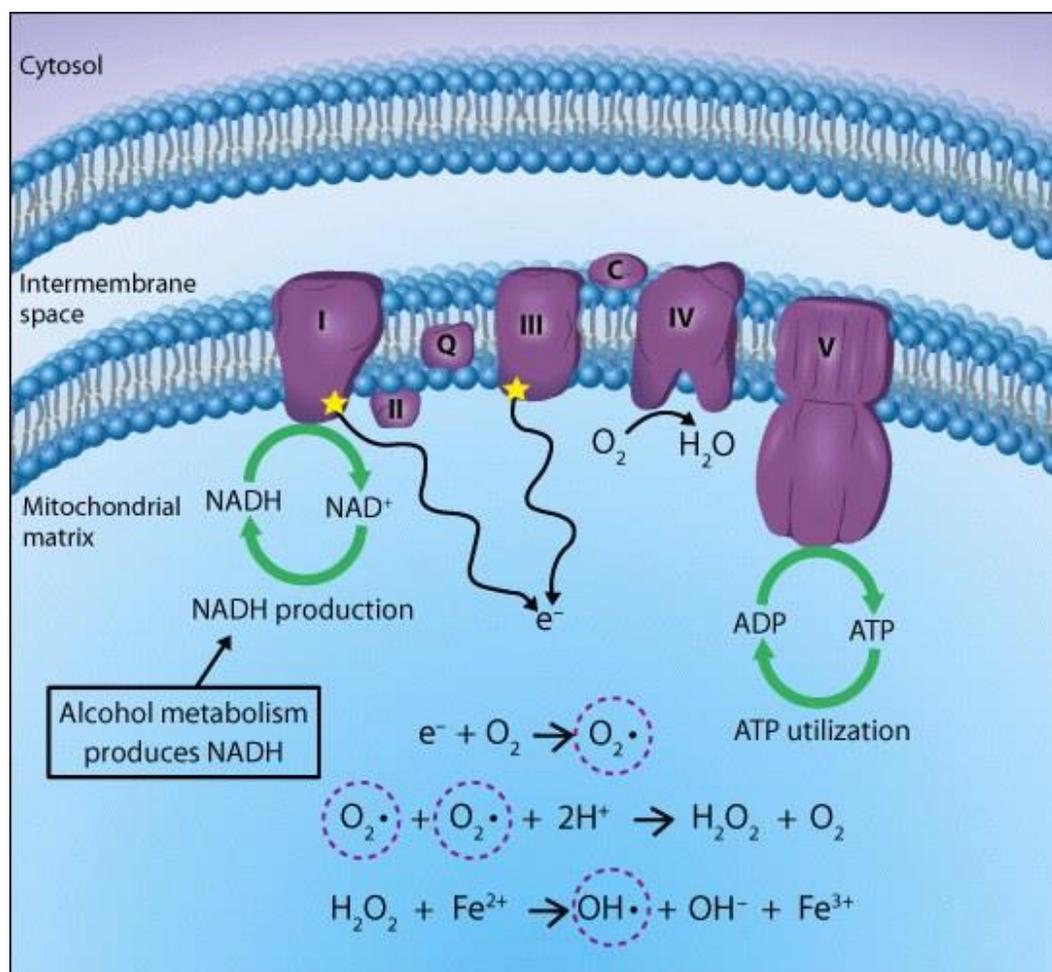
Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden generarse en las mitocondrias por la acción de varias oxidasas, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC), principalmente por la acción de los complejos enzimáticos I y III (Com. I, Com. III) (Figura 12). En condiciones fisiológicas normales el complejo I es la principal fuente de ROS mitocondriales en el cerebro, mientras que el complejo III contribuye con ROS principalmente al corazón y pulmones. Cuando se producen condiciones patológicas en el organismo, el complejo IV (Com. 4) se inhibe, y se libera el anión superóxido a partir del Com. 3 (Liu et al., 2002; L. Zhang et al., 2019; Zhao et al., 2019).

NADPH Oxidasas (NOX). Son las principales enzimas involucradas en la producción regulada de ROS, de las cuales existen siete isoformas: NOX1-5 y DUOX1-2, las cuales se expresan ampliamente en el pulmón (Tabla 4). La familia NOX2, es esencial para la destrucción de microorganismos en los fagocitos, al producir $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 . Mientras que DUOX1-2, son la fuente principal de H_2O_2 en las células epiteliales de las vías respiratorias. Además de su función catalítica, estas enzimas también cumplen un papel en la defensa del huésped, en la transducción de señales y en la síntesis de hormonas (Deshane & Thannickal, 2015; Sedeek et al., 2013).

Los ROS producidos mediante la catálisis con NOX, actúan en la señalización celular como segundos mensajeros, son mediadores de los efectos hormonales, regulan la expresión génica, el crecimiento de la célula, la apoptosis y la senescencia (Sedeek et al., 2013).

Figura 12

Generación de ROS ($O_2^{\bullet-}$ y OH^{\bullet}) mediante la Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial.



Nota. Tomado de Formation of Reactive Oxygen Species and Cellular Damage, por Duke University.

Tabla 4

Enzimas involucradas en la producción de ROS en el pulmón.

Enzima	Distribución en el Pulmón	Tipo de células pulmonares
DUOX1, DUOX2, NOX2, NOX4	Tráquea y vías superiores	Células epiteliales de las vías respiratorias
NOX1, NOX2, NOX4	Vasculatura pulmonar	Células endoteliales
NOX4	Vasculatura pulmonar	Células del músculo liso
DUOX1, DUOX2, NOX2, NOX4	Vías inferiores/alvéolos	Células epiteliales de las vías respiratorias
NOX3	Alvéolos	Células endoteliales
NOX4	Alvéolos	Miofibroblastos
NOX2, NOX4	Espacio alveolar/sangre	Monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos

Nota. Tomado de Redox Signaling and Oxidative Stress in Lung Diseases, (p.342), por Deshane & Thannickal. 2015. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Sintasas de Óxido Nítrico (NOS). Esta familia de enzimas cataliza la producción de óxido nítrico (NO[•]), encontrándose tres isoformas que se expresan en el pulmón: NOS1 o nNOS, que es la forma neural; NOS2 o iNOS, que es la forma inducible, se expresa principalmente en los macrófagos en condiciones proinflamatorias (Martínez & Andriantsitohaina, 2009).

Y NOS3 o eNOS, que es la forma endotelial y puede interactuar con las porinas de la membrana mitocondrial, modulando la producción de ROS en la mitocondria (Tabla 5) (Deshane & Thannickal, 2015; Förstermann & Sessa, 2012).

En ausencia del sustrato L-Arginina, los electrones se transfieren al O_2 , formando $O_2^{\cdot-}$, este fenómeno se llama desacoplamiento de NOS, lo que provoca una reducción en los niveles de NO^{\cdot} y un aumento de $O_2^{\cdot-}$, el primero es un compuesto cardioprotector, mientras que el segundo es una molécula toxica para la célula (L. Zhang et al., 2019).

Tabla 5

Enzimas involucradas en la producción de óxido nítrico (NO^{\cdot}) en el pulmón.

Enzima	Distribución en el Pulmón	Tipo de células pulmonares
NOS1 o nNOS (neural)	Tráquea, bronquios, vía respiratoria	Células epiteliales de las vías respiratorias, neutrófilos, neuronas
NOS2 o iNOS (inducible)	Vía respiratoria, alvéolos, espacio alveolar/sangre	Células del músculo liso y de las vías respiratorias, neumocitos tipo II, fibroblastos, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos
NOS3 o eNOS (endotelial)	Vía respiratoria, vasculatura pulmonar	Células epiteliales de las vías respiratorias, neumocitos tipo II, células del músculo liso, células endoteliales, macrófagos

Nota. Tomado de Redox Signaling and Oxidative Stress in Lung Diseases, (p.342), por Deshane & Thannickal. 2015. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Especies Reactivas De Oxígeno (ROS)

Los radicales libres y no radicales que conforman los ROS, se producen a partir del oxígeno molecular, mediante reacciones de reducción de un electrón ($1e^-$) (Collin, 2019). Los ROS se pueden producir por cuatro vías: (1) Generación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical altamente reactivo (Deshane & Thannickal, 2015); (2) Generación del radical hidroxilo ($\cdot OH$), el cual interacciona con todas las biomoléculas, siendo el radical más reactivo; (3) Generación del peróxido de hidrogeno (H_2O_2); y (4) Generación de radicales lipídicos (Tabla 6) (L. Zhang et al., 2019).

Tabla 6

Principales mecanismos para la producción de ROS.

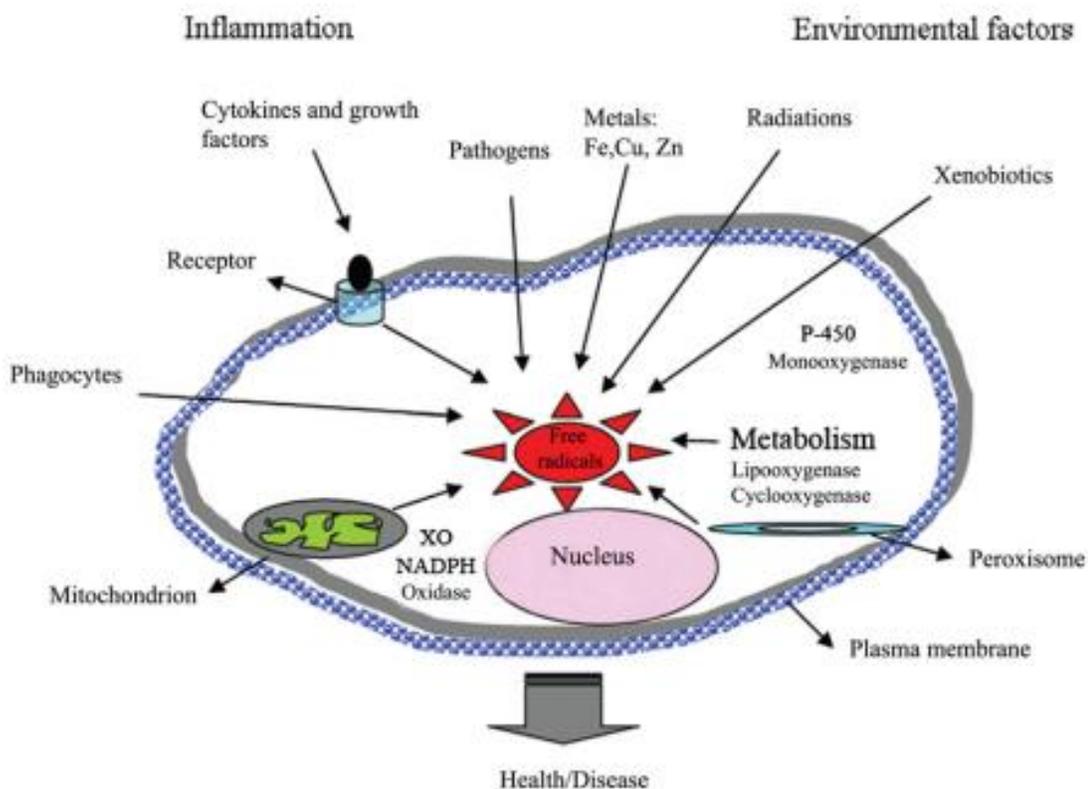
Especie Reactiva de Oxígeno	Formula	Reacción Química
Anión Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de Hidrogeno	H_2O_2	Hipoxantina + H_2O + $O_2 \rightleftharpoons$ Xantina + H_2O_2 Xantina + H_2O + $O_2 \rightleftharpoons$ Acido úrico + H_2O_2
Radical Hidroxilo	$\cdot OH$	$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + \cdot OH$
Radical Peroxilo	$ROO\cdot$	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$

Nota. Tomado de Redox Signaling and Oxidative Stress in Lung Diseases, (p.342), por Deshane & Thannickal, 2015, Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Estos radicales se producen de forma endógena en la célula, como un subproducto natural del metabolismo del oxígeno (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014; Pizzino et al., 2017). Sin embargo, también se pueden producir debido a la interacción con fuentes exógenas como, la luz ultravioleta, radiación ionizante (Katerji et al., 2019), o por la inhalación de toxinas ambientales (Figura 13) (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014).

Figura 13

Factores internos y externos que producen la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.



Nota. Tomado de Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases, (p. 326), por Afonso et al., 2007, Joint Bone Spine.

Metabolismo de Especies Reactivas de Oxígeno

Generación de $O_2^{\cdot-}$. Este radical, se forma por el acoplamiento del O_2 con un electrón (e^-) de la molécula donadora de electrones (NADH-Nicotinamida adenina dinucleótido reducido o NADPH-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido). Mediante la catálisis por oxidasas (NADPH oxidasas o Xantina oxidasas), se produce el acoplamiento del electrón con el O_2 , generando una molécula iónica cargada con un electrón desapareado, el anión superóxido (Figura 14) (Afonso et al., 2007; Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019).

El principal lugar donde se genera el $O_2^{\cdot-}$ es en las mitocondrias, ya que durante el transporte de electrones mitocondriales se produce una fuga de aproximadamente 1-3% de e^- hacia el oxígeno. Debido a su carga negativa, no puede atravesar la membrana de la mitocondria, liberándose en la matriz mitocondrial, en donde interacción con proteínas que contienen grupos hemo, produciendo la pérdida de su función proteica. Además de las reacciones producidas en la mitocondria, la actividad enzimática del retículo endoplasmático, también reduce el O_2 a $O_2^{\cdot-}$ y/o H_2O_2 . El anión superóxido también cataliza la producción del $\cdot OH$ y es el principal oxidante en la inflamación crónica de los pulmones (Deshane & Thannickal, 2015; Liu et al., 2002).

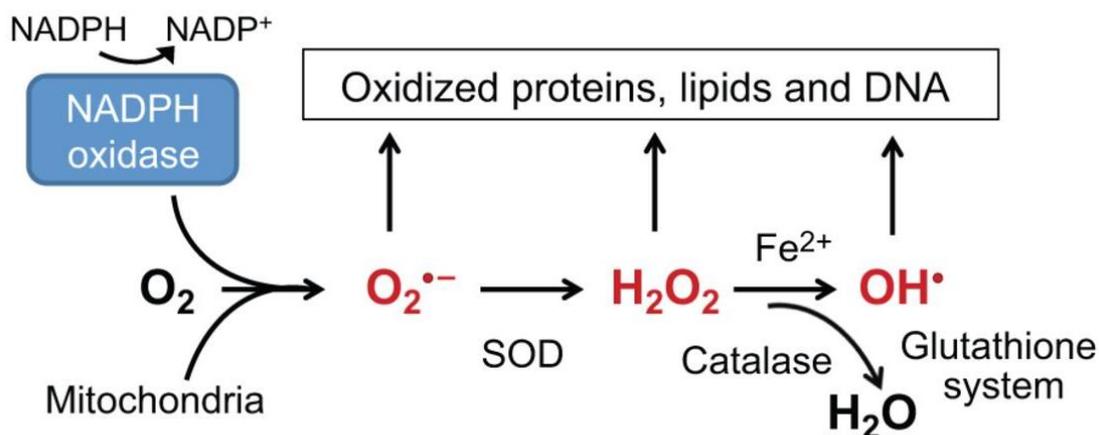
Generación de H_2O_2 . Este no radical se genera debido a la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ principalmente por acción enzimática del superóxido dismutasa (SOD) o por reacciones de dismutación espontaneas (Figura 14) (Bigarella et al., 2014; Deshane & Thannickal, 2015; Gough & Cotter, 2011; L. Zhang et al., 2019). El peróxido de hidrogeno está implicado en procesos de señalización intracelular, actuando como segundos mensajeros, e integrando señales ambientales y pasándolas a la cascada de transducción de señales (Bigarella et al., 2014).

Este no radical puede difundirse fácilmente por las membranas celulares (Bigarella et al., 2014), pudiendo usarse como indicador de la elaboración de superóxido mitocondrial (Liu et al., 2002).

Generación de $\cdot\text{OH}$. Este radical es producido principalmente a partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , mediante un ion metálico (cobre o hierro). La reacción consiste en la reducción del ion por $\text{O}_2^{\cdot-}$, y una posterior reacción del ion reducido con H_2O_2 , formando $\cdot\text{OH}$ (Figura 14) (L. Zhang et al., 2019). El radical hidroxilo también puede formarse a partir de reacciones catalizadas por enzimas mieloperoxidasas (MPO) o peroxidasas de eosinófilos (EPO), entre el ácido hipocloroso (HOCl) y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ en las células inflamatorias (Deshane & Thannickal, 2015).

Figura 14

Anión superóxido y sus derivados (H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$).

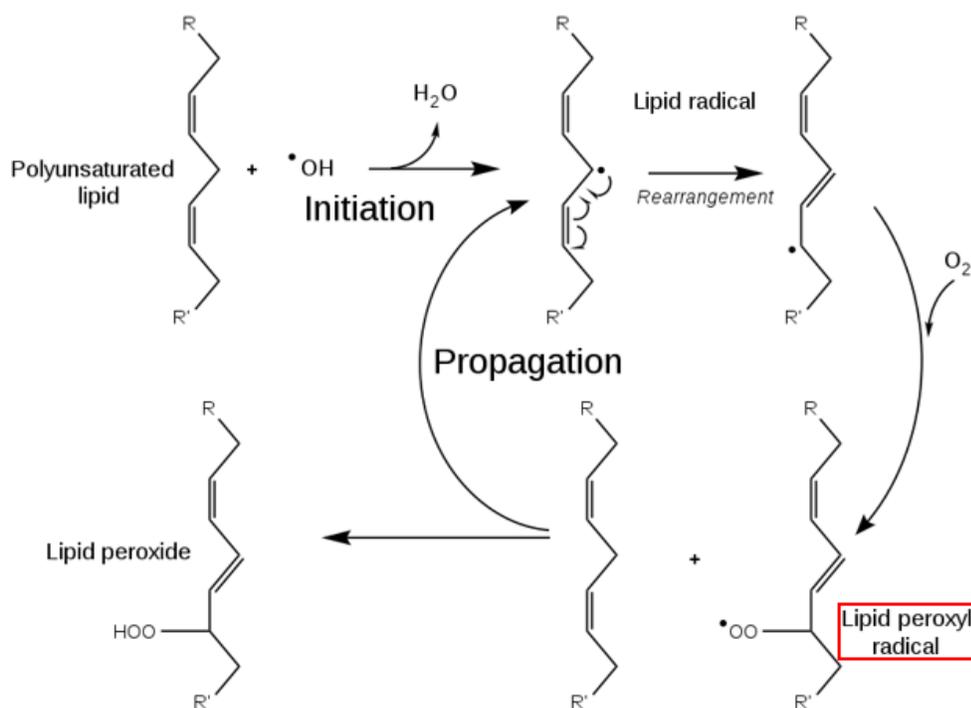


Nota. Tomado de Stem cells and the impact of ROS signaling, (p. 4207), por Bigarella et al., 2014, Development.

Generación Del Radical Peroxilo Lipídico (LOO[•]). Cuando un lípido entra en contacto con el [•]OH, forma un radical lipídico (L[•]), el cual reacciona inmediatamente con el O₂, formando el radical LOO[•], el cual puede sustraer H de los lípidos, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) y un radical L[•] (Figura 15) (L. Zhang et al., 2019), produciéndose una reacción en cadena que daña a los ácidos grasos. Finalmente, los hidroperóxidos se descomponen en aldehídos reactivos, como el malondialdehído, los cuales reaccionan con péptidos y ADN, produciendo efectos genotóxicos y citotóxicos (Céspedes & Castillo, 2008).

Figura 15

Reacción para la formación del radical peroxilo lipídico (LOO[•]).



Nota. Tomado de Antioxidant Properties of Rosemary and Its Potential Uses as Natural Antioxidant in Dairy Products—A Review, (p. 183), por Gad & Sayd, 2015, Food and Nutrition Sciences.

Especies Reactivas De Nitrógeno (RNS)

Los radicales libres y no radicales que conforman los RNS incluyen: (1) Óxido nítrico (NO^{\bullet}), el cual es un oxidante muy débil, que reacciona principalmente con radicales libres y metales; (2) Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}), radical moderadamente reactivo; (3) Peroxinitrito (ONOO^-), no radical elevadamente reactivo; (4) Ácido peroxinitroso (ONOOH); y (5) Nitritos (NO_2^-) (Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019).

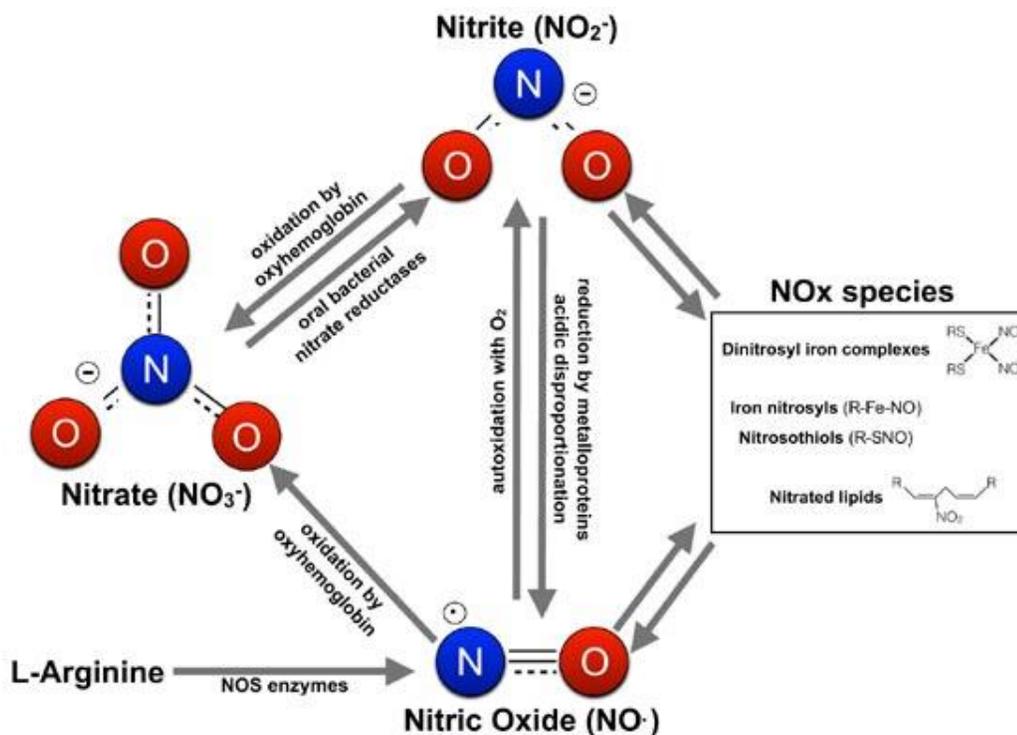
Metabolismo de Especies Reactivas De Nitrógeno

Generación del óxido nítrico (NO^{\bullet}). Este compuesto es producido de forma endógena a partir de la L- arginina (L-Arg) y oxígeno molecular, reacción catalizada por NOS (L. Zhang et al., 2019). Cerca del 40% de NO^{\bullet} altamente reactivo y difusible se ocupa en reacciones químicas, y al ser metabolizado genera las diversas especies reactivas de nitrógeno, ya que este compuesto prefiere reaccionar con otros radicales, así como con metales (Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019).

Tanto el nitrito (NO_2^-) como el nitrato (NO_3^-) son productos finales del metabolismo del NO^{\bullet} , estos compuestos se forman por la autooxidación del óxido nítrico con el oxígeno (Figura 16). Sin embargo el nitrato es relativamente inofensivo a menos que se reduzca a nitrito, mediante un proceso químico llamado reducción (Drew & Leeuwenburgh, 2002). Adicionalmente, cuando se produce una reacción de oxidación del nitrito, mediante peroxidasas, se forma el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}) (Deshane & Thannickal, 2015), el cual puede formar nitrosaminas, oxidar átomos de hierro y reducirse a óxido nítrico y amoníaco (Tharmalingam et al., 2017).

Figura 16

Reacciones de formación de nitrito y nitrato.



Nota. Tomado de The Medicinal Chemistry of Nitrite as a Source of Nitric Oxide Signaling, por Blood, 2017, Current Topics in Medicinal Chemistry.

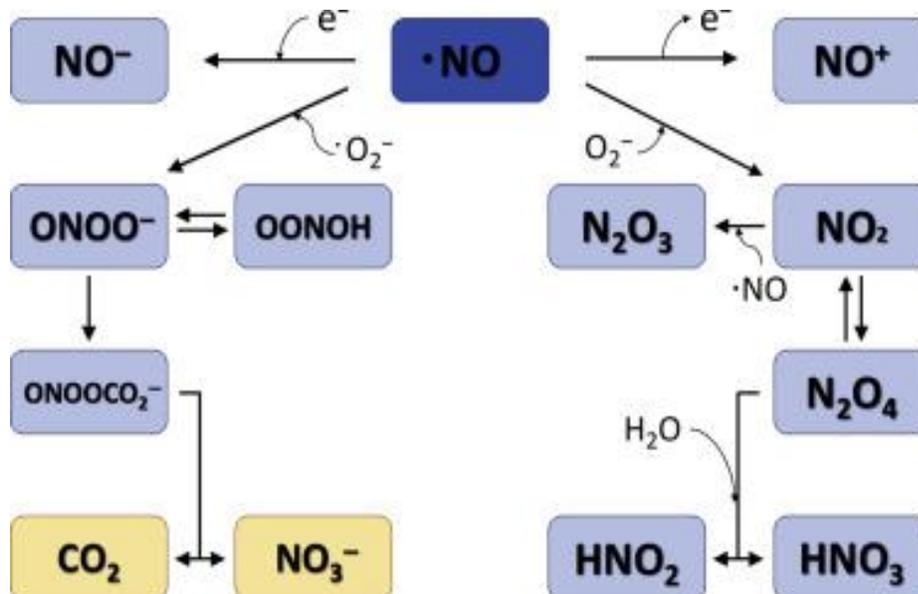
Generación del peroxinitrito (ONOO^-). Este radical se forma por reacción entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\text{NO}\cdot$, solo en condiciones patológicas, siendo el RNS más reactivo y dañino (Figura 17) (Czaja, 2017). Este radical puede reaccionar con dióxido de carbono (CO_2), formando el nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), del cual 2/3 se puede descomponer en CO_2 y nitrato (NO_3^-), y el 1/3 se descompone en trióxido de carbono ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y nitrito (NO_2^-), ambos compuestos tóxicos (L. Zhang et al., 2019).

El radical peroxinitrito puede dañar las membranas celulares, oxidar proteínas intracelulares, y escindir cadenas de ADN, principalmente de macrófagos, células epiteliales pulmonares y células epiteliales intestinales (Liaudet et al., 2001).

Generación de ácido peroxinitroso (ONOOH). Este compuesto se forma cuando el ONOO^- se encuentra en ambientes ácidos. Además, puede sufrir una fisión por homólisis generando nitritos NO_2^- y $\cdot\text{OH}$, principalmente al ingresar a una membrana lipídica (Figura 17). Puede causar un daño irreversible en el sistema respiratorio, ya que puede reaccionar con residuos de tiol formando S-nitrosotioles (SNO), importantes en la bioactividad del NO^\cdot en el sistema respiratorio, debido a la interacción con proteínas quinasas y factores de transcripción. (Deshane & Thannickal, 2015).

Figura 17

Reacciones químicas del óxido nítrico para formar peroxinitrito y ácido peroxinitroso.



Nota. Tomado de Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress, (p. 154), por Alhasawi, et al., 2019, Microbial Diversity in the Genomic Era.

Interacción Metabólica Entre Especies Reactivas De Oxígeno y Nitrógeno (ROS/RNS) Y Sistemas Antioxidantes

Las células poseen sistemas de defensa antioxidantes que sirven para contrarrestar los efectos nocivos provocados por los radicales libres, estas defensas pueden ser antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Katerji et al., 2019).

Los mecanismos no enzimáticos son la primera línea de defensa para la eliminación de ROS y RNS, estos pueden ser glutatión, β -caroteno, vitamina C y E, ácido úrico, taurina, tioles, lactoferrina y albúmina (Apak et al., 2016; Bigarella et al., 2014; Deshane & Thannickal, 2015; Martínez & Andriantsitohaina, 2009).

Mientras que los antioxidantes enzimáticos, también han sido reconocidos como sistemas potenciales para eliminar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, estos son (Martínez & Andriantsitohaina, 2009), superóxido dismutasas (SOD), catalasas, reductasas, peroxiredoxinas (PRDX), tioredoxinas (TRX), glutaredoxinas, hemo oxigenasas, y glutatión peroxidasa (Apak et al., 2016; Bigarella et al., 2014; Deshane & Thannickal, 2015).

Existen cinco vías principales por las cuales se produce la eliminación de ROS: (1) Dismutación del $O_2^{\cdot-}$ por la enzima SOD a H_2O_2 ; (2) Descomposición del H_2O_2 por la catalasa (CAT) a H_2O y O_2 ; (3) Ciclo Redox del Glutatión, que consiste en la descomposición del H_2O_2 y LOOH por el glutatión peroxidasa (GPX); (4) Ciclo Redox de Tiorredoxinas, en el que se produce la reducción del H_2O_2 en H_2O por la acción de la peroxiredoxina (PRDX); y (5) Desintoxicación Xenobiótica por la glutatión transferasa (GST) (L. Zhang et al., 2019).

Tanto los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos se expresan de manera diferencial en las todas las células pulmonares, como se puede observar en la tabla 7 (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015).

Tabla 7

Enzimas antioxidantes para eliminar ROS y RNS.

Enzima	Distribución celular	Expresión en células pulmonares
SOD1 (Cu/Zn)	Citosol, núcleo, lisosoma	Células epiteliales, células mesenquimales, fibroblastos, células endoteliales
SOD2 (Mn)	Mitocondria	Células epiteliales alveolares tipo II, macrófagos alveolares
SOD3 (SOD-EC)	Membrana plasmática	Células epiteliales bronquiales y alveolares, células endoteliales, macrófagos alveolares
CAT	Peroxisomas, mitocondrias	Células epiteliales, neumocitos tipo II, macrófagos alveolares
GPX	Citosol, mitocondria	Células epiteliales de las vías respiratorias, macrófagos alveolares
TRX	Citosol, mitocondrias	Células epiteliales bronquiales y alveolares, macrófagos
GST	Membrana plasmática, citosol, mitocondrias	Células bronquiales y alveolares tipo II, células epiteliales

PRDX	Citosol, mitocondrias, peroxisomas	Células bronquiales y alveolares, macrófagos
------	--	---

Nota. Tomado de Redox Signaling and Oxidative Stress in Lung Diseases, (p.345), por Deshane & Thannickal. 2015. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders.

Antioxidantes Enzimáticos

Superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima representa la defensa principal contra las especies reactivas producidas por los procesos fisiológicos normales o por los estados inflamatorios. Esta enzima ubicua cataliza la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$, regula la homeostasis celular normal, promueve la vasorreactividad y reduce la inflamación. En humanos, existen tres isoformas de SOD: SOD1 (Cu/Zn), SOD2 (Mn) y SOD3 (SOD-EC) (Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019).

SOD1. La SOD de cobre-zinc intracelular, es la principal isoforma para la eliminación del anión superóxido producido en el citoplasma, el núcleo y el espacio intermembrana de las mitocondrias de todos los tejidos y células (Afonso et al., 2007; L. Zhang et al., 2019). También, se ha sugerido que desempeña un papel fundamental en la reducción del estrés nitrosativo (Fransen et al., 2012). Esta enzima juega un papel importante en el crecimiento y supervivencia de la célula, ya que se ha encontrado que los niveles de la SOD1 aumentan en respuesta a diversas fuentes de estrés como: choques térmicos, metales pesados y estrés oxidativo (Afonso et al., 2007).

SOD2. La SOD de manganeso mitocondrial, se encuentra de forma ubicua en los seres humanos. Y es la principal isoforma para eliminar el $O_2^{\cdot-}$ en la matriz mitocondrial, produciendo una fuerte protección contra la apoptosis celular (L. Zhang et al., 2019).

SOD3. La SOD extracelular, se expresa principalmente en los vasos, pulmones y riñones (L. Zhang et al., 2019). Esta enzima protege a las células y a la matriz extracelular del $O_2^{\cdot -}$ generado por neutrófilos activados (Afonso et al., 2007). Además suele presentar altas concentraciones en el medio pulmonar, debido a la amplia red vascular de la vía respiratoria y por el constante contacto con partículas del exterior, las cuales provocan inflamación, siendo esta enzima esencial en la protección pulmonar (Deshane & Thannickal, 2015).

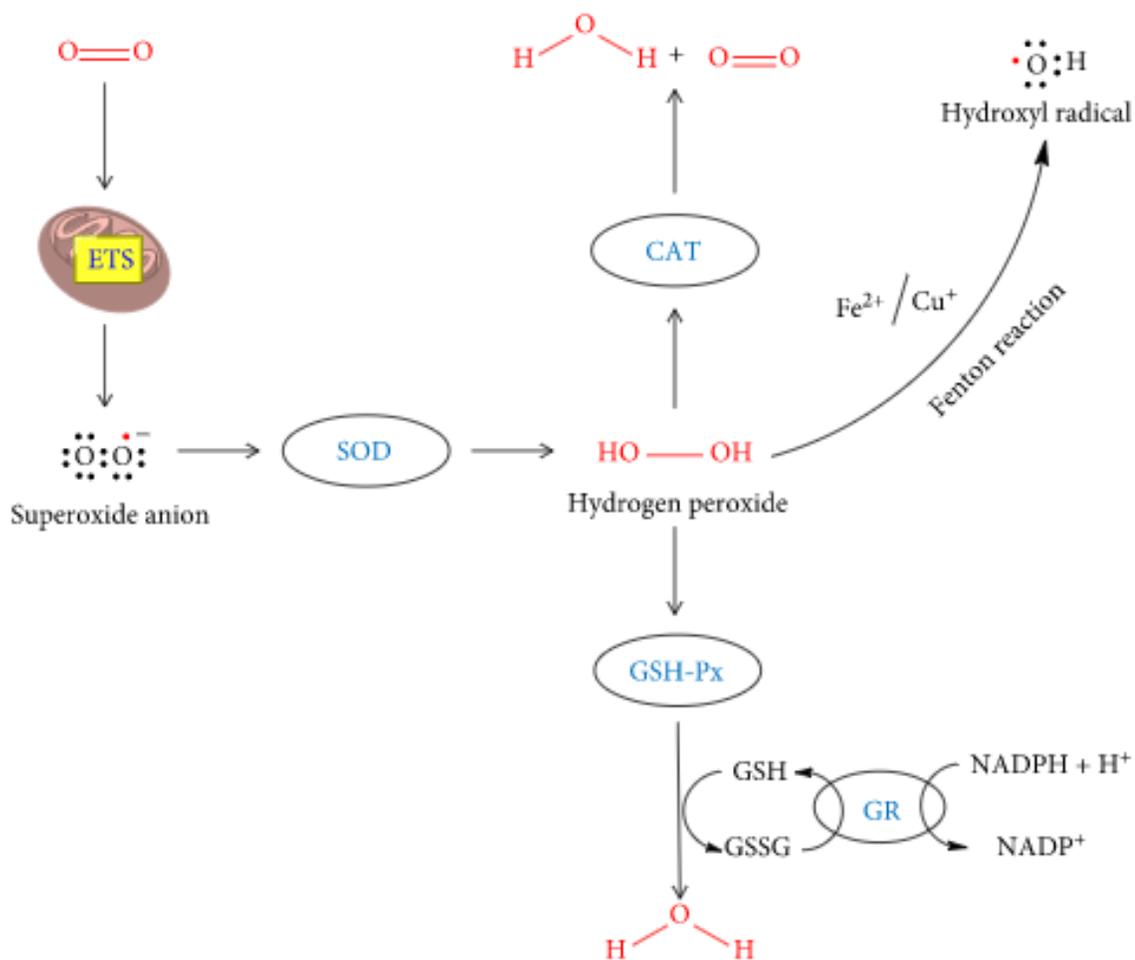
Catalasa (CAT). Esta enzima es una peroxidasa que reduce el H_2O_2 a O_2 y H_2O (Figura 18), expresándose ampliamente en las células pulmonares y localizándose principalmente en los peroxisomas. Sin embargo, CAT solo reduce el H_2O_2 , cuando la concentración de este último se encuentra muy por encima de los niveles fisiológicos normales (L. Zhang et al., 2019). CAT también puede descomponer sustratos como el metanol, formiato, hidroperóxidos y los peroxinitritos, así como oxidar el óxido nítrico a nitrito (Glorieux & Calderon, 2017). Sin embargo, es incapaz de metabolizar peróxidos moleculares grandes, como los peróxidos lipídicos (Deshane & Thannickal, 2015).

Glutación Peroxidasa (GPX). Cataliza la reacción de biotransformación de peróxidos orgánicos e inorgánicos, como el H_2O_2 y peróxidos lipídicos, en H_2O (Figura 18). En los seres humanos se han encontrado ocho isoformas de GPX (GPX1-GPX8), siendo las primeras cuatro, las que se expresan principalmente en el sistema respiratorio, las cuales son: (1) GPX1, esta enzima intracelular se encuentra principalmente en el citosol y en la matriz mitocondrial, y es la forma predominante que cataliza la eliminación de peróxidos; (2) GPX2, se encuentra principalmente en el espacio extracelular; (3) GPX3, esta enzima extracelular se expresa ampliamente en el riñón y en el pulmón, representando el 57% de las GPX en el líquido del revestimiento

del epitelio; y (4) GPX4, se expresa en el citosol, mitocondrias y en el núcleo, actuando en los hidroperóxidos de lípidos (Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019).

Figura 18

Reacciones enzimáticas antioxidantes mediadas por la catalasa y el glutatión peroxidasa.



Nota. ETS: Sistema de transporte de electrones. Tomado de Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases, (p. 2), por Nandi, et al., 2019, Oxidative Medicine and Cellular Longevity.

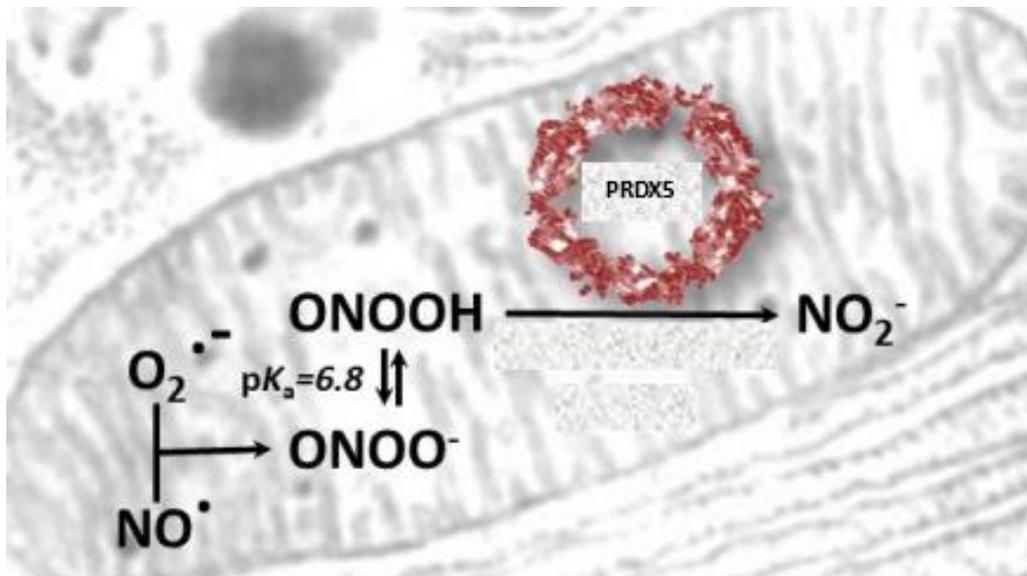
Peroxiredoxinas (PRDX). Las PRDX son peroxidasas que catalizan la reacción de reducción de los peroxinitritos y del H_2O_2 , protegiendo a los pulmones de las lesiones generadas por ROS (Deshane & Thannickal, 2015). En los mamíferos se han identificado seis isoformas (PRDX1-6), las cuales se describen a continuación: (1) PRDX1, se ubica en el citosol, y actúa en el control del ciclo celular; (2) PRDX2, se expresa principalmente en los eritrocitos, interviniendo en la regulación de los factores de crecimiento y señalización de $TNF-\alpha$; (3) PRDX3, se expresa en los ovarios principalmente, regulando la proliferación y diferenciación de las células; (4) PRDX4, existe principalmente en el espacio extracelular y protege a la célula del estrés oxidativo; (5) PRDX5, se expresa en las mitocondrias, citosol y núcleo celular, siendo el antioxidante más eficaz contra $ONOO^-$ (Figura 19); y (6) PRDX6, se localiza en la tiroides, riñón y la tráquea (Fransen et al., 2012; Ismail et al., 2019; L. Zhang et al., 2019).

Antioxidantes no Enzimáticos

Glutación (GSH). Actúa reduciendo a la enzima GPX, para que esta se active y pueda reaccionar con compuestos oxidantes. Se expresa de forma ubicua principalmente en el citosol, sin embargo, un pequeño porcentaje (10-15%) se ha encontrado en las mitocondrias (Armstrong et al., 2002). GSH actúa como reductor de la GPX y de antioxidantes oxidados. Esta enzima mantiene el estado redox de todo el cuerpo (L. Zhang et al., 2019), regula la transcripción de genes y modula los procesos apoptóticos celulares (Armstrong et al., 2002).

Figura 19

Reacción enzimática de la PRDX5 en RNS.



Nota. Tomado de Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: Implications for the fate of oxidants in mitochondria, (p. 3), por De Armas, et al., 2018, Free Radical Biology and Medicine.

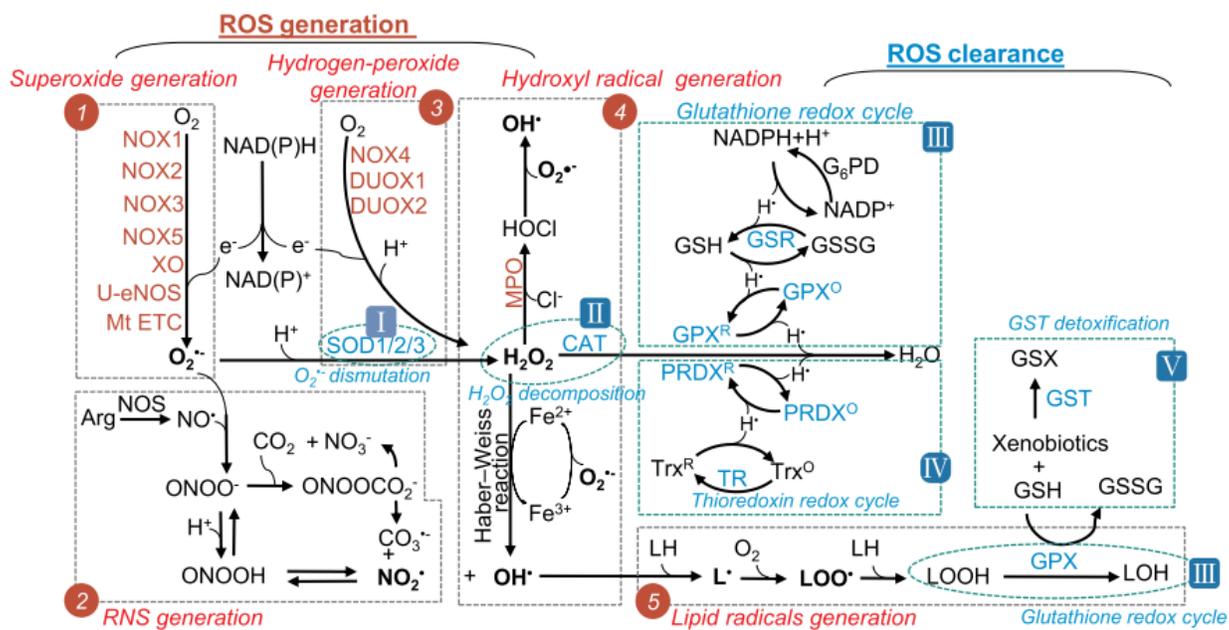
Tiorredoxinas (TRX). Actúan como sensores redox, reducen el H_2O_2 a H_2O , en cooperación con las peroxiredoxinas incrementan la expresión de antioxidantes, actúa en el plegamiento de proteínas oxidadas, protegen a las células del estrés oxidativo, activan factores de transcripción, y actúa en la proliferación y supervivencia celular (Deshane & Thannickal, 2015). Además esta enzima es la principal defensa contra el estrés nitrosativo, escinden y suprimen RNS, como el peroxinitrito (Czaja, 2017).

Glutación-S-transferasas (GST). Estas enzimas se expresan principalmente en las vías respiratorias, y tienen como funciones: inactivar metabolitos secundarios (aldehídos, epóxidos), regular el metabolismo del glutatión y proteger a las células contra especies oxidantes (Deshane & Thannickal, 2015).

En la figura 20, se puede observar tanto las vías por las cuales se producen las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como las vías de eliminación de ROS/RNS por la acción de especies antioxidantes (L. Zhang et al., 2019).

Figura 20

Vías metabólicas por las cuales se generan y se eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS).



Nota. Tomado de Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation, (p. 4), por L. Zhang et al., 2019, Redox Biology.

Modelos *in vitro*

La investigación de patologías pulmonares necesita modelos que permitan representar la fisiología del epitelio alveolar, pero la limitada disponibilidad de tejido, la reproducibilidad, la consistencia, la aprobación ética, los desafíos técnicos y el consentimiento del paciente representan una limitación para su estudio. Una solución a este problema ha sido el uso de células madre embrionarias humanas, células pluripotentes, células madre mesenquimales, células cancerígenas u otras líneas celulares inmortalizadas (Cooper et al., 2016).

Línea celular A549

La línea celular de carcinoma de pulmón A549 es uno de los modelos celulares más usados (Cooper et al., 2016) en investigación respiratoria (Cooper, 2012), fue aislada en 1973 a partir un adenocarcinoma pulmonar y caracterizada como células de tipo AT II (Cooper et al., 2016); su posterior cultivo evidencio una diferenciación celular ya que se observó una elevada cantidad de cuerpos multilamelares, característica de las células AT II. Esta línea celular se ha usado en estudios sobre el funcionamiento de las vías respiratorias, cáncer, enfermedades pulmonares y virología. Para investigar enfermedades pulmonares se recomienda cultivar las células por al menos 20 días, cambiando regularmente el medio de cultivo para tener un fenotipo AT II (Cooper, 2012).

Pruebas De Toxicidad

El nivel de viabilidad o la proliferación celular son indicadores del estado en que se encuentran las células, agentes fisicoquímicos pueden alterar dicho estado a través de mecanismos como destrucción de las membranas, inhibición de la síntesis proteica, unión irreversible a receptores, detención de la extensión de las cadenas de ADN o ARN o inhibición de reacción enzimáticas (Aslantürk, 2018).

Los ensayos de citotoxicidad son un indicador de vital importancia en los estudios *in vitro*, estos son económicos, rápidos, reproducibles y confiables (Aslantürk, 2018). Además, permiten estudiar el efecto de un determinado tratamiento en la proliferación celular y su efecto citotóxico (Genez et al., 2016).

Los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular se pueden clasificar en: (1) Ensayo de exclusión de colorantes, las células viables excluyen el colorante mientras que las células muertas no lo hacen, estos pueden ser: ensayo de azul tripán, eosina o eritrosina B; (2) Ensayos colorimétricos, consiste en medir un marcador bioquímico para evaluar el metabolismo celular, pueden ser: MTT, MTS, XTT, LDH, SRB o CVS; (3) Ensayos fluorométricos, son más sensibles que los ensayos colorimétricos pero necesitan un microscopio de fluorescencia, pueden ser: ensayo alamarBlue o CFDA-AM y (4) Ensayos luminométricos, consiste en la formación de una señal de tipo resplandor la cual se leerá en un lector luminométrico, estos pueden ser: ensayo de ATP o ensayo de viabilidad en tiempo real (Aslantürk, 2018).

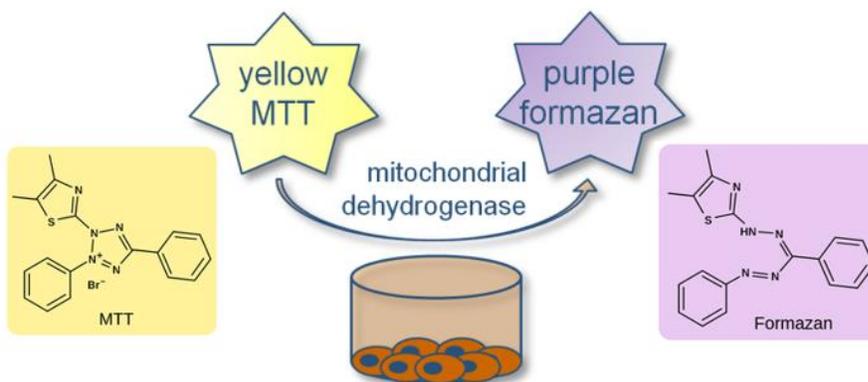
Ensayo MTT

El ensayo colorimétrico MTT, es una de las pruebas más utilizadas para evaluar la proliferación de las células y su citotoxicidad. Se basa en determinar la función mitocondrial, midiendo la actividad de enzimas mitocondriales compuestas por flavina, como la succinato deshidrogenasa. Por lo que este ensayo, depende de la respiración mitocondrial y sirve indirectamente para evaluar la capacidad energética celular (Aslantürk, 2018; Chacon et al., 1997; Jo et al., 2015).

En este ensayo se utiliza una sal de tetrazolio amarilla soluble en agua, conocida como bromuro de [3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual es reducido por deshidrogenasas mitocondriales de células viables con metabolismo activo, a cristales de formazán de color púrpura (Figura 21) (Jo et al., 2015; Patravale et al., 2012; Riss et al., 2004). El producto formado se analiza espectrofotométricamente, después de la disolución de los cristales de formazán con un disolvente orgánico (DMSO o SDS) (Patravale et al., 2012), la adición del disolvente se debe a que el formazán se acumula como un precipitado insoluble dentro de las células, depositándose en la superficie celular y en el medio de cultivo (Riss et al., 2004).

Figura 21

Ensayo MTT.



Nota. Tomado de In vitro Cytotoxicity Assay with MTT Dye, por Eurofins.

El ensayo MTT permite tener una detección cuantitativa y sensible de la proliferación de las células, ya que mide la tasa de crecimiento celular en función de la actividad celular y la absorbancia (Mahajan et al., 2012). Cuando las células mueren, pierden la capacidad de reducir el MTT a formazán, de manera que la formación del color sirve como un marcador solo para células viables (Riss et al., 2004).

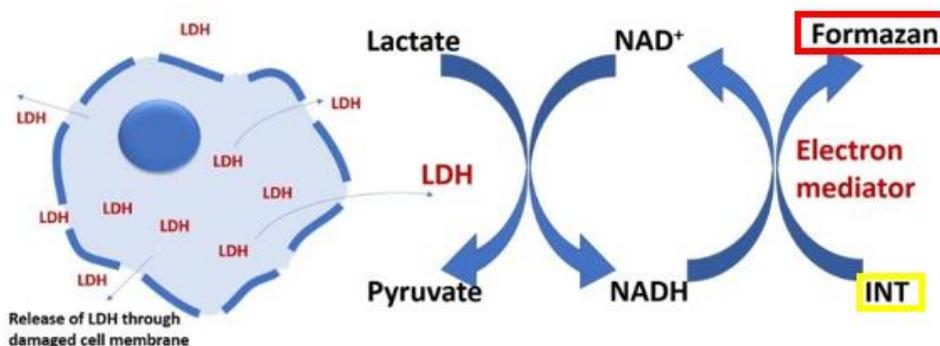
Ensayo LDH

El método colorimétrico LDH (lactato deshidrogenasa) permite analizar la citotoxicidad mediada por productos químicos tóxicos o compuestos de prueba, mediante la medición de la actividad de enzimas citoplasmáticas liberadas por células dañadas (Aslantürk, 2018; Kumar et al., 2018).

La enzima citosólica lactato deshidrogenasa se encuentra normalmente dentro del citoplasma celular, cuando la membrana plasmática está dañada la enzima se libera al medio de cultivo celular. La LDH liberada se mide con una reacción enzimática acoplada: (a) primero, la LDH cataliza la conversión de lactato en piruvato y el NAD es reducido a NADH/H⁺ y (b) segundo, el catalizador (diaforasa) transfiere el H/H⁺ del NADH/H⁺ a la sal de tetrazolio idonitrotetrazolio (INT), que se reduce a formazán rojo el cual se puede medir cuantitativamente a 490 nm (Figura 22). La actividad de la LDH se determina como oxidación del NADH o reducción del INT. Y la cantidad de formazán formado es directamente proporcional a la cantidad de LDH en el cultivo celular, lo que a su vez es directamente proporcional a la cantidad de células dañadas o muertas (Aslantürk, 2018; Kumar et al., 2018).

Figura 22

Ensayo LDH



Nota. Tomado de LDH Cytotoxicity Assay Kit, por AG Scientific.

Pruebas De Estrés Oxidativo

Dada la importancia de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la fisiología y fisiopatología del ser humano, se ha vuelto esencial desarrollar métodos que permitan cuantificar los niveles de estas moléculas tanto en células como en tejidos (S. Dikalov et al., 2007).

Los ensayos para conocer de forma directa los niveles de ROS son difíciles de realizar debido a la corta vida y la rápida reactividad de las especies reactivas de oxígeno. Por lo que, la medición indirecta de ROS mediante el análisis del daño oxidativo que producen los radicales en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, es un enfoque alternativo. Además, también se han desarrollado enfoques para medir la actividad o los niveles de los antioxidantes que contrarrestan los efectos nocivos que provocan las especies reactivas de oxígeno (Katerji et al., 2019).

Los métodos para determinar ROS pueden ser: (1) Espectroscópicos, como las trampas de espín; (2) Sondas quimioluminiscentes; (3) Sondas fluorescentes; (4) Espectrofotométricos, en los cuales se genera una reacción entre el ROS y sustancias redox (SOD, CAT o GSH); y (5) Electroquímicos (S. I. Dikalov & Harrison, 2014).

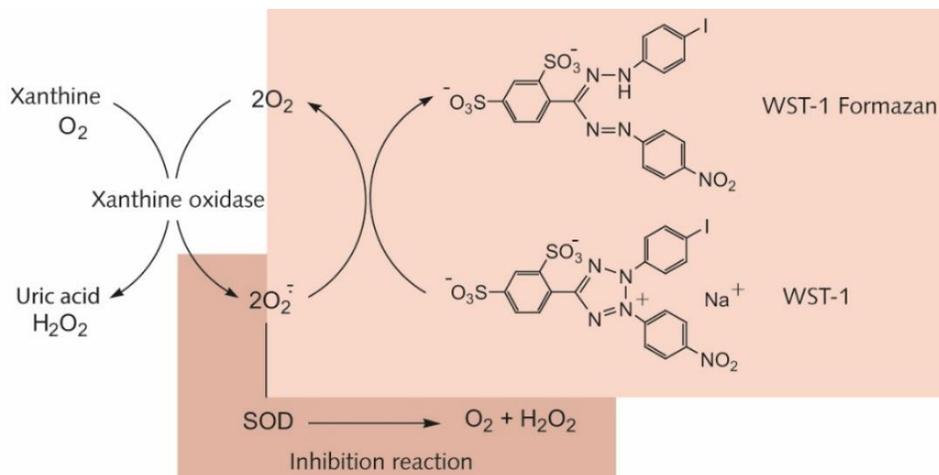
Los ensayos para determinar la presencia de óxido nítrico se pueden clasificar como métodos directos, en donde se mide el NO[•] en sí, y como métodos indirectos, en los cuales se mide la actividad enzimática de NOS, activación de dianas moleculares de NO[•] o productos derivados de las reacciones del óxido nítrico (nitritos y nitratos) (Csonka et al., 2015).

Los métodos para determinar RNS pueden ser: (1) Espectroscópicos, que incluyen los ensayos colorimétricos (Reacción de Griess), de fluorimetría, luminometría y espectroscopia de resonancia de espín electrónico (ESR); o (2) Electroquímicos, como amperometría y volumetría (Csonka et al., 2015).

Ensayo SOD

La actividad de la enzima superóxido dismutasa se puede medir al usar un método indirecto desarrollado por Nishikimi et al., (1972). El principio de este método consiste en que los radicales superóxidos, como el anión $O_2^{\cdot-}$, formado debido a la oxidación de la hipoxantina por la enzima xantina oxidasa, producen la reducción de sales de tetrazolio como la WST-1 [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium], en formazán cromogénico soluble en agua (Figura 23), el cual se puede medir espectrofotométricamente a 470-560 nm (Katerji et al., 2019; Peskin & Winterbourn, 2017).

La SOD producida en las muestras compiten por los radicales superóxidos, inhibiendo así la reacción de reducción del tetrazolio, y convirtiendo al anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. En este método la acción enzimática de la SOD, se define como la cantidad de enzima que causa inhibición de la reacción (reducción del tetrazolio) (Katerji et al., 2019).

Figura 23**Ensayo SOD**

Nota. Tomado de SOD Assay Kit, por PromoCell.

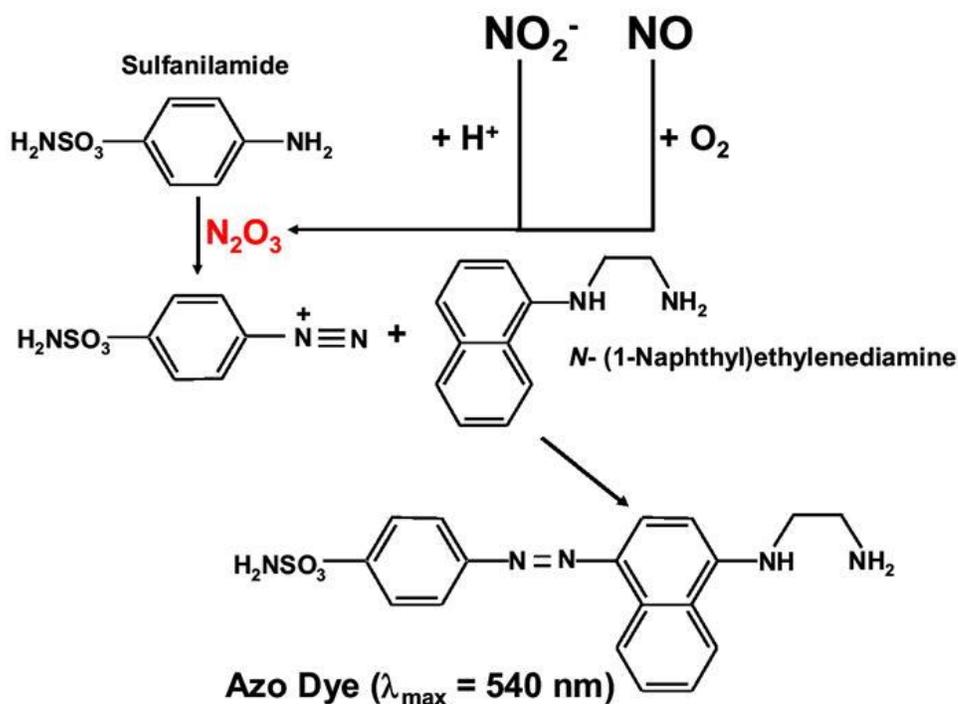
Ensayo de Griess

Es un método colorimétrico para determinar la presencia indirecta de NO^* mediante la medición espectrofotométrica de sus productos de descomposición, NO_3^- y NO_2^- . Este método se basa en que el NO_3^- debe ser reducido a NO_2^- , y este último se determina por el ensayo de Griess (Bryan & Grisham, 2007).

La prueba de Griess es una reacción de dos pasos, en donde el compuesto nitrosante derivado del NO^* , el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) generado a partir de nitrito acidificado (o por autooxidación del NO^*), reacciona con la sulfanilamida para producir ion diazonio que luego se acopla a N-(1-naftil) etilendiamina (NED) para formar un producto azo de color púrpura que se absorbe a 540 nm (Figura 24) (Bryan & Grisham, 2007; Csonka et al., 2015).

Figura 24

Ensayo de Griess



Nota. Tomado de *Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples*, (p. 19), por Bryan & Grisham, 2007, *Free Radical Biology and Medicine*.

Análisis Molecular

El análisis de la expresión génica se ha convertido en la base de la biología molecular moderna, de la regulación transcripcional y de la genética; una de las metodologías más usadas para determinar la expresión de los genes es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR con retrotranscripción (RT-PCR) y la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Dichas técnicas permiten detectar ARN mensajeros transcritos por genes específicos, siendo ampliamente utilizadas (Sandoval Pineda et al., 2017).

ARN

El ARN es una molécula monocatenaria (Hajjawi, 2015) de elevado peso molecular que actúa en la síntesis de proteínas, está compuesto por ribosas, fosfatos y cuatro bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y uracilo (Chatterjee & Wan, 2018). Cumple diversas funciones: transporta códigos genéticos (ARN mensajero – ARNm), actúa como una entidad estructural (ARN ribosómico – ARNr) o tiene un papel de reconocimiento (ARN de transferencia – ARNt) (Liljas et al., 2009).

Métodos De Extracción De ARN

El ARN es un ácido nucleico muy lábil tanto química como biológicamente, por lo que su obtención debe ser rápida con reactivos libres de RNasa para evitar su degradación. Las metodologías para aislar ARN comienzan con la lisis celular mediada por: (1) Tampones con agentes caotrópicos fuertes; o (2) Tampones de lisis hipotónicos no iónicos. Posteriormente los organelos y desechos celulares se eliminan por centrifugación o con la adición de solventes orgánicos (Farrell, 2017).

Extracción con tampones hipotónicos no iónicos. Solubilizan suavemente la membrana plasmática mientras mantienen la integridad nuclear y de otros orgánulos. La lisis inicial con tampón que contiene un detergente no iónico como NP-40 impide la mezcla de ARN nuclear y citoplasmático. Separándose los núcleos intactos, los orgánulos y los restos celulares por centrifugación diferencial. El sobrenadante resultante contendrá ARN citoplasmático y proteínas, las cuales se separan mediante extracciones con disolventes orgánicos como fenol y cloroformo. La ventaja de esta técnica es que se aísla ARN citoplasmático, para estudios de regulación génica (Farrell, 2017).

Extracción con tampones caotrópicos. Los tampones caotrópicos (biológicamente disruptivos) como sales de guanidinio, dodecil sulfato de sodio (SDS), urea, fenol o cloroformo; solubilizan la membrana plasmática y orgánulos, desnaturalizan y solubilizan las proteínas (Farrell, 2017) e inactivan las ribonucleasas endógenas (Chomczynski & Sacchi, 2006), obteniéndose una mezcla de ARN nuclear heterogéneo (hnRNA), ADN genómico del núcleo, ADN y ARN mitocondriales y ARN citoplasmático (Farrell, 2017).

La extracción de ARN con tiocianato de guanidinio o guanidinio-HCl es la técnica más utilizada para la purificación rápida de ARN ya que es uno de los desnaturalizantes de proteínas más efectivos. Sin embargo, se requiere un procedimiento posterior para separar el ARN, ADN y proteínas del lisado resultante, mediante uno de los tres enfoques básicos (Farrell, 2017):

Ultracentrifugación isopícnica. En esta técnica se usa un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) y la separación del ADN se produce por diferencia de densidades (Farrell, 2017).

Extracción con fenol ácido. Después de la lisis se utiliza una solución de fenol ácida, seguido de la adición de cloroformo para facilitar la división del material acuoso y orgánico. El ARN queda retenido en la fase acuosa, mientras que el ADN y proteínas se quedan en la fase orgánica inferior. El ARN se recupera por precipitación con isopropanol y se recoge por centrifugación (Farrell, 2017). Este método ha sido ocupado en tejidos de mamíferos, plantas y cultivos celulares (Ali et al., 2017).

Unión a filtros de fibra de vidrio (Tecnología de sílice). Se utiliza columnas de filtro de sílice, los filtros consisten en microfibras de vidrio que se colocan en el fondo de una pequeña columna de plástico. El ARN se une a la sílice en un entorno caotrópico con alto contenido de sal producido mediante la dilución de una muestra de ácido nucleico en tiocianato de guanidinio. Después de una serie de lavados, el material purificado se eluye de la matriz de sílice en condiciones de muy baja sal (Farrell, 2017).

También existen métodos de extracción en fase sólida, la cual se basa en fases estacionarias y líquidas que separan el compuesto objetivo en función de sus propiedades iónicas, hidrofóbicas o polares; como: matrices de sílice explicadas anteriormente, perlas de vidrio, perlas magnéticas, material de intercambio aniónico o matrices de celulosa. Estos métodos suelen presentar desventajas como: costos elevados, un solo uso, interferencia en la amplificación por PCR, presencia de altas concentraciones de sal, protocolos complejos y propensos a errores (Ali et al., 2017).

Reacción en cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN, partiendo de una sola molécula, basándose en la síntesis de nuevas hebras de ADN con base en una cadena molde. La síntesis de las nuevas cadenas se lleva a cabo al mezclar: el ADN que contiene los fragmentos a amplificar, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), los cebadores (fragmentos de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar), la polimerasa, desoxinucleótidos (dNTPs) y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis. Esta mezcla se somete a diferentes ciclos de PCR, repeticiones de ciclos a diferentes temperaturas, para la síntesis del fragmento necesario (Serrato et al., 2014).

Generalmente, la PCR inicia con la desnaturalización (separación de las dos hebras de ADN) mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 °C para romper los puentes de hidrógeno que unía las dos hebras. Ya separadas las cadenas de ADN, se alinean los cebadores al fragmento complementario de interés de las cadenas sencillas al bajar la temperatura entre 40 y 60 °C. Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' incrementándose la temperatura a 72 °C, ya que es la temperatura óptima en que la ADN polimerasa se une a los cebadores y comienza la síntesis. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, produciendo millones de copias del fragmento de interés (Serrato et al., 2014).

CAPÍTULO III: Materiales y Métodos

Localización Geográfica

El presente trabajo de investigación fue financiado por el proyecto “Evaluación de citotoxicidad previa exposición de cenizas volcánicas en Ecuador en modelos *in vitro* e *in vivo*”, de la convocatoria INÉDITA – Programa Nacional de Financiamiento para Investigación. La parte experimental se lo realizó en el Laboratorios de Inmunología y Virología de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en Sangolquí en el Sector Santa Clara, cantón Rumiñahui, provincia Pichincha – Ecuador.

Recolección De Ceniza Volcánica

La ceniza de los volcanes fue proporcionada por Theofilos Toulkeridis, Ph.D. docente investigador en la Facultad de Ciencias de la Tierra y Construcción de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y por el señor Vicente Nicanor Varela Guevara. La ceniza fue recolectada en los eventos eruptivos producidos por el volcán Cotopaxi el 23 de agosto de 2015, por el Pichincha el 05 de octubre de 1999 y por el Tungurahua el 16 de agosto de 2006; y almacenada a temperatura ambiente en frascos de plástico estériles.

Preparación De Ceniza Volcánica

Se preparó una concentración de ceniza de 40 mg/cm² de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua; de la cual se realizó diluciones sucesivas obteniéndose las siguientes concentraciones: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 mg/cm².

Todas las diluciones se sonicaron durante 60 minutos a 37°C en el baño ultrasónico (Branson Ultrasonics, 1510MTH), 1 hora antes del ensayo. Como controles positivos se utilizó óxido de silicio 0.1 mg/mL (SiO₂), cloruro de cobalto 400 µM (CoCl₂) y 5.27×10⁸ Unidades formadoras de colonia (UFC)/mL de la bacteria *Escherichia coli* (LPS); y como control negativo se usó células sin tratamiento de ceniza.

Cultivo *in vitro* De Líneas Celulares

El cultivo de las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano, A549 (ATCC® CCL-185™) se lo realizó en Medio Nutriente F-12K, suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (Thermo Fisher Scientific, 16000044). Ambas líneas celulares se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ (Panasonic).

Para realizar los ensayos se levantaron las células, se centrifugaron y se resuspendió el pellet celular en 2 mL de medio completo, se realizó una dilución 1:20 de la suspensión celular: azul de tripán al 0.4% (Gibco, 15250061) y se contó el número de células totales mediante cámara de Neubauer aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{N}^\circ. \text{ de células contadas} * 10000 * \text{Factor de dilución} * \text{Volumen de suspensión celular}}{\text{Número de cuadrantes contados}}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen final}}{\text{Volumen de células}}$$

Utilizándose 5×10³ células/pocillo para el ensayo de viabilidad celular y 3×10⁶ células/pocillo para el ensayo de extracción de ARN.

Ensayo De Viabilidad Celular

Para determinar la viabilidad de las células A549 al ser expuestas a ceniza volcánica, se realizó el ensayo colorimétrico MTT (bromuro de [3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Invitrogen, M6494).

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos con 100 μL de medio de cultivo completo, incubándose durante 24 h a 37°C con 5% de CO_2 . Pasado el tiempo de incubación se colocó 100 μL de las ocho diluciones de ceniza preparadas previamente y se añadió los controles positivos, CoCl_2 400 μM y SiO_2 0.1 mg/mL, y el control negativo fue células sin tratamiento de ceniza; como se observa en el diseño de placa en la figura 25. Se incubó la placa por 48 h y 96 h a 37°C con 5% de CO_2 , después de colocar los tratamientos. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua.

Figura 25

Diseño de placa para el ensayo MTT.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Tiempo	Células
A	Medio	Células	CoCl_2	SiO_2	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	48 h	A549
B	Medio	Células	CoCl_2	SiO_2	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0		
C	Medio	Células	CoCl_2	SiO_2	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	96 h	
D	Medio	Células	CoCl_2	SiO_2	0.3125	0.625	1.25	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0		

Nota. Las concentraciones de ceniza 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 están en mg/cm^2 .

A las 48 h y 96 h de incubación se retiró el medio de cultivo de los tratamientos y los controles y se realizó lavados con PBS 1X para eliminar residuos de ceniza. Posteriormente se colocó 100 μL de medio completo y se añadió 10 μL del reactivo MTT (5 mg/mL) a cada pocillo en ausencia de luz, incubándose durante 4 h a 37°C. Después de este tiempo se agregó 100 μL de SDS al 10% y se homogenizó para disolver el formazán producido después de la actividad metabólica celular.

Se cuantificó la cantidad de formazán por densidad óptica a 570 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific).

Análisis Molecular

Extracción De ARN

Para realizar la extracción de ARN, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos con 1000 μ L de medio de cultivo completo, incubándose durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación, las células se trataron durante 24 h y 72 h con las siguientes diluciones de ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, preparadas previamente: 40 mg/cm², 10 mg/cm² y 5 mg/cm². Se añadió los controles positivos, CoCl₂ 400 μ M y 100 UFC de *E. coli* por célula, y el control negativo fueron células sin tratamiento. Ambos ensayos se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

Después del tiempo de incubación se recolectó el sobrenadante de los pocillos con los diferentes tratamientos y se almacenó a -20°C, para realizar los ensayos de estrés oxidativo a nivel celular. Posteriormente las células se lavaron con PBS 1X, se añadió 500 μ L de Tri Reagent (Molecular Research Center, TR 118) para una densidad celular de 3x10⁶ células/pocillo y se recolectaron las células en un tubo de 1.5 mL.

Se utilizó un homogenizador de tejido (OMNI TH), el cual fue desinfectado entre tratamientos pasando la sonda 3 veces por agua destilada autoclavada, 1 vez por NaOH 0.4 M y 3 veces más por agua destilada.

Las células se trituraron dos veces por 30 segundos (5000 – 35000 rpm) e inmediatamente se añadió 100 μ L de cloroformo (libre de RNasa) por cada 500 μ L de Tri Reagent, se agitó con fuerza manualmente durante 15 segundos, se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase orgánica (fenol/cloroformo, color rosa, parte inferior), una interfase (parte intermedia, color blanco) y una fase acuosa (incolores, parte superior). La fase acuosa que contiene el ARN se recuperó en un tubo, al cual se añadió 250 μL de isopropanol (libre de RNasa) por cada 500 μL de Tri Reagent, se agitó, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, observándose la formación de un precipitado, que corresponde con el ARN.

Posteriormente se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500 μL de etanol al 75%, por cada 500 μL de Tri Reagent, se agitó los tubos y se centrifugó a 7500 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el sedimento y se resuspendió el pellet de ARN en 20 – 25 μL de agua DEPC.

Se midió la concentración de ARN (ng/ μL) y de los ratios 260/280, 260/230 con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000) y se consideró un ARN puro cuando la relación 260/280 es ~ 2.0 y la relación 260/230 está entre 2 – 2.2.

Para determinar la calidad de las muestras de ARN, estas fueron observadas en gel de agarosa al 1.5% en una cámara electroforética, colocando 500 – 1000 ng de ARN, 2 μL de agua DEPC (Thermo Fisher Scientific, R0601) y 2 μL de Buffer de carga en cada pocillo del gel. Se realizó una corrida electroforética durante 45 minutos a 100 V y 300 mA, y se observaron las bandas de ARN en el transiluminador (Chemidoc).

Las muestras de ARN extraídas se purificaron mediante tratamiento con el kit de DNasa I (Libre de RNasa) (Life Technologies, AM2222) siguiendo el protocolo de Life Technologies (2012). Primero se colocó en un tubo de 0.2 mL los componentes detallados en la tabla 8.

Tabla 8

Componentes por reacción para tratamiento con DNasa I.

Reactivos	Volumen (uL)
DNasa I Buffer 10x	0.5
DNasa I (Libre de RNasa) (2 U/ μ L)	0.5
ARN (500 – 1500 ng)	2 – 4
Agua DEPC	0.5 – 2.5
TOTAL	5.5

Se incubó la mezcla durante 20 minutos a 37°C en el termociclador ProFlex (Thermo Fisher Scientific, 4483636), se añadió 1 μ L de EDTA 5mM y se incubó durante 10 minutos a 75°C. Posteriormente se cuantificó la concentración de ARN (ng/ μ L) después del tratamiento con DNasa en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000).

Retrotranscripción del ARN

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit de reactivos de transcripción inversa M-MLV (Invitrogen, 28025-013), de acuerdo con las instrucciones del fabricante Invitrogen (2015). Se agregó los componentes detallados en la tabla 9 en un tubo de 0.2 mL.

Tabla 9

Componentes del Master Mix 1 para la retrotranscripción del ARN.

Reactivos	Volumen (uL)
Oligo (dT)12-18 (500 µg/mL)	1
ARNm tratado con DNasa (1 ng a 500 ng)	5.5
dNTP Mix 10 mM	1
H2O DEPC	4.5
TOTAL	12

Nota. La retrotranscripción se realiza para un volumen final de 20 µL.

Se incubo durante 10 minutos a 65°C y se dejó enfriar el tubo en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se agregó los componentes de la tabla 10 a la mezcla.

Tabla 10

Componentes del Master Mix 2 para la retrotranscripción del ARN

Reactivos	Volumen (uL)
Master Mix 1	12
5X First-Strand Buffer	4
0.1 M DTT	2
TOTAL	18

Se homogenizó el contenido del tubo, se incubó durante 2 minutos a 37°C y se agregó los componentes de la tabla 11.

Tabla 11

Componentes del Master Mix 3 para la retrotranscripción del ARN.

Reactivos	Volumen (uL)
Master Mix 2	18
M-MLV RT (200 unidades)	0.8
H ₂ O DEPC	1.2
TOTAL	20

Se realizó una centrifugación spin para precipitar el contenido, incubándose la mezcla durante 50 minutos a 37°C e inactivando la reacción a 70°C durante 15 minutos. Se midió la concentración de cDNA (ng/μL) y de los ratios 260/280, 260/230 con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000), y se consideró un ADN puro cuando la relación 260/280 es ~1.8 y la relación 260/230 esta entre 2 – 2.2. El cDNA se almaceno a -20°C.

Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)

Para la PCR punto final se utilizó la enzima DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, MAN0012704). En tubos de 0.2 mL se colocó los componentes detallados en la tabla 12, y se realizaron corridas por duplicado para cada muestra de cDNA. Finalmente se realizó un spin y se colocaron las muestras en el Termociclador Proflex (Thermo Fisher Scientific, 4483636).

Tabla 12

Componentes para una reacción de (1X) para PCR Punto Final.

Componentes	Volumen (µL)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12.5
Primer Forward 1X	2.0
Primer Reverse 1X	2.0
cDNA 100 ng/µL	2.0
H ₂ O DEPC	6.5
TOTAL	25.0 µL

Los primers IL-6, IL-8, IL-1 β , HPRT y GAPDH fueron tomados de Aguilera et al., (2018) (Tabla 13).

Tabla 13

Secuencias de Primers para PCR punto final.

GEN	SECUENCIA	TAMAÑO (pb)	Tm (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN
HPRT	FORWARD TGTAATGACCAGTCAACAGGGG	22	59.96	139
	REVERSE GCCTGACCAAGGAAAGCAAAG	21	60.00	
IL-8	FORWARD TGGACCACACTGCGCCAA	18	62.18	120
	REVERSE TCAGCCCTCTTCAAAACTTCTCC	24	60.99	
IL-6	FORWARD GCAATAACCACCCCTGACCC	20	60.68	134
	REVERSE CTCAGGCTGGACTGCAGGAA	20	61.83	

IL-1β	FORWARD	23	61.30	138
	TCAGCACCTCTCAAGCAGAAAAC			
	REVERSE	25	64.27	
	AGTCCACATTTCAGCACAGGACTCTC			
GAPDH	FORWARD	24	61.10	138
	CCATGACAACCTTTGGTATCGTGGA			
	REVERSE	21	60.48	
	GAGGCAGGGATGATGTTCTGG			

Las condiciones de la PCR punto final se detallan en la tabla 14.

Tabla 14

Programa de amplificación de la PCR punto final.

Ciclos	Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	3 min
	Desnaturalización	95	30 seg
35	Annealing	62	30 seg
	Extensión	72	30 seg
1	Extensión Final	72	7 min
	Enfriamiento	4	∞

Electroforesis En Gel De Agarosa

Después de realizar la PCR, los productos amplificados fueron observados en un gel de agarosa al 1.5% en una cámara electroforética. Se colocó 10 μ L de cada muestra en los pocillos del gel. Además, se colocó 2 μ L del marcador de peso molecular de ADN y 3 μ L del tampón de carga de gel BlueJuice 10X (Thermo Fisher Scientific, 10068013). Y se realizó la corrida electroforética durante 45 minutos a 100 V y 300 mA, observándose las bandas del producto de la PCR en el transiluminador (Chemidoc).

Posteriormente se analizaron las bandas del gel mediante análisis densitométrico, utilizando el software Image Lab (Bio-Rad), obteniéndose una cuantificación absoluta de las bandas de cada muestra.

Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad

Los sobrenadantes conservados a -20°C , se utilizaron en los ensayos de NO, SOD, y LDH.

Ensayo de Griess

El ensayo de Griess permite conocer el nivel de óxido nítrico (NO) en una placa de 96 pocillos se colocó 100 μ L del sobrenadante de cada muestra por duplicado, para los dos tiempos de tratamiento de 24 y 72 horas; siguiendo el diseño de placa de la figura 26.

También se realizó una curva estándar usando una solución de nitrito de sodio 100 μ M, de la cual se añadió 200 μ L en los pocillos G1 y H1. En los pocillos G2-H2 a G8-H8 se colocó 100 μ L de medio basal y se realizaron 6 diluciones seriadas al recoger 100 μ L del pocillo anterior y pasarlo al siguiente pocillo. Posteriormente se añadió 100 μ L de una solución 1:1 de 1-naftiletildiamina (NED):sulfanilamida en cada pocillo, se homogenizó y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro (Biorad) a una longitud de onda de 540 nm y los resultados de la curva estándar se graficaron en función de la absorbancia (A_{540}) vs concentración de nitritos [$\mu\text{g/mL}$].

La curva estándar obtenida es una ecuación lineal, con la siguiente formula:

$$A_{540} = a * [\text{Nitritos}] + b$$

Donde, a: pendiente; b: intersección con el eje y.

La concentración de nitritos de las muestras se obtuvo al reemplazar los valores de a, b y A_{540} ; en la ecuación lineal de la gama estándar.

Figura 26

Diseño de placa P96 para el ensayo NO.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Células		[5]	Pichincha	Células		[5]	Pichincha
B	CoCl ₂ 400 μM		[10]		CoCl ₂ 400 μM		[10]	
C	<i>E. coli</i>		[40]		<i>E. coli</i>		[40]	
D	[5]	Cotopaxi	[5]	Tungurahua	[5]	Cotopaxi	[5]	Tungurahua
E	[10]		[10]		[10]			
F	[40]		[40]		[40]			
G	100	50	25	12.50	6.25	3.125	1.563	0
H								
Tiempo	24 horas				72 horas			

Nota. Los valores [5], [10] y [40] son las concentraciones de ceniza en mg/cm^2 que se colocó en las células. Y los valores de las filas G y H es la concentración de nitrito de sodio en μM .

Ensayo De La Superóxido Dismutasa (SOD)

Para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el SOD Determination Kit (Sigma-Aldrich, 19160), siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma Aldrich, 2018). En una placa de 96 pocillos se colocó 20 μL del sobrenadante celular de las muestras de 40 mg/cm^2 de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, y todas las muestras del volcán Tungurahua (5, 10 y 40 mg/cm^2), para el tiempo de tratamiento de 24 horas; siguiendo el diseño de placa de la figura 27. En el Blanco 2 se añadió 20 μL del medio de cultivo y en el Blanco 1 y 3, se añadió 20 μL de H_2O ultrapura.

Figura 27

Diseño de placa P96 para el ensayo SOD.

	1	2
A	Blanco 1	[5] Tungurahua
		[10] Tungurahua
		[40] Tungurahua
B	Blanco 2	
C	Blanco 3	
D	H_2O	
E	[40] Cotopaxi	
F	[40] Pichincha	
Tiempo	24 horas	

Nota. Los valores [5], [10] y [40] son las concentraciones de ceniza en mg/cm^2 que se colocó en las células.

Posteriormente se añadió 200 μL de la solución de trabajo WST a cada pocillo, 20 μL del tampón de dilución a los pocillos del blanco 2 y 3 y 20 μL de la solución de trabajo enzimática a los pocillos del blanco 1. La placa se incubó durante 20 minutos a 37°C y se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro (Biorad) a una longitud de onda de 450 nm.

La actividad enzimática de la SOD se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD (\% de inhibición)} = \frac{[(A. \text{Blanco1} - A. \text{Blanco3}) - (A. \text{Muestra} - A. \text{Blanco2})]}{(A. \text{Blanco 1} - A. \text{Blanco 3})} \times 100\%$$

Graficándose los resultados en función del % de Actividad de la SOD vs las muestras.

Ensayo del lactato deshidrogenasa (LDH)

El daño celular se determinó mediante la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo celular, usando el kit *In Vitro* Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based (Sigma Aldrich, TOX7) siguiendo el protocolo del fabricante Sigma Aldrich (2020). Se preparó la mezcla del ensayo de lactato deshidrogenasa, colocando volúmenes iguales de la solución de sustrato, de la solución colorante y de la preparación del cofactor 1X del ensayo LDH. En una placa de 96 pocillos se colocó 20 μL del sobrenadante de cada muestra por duplicado, para los dos tiempos de tratamiento de 24 y 72 horas; siguiendo el diseño de placa de la figura 26.

Posteriormente se agregó 40 μL de la mezcla del ensayo LDH preparada previamente a cada pocillo, se incubó la placa durante 20-30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo la reacción añadiendo 4 μL de ácido clorhídrico 1 N (HCl). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro (Biorad) a una longitud de onda de 490 nm.

El porcentaje de LDH liberado se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% LDH = \frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Control}} \times 100\%$$

Graficándose los resultados en función del % de LDH vs las muestras.

Diseño Experimental y Análisis De Datos

En esta investigación se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado que permitió establecer como la variable independiente, tiempo de exposición de las células a diferentes concentraciones de ceniza de los tres volcanes; modificó a la variable dependiente, nivel de expresión de citocinas inflamatorias y daño celular (Figura 28) (Montgomery, 2013).

Para el análisis estadístico se realizó una estadística inferencial utilizando el software GraphPad PRISM (San Diego, CA) (Osterman et al., 2015). Todos los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Se realizó comparaciones múltiples de los datos obtenidos utilizando análisis de varianza (ANOVA) unidireccional y bidireccional, cuando correspondía. Y posteriormente se realizó la prueba post hoc de Dunnett y Tukey, para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo control (Montgomery, 2013). En todos los casos, las pruebas se consideraron significativas cuando $p \leq 0.05$ (Damby et al., 2016).

Figura 28

Diseño completamente aleatorizado.

Variable Tratamiento	Concentración de ceniza (mg/cm ²).	Tiempo (horas).
Tratamiento 1	5	24
Tratamiento 2		72
Tratamiento 3	10	24
Tratamiento 4		72
Tratamiento 5	40	24
Tratamiento 6		72
Tratamiento 7	Control positivo	24
Tratamiento 8		72
Tratamiento 9	Control negativo	24
Tratamiento 10		72

Nota. Este diseño se aplicará para cada volcán: Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua.

CAPÍTULO IV: Resultados

Ensayo De Viabilidad Celular

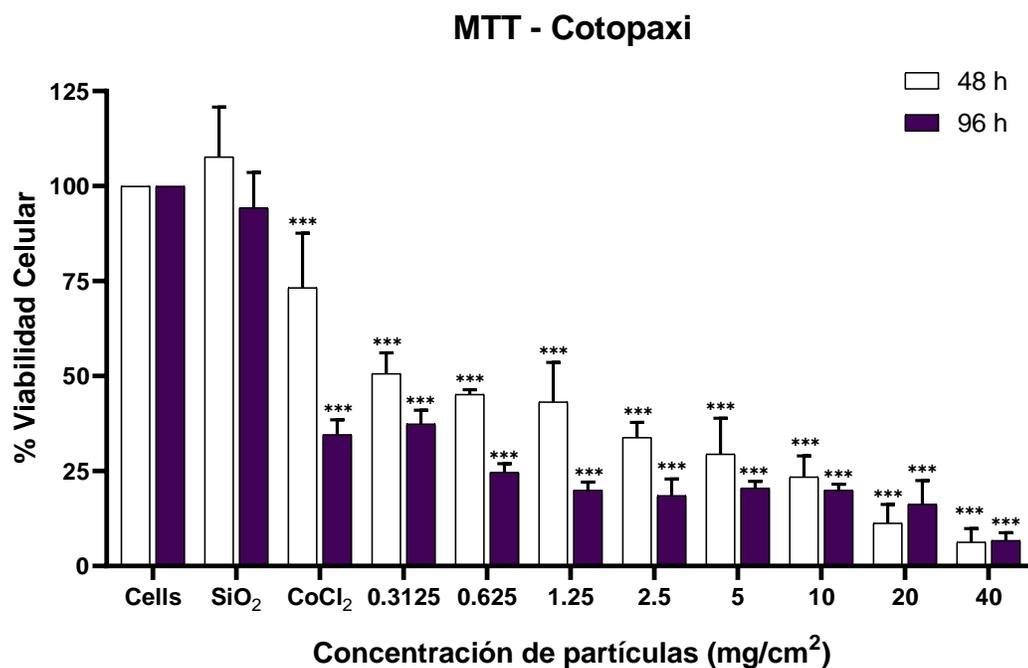
La determinación de la viabilidad celular se realizó usando el ensayo colorimétrico MTT [bromuro de [3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio] en células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549), a una concentración de aproximadamente 5×10^3 células, las cuales fueron tratadas con ocho concentraciones de ceniza: 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/cm², proveniente de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, en los tiempos, de 48 y 96 horas.

En el ensayo del volcán Cotopaxi la viabilidad de las células tratadas con el control positivo (0.1 mg/mL SiO₂), a las 48 y 96 h fue de, 100% y 94.27%, respectivamente. Mientras que las células tratadas con las ocho concentraciones de ceniza del volcán Cotopaxi (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/cm²), durante los dos tiempos de tratamiento, presentaron una disminución significativa en su viabilidad celular al compararla con el grupo control ($p < 0.001$).

Se observó que la viabilidad celular para la concentración menor de ceniza (0.3125 mg/cm²) fue de, 50.65% y 37.40%; para la concentración intermedia de ceniza (5 mg/cm²) se obtuvo valores de 29.46% y 20.50% y para la concentración mayor de ceniza volcánica (40 mg/cm²) la viabilidad de las células fue de 6.30% y 6.71%, respectivamente para los dos tiempos de tratamiento (Figura 29).

Figura 29

Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Cotopaxi.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=3 experimentos independientes.

***p<0.001 comparado con el control por ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Dunnett.

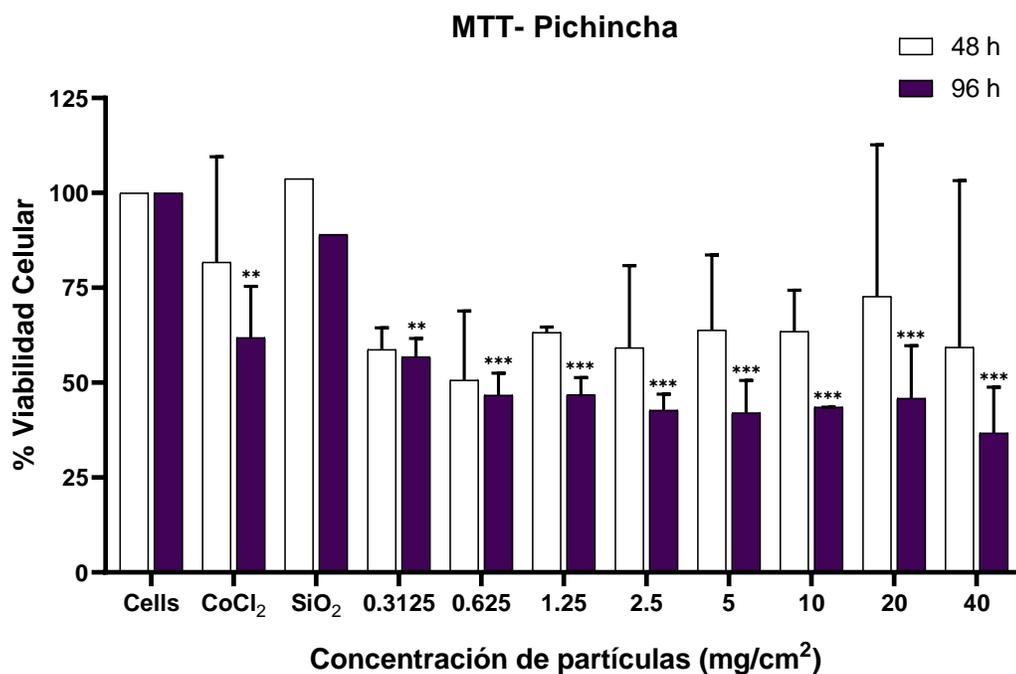
Por otro lado, las células tratadas con la ceniza del volcán Pichincha, también presentaron una disminución en su viabilidad, para los tratamientos de 48 y 96 h. Sin embargo, solo se observó diferencias significativas con el tratamiento de 96 h, para todas las concentraciones de ceniza volcánica, al compararlo con el grupo control (p<0.001).

Se obtuvo que a la concentración menor de ceniza (0.3125 mg/cm^2) la viabilidad de las células fue de, 58.73% y 56.79%; para la concentración intermedia de ceniza (5 mg/cm^2) se obtuvieron los valores de 63.8% y 42.01%; y para la concentración mayor de ceniza volcánica (40 mg/cm^2), la viabilidad celular fue de 59.30% y 36.69%, respectivamente para los tratamientos de 48 y 96 h (Figura 30).

También se determinó la viabilidad de las células tratadas con el control positivo (0.1 mg/mL SiO_2), a las 48 y 96 h, obteniéndose valores de, 100% y 89.06%.

Figura 30

Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Pichincha.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de $n=3$ experimentos independientes.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con el control por ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Dunnett.

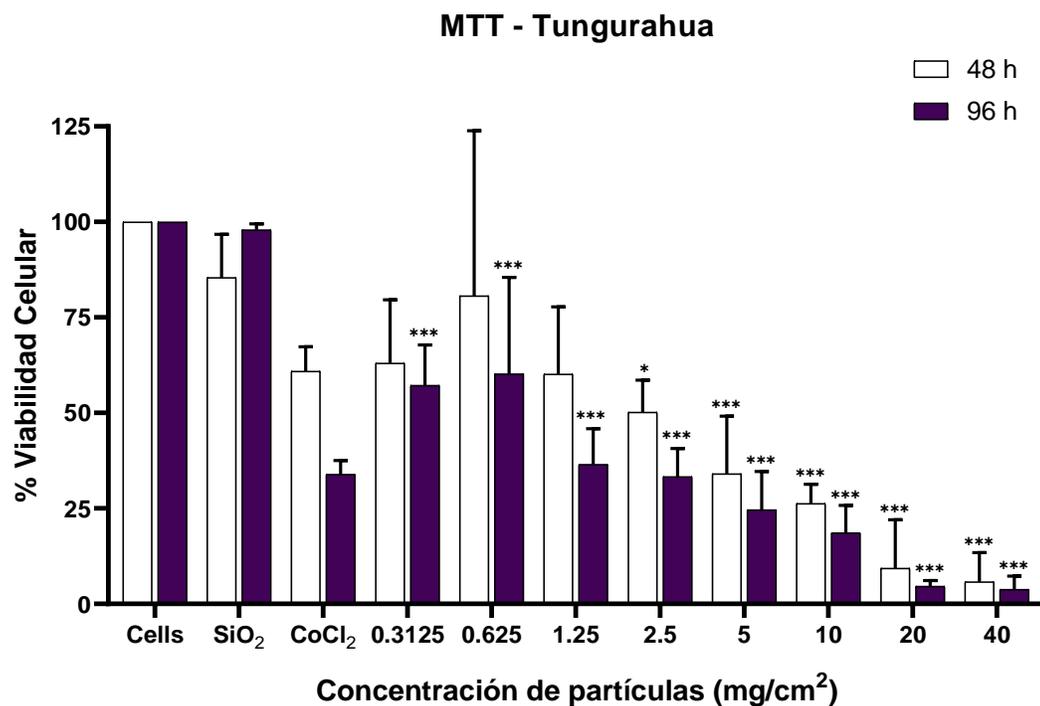
Las células tratadas con las ocho concentraciones de ceniza del volcán Tungurahua (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/cm²), durante 48 y 96 horas, también presentaron una disminución significativa en su viabilidad celular ($p < 0.05$ y $p < 0.001$), comparándolas con las células sin tratamiento.

A la concentración menor de ceniza (0.3125 mg/cm²), se obtuvo una viabilidad de 63.01% y 57.23%, para la concentración intermedia de ceniza (5 mg/cm²), se observaron valores de 34.04% y 24.63%, y para la concentración mayor de ceniza volcánica (40 mg/cm²), la viabilidad celular fue de 5.74% y 3.81%. Mientras que las células tratadas con el control positivo (0.1 mg/mL SiO₂), se observó una viabilidad de, 85.40% y 97.90% (Figura 31).

Por lo tanto, a mayor concentración de ceniza (40 mg/cm²) de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, la viabilidad celular disminuye respecto al grupo control, siendo estas variables dependientes una de la otra. Además, también se puede observar que las células tratadas durante 96 horas presentan una menor viabilidad que las células tratadas durante 48 horas. Por lo que, en el ensayo de viabilidad celular, la ceniza volcánica produce una respuesta dosis y tiempo dependientes.

Figura 31

Viabilidad celular de las células A549 después de la exposición a ceniza del volcán Tungurahua.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=3 experimentos independientes.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con el control por ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Dunnett.

Inflamación Celular

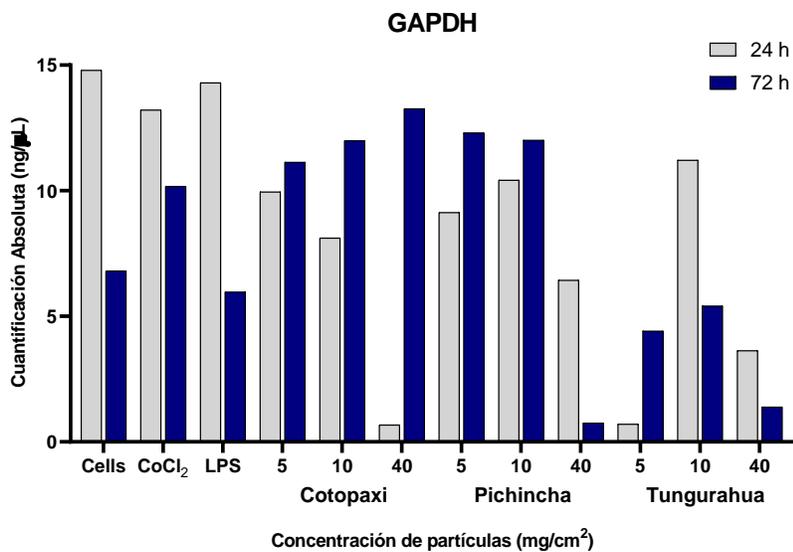
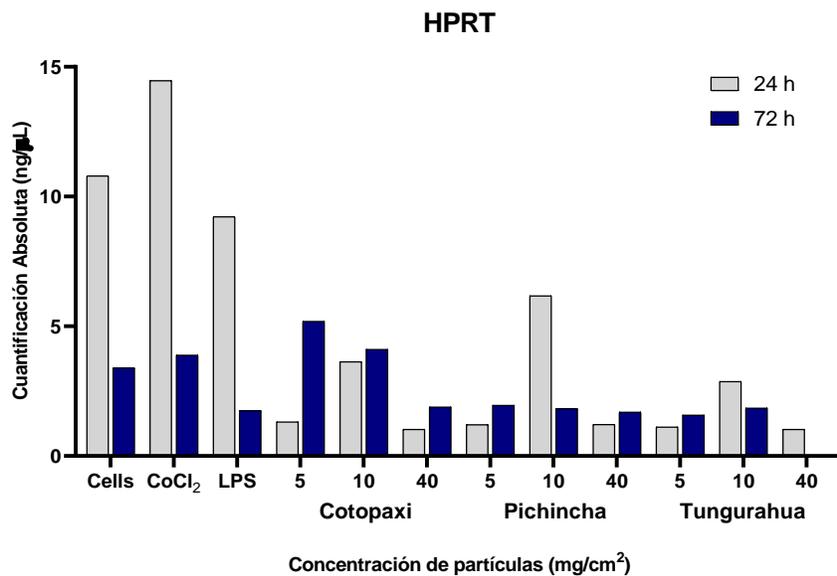
Las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549), fueron tratadas con tres concentraciones de ceniza de: 5, 10 y 40 mg/cm², proveniente de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, en los tiempos, de 24 y 72 horas.

Posteriormente se realizó la extracción y la retrotranscripción del ARN de las células A549 tratadas con la ceniza volcánica, y se analizó la expresión de las citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL-6, e IL-8, así como de los genes constitutivos HPRT y GAPDH, mediante PCR punto final. Los amplicones se observaron en un gel de agarosa al 1.5% y fueron analizados mediante densitometría.

En la figura 32, se puede observar la cuantificación absoluta correspondiente a los genes endógenos HPRT (Hipoxantina Fosforribosiltransferasa) y GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). Al ser estos genes constitutivos (Kozera & Rapacz, 2013), se expresaron en todas las células, tanto en el grupo control que son las células sin tratamiento, en los controles positivos, que fueron células tratadas con 400 μ M de CoCl₂ y 5.27 \times 10⁸ UFC/mL de *Escherichia coli* (LPS), así como en las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza (5, 10 y 40 mg/cm²), de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua.

Figura 32

Expresión de los genes constitutivos HPRT y GAPDH.



Al realizar el análisis de varianza bidireccional para los datos de expresión de las citocinas inflamatorias, con una significancia del 0.05, no se obtuvo diferencias significativas entre el grupo control (células sin tratamiento) y las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza (5, 10 y 40 mg/cm²) de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua. Sin embargo, a pesar de no ser estadísticamente diferentes si se observó una mayor expresión de las citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL-6 e IL-8, en las células tratadas con ceniza volcánica, que en las células sin tratamiento.

La expresión de IL-1 β en el grupo control, a las 24 y 72 horas, fue de, 1.877 y 3.082 ng/ μ L. Mientras que el control positivo (células tratadas con LPS), expresó 3.763 ng/ μ L y 4.331 ng/ μ L, respectivamente para las 24 y 72 h.

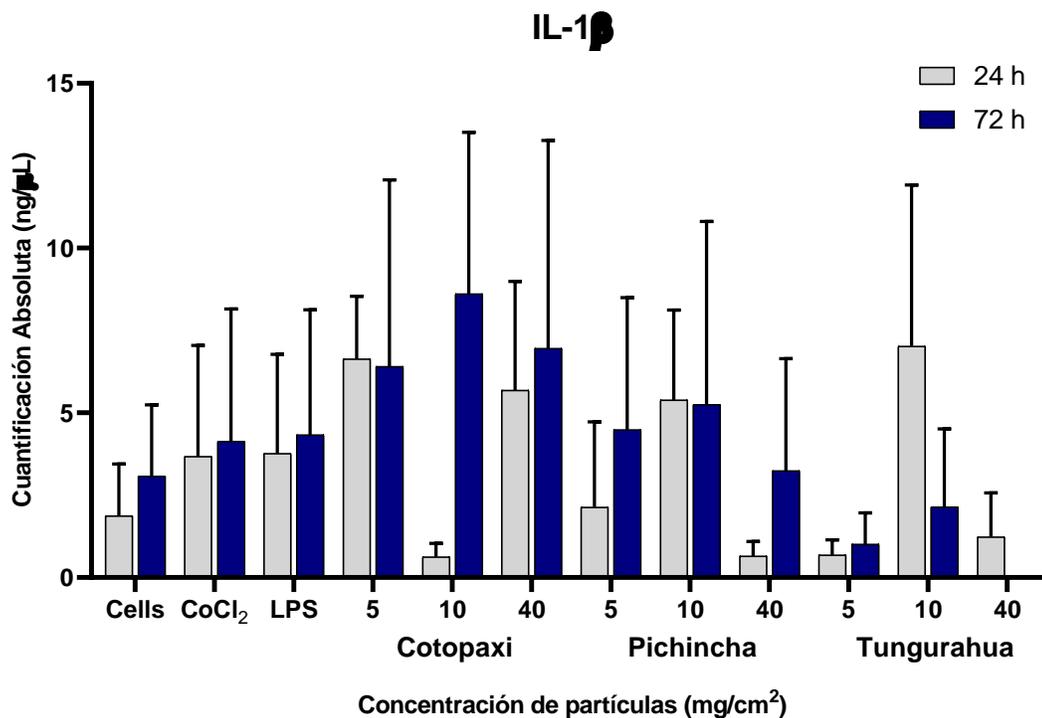
Se observó que las células tratadas con las concentraciones de 5 y 40 mg/cm² de ceniza del volcán Cotopaxi, durante 24 h, expresaron 6.633 y 5.681 ng/ μ L de IL-1 β , respectivamente. Y en el tratamiento de 72 h, se obtuvo una expresión de IL-1 β mayor a la del grupo control, para todas las concentraciones de ceniza, con valores de 6.402 ng/ μ L para la concentración de 5 mg/cm², de 8.611 ng/ μ L para la concentración de 10 mg/cm² y de 6.954 ng/ μ L para la concentración de 40 mg/cm².

Por otro lado, se obtuvo que las células tratadas con ceniza del volcán Pichincha durante 24 h, tuvieron una mayor expresión de IL-1 β que las del grupo control, a las concentraciones de 5 y 10 mg/cm², con valores de 2.132 y 5.387 ng/ μ L. Mientras que, en el ensayo de 72 h, se obtuvo que las tres concentraciones de ceniza volcánica indujeron una expresión de IL-1 β superior a la del grupo control, observándose valores de 4.485 ng/ μ L (5 mg/cm²), 5.251 ng/ μ L (10 mg/cm²) y 3.243 ng/ μ L (40 mg/cm²).

Y en el ensayo con cenizas del volcán Tungurahua se observó que las células tratadas con una concentración de 10 mg/cm² durante 24 h, expresaron 7.02 ng/μL de IL-1β, siendo este valor la mayor concentración de expresión de esta citocina, para este volcán. Ya que, para las concentraciones de 5 y 40 mg/cm² en el tratamiento de 24 h y para las tres concentraciones de ceniza en el tratamiento de 72 h, la expresión de IL-1β fue menor a la del grupo control (Figura 33).

Figura 33

Expresión de IL-1β por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.



Nota. Los resultados son las medias ± SD de n=2 experimentos independientes.

Al analizar la expresión de IL-6, se obtuvo que el grupo control expresó 0.138 y 0.156 ng/ μ L, a las 24 y 72 horas, respectivamente. Mientras que el control positivo, expresó 0.143 ng/ μ L y 0.291 ng/ μ L.

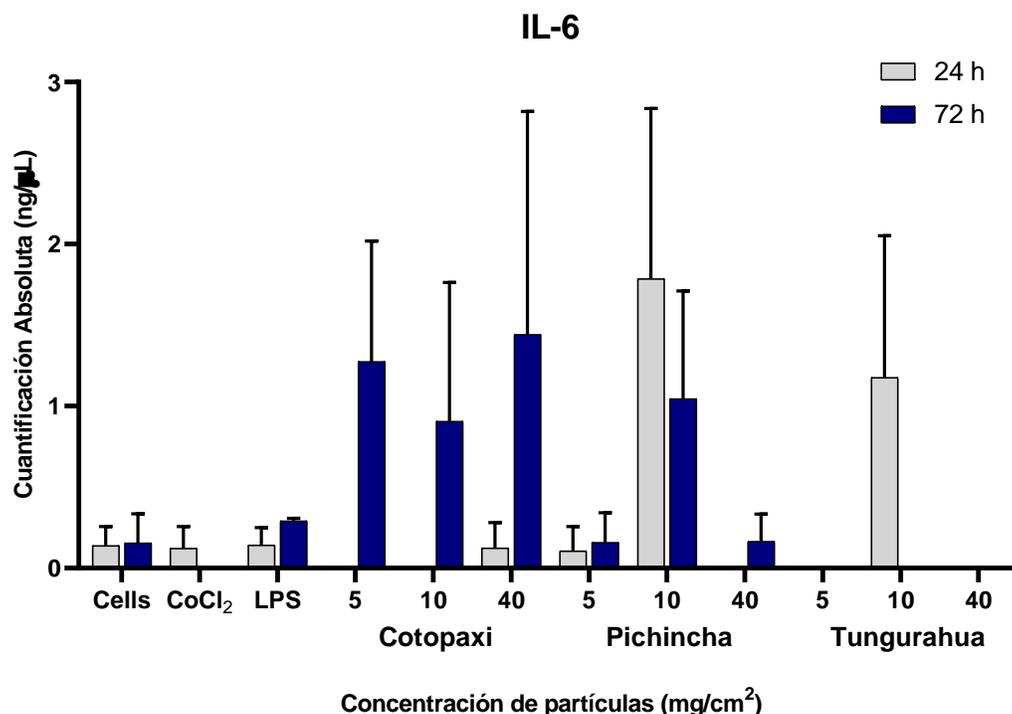
Las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza del volcán Cotopaxi, durante 72 h, presentaron valores de expresión más altos de la IL-6, que las células sin tratamiento (grupo control), los cuales fueron de, 1.275 ng/ μ L (5 mg/cm²), 0.905 ng/ μ L (10 mg/cm²) y 1.442 ng/ μ L (40 mg/cm²). Mientras que, para el tratamiento de 24 h, no se observó la expresión de IL-6 al compararla con el grupo control.

Por otro lado, las células tratadas con ceniza del volcán Pichincha, durante 24 h, expresaron la mayor cantidad de IL-6 a una concentración de 10 mg/cm², la cual fue de 1.786 ng/ μ L. Mientras que, en el ensayo de 72 h, se obtuvo que las tres concentraciones de ceniza volcánica indujeron una expresión de IL-6 superior a la del grupo control, observándose valores de 0.159 ng/ μ L (5 mg/cm²), 1.046 ng/ μ L (10 mg/cm²) y 0.164 ng/ μ L (40 mg/cm²).

Y en el ensayo con cenizas del volcán Tungurahua se observó que las células tratadas con una concentración de 10 mg/cm² durante 24 h, expresaron 1.176 ng/ μ L de IL-6, siendo este valor la mayor concentración de expresión de esta citocina, para este volcán. Ya que, para las concentraciones de 5 y 40 mg/cm² en el tratamiento de 24 h y para todas las concentraciones de ceniza en el tratamiento de 72 h, no se observó la expresión de IL-6 (Figura 34).

Figura 34

Expresión de IL-6 por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=2 experimentos independientes.

Al analizar la expresión de la IL-8, se obtuvo que el grupo control, a las 24 y 72 horas, expresó 5.901 y 0.593 ng/μL, respectivamente. Mientras que el control positivo, expresó 7.404 ng/μL y de 0.979 ng/μL de esta citocina.

Las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza del volcán Cotopaxi, durante 72 h, presentaron valores de expresión más altos de la IL-8, que las células sin tratamiento (grupo control), los cuales fueron de, 1.501 ng/μL (5 mg/cm²), 3.542 ng/μL (10 mg/cm²) y 5.136 ng/μL (40 mg/cm²). Mientras que, para el tratamiento de 24 h, no se observó la expresión de IL-8 al compararla con el grupo control.

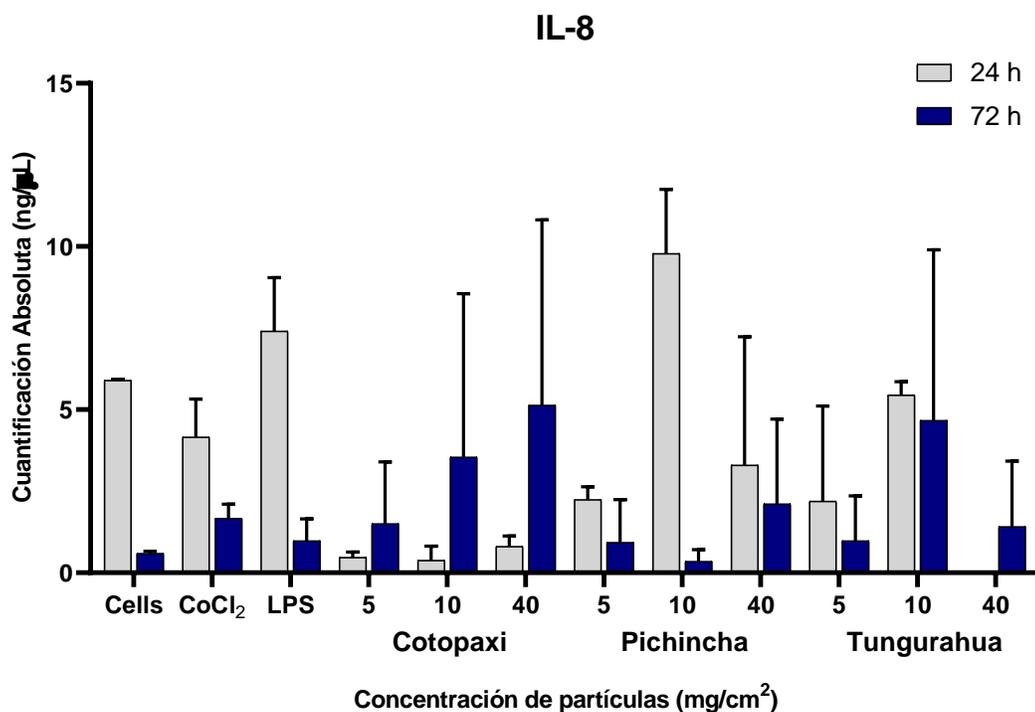
Por otro lado, las células tratadas con ceniza del volcán Pichincha, durante 24 h, expresaron la mayor cantidad de IL-8 a una concentración de 10 mg/cm², la cual fue de 9.782 ng/μL. Mientras que, en el ensayo de 72 h, se obtuvo que las tres concentraciones de ceniza volcánica indujeron una expresión de IL-8 superior a la del grupo control, observándose valores de 0.929 ng/μL (5 mg/cm²), 0.352 ng/μL (10 mg/cm²) y 2.113 ng/μL (40 mg/cm²).

Y en el ensayo con cenizas del volcán Tungurahua se observó que las células tratadas con una concentración de 10 mg/cm² durante 24 h, expresaron 5.447 ng/μL de IL-8, siendo este valor la mayor concentración de expresión de esta citocina, para este volcán. Mientras que, en el ensayo de 72 h, se obtuvo que las tres concentraciones de ceniza volcánica indujeron una expresión de IL-8 superior a la del grupo control, observándose valores de 0.976 ng/μL (5 mg/cm²), 4.666 ng/μL (10 mg/cm²) y 1.416 ng/μL (40 mg/cm²) (Figura 35).

Por lo tanto, la respuesta inflamatoria producida por las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549), a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, presento una respuesta dependiente de la composición de la ceniza volcánica y de las citoquinas (IL-1β, IL-6, e IL-8). Sin embargo, esta respuesta fue independiente de las concentraciones de ceniza (5, 10, y 40 mg/cm²) y de los tiempos de tratamiento (24 y 72 h).

Figura 35

Expresión de IL-8 por las células A549, expuestas a ceniza volcánica.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=2 experimentos independientes.

Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad

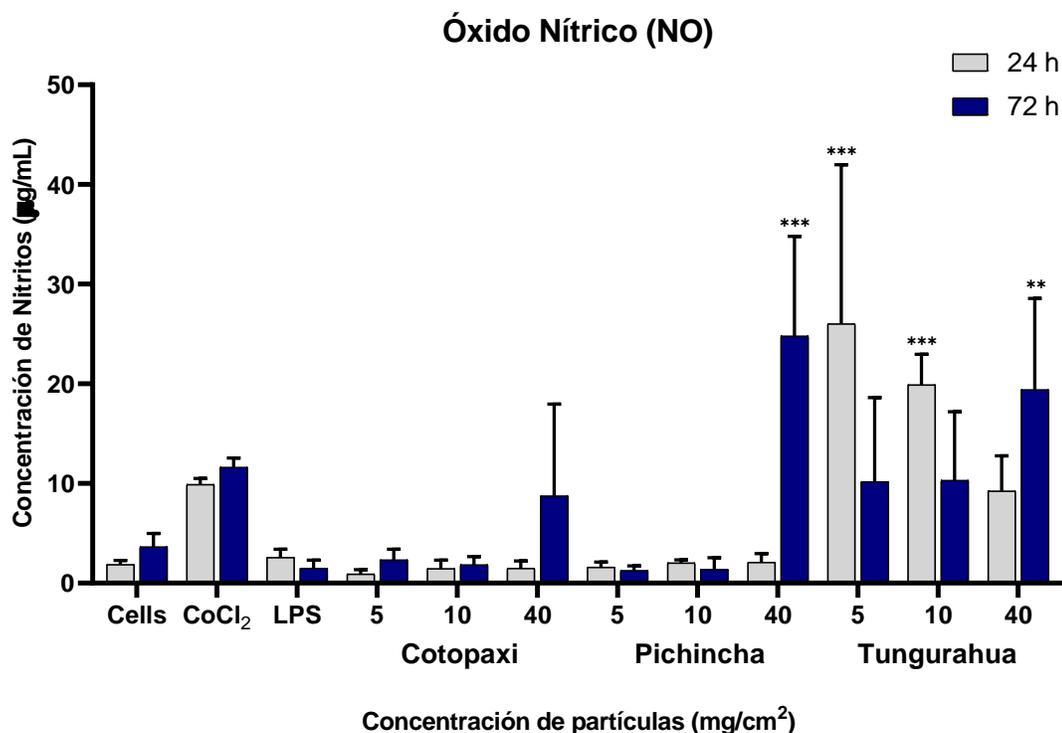
Después del tratamiento de las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549) con las tres concentraciones de ceniza de: 5, 10 y 40 mg/cm², proveniente de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, en los tiempos, de 24 y 72 horas. Se recogieron los sobrenadantes y se realizaron los siguientes ensayos.

Ensayo de Griess

Este método colorimétrico permitió determinar la presencia indirecta del óxido nítrico (NO[•]) en los sobrenadantes de las células tratadas con ceniza volcánica, mediante la medición de sus metabolitos finales, nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻). Este ensayo nos ayudó a definir si se produjo en las células un estrés nitrosativo debido a los tratamientos de ceniza (Figura 36).

Figura 36

Concentración de nitritos generados por las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=4 experimentos independientes.

p<0.01, *p<0.001, comparado con el control por ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Tukey.

La concentración de nitritos en las células sin tratamiento a las 24 horas fue de 1.86 $\mu\text{g/mL}$ y para las 72 h fue de 3.64 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para el control positivo (CoCl_2), se obtuvieron concentraciones de 9.91 y 11.62 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para los dos tiempos.

Las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza del volcán Cotopaxi, durante 24 h, no presentaron niveles de nitritos superiores al grupo control ($p>0.05$), observándose los mismos resultados en el tratamiento de 72 h, para las concentraciones de ceniza de 5 y 10 mg/cm^2 . Solo el tratamiento de 40 mg/cm^2 , a las 72 h, produjo el mayor nivel de nitritos (8.75 $\mu\text{g/mL}$) al compararlo con el grupo control (3.64 $\mu\text{g/mL}$).

Los tratamientos de 10 y 40 mg/cm^2 , a las 24 h, con la ceniza del volcán Pichincha, presentaron niveles de nitrito ligeramente superiores y casi equivalentes al grupo control (1.86 $\mu\text{g/mL}$), siendo estos de 2.05 y 2.08 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente para las dos concentraciones. Mientras que la concentración de 5 mg/cm^2 a las 24 h, y las concentraciones de 5 y 10 mg/cm^2 a las 72 h, no presentaron niveles de nitritos superiores a las células sin tratamiento ($p>0.05$). Solo el tratamiento de 40 mg/cm^2 (72 horas), produjo un aumento significativo en la concentración de nitritos, el cual fue de 24.79 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$).

Y en el ensayo con cenizas del volcán Tungurahua, se observó que las células tratadas con las concentraciones de 5, 10 y 40 mg/cm^2 , indujeron un aumento significativo en los niveles de nitritos al compararlo con las células sin tratamiento (grupo control). A las 24 h, se obtuvo las siguientes cantidades de nitritos, 26.03, 19.89 y 9.26 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.001$) y a las 72 h, se obtuvo niveles de 10.18, 10.32 y 19.42 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0.01$), respectivamente para cada concentración de ceniza volcánica.

Por lo tanto, la cantidad de nitritos producidos por las células A549 tratadas, durante 24 y 72 h, con las cenizas de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, no presentaron una respuesta dependiente de la dosis, ni del tiempo.

Ensayo De La Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

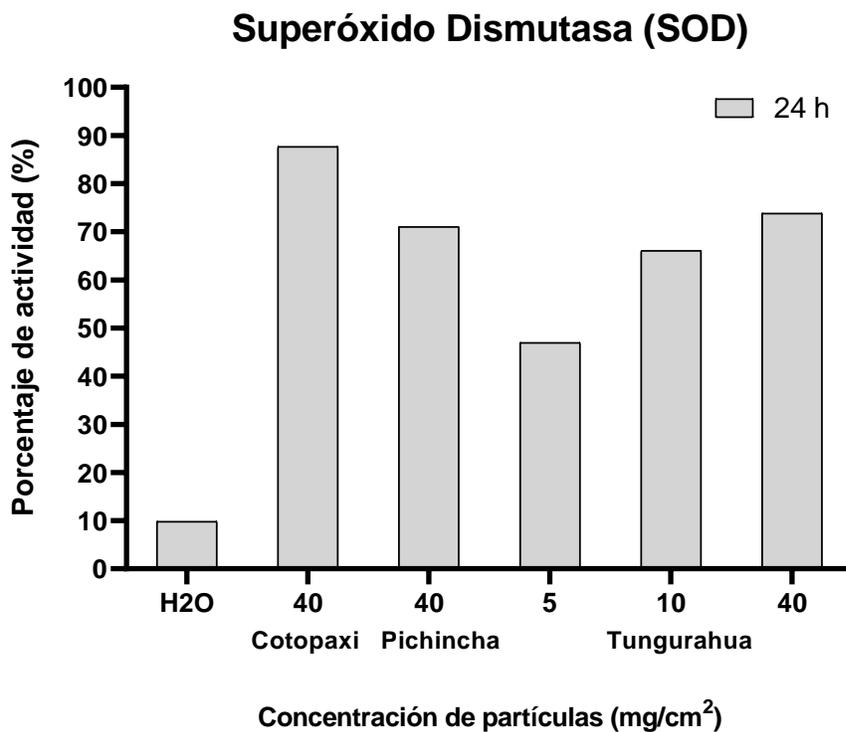
Se determino la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), para conocer si se produjo un estrés oxidativo. Se utilizaron las células tratadas con la mayor concentración de ceniza (40 mg/cm²) de los volcanes Cotopaxi y Pichincha. Y las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza del volcán Tungurahua (Figura 37). Debido a que estas muestras presentaron una elevada concentración de nitritos en el ensayo de Griess.

Se observo que las células tratadas con la mayor concentración de cenizas de los volcanes Cotopaxi y Pichincha (40 mg/cm²), durante 24 h, presentaron una elevada actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), observándose el 87,67% y 71,07% de actividad, respectivamente para cada volcán.

Mientras que en el ensayo con la ceniza del volcán Tungurahua, se determinó que, a mayor concentración de ceniza, la actividad de la SOD también aumenta, observándose una respuesta dosis dependiente. Obteniéndose valores de, 46,99%, 66.08% y 73.86%, de actividad enzimática, para las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza (5, 10 y 40 mg/cm²) del volcán Tungurahua durante 24 horas.

Figura 37

Actividad enzimática de la SOD producida por las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.

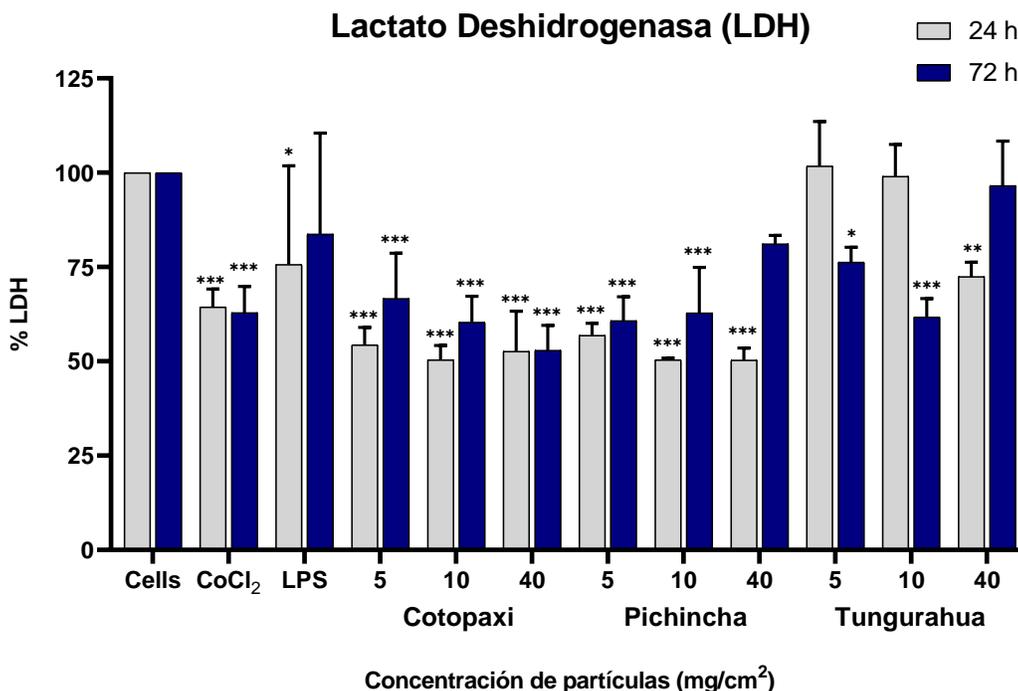


Ensayo del Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Este método colorimétrico permitió determinar el daño celular (citólisis de la célula) mediante la liberación de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo celular (Figura 38).

Figura 38

Liberación de la enzima lactato deshidrogenasa de las células A549 después de la exposición a ceniza volcánica.



Nota. Los resultados son las medias \pm SD de n=4 experimentos independientes.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparado con el control por ANOVA de dos vías seguido por la prueba post hoc de Tukey.

La evaluación del ensayo de la enzima lactato deshidrogenasa, dio como resultado que el LDH citoplasmático liberado por las células tratadas con las cenizas de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, fue menor al grupo control (p<0.001). Mientras que en el ensayo con la ceniza del volcán Tungurahua, se produjo una liberación de LDH citoplasmático equivalente al grupo control, para las concentraciones de 5 y 10 mg/cm² a las 24 h de tratamiento y para la concentración de 40 mg/cm² a las 72 h.

El LDH liberado de las células tratadas con el control positivo ($400 \mu\text{M CoCl}_2$) a las 24 y 72 h fue de, 64.39% y 62.86%. Mientras que las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, para las 24 y 72 horas, presentaron valores que se encontraban entre el 50% y 80%.

Por otro lado, el LDH liberado de las células tratadas con ceniza del volcán Tungurahua, fue de 99% y 102% para las concentraciones de 5 y 10 mg/cm^2 (24 h), y de 96.57% para la concentración de 40 mg/cm^2 (72 h).

Observándose que las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza (5, 10 y 40 mg/cm^2) para los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, no presentaron un incremento en la liberación de la enzima LDH, por lo tanto, las células A549 no sufrieron citólisis de su membrana plasmática.

CAPÍTULO V: Discusión

En el mundo las erupciones volcánicas han causado 37000 muertes en el último siglo, observándose que el 76% de estas muertes ocurrieron en América Latina y el Caribe (Morales & Liao, 1999). Además, en los últimos 15 años, la mitad de las erupciones más fuertes del mundo tuvieron lugar en esta región (PAHO, 2019), emitiendo una densa columna de ceniza afectando a millones de personas que viven en pueblos y ciudades cercanas (OCHA, 2019).

La ceniza expulsada por las erupciones volcánicas puede dispersarse miles de kilómetros (Toulkeridis & Zach, 2017), debido a su movilización por el viento o por actividades humanas (Cervini-Silva et al., 2014). Los efectos tóxicos de la ceniza depende de factores como su composición fisicoquímica, concentración y tamaño (Grob et al., 2012; Naumova et al., 2007; Sierra et al., 2018). Se conoce que está compuesta principalmente por óxido de silicio (SiO_2), cuyo contenido puede variar entre un 45–75% (Sierra et al., 2018), pudiendo producir citotoxicidad en las células pulmonares, estrés oxidativo, estimulación de la respuesta proinflamatoria y fibrosis (J. Y. W. Chan et al., 2017).

Se ha encontrado que la ceniza del volcán Cotopaxi del evento eruptivo del 2015, presenta características basálticas/andesíticas, teniendo una concentración de óxido de silicio (SiO_2) del 55.67% (Troncoso et al., 2017). Por otro lado, la ceniza del volcán Pichincha del evento eruptivo de 1999, presenta una típica composición basáltica/andesítica con una proporción de SiO_2 de 43,83% (Aguilera et al., 2018; Millet et al., 2014). Mientras que la ceniza del volcán Tungurahua, del evento eruptivo del 2006, presenta características andesíticas/dacíticas con una concentración de SiO_2 entre 54% y 67% (Bustillos et al., 2016).

Además, los gránulos de ceniza con un diámetro de 10 μm pueden ser inhaladas y llegar al árbol traqueo-bronquial produciendo amigdalitis y laringitis, mientras que las partículas menores a 5 μm de diámetro se pueden albergar en los alveolos, y producir hiperreactividad bronquial. Así como exacerbar enfermedades pulmonares previamente presentes, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Gudmundsson, 2011; Organización Panamericana de la Salud, 2005).

Por lo tanto, para realizar estudios pulmonares se necesitan modelos que permitan representar la fisiología del epitelio alveolar. Los modelos *in vitro*, usando células humanas pulmonares pueden complementar a los modelos animales, logrando una mejor comprensión de los mecanismos patológicos y las alteraciones en el sistema respiratorio humano (James Cooper et al., 2016; Miller & Spence, 2017).

Los ensayos *in vitro* con líneas celulares humanas, ha sido una buena herramienta durante décadas para estudiar la biología de las células (Miller & Spence, 2017). Las diferentes líneas celulares epiteliales del tracto respiratorio, se han utilizado como modelos *in vitro* para evaluar los procesos por los cuales las partículas tóxicas (ceniza volcánica) ejercen sus diversos efectos (Hetland et al., 2001).

Siendo, la línea celular inmortalizada de adenocarcinoma humano A549, la más utilizada en modelamientos de enfermedades del sistema respiratorio, así como en estudios de toxicidad (Adamson et al., 2011; James Cooper et al., 2016; Damby et al., 2016; Harrington et al., 2012), debido a que estas células tienen un papel esencial en la inflamación y en la fibrogénesis pulmonar como respuesta a la exposición de sílice cristalina (Adamson et al., 2011; James Cooper et al., 2016; Damby et al., 2016).

Como la ceniza volcánica puede exacerbar las enfermedades pulmonares preexistentes, tanto en jóvenes como en ancianos (P. J. Baxter et al., 2014), en esta investigación se ocuparon las células de adenocarcinoma A549, para representar la exposición pulmonar (Caston et al., 2018) a las cenizas de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, y evaluar los efectos tóxicos producidos en células cancerígenas al estar en contacto con partículas de ceniza.

Viabilidad Celular

La cuantificación de la viabilidad celular como respuesta a factores externos (partículas de ceniza) es fundamental en los ensayos *in vitro* (Bahuguna et al., 2017).

El ensayo colorimétrico MTT [bromuro de [3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio] se basa en evaluar la actividad metabólica de las células, las cuales son expuestas a diferentes concentraciones de compuestos tóxicos, siendo una de las pruebas más utilizadas para evaluar la viabilidad celular, (Aslantürk, 2018; Bahuguna et al., 2017).

El principio del ensayo MTT, se basa en la conversión del tetrazolio MTT, el cual es una solución acuosa amarillenta, mediante deshidrogenasas y agentes reductores presentes en las células vivas, hasta formar cristales de formazán azul violeta insolubles. Este ensayo determina la actividad mitocondrial que presentan las células vivas, la cual está relacionada directamente con el número de células viables (Meerlo et al., 2011; Tesone et al., 2018). De manera que, se utilizó el ensayo MTT para determinar la viabilidad de las células A549 después de la exposición a las concentraciones de ceniza de 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, y 40 mg/cm² de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, durante un tiempo de 48 y 96 horas.

En un estudio realizado por Damby et al., (2016), se evaluó la disminución en la viabilidad de las células A549 producida por la exposición a ceniza de los volcanes Colima – México, Merapi – Indonesia, Santa Helena – USA, Soufrière Hills – Montserrat y Unzen – Japón. Obteniéndose que al exponer a las células A549 a partículas de ceniza con concentraciones de 5, 10, 25, y 50 mg/cm², durante 24 h, se produjo una reducción en la viabilidad celular como respuesta al tratamiento con cenizas volcánicas.

Por otro lado, en un estudio de citotoxicidad *in vitro*, se encontró que las cenizas del volcán Popocatepetl, indujeron una elevada disminución en la viabilidad de las células A549, en el tratamiento de 48 h, presentándose una respuesta dependiente de la dosis (Sierra et al., 2018). Al igual que en la investigación realizada por Chan et al., (2017), en donde las células A549, después de haber sido expuestas a diferentes concentraciones de polvo de sílice (0-100 µg/cm²), presentaron una toxicidad dependiente de la dosis y del tiempo.

Resultados similares se obtuvieron al tratar células A549 con ceniza del volcán Soufrière Hills, durante 24 h, en donde se observó que las partículas probadas indujeron una disminución dependiente de la dosis al realizar el ensayo MTT, alcanzando su máximo efecto con la mayor concentración de ceniza (500 µg/mL) (Wilson et al., 2000). Estos resultados concuerdan con la disminución en la viabilidad celular observada al tratar las células A549 con la ceniza volcánica de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, ya que se obtuvo principalmente una disminución típica dependiente de la dosis, siendo la mayor concentración de ceniza volcánica (40 mg/cm²), la que produjo una menor viabilidad de las células al compararlas con el grupo control (p<0.001).

Las células tratadas con las ocho concentraciones de ceniza (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/cm²) de los volcanes Cotopaxi y Tungurahua, durante los dos tiempos de tratamiento (48 y 96 h), presentaron una disminución significativa en su viabilidad celular al compararla con el grupo control ($p < 0.001$). Mientras que para el ensayo con ceniza del volcán Pichincha, solo se observó una diferencia significativa en la viabilidad de las células en el tratamiento de 96 h ($p < 0.001$), para todas las concentraciones de ceniza volcánica. Esta variabilidad en los resultados pueden explicarse, debido a que las propiedades superficiales de las cenizas volcánicas pueden ejercer un mayor efecto en la disminución de la viabilidad celular (Cervini-Silva et al., 2014). Además, según Wilson et al., (2000), las diferencias observadas en la viabilidad de las células podrían estar relacionadas con la composición de la ceniza volcánica, así como del evento eruptivo del que se obtuvo la muestra.

Es bien conocido que existe una variabilidad de respuestas de las células, después de haber sido expuestas a compuestos dañinos, como la ceniza volcánica. Por lo tanto, la viabilidad celular, como respuesta a agentes tóxicos puede variar con el tiempo (Damby et al., 2016; Poland et al., 2014).

Las células A549 expuestas a ceniza volcánica, produjeron una respuesta dosis y tiempo dependientes. Se determinó que, en el tratamiento de 96 horas, las células presentaron una menor viabilidad, que las células tratadas con ceniza durante 72 horas. Observándose que las células expuestas a la mayor concentración de ceniza volcánica, 40 mg/cm², presentaron una viabilidad celular de 6.30% y 6.71% para Cotopaxi, de 59.30% y 42.70% para Pichincha y de 5.74 y 3.81% para Tungurahua, respectivamente para los dos tiempos de tratamiento (48 y 96 h). Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Lin et al., (2006), Petrache Voicu et al., (2015), y Chan et al., (2017), en los cuales después de exponer a las células A549 a diferentes

concentraciones de SiO₂, durante 24, 48 y 72 h, se pudo observar que la viabilidad celular disminuyó en función tanto del tiempo como de la concentración de las partículas.

Inflamación Celular

El mecanismo exacto por el que se produce la reacción patológica como respuesta al contacto con partículas tóxicas (ceniza volcánica) aún no se comprende completamente. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el proceso inflamatorio es fundamental en el desarrollo de enfermedades pulmonares (fibrosis pulmonar y cáncer), produciéndose citoquinas inflamatorias, debido a la inhalación de contaminantes particulados cristalinos como el asbesto o la sílice, siendo este último compuesto el principal componente de las cenizas volcánicas (Damby et al., 2018; Hetland et al., 2001; Unno et al., 2014).

Las citoquinas son moléculas de señalización secretadas por numerosas células, las cuales median la función inmune del organismo, permiten la comunicación entre células y pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autocrina), en células cercanas (acción paracrina) o en células distantes (acción endocrina) (Damby, 2012; Dinarello, 2007; J. M. Zhang & An, 2007). Las citoquinas no se almacenan dentro de las células, sino, que se segregan en respuesta a un estímulo, como son las partículas cristalinas (ceniza) (Damby, 2012). Posterior a ser producidas, las citoquinas interactúan con las células objetivo, desencadenando cascadas de señalización, y produciendo una respuesta inmunitaria (J. M. Zhang & An, 2007).

Estas moléculas pueden dividirse según su secreción en: (1) Citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF α), que estimulan y amplifican los procesos inflamatorios; (2) Quimiocinas, como la IL-8, las cuales inducen la quimiotaxis de las células, reclutando células inmunológicas en el área afectada; (3)

Linfocinas, citocinas que son secretadas por las células T y regulan la respuesta inmunitaria; (4) Factores de crecimiento, son citocinas que promueven la supervivencia celular y producen cambios estructurales en las vías respiratorias; y (5) Citocinas antiinflamatorias, que son citocinas inmunorreguladoras que controlan la respuesta de las citocinas proinflamatorias (Ray, 2016; Turner et al., 2014; J. M. Zhang & An, 2007).

Por lo tanto, en este estudio, se evaluó la respuesta proinflamatoria de las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano A549, expuestas a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, mediante la expresión de las citocinas, IL-1 β , IL-6, e IL-8.

Señales de peligro endógenas y exógenas, como ácido úrico, sílice o especies reactivas de oxígeno (ROS), pueden activar al inflamasoma NLRP3 (Kaneko et al., 2019; Kang et al., 2017; Tomašek et al., 2018), este complejo receptor citosólico activado, recluta a la proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein), formando una multiproteína que recluta y activa la caspasa-1, la cual conduce al procesamiento y secreción de las citocinas proinflamatorias interleucina-1 beta (IL-1 β) e IL-18 en sus formas activas (Damby et al., 2018; Hernández & Urcuqui, 2012; Unno et al., 2014).

Por lo tanto, la IL-1 β no se expresa constitutivamente, esta citocina se sintetiza en el citosol como una forma precursora biológicamente inactiva (pro-IL-1 β). Primero se produce una señal preestimuladora (primera señal), en las células activadas por PRR, produciendo la activación de NF- κ B, necesario para inducir la expresión de la pro-IL-1 β , pro-IL-18 y el NLRP3. Una vez activada la primera señal, la sílice, el asbesto u otras partículas cristalinas pueden proporcionar la segunda señal, para que se active el inflamasoma que contiene caspasa-1, y convierta la pro-IL-1 β en su forma

biológicamente activa (IL-1 β) para su posterior secreción (Hernández & Urcuqui, 2012; Kaneko et al., 2019; Unno et al., 2014; J. M. Zhang & An, 2007).

La IL-1 β es un potente mediador de los procesos inmunitarios innatos, como la inflamación, proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Damby et al., 2018; Muroya et al., 2012; Shen et al., 2017). Es liberada principalmente por macrófagos, así como por células no inmunes, como los fibroblastos y las células epiteliales; siendo importante en el desarrollo de enfermedades pulmonares debido a la interacción con sílice cristalina (SiO₂) (Damby et al., 2016, 2018; Unno et al., 2014; J. M. Zhang & An, 2007).

En el estudio realizado por de Damby et al., (2018), se trataron células con la ceniza del volcán Soufrière Hills, las cuales expresaron dos veces más IL-1 β (~ 0.5 ng/mL) que el grupo control (~0.25 ng/mL). Datos similares se obtuvieron en los experimentos ejecutados por Herseth et al., (2008), en donde se realizó un co-cultivo con macrófagos (THP-1) y células epiteliales alveolares de adenocarcinoma (A549), las cuales fueron tratadas con sílice cristalina en concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 43 h, obteniéndose una expresión de IL-1 β de dos y cuatro veces más (~20 pg/mL y ~40 pg/mL) que lo expresado por el grupo control (~10 pg/mL).

Estos resultados son similares a los obtenidos en las células A549, tratadas con ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, en donde se observó que a una concentración de 5 mg/cm^2 (24 h) y a una concentración de 10 mg/cm^2 (72 h) de ceniza del volcán Cotopaxi, se produjo una expresión de 6.63 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 8.61 $\text{ng}/\mu\text{L}$, de IL-1 β . Por otro lado, las células expuestas a una concentración de ceniza de 10 mg/cm^2 del volcán Pichincha, durante 24 y 72 h, produjeron una liberación de IL-1 β de 5.39 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 5.25 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Mientras que para el volcán Tungurahua, se obtuvo una expresión de 7.02 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de IL-1 β , para el tratamiento de 24 h.

Observándose que las cenizas de estos tres volcanes inducen una producción de IL-1 β aproximadamente tres veces mayor que el grupo control (1.88 ng/ μ L – 24 h y 3.08 ng/ μ L – 72 h). Por lo que la producción de esta citocina inflamatoria debido a la inhalación de partículas cristalinas (sílice o ceniza), puede afectar a las células pulmonares, e influir en el desarrollo de enfermedades fibróticas (J. Y. W. Chan et al., 2017; Damby et al., 2018; Herseth et al., 2008).

La IL-6 es una citocina multifuncional que se expresa en una amplia gama de células (Yu et al., 2002), que incluyen a los fagocitos mononucleares, células T y B, células endoteliales, fibroblastos (Turner et al., 2014), macrófagos alveolares, células epiteliales alveolares y células endoteliales; pero generalmente esta citocina se expresa en sitios de inflamación (Yu et al., 2002).

La IL-6 posee varias acciones biológicas como, la maduración de las células B, activación de las células T, y la diferenciación y regulación de los fenotipos Th2 (Hetland et al., 2001; Turner et al., 2014). Sin embargo, el papel de la IL-6 en la inflamación pulmonar, debido a la exposición a contaminantes ambientales, no se ha investigado ampliamente (Yu et al., 2002). Por lo que investigar la expresión de esta citocina en células pulmonares permitirá comprender mejor los procesos inflamatorios en el sistema respiratorio, debido a partículas de ceniza.

Hetland et al., (2001), evaluó el potencial inflamatorio de la IL-6, al exponer células epiteliales pulmonares A549 a diferentes concentraciones de partículas de sílice, durante 40 horas. Encontrándose que se produjo una elevada expresión de IL-6 (~ 1–11 ng/mL) al compararlo con el grupo control.

Los resultados anteriormente descritos pueden compararse con los obtenidos por Skuland et al., (2020), en donde se trataron cultivos de macrófagos THP-1 y células epiteliales alveolares A549, con 12 y 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de sílice (SiO_2), durante 20 horas, observándose que las partículas de SiO_2 indujeron una expresión de IL-6 de aproximadamente de 350 veces mayor que la expresada por las células sin tratamiento.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, en el cual después de la exposición a ceniza volcánica, las células A549, expresaron una mayor expresión de IL-6, a comparación de las células sin tratamiento (0.14 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (24 h) y 0.16 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (72 h)). A las 72 h, de haber colocado las cenizas de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, se observó que todas las concentraciones (5, 10 y 40 mg/cm^2), expresaron niveles elevados de IL-6, siendo la concentración de 40 mg/cm^2 para Cotopaxi y la de 10 mg/cm^2 para Pichincha, las que presentaron la mayor cantidad de esta citocina, observándose valores de 1.44 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 1.05 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Mientras que, a las 24 h, de haber colocado una concentración de ceniza de 10 mg/cm^2 , de los volcanes Pichincha y Tungurahua, se obtuvo una expresión de IL-6 de 1.79 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 1.18 $\text{ng}/\mu\text{L}$, respectivamente.

Sin embargo, también se pudo observar, que los demás tratamientos de ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, expresaron pocas o nulas cantidades de la IL-6, al compararlos con el grupo control (0.138 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Principalmente Tungurahua presento nula expresión de IL-6 para todas sus concentraciones de ceniza a las 72 h de tratamiento. Esto se puede explicar debido a que las partículas compuestas por óxido de silicio, como la ceniza volcánica, se pueden agrupar formando agregados, los cuales son de mayor tamaño que las partículas individuales (Lin et al., 2006), por lo que no tendrán la capacidad de ingresar a las células pulmonares, produciendo una menor respuesta inflamatoria (Sierra, 2012).

La quimiocina proinflamatoria IL-8 (CXCL8), es producido por varios tipos de células, incluidos los monocitos, basófilos, eosinófilos, fibroblastos, macrófagos alveolares, y células epiteliales bronquiales (Pease & Sabroe, 2002). Tiene como principal función ser un potente quimioatrayente, ya que recluta y activa neutrófilos en el sitio de la inflamación (Monteiller et al., 2007; Turner et al., 2014).

La transcripción de esta quimiocina depende del factor nuclear – kB (NF-kB), este complejo proteico, se activa después de la exposición celular a sílice (SiO₂), respondiendo la IL-8 al estrés oxidativo en las células expuestas a partículas de ceniza, y encontrándose involucrada en los efectos proinflamatorios del cuerpo (Damby, 2012; Damby et al., 2016; Duffin et al., 2001).

También se ha observado que la presencia continua y prolongada de IL-8 en la circulación en respuesta a procesos inflamatorios puede ocasionar lesiones en los tejidos (Ghasemi et al., 2011), además, se ha relacionado que los neutrófilos están implicados en varias enfermedades pulmonares inflamatorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma (Pease & Sabroe, 2002).

Skuland et al., (2020), evaluó el potencial inflamatorio de la IL-8, al exponer cultivos de macrófagos THP-1 y células epiteliales alveolares A549, con 12 y 24 µg/cm² de sílice (SiO₂), durante 20 horas, observándose que las partículas de SiO₂ indujeron una expresión elevada de IL-8, de aproximadamente de 110 veces mayor que la expresada por las células sin tratamiento. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Hetland et al., (2001), en donde se observó un aumento en la expresión de IL-8 en células alveolares de adenocarcinoma (A549) después de la exposición a óxido de silicio (SiO₂), durante 40 h.

Resultados similares se observaron en un estudio realizado por Herseth et al., (2008), en donde se realizó un co-cultivo con macrófagos (THP-1) y células epiteliales alveolares de adenocarcinoma (A549), las cuales fueron tratadas con sílice cristalina en concentraciones de 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ durante 43 h, obteniéndose una elevada expresión de IL-8, observándose valores de $\sim 0.08 \mu\text{g}/\text{mL}$ y de $\sim 0.14 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Datos similares se obtuvieron en los experimentos ejecutados por Perkins et al., (2012), en donde se cultivaron células epiteliales bronquiales humanas, las cuales fueron expuestas a partículas de sílice, con concentraciones de 75 y 150 mg/mL , durante 24 h, obteniéndose un aumento significativo en la expresión de IL-8, observándose valores de aproximadamente 1000 pg/mL y de 1300 pg/mL , siendo estos seis veces mayores que la concentración de IL-8 expresada por las células sin tratamiento ($\sim 200 \text{pg}/\text{mL}$).

Los resultados anteriormente descritos pueden compararse con los obtenidos en este estudio, ya que después de exponer las células A549 a la ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, durante 72 h, se obtuvo una expresión elevada de IL-8 para las tres concentraciones de tratamiento. Se observó que para la concentración de 40 mg/cm^2 de ceniza de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, la expresión de IL-8 fue de 5.14 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y de 2.11 $\text{ng}/\mu\text{L}$, respectivamente. Mientras que para la concentración de ceniza de 10 mg/cm^2 del volcán Tungurahua, se produjo una expresión de 4.67 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de IL-8. Siendo estos valores de expresión ocho veces más altos que lo expresado por el grupo control (0.59 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Por otro lado, para el tratamiento de 24 h, solo las cenizas de los volcanes Pichincha y Tungurahua, expresaron valores elevados de IL-8, siendo estos de 9.78 y 5.45 $\text{ng}/\mu\text{L}$, respectivamente.

Al analizar la expresión de las citocinas inflamatorias de las células A549 tratadas con las cenizas de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, se observó una desviación estándar elevada de los datos. Según Damby et al., (2016), estos resultados se deben a la mineralogía heterogénea de las muestras de ceniza volcánica, ya que sus propiedades intrínsecas produce una mayor dispersión de los datos de expresión.

Por lo tanto, la diferencia en la expresión de estas citocinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, e IL-8), es dependiente del tiempo de exposición de las células a la ceniza volcánica (24 y 72 h), y de las características químicas de las cenizas de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, como su composición (principalmente el contenido de sílice), y de sus características físicas, como el área superficial, estructura cristalina y tamaño de partícula, por ejemplo, las partículas de cuarzo (SiO₂) de menor tamaño van a ser más potentes al inducir la expresión de citocinas que las partículas de mayor tamaño (Damby et al., 2016; Hetland et al., 2001; Tesone et al., 2018).

Basándonos en las citocinas inflamatorias producidas (IL-1 β , IL-6, e IL-8) por las células epiteliales alveolares, se propone que se podría producir una respuesta Th2 (Caucheteux et al., 2016; Diehl & Rincón, 2002; Santarlaschi et al., 2013), en los individuos que tengan contacto con ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua. La respuesta Th2 produce IL-4, e IL-13, las cuales inducen el cambio de clase de IgE, permitiendo la sensibilización de mastocitos y basófilos, también expresan IL-5, que actúa sobre la diferenciación, activación y reclutamiento de eosinófilos. Y expresan IL-9, la cual induce la producción de moco por las células del tracto respiratorio (Caucheteux et al., 2016; Santarlaschi et al., 2013). Además, estas citocinas Th2, están relacionadas con el desarrollo de lesiones y la expansión de la fibrosis pulmonar, producida por inhalación de sílice (SiO₂) (Barbarin et al., 2005).

Ensayos De Estrés Oxidativo y Citotoxicidad

Un mecanismo subyacente a la generación de citocinas inflamatorias en las células expuestas a ceniza volcánica, y al daño del tejido pulmonar, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), las cuales generan estrés oxidativo y estrés nitrosativo, en las células pulmonares (Deshane & Thannickal, 2015; L. Zhang et al., 2019). Estos procesos se producen debido a un desequilibrio del sistema antioxidante celular (Monteiller et al., 2007; Petrache Voicu et al., 2015; Sierra et al., 2018). Por lo que, tanto la expresión de citocinas como la generación de ROS, están regulados por un mecanismo de retroalimentación positiva (Petrache Voicu et al., 2015).

Las especies reactivas de oxígeno, pueden ser, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), estos compuestos pueden generarse por inhalación de toxinas ambientales, causando la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Deshane & Thannickal, 2015; Gagné, 2014). Mientras que las especies reactivas de nitrógeno, pueden ser el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el nitrito (NO_2^-), el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el ácido peroxinitroso ($ONOOH$), los cuales generan efectos citotóxicos en las células, pudiendo provocar un daño irreversible en los pulmones (Martínez & Andriantsitohaina, 2009; L. Zhang et al., 2019).

En el sistema respiratorio el fluido del revestimiento pulmonar contiene elevadas concentraciones de compuestos antioxidantes, los cuales forman una barrera protectora frente al daño oxidativo, si estas defensas antioxidantes se agotan, se produce estrés oxidativo y nitrosativo en las células epiteliales que recubren los espacios aéreos de los pulmones (Deshane & Thannickal, 2015; Ma et al., 2018).

El estrés celular producido por los ROS y RNS, permiten entender cómo influyen las características de las cenizas volcánicas en las células tratadas con estas partículas. Por ejemplo, el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), puede formarse debido a la interacción de las células con los metales que forman parte de la ceniza (Damby et al., 2016; Lin et al., 2006; Monteiller et al., 2007).

Ensayo de Griess

El óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) es una molécula de señalización producida por muchos tipos de células, incluidas las neuronas, las plaquetas, las células del músculo liso, los macrófagos, los fibroblastos y las células epiteliales (Rosselli et al., 1998). Actúa como un relajante vascular, inhibidor de la agregación plaquetaria, como neurotransmisor (Coleman, 2001), regula el crecimiento celular, la apoptosis, y las reacciones inmunitarias producidas por infecciones (Rosselli et al., 1998).

El $\text{NO}\cdot$ también es un miembro de las especies reactivas de nitrógeno, pudiendo inducir el desarrollo de respuestas inflamatorias, debido a factores externos (partículas), al actuar como una especie oxidante (Tesone et al., 2018). Por lo tanto, el $\text{NO}\cdot$ es considerado como un mensajero intracelular, el cual a la vez puede usarse como un indicador extracelular del estado redox de la célula (Deshane & Thannickal, 2015; Tesone et al., 2018).

El ensayo de Griess es un método colorimétrico indirecto que determina la presencia del óxido nítrico mediante la medición de sus productos de descomposición nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-) (Bryan & Grisham, 2007).

En un estudio realizado por Tesone et al., (2018), después de tratar a células epiteliales con ceniza del complejo volcánico Puyehue-Cordón Caulle y del volcán Calbuco, durante 24 h, se produjo un aumento significativo en los niveles de nitrito para el complejo volcánico, al compararlo con el grupo control (~ 0.6 nmol/mg), obteniéndose una concentración de 143 nmol/mg para el tratamiento de ceniza de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y de 183 nmol/mg para una concentración de ceniza de 50 $\mu\text{g/mL}$. Observándose una producción de nitritos de 250 veces superior a las células sin tratamiento. Mientras que para el volcán Calbuco solo se produjo un ligero aumento en la concentración de nitritos, casi equiparable al grupo control (~ 0.6 nmol/mg).

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en este estudio, ya que se observó que las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza del volcán Cotopaxi, a las 24 h, no presentaron niveles de nitritos superiores al grupo control (1.86 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo, la concentración de 40 mg/cm^2 a las 72 h, produjo el mayor nivel de nitritos para este volcán (8.75 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, las células A549 expuestas a ceniza del volcán Pichincha, durante 24 h, produjeron concentraciones de nitritos ligeramente superiores (~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$) a las células sin tratamiento (1.86 $\mu\text{g/mL}$), a las concentraciones de 10 y 40 mg/cm^2 . En cambio, el tratamiento con la concentración de 40 mg/cm^2 , para las 72 h, produjo la mayor cantidad de nitritos para este volcán (24.79 $\mu\text{g/mL}$). En el ensayo con la ceniza del volcán Tungurahua, se observó que los tratamientos con las tres concentraciones de partículas (5, 10, 40 mg/cm^2), indujeron un aumento significativo en los niveles de nitrito, a las 24 y 72 h, siendo las mayores concentraciones, las de 26.03 $\mu\text{g/mL}$ (5 mg/cm^2) y 19.42 $\mu\text{g/mL}$ (40 mg/cm^2), respectivamente. Obteniéndose una producción de nitritos de aproximadamente diez y tres veces mayor que el grupo control, respectivamente para los dos tiempos de tratamiento.

Los resultados obtenidos también son congruentes con el estudio realizado por Park & Park, (2009), en el que se cultivaron macrófagos (RAW264.7), los cuales fueron tratados con partículas de sílice (SiO_2), a las concentraciones de 5, 10, 20 y 40 ppm, obteniéndose una elevada producción de nitritos, al compararlos con el grupo control.

Según Chen et al., (2018), Duan et al., (2014) y Murugadoss et al., (1993), las partículas de óxido de silicio (SiO_2) pueden inducir disfunción mitocondrial, alterando el equilibrio entre el compuesto oxidante (NO^*) y las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS), tal desequilibrio produce un aumento significativo de la respuesta proinflamatoria. Esto es congruente con los resultados obtenidos en el estudio realizado, ya que, debido a las elevadas concentraciones de nitrito producidas por las células epiteliales alveolares tratadas con ceniza volcánica, se pudo generar un desequilibrio de RNS en la mitocondria, y producirse la expresión de las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 e IL-8).

Ensayo De La Superóxido Dismutasa (SOD)

Las especies reactivas de oxígeno son compuestos importantes para mantener la homeostasis inmunitaria, sin embargo, sustancias particuladas (ceniza) pueden producir cantidades excesivas de ROS (Damby et al., 2018), las cuales inducen un aumento en la permeabilidad de la membrana de las células epiteliales pulmonares, permitiendo que las partículas de ceniza ingresen al intersticio pulmonar, y se desarrollen procesos inflamatorios y cancerígenos (Cullen et al., 2002).

En condiciones metabólicas normales, existen vías de defensa celular que regulan el nivel de ROS, y protegen a las células de agentes oxidantes dañinos. Estos sistemas de defensa pueden ser mecanismos no enzimáticos, como el glutatión o el β -caroteno, y mecanismos enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) (Apak et al., 2016; Deshane & Thannickal, 2015; Petrache Voicu et al., 2015).

La superóxido dismutasa (SOD) es un antioxidante enzimático pulmonar, que representa la primera línea de defensa contra ROS producidos por procesos inflamatorios. Esta enzima cataliza la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el cual se convierte en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2) mediante la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (Deshane & Thannickal, 2015; Petrache Voicu et al., 2015).

Se conoce que la sílice (SiO_2) puede producir anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir de oxígeno molecular (O_2) en el medio de cultivo celular mediante acción enzimática (Hamilton et al., 2008). La carga que tiene el anión superóxido extracelular, le impide ingresar a la célula atravesando la membrana plasmática. Sin embargo, puede ingresar a través de los canales de cloruros (Petrache Voicu et al., 2015).

Tesone et al., (2018), trató a las células epiteliales con ceniza del complejo volcánico Puyehue-Cordón Caulle y del volcán Calbuco, durante 24 h, observándose un incremento significativo de la actividad de la enzima SOD, al compararlo con el grupo control, el cual fue del 29% y 39%, para las concentraciones de ceniza del 50 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que para el volcán Calbuco solo se produjo un aumento en la actividad enzimática, con la mayor concentración de ceniza (1000 $\mu\text{g/mL}$), la cual fue del 24%.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos al tratar células A549 con la mayor concentración de ceniza (40 mg/cm^2) de los volcanes Cotopaxi y Pichincha, obteniéndose una elevada actividad de la enzima SOD, la cual fue del 87.67% y 71.07%, respectivamente. También, se determinó que la actividad de la SOD para las concentraciones de ceniza de, 5, 10 y 40 mg/cm^2 , del volcán Tungurahua fueron de 46,99%, 66.08% y 73.86%. Observándose una respuesta dosis dependiente. Probablemente la elevada activación de esta enzima, se debe a que la ceniza volcánica genera grandes cantidades de radicales libres, los cuales afectan al entorno celular (Damby, 2012). Además, se ha observado una producción aumentada de especies reactivas de oxígeno en células tratadas con SiO_2 , en investigaciones realizadas por Damby et al., (2018), Lin et al., (2006), y Petrache Voicu et al., (2015).

La elevada actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), provocaría la dismutación del anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, presente en las células de adenocarcinoma A549, formándose el no radical, peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Bigarella et al., 2014; Gough & Cotter, 2011). Este compuesto, es producido en los procesos inflamatorios crónicos del pulmón, aumentándose su potencial oxidante por las peroxidasas de las células inmunológicas (Deshane & Thannickal, 2015).

De acuerdo a Damby et al., (2018), las células expuestas a ceniza del volcán Soufrière Hills, produjeron elevadas concentraciones de ROS, las cuales estimularon la activación del inflammasoma NLRP3, y su consiguiente producción de IL-1 β . Estos resultados son congruentes con los obtenidos en esta investigación, ya que las células A549 tratadas con ceniza de los volcanes Cotopaxi y Tungurahua, a una concentración de 40 mg/cm^2 y 10 mg/cm^2 , respectivamente; expresaron IL-1 β , por encima del control no tratado, así como también presentaron una elevada actividad de la enzima SOD.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio serian consistentes con la hipótesis planteada por Monteiller et al., (2007) y Chen et al., (2018), la cual dice que el estrés oxidativo y nitrosativo producido por la formación de radicales libres en las células epiteliales tratadas con ceniza volcánica, serían los mecanismo por el que la ceniza produce la expresión de las citocinas inflamatorias.

Además, el estrés oxidativo, nitrosativo, y la respuesta inflamatoria producida en las células al entrar en contacto con las cenizas de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, pudo haber generado la reducción en la viabilidad celular, concordando con las observaciones realizadas por Tesone et al., (2018) y Wu et al., (2019).

Ensayo Del Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Cuando se genera un incremento en la cantidad de ROS, suele producirse la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, mitocondrial y nuclear de las células expuestas a partículas de ceniza volcánica, degradándose las proteínas citosólicas y alterándose los ácidos nucleicos (Cullen et al., 2002; Petrache Voicu et al., 2015).

La L-lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que cataliza la conversión de L-lactato a piruvato, para producir energía (Farhana & Lappin, 2020). La LDH se distribuye en todas las células del cuerpo, presentando actividades elevadas en el corazón, hígado, riñones y eritrocitos, mientras que se expresa en bajas cantidades en el pulmón, musculo liso y cerebro (Klein et al., 2020).

La LDH se libera de la célula en respuesta al daño de la membrana plasmática, debido a factores externos (partículas), produciendo en última instancia, la muerte celular (Kaja et al., 2015).

Esta enzima es muy estable en el entorno extracelular, particularmente en los medios de cultivo, por lo que la liberación de LDH se ha ocupado para evaluar el daño producido en las células expuestas a factores externos (Damby, 2012; Kaja et al., 2015).

En la investigación realizada, se obtuvo que el LDH liberado por las células tratadas con cenizas de los volcanes Cotopaxi y Pichincha fue menor al compararlo con el grupo control. Mientras que las células tratadas con ceniza del volcán Tungurahua, produjo una liberación de LDH aproximadamente equivalente a las células sin tratamiento. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Damby et al., (2016), en donde se determinó que las células tratadas con muestras de ceniza de los volcanes Merapi – Indonesia, y Soufrière Hills – Montserrat, produjeron niveles reducidos de LDH, los cuales fueron menores a los valores del control negativo (TiO_2).

Los resultados anteriormente descritos también son congruentes con los estudios realizados por Voicu et al., (2019), en donde se expusieron fibroblastos pulmonares a partículas de óxido de silicio, con una concentración de $62.5 \mu\text{g/mL}$, durante 24 y 48 h, observándose una liberación de la enzima LDH equiparable al grupo control, indicando que no se produjo daño en la membrana celular. De igual manera, en el estudio realizado por Brown et al., (2015), no se observó un aumento significativo en la liberación de LDH en las células A549 tratadas con partículas de sílice (SiO_2), en comparación con las células sin tratamiento.

El bajo nivel de LDH medido en el medio extracelular, es un indicador de que no se ha producido peroxidación lipídica, ni daño en la membrana citoplasmática (Lin et al., 2006). Por lo tanto, las cenizas de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, no indujeron un daño en la integridad de la membrana de las células A549, por lo que no se produjo una muerte celular debido a la lisis de la membrana plasmática, proceso denominado necrosis (F. Chan et al., 2013).

Sin embargo, las células A549 si presentaron una disminución en su viabilidad celular para todas las concentraciones de ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua. Por lo que, se propone que la muerte celular se produjo por apoptosis en lugar de necrosis. Concordando con los datos obtenidos por Damby et al., (2016), en donde se produjo una disminución en la viabilidad de las células A549, de aproximadamente 20%, atribuyéndose la muerte celular a procesos apoptóticos.

Además, Hogquist et al., (1991), demostraron que la liberación de la citocina proinflamatoria IL-1 β , se correlaciona con la lesión tisular y que su procesamiento solo se produce de manera eficiente en las células que mueren por apoptosis.

Los resultados para muestras individuales realizados en este estudio no siempre se correspondieron unos con otros, pudiendo producirse resultados discordantes entre los ensayos, como los observados en el estudio de Damby, 2012. Por ejemplo, para las células tratadas con una concentración de 10 mg/cm² de ceniza del volcán Tungurahua, no se produjo una liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), al compararlo con las células sin tratamiento. Sin embargo, si se produjo una disminución en la viabilidad celular (26.29%), así como un aumento significativo de nitritos (19.89 μ g/mL) y de la actividad de la enzima SOD (66.08%). También, se observó una elevada expresión de IL-1 β (7.02 ng/ μ L), IL-6 (1.18 ng/ μ L), e IL-8 (4.67 ng/ μ L), al compararlos con la expresión del grupo control para cada citocina.

Por lo tanto, la respuesta inmunitaria observada, se puede explicar debido a la naturaleza heterogénea de las cenizas volcánicas, tanto de sus características intrínsecas como de sus factores externos (Cervini-Silva et al., 2014; Damby, 2012).

CAPÍTULO VI: Conclusiones

Se determinó que las ocho concentraciones de ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 mg/cm²), produjeron una disminución significativa en la viabilidad de las células epiteliales alveolares de adenocarcinoma humano (A549). Observándose una respuesta dosis y tiempo dependientes, siendo la mayor concentración de ceniza volcánica (40 mg/cm²), la que produjo una menor viabilidad celular.

Se observó que las células A549 desarrollaron una respuesta inflamatoria después de la exposición a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, mediante la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-8. Observándose que en la concentración de 10 mg/cm² de ceniza del volcán Tungurahua, a las 24 h, se expresaron los mayores niveles de las tres citocinas evaluadas. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria fue independiente de la dosis de ceniza volcánica y de los tiempos de tratamiento.

La concentración de óxido nítrico, cuantificada como cantidad de nitritos, solo fue representativa en las células tratadas con la ceniza del volcán Tungurahua, obteniéndose un aumento significativo en los niveles de nitritos al compararlos con el grupo control. Por lo tanto, se produjo un estrés nitrosativo en las células A549, lo que provocó un incremento en la respuesta proinflamatoria.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa presentó una respuesta dependiente de la dosis, en las células tratadas con las tres concentraciones de ceniza (5, 10 y 40 mg/cm²) del volcán Tungurahua. Produciéndose una disminución en la viabilidad celular debido al estrés oxidativo generado.

No se produjo una liberación de la enzima lactato deshidrogenasa, en las células A549 expuestas a ceniza de los volcanes Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua, al compararlas con las células sin tratamiento. Por lo tanto, la muerte de las células A549 no fue ocasionada por la lisis de la membrana plasmática.

Este estudio demostró que las cenizas del volcán Tungurahua, son las más dañinas, ya que producen un elevado efecto citotóxico y una mayor respuesta inflamatoria en células de adenocarcinoma humano. Observándose una menor respuesta para las cenizas del volcán Pichincha y finalmente para el volcán Cotopaxi.

CAPÍTULO VII: Recomendaciones

Realizar los ensayos de viabilidad celular, expresión de citocinas inflamatorias y desarrollo de estrés oxidativo y nitrosativo, en células humanas pulmonares sanas, para determinar que los resultados obtenidos no son exclusivos de células cancerígenas (A549).

Utilizar solo las fracciones respirables de la ceniza volcánica (PM_{10} Y $PM_{2.5}$), para determinar el efecto toxico y el proceso inflamatorio, producido en la región torácica y alveolar del sistema respiratorio.

Realizar la cuantificación de las citocinas inflamatorias mediante PCR en tiempo real, ya que la cuantificación génica mediante esta técnica es altamente específica y eficiente.

Utilizar una matriz 3D de tejido primario del pulmón humano, modelando la fisiología pulmonar, para determinar los efectos tóxicos que produce la ceniza volcánica, en un entorno más semejante al verdadero pulmón.

Referencias

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). Inmunidad Innata. In *Inmunología celular y molecular* (8va ed., pp. 51–84).
- Adamson, J., Haswell, L., Phillips, G., & Gaca, M. (2011). In Vitro Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In *Bronchitis*. InTech.
<https://doi.org/10.5772/18247>
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.02.002>
- Aguilera, C., Viteri, M., Seqqat, R., Navarrette, L. A., Toulkeridis, T., Ruano, A., & Arias, M. T. (2018). *Biological Impact of Exposure to Extremely Fine-Grained Volcanic Ash*. <https://doi.org/10.1155/2018/7543859>
- Ahmed, A., Saha, B., Patwardhan, A., Shivprasad, S., & Nandi, D. (2009). The major players in adaptive immunity. *Resonance*, 14(5), 455–471.
<https://doi.org/10.1007/s12045-009-0046-0>
- Ali, N., De Cássia, R., Rampazzo, P., Dias Tavares Costa, A., & Krieger, M. A. (2017). *Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics*. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Alvarez, M., & Avilés, J. (1999). Ceniza Volcánica: Un nuevo agente de contaminación Química. In *Unidad de preparación para Desastres Químicos*.
https://www.paho.org/disasters/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=article-1236&alias=2568-ceniza-volcanica-un-nuevo-agente-

contaminacion-quimica-568&Itemid=1179&lang=en

- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(5), 1046–1070.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04744>
- Ardain, A., Marakalala, M. J., & Leslie, A. (2020). Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*, *159*(3), 245–256. <https://doi.org/10.1111/imm.13143>
- Armstrong, J. S., Steinauer, K. K., Hornung, B., Irish, J. M., Lecane, P., Birrell, G. W., Peehl, D. M., & Knox, S. J. (2002). Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death and Differentiation*, *9*, 252–263. <https://doi.org/10.1038/sj/cdd/4400959>
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, *12*(2), 8.
<https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>
- Bals, R., & Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. In *European Respiratory Journal* (Vol. 23, Issue 2, pp. 327–333). European Respiratory Society.
<https://doi.org/10.1183/09031936.03.00098803>
- Barbarin, V., Xing, Z., Delos, M., Lison, D., & Huaux, F. (2005). Pulmonary

- overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 288(5 32-5), 841–848. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00329.2004>
- Baxter, P. (2004). Erupciones volcánicas. In E. Noji (Ed.), *Impacto de los Desastres en la Salud Pública* (pp. 178–202).
- Baxter, P. J., Searl, A. S., Cowie, H. A., Jarvis, D., & Horwell, C. J. (2014). Evaluating the respiratory health risks of volcanic ash at the eruption of the Soufrière Hills Volcano, Montserrat, 1995 to 2010. *Geological Society, London, Memoirs*, 39(1), 407–425. <https://doi.org/10.1144/M39.22>
- Biaass, S., & Bonadonna, C. (2013). A fast GIS-based risk assessment for tephra fallout: The example of Cotopaxi volcano, Ecuador: Part I: Probabilistic hazard assessment. *Natural Hazards*, 65(1), 477–495. <https://doi.org/10.1007/s11069-012-0378-z>
- Bigarella, C. L., Liang, R., & Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*, 141(22), 4206–4218. <https://doi.org/10.1242/dev.107086>
- Brown, D. M., Varet, J., Johnston, H., Chrystie, A., & Stone, V. (2015). Silica nanoparticles and biological dispersants: genotoxic effects on A549 lung epithelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(10), 410. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-3210-3>
- Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 43, Issue 5, pp. 645–657). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>
- Buist, A., Vollmer, W., Johnson, L., Bernstein, R., & McCamant, L. (1986). A four-year

prospective study of the respiratory effects of volcanic ash from Mt. St. Helens. *The American Review of Respiratory Disease*, 133, 526–534.

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. In *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* (Vol. 25, Issue 3, pp. 287–299). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>

Bustillos, J., Romero, J., Troncoso, L., & Guevara, A. (2016). Tephra fall at Tungurahua Volcano (Ecuador) – 1999-2014: An Example of Tephra Accumulation from a Long-lasting Eruptive Cycle. *Geofísica Internacional*, 55(1), 55–67.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/geoint/v55n1/0016-7169-geoint-55-01-00055.pdf>

Cano, J. (1994). *Grandes erupciones volcánicas y su influencia en el clima*.

Cano, L. E., & Lopera, D. E. (2013). Introduction to T and B lymphocytes. In J. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas, R. Levy, & R. Cervera (Eds.), *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459471/>

Caston, R., Luc, K., Hendrix, D., Hurowitz, J. A., & Demple, B. (2018). Assessing Toxicity and Nuclear and Mitochondrial DNA Damage Caused by Exposure of Mammalian Cells to Lunar Regolith Simulants. *GeoHealth*, 2(4), 139–148.
<https://doi.org/10.1002/2017GH000125>

Caucheteux, S. M., Hu-Li, J., Guo, L., Bhattacharyya, N., Crank, M., Collins, M. T., & Paul, W. E. (2016). IL-1 β enhances inflammatory TH2 differentiation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(3), 898-901.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.033>

Cervini-Silva, J., Antonio-Nieto-Camacho, Gomez-Vidales, V., Ramirez-Apan, M. T.,

- Palacios, E., Montoya, A., Kaufhold, S., Abidin, Z., & Theng, B. K. G. (2014). Lipid peroxidation and cytotoxicity induced by respirable volcanic ash. *Journal of Hazardous Materials*, 274, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.015>
- Céspedes, E., & Castillo, J. (2008). Lipid peroxidation in diagnosis of oxidative stress of hypertensive patient. Reality or myth? *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 27. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002008000200003
- Chacon, E., Acosta, D., & Lemasters, J. (1997). Primary Cultures of Cardiac Myocytes as In Vitro Models for Pharmacological and Toxicological Assessments. In *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research* (pp. 209–223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012163390-5.50010-7>
- Chan, F., Moriwaki, K., & De Rosa, M. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Molecular Biology*, 979, 65–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- Chan, J. Y. W., Tsui, J. C. C., Law, P. T. W., So, W. K. W., Leung, D. Y. P., Sham, M. M. K., Tsui, S. K. W., & Chan, C. W. H. (2017). Profiling of the silica-induced molecular events in lung epithelial cells using the RNA-Seq approach. *Journal of Applied Toxicology*, 37(10), 1162–1173. <https://doi.org/10.1002/jat.3471>
- Chatterjee, K., & Wan, Y. (2018, July 13). *RNA: Definition, Structure, Types, & Functions*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/RNA>
- Chen, L., Liu, J., Zhang, Y., Zhang, G., Kang, Y., Chen, A., Feng, X., & Shao, L. (2018). The toxicity of silica nanoparticles to the immune system. *Nanomedicine*, 13(15), 1939–1962. <https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0076>

- Chiu, C., & Openshaw, P. J. (2015). Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs. In *Nature Immunology* (Vol. 16, Issue 1, pp. 18–26). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/ni.3056>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Cifuentes, C., Alvarado, A., Naranjo, A., Naranjo, C., Andrea, A., & Chamba, C. (2017). *Asociación entre alteraciones respiratorias y espirométricas con la exposición inhalatoria crónica de las cenizas del volcán Tungurahua Resumen Association between spirometric and respiratory alterations with the chronic inhalation exposure of the ashes o* (Vol. 36).
- Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1397–1406. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00086-8)
- Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>
- Cooper, J. (2012). *Cell Line Profile: A549*. <https://www.culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf>
- Cooper, James, Abdullatif, M., Burnett, E., Kempell, K., Conforti, F., Tolley, H., Collins, J., & Davies, D. (2016). Long term culture of the a549 cancer cell line promotes multilamellar body formation and differentiation towards an alveolar type II Pneumocyte phenotype. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164438>

- Csonka, C., Páli, T., Bencsik, P., Görbe, A., Ferdinandy, P., & Csont, T. (2015). Measurement of NO in biological samples. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 172, Issue 6, pp. 1620–1632). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/bph.12832>
- Cullen, R., Jones, A., Miller, B., Tran, L., Davis, J., Donaldson, K., Wilson, M., Stone, V., & Morgan, A. (2002). *Toxicity of volcanic ash from Montserrat*.
<https://www.researchgate.net/publication/242635099>
- Czaja, A. J. (2017). Immunopathogenesis of Autoimmune Liver Damage. In *Handbook of Systemic Autoimmune Diseases* (Vol. 13, pp. 19–48). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63707-9.00002-7>
- Damby, D. E. (2012). *From Dome to Disease: The Respiratory Toxicity of Volcanic Cristobalite*. <http://etheses.dur.ac.uk/7328/>
- 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), 2000.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02000>
- 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>
- Dela Cruz, C. S., & Kof, J. L. (2015). Lung Immunology. In J. Elias, R. Kotloff, J. Fishman, A. Pack, & R. Senior (Eds.), *Fishman's pulmonary diseases and disorders*. (Fifth, Vol. 12, Issue 8, pp. 246–303).
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201506-336OT>

- Deshane, J., & Thannickal, V. (2015). Redox Signaling and Oxidative Stress in Lung Diseases. In J. Elias, R. Kotloff, J. Fishman, A. Pack, & R. Senior (Eds.), *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* (Fifth, pp. 341–358).
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201506-336OT>
- Diehl, S., & Rincón, M. (2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology*, 39(9), 531–536. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00210-9)
- Dikalov, S., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. In *Hypertension* (Vol. 49, Issue 4, pp. 717–727).
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000258594.87211.6b>
- Dikalov, S. I., & Harrison, D. G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(2), 372–382. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4886>
- Dinareello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. In *European Journal of Immunology* (Vol. 37, Issue SUPPL. 1, p. S34). NIH Public Access.
<https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
- Donald, R. (2016, November 1). *Volcanoes* | *National Geographic Society*.
<https://www.nationalgeographic.org/media/volcano-satellite-images/>
- Drew, B., & Leeuwenburgh, C. (2002). Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959(1), 66–81.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02084.x>
- Duan, J., Yu, Y., Yu, Y., Li, Y., Wang, J., Geng, W., Jiang, L., Li, Q., Zhou, X., & Sun, Z. (2014). Silica nanoparticles induce autophagy and endothelial dysfunction via the

PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 5131–5141. <https://doi.org/10.2147/IJN.S71074>

Duffin, R., Gilmour, P. S., Schins, R. P. F., Clouter, A., Guy, K., Brown, D. M., MacNee, W., Borm, P. J., Donaldson, K., & Stone, V. (2001). Aluminium lactate treatment of DQ12 quartz inhibits its ability to cause inflammation, chemokine expression, and nuclear factor- κ B activation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 176(1), 10–17. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9268>

Farhana, A., & Lappin, S. L. (2020). Biochemistry, Lactate Dehydrogenase (LDH). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32491468>

Farrell, R. E. (2017). RNA Isolation Strategies. In *RNA Methodologies* (pp. 75–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804678-4.00003-8>

Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal*, 33(7), 829. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

Franks, T. J., Colby, T. V., Travis, W. D., Tuder, R. M., Reynolds, H. Y., Brody, A. R., Cardoso, W. V., Crystal, R. G., Drake, C. J., Engelhardt, J., Frid, M., Herzog, E., Mason, R., Phan, S. H., Randell, S. H., Rose, M. C., Stevens, T., Serge, J., Sunday, M. E., ... Williams, M. C. (2008). Resident Cellular Components of the Human Lung. *National Institutes of Health*, 19(20), 763–766. <https://doi.org/10.1513/pats.200803-025HR>

Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., & Apanasets, O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1363–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.001>

- Gagné, F. (2014). Oxidative Stress. In *Biochemical Ecotoxicology* (pp. 103–115). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411604-7.00006-4>
- García, L., & Sibila, O. (2013). Mecanismos de defensa pulmonar. *Medicina Respiratoria*, 6, 15–24. <http://www.neumologiaysalud.es/descargas/R6/R62-3.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>
- Genez, K., Posada, V., Fernández-Morales, P., & Ramírez, J. (2016). Evaluación citotóxica y biocompatibilidad de la aleación AZ31B para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos Cytotoxic evaluation and biocompatibility of AZ31B alloy for applications in bone tissue engineering. *Págs. Prospect*, 14(2), 7–12. <https://doi.org/10.15665/rp.v14i2.691>
- Ghasemi, H., Ghazanfari, T., Yaraee, R., Faghihzadeh, S., & Hassan, Z. M. (2011). Roles of IL-8 in Ocular Inflammations: A Review. *Ocular Immunology and Inflammation*, 19(6), 401–412. <https://doi.org/10.3109/09273948.2011.618902>
- Global Volcanism Program. (1993). Report on Guagua Pichincha (Ecuador). *Bulletin of the Global Volcanism Network*, 18(2). <https://doi.org/10.5479/si.gvp.bgvn199302-352020>
- Global Volcanism Program. (2016). Report on Cotopaxi (Ecuador). *Bulletin of the Global Volcanism Network*, 41(4). <https://doi.org/10.5479/si.gvp.bgvn201604-352050>
- Global Volcanism Program. (2018). Report on Tungurahua (Ecuador). *Bulletin of the*

Global Volcanism Network, 43(2). <https://doi.org/10.5479/si.gvp.bgvn201802-352080>

Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

González, R., & Carranza, L. (2015). *Impacto de las Erupciones Volcánicas en la Salud Pública*.

Gough, D. R., & Cotter, T. G. (2011). Hydrogen peroxide: A Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease*, 2(10), e213–e213. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.96>

Grob, E., Oyarzún, M., Cavieres, I., Zarges, P., & Bustamante, G. (2012). ¿Son las cenizas volcánicas un riesgo para la salud respiratoria? *Revista Chilena De Enfermedades Respiratorias*, 28, 294–302. <https://revchilenfermrespir.cl/index.php/RChER/article/view/384>

Gudmundsson, G. (2011). Respiratory health effects of volcanic ash with special reference to Iceland. A review. In *Clinical Respiratory Journal* (Vol. 5, Issue 1, pp. 2–9). <https://doi.org/10.1111/j.1752-699X.2010.00231.x>

Guevara, A., Torre, E., Criollo, L., Valencia, L., Gallegos, B., & Mena, F. (2009). Evaluación de la influencia de la ceniza volcánica sobre suelos agrícolas aledaños al volcán Tungurahua. *Gestión Del Riesgo*, 4(6), 20–23. https://www.gestionderiesgos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/07/Revista_Informativa_de_la_SNGR.pdf

Hajjawi, O. S. (2015). Ribonucleic acid (RNA) biosynthesis in human cancer. In *Cancer*

Cell International (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd.

<https://doi.org/10.1186/s12935-015-0167-3>

Hakim, A., & Usmani, O. S. (2014). Structure of the Lower Respiratory Tract. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00215-4>

Hamilton, R. F., Thakur, S. A., & Holian, A. (2008). Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, *44*(7), 1246–1258.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.027>

Harrington, A. D., Tsirka, S. E., & Schoonen, M. A. A. (2012). Quantification of particle-induced inflammatory stress response: A novel approach for toxicity testing of earth materials. *Geochemical Transactions*, *13*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1467-4866-13-4>

Hernández, J., & Urcuqui, S. (2012). Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*, *25*(4), 380–390.

<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v25n4/v25n4a08.pdf>

Herrero, J. (2010, October 1). ABC de los «Toll-like receptors»: Relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Seminarios de La*

Fundacion Espanola de Reumatologia, *11*(4), 135–143.

<https://doi.org/10.1016/j.semreu.2010.04.005>

Herseth, J. I., Volden, V., Låg, M., & Refsnes, M. (2008). IL-1beta differently involved in IL-8 and FGF-2 release in crystalline silica-treated lung cell co-cultures. *Particle and Fibre Toxicology*, *5*(16), 1–18. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-16>

Hetland, R. B., Schwarzel, P. E., Johansen, B. V, Myran, T., Uthus, N., & Refsnes, M.

(2001). Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size. *Human & Experimental Toxicology*, 20(1), 46–55.

<https://doi.org/10.1191/096032701676225130>

Hickson, C., Spurgeon, T., Tilling, R., & Adam, P. (2013). Factors Influencing Volcanic Hazards and the Morphology of Volcanic Landforms. In J. Shroder (Ed.), *Treatise on Geomorphology* (Vol. 13, pp. 219–242). Springer Netherlands.

https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4399-4_122

Hogan, B., & Tata, P. (2019). Cellular organization and biology of the respiratory system. *Nature*.

https://www.stemcell.com/media/files/wallchart/Cellular_Organization_and_Biology_of_the_Respiratory_System.pdf

Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R., & Chaplin, D. D. (1991). Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8485–8489.

<https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8485>

Horton, R., & McCaldin, R. (1964). Observations on air pollution aspects of Irazú Volcano, Costa Rica. *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1896)*, 79(10), 925–929. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14198583>

Horwell, C. J. (2007). Grain-size analysis of volcanic ash for the rapid assessment of respiratory health hazard. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(10), 1107.

<https://doi.org/10.1039/b710583p>

Instituto Geofísico. (2014, August 19). *Informe especial del Volcán Tungurahua - N° 19*.

<https://www.igepn.edu.ec/servicios/noticias/901-informe-especial-del-volcán-tungurahua-n°-19>

Invitrogen. (2015, October 30). *M-MLV Reverse Transcriptase*. Thermo Fisher Scientific.

https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2Fmmlv_rt_man.pdf&title=UHJvZHVjdCBJbmZvIFNoZWV0OiBNLU1MViBSZXZlcnNlIFRyYW5zY3JpcHRhc2U=

Ismail, T., Kim, Y., Lee, H., Lee, D. S., & Lee, H. S. (2019). Interplay between mitochondrial peroxiredoxins and ROS in cancer development and progression.

International Journal of Molecular Sciences, 20(18).

<https://doi.org/10.3390/ijms20184407>

Jo, H. Y., Kim, Y., Park, H. W., Moon, H. E., Bae, S., Kim, J., Kim, D. G., & Paek, S. H.

(2015). The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. *Experimental Neurobiology*, 24(3), 235–245.

<https://doi.org/10.5607/en.2015.24.3.235>

Johnson, K., Loftsgaarden, D., & Gideon, R. (1982). The effects of Mount St. Helens ash on the pulmonary function of 120 elementary school Children. *American Review of Respiratory Disease*, 126, 1066–1069.

Jovanović, P., Žorić, L., Stefanović, I., Džunić, B., Djordjević-Jocić, J., Radenković, M., &

Jovanović, M. (2010). Lactate dehydrogenase and oxidative stress activity in primary open-angle glaucoma aqueous humour. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 10(1), 83–88. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2010.2743>

Kaja, S., Payne, A. J., Singh, T., Ghuman, J. K., Sieck, E. G., & Koulen, P. (2015). An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 73, 1–6.

<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.02.001>

- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., & Masumoto, J. (2019). The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflammation and Regeneration*, 39(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
- Kang, M. J., Jo, S. G., Kim, D. J., & Park, J. H. (2017). NLRP3 inflammasome mediates interleukin-1 β production in immune cells in response to *Acinetobacter baumannii* and contributes to pulmonary inflammation in mice. *Immunology*, 150(4), 495–505.
<https://doi.org/10.1111/imm.12704>
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Klein, R., Nagy, O., Tóthová, C., & Chovanová, F. (2020). Clinical and Diagnostic Significance of Lactate Dehydrogenase and Its Isoenzymes in Animals. *Veterinary Medicine International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5346483>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. In *Journal of Applied Genetics* (Vol. 54, Issue 4, pp. 391–406). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095497.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Langmann, B. (2013). Volcanic Ash versus Mineral Dust: Atmospheric Processing and Environmental and Climate Impacts. *ISRN Atmospheric Sciences*, 2013, 1–17.
<https://doi.org/10.1155/2013/245076>

- Le-Pennec, J., Samaniego, P., Eissen, J.-P., Hall, M., Molina, I., Robin, C., Mothes, P., Yepes, H., Ramón, P., Monzier, M., & Egred, J. (2005). *Peligros Volcánicos asociados con el Tungurahua*.
- Leonard, G., Johnston, D., Williams, S., Cole, J. W., Finnis, K., & Barnard, S. (2005). *Impacts and management of recent volcanic eruptions in Ecuador: lessons for New Zealand*. <https://www.civildefence.govt.nz/assets/Uploads/publications/GNS-SR2005-20-Ecuador-volcano-impacts.pdf>
- Liaudet, L., Soriano, F., & Szabó, C. (2001). Poly (ADP-Ribose) Synthetase as a Novel Therapeutic Target for Circulatory Shock. In J. Vincent (Ed.), *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* (pp. 97–89). Springer.
- Life Technologies. (2012). *DNase I (RNase free)*. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F4393898B.pdf&title=UEkgU2hZlXQ6IEROYXNIIIEkgKFJOYXNIIIGZyZWUp>
- Liljas, A., Liljas, L., Piskur, J., Lindblom, G., Nissen, P., & Kjeldgaard, M. (2009). Textbook of Structural Biology. In *Textbook of Structural Biology*. WORLD SCIENTIFIC. <https://doi.org/10.1142/6620>
- Lin, W., Huang, Y., Zhou, X.-D., & Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.004>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780–787. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x>

- Lloyd, C. M. (2014). Chair's summary: Innate and adaptive immune responses in airway disease. In *Annals of the American Thoracic Society* (Vol. 11, pp. S234–S235). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201405-210AW>
- Loaiza, Y. (2019). *¿Conocemos el verdadero riesgo de los volcanes en el Ecuador? ¿Conocemos el verdadero riesgo de los volcanes en el Ecuador?* <https://gk.city/2019/09/16/riesgo-volcanes-ecuador-cotopaxi-tungurahua/>
- Ma, J., Yang, L., Ren, J., & Yang, J. (2018). Autophagy, Oxidative Stress, and Redox Regulation. In *Autophagy and Cardiometabolic Diseases* (pp. 237–251). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805253-2.00020-1>
- Mahajan, S. D., Law, W.-C., Aalinkeel, R., Reynolds, J., Nair, B. B., Yong, K.-T., Roy, I., Prasad, P. N., & Schwartz, S. A. (2012). Nanoparticle-Mediated Targeted Delivery of Antiretrovirals to the Brain. In *Methods in Enzymology* (Vol. 509, pp. 41–60). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391858-1.00003-4>
- Maldonado, F., Coronel, V., Maldonado, K., & Silva, V. (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>
- Martin, T. R., & Frevert, C. W. (2005). Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(5), 403–411. <https://doi.org/10.1513/pats.200508-090js>
- Martínez, C., & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive Nitrogen Species: Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(3), 669–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>

- Meerlo, J., Kaspers, G., & Cloos, J. (2011). *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay* (pp. 237–245). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Melo, W., Mesquita, D., Pereira, J., Takao, T., Wagner, A., Pereira, N., & Coelho, L. (2010). Immune system-Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Brazilian Journal of Rheumatology*, *50*(4), 448–461. https://www.scielo.br/pdf/rbr/v50n4/en_v50n4a08.pdf
- Miller, A. J., & Spence, J. R. (2017). In vitro models to study human lung development, disease and homeostasis. In *Physiology* (Vol. 32, Issue 3, pp. 246–260). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2016>
- Millet, M.-A., Tutt, C. M., Handler, M. R., & Baker, J. A. (2014). Processes and time scales of dacite magma assembly and eruption at Tauhara volcano, Taupo Volcanic Zone, New Zealand. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, *15*(1), 213–237. <https://doi.org/10.1002/2013GC005016>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2000, February 1). *Efectos en la salud por les erupciones del Tungurahua - Ecuador | ReliefWeb*. Oficina de Naciones Unidas Para La Coordinación de Asuntos Humanitarios. <https://reliefweb.int/report/ecuador/efectos-en-la-salud-por-les-erupciones-del-tungurahua>
- Monteiller, C., Tran, L., MacNee, W., Faux, S., Jones, A., Miller, B., & Donaldson, K. (2007). The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occupational and Environmental Medicine*, *64*(9), 609–615. <https://doi.org/10.1136/oem.2005.024802>

- Montgomery, D. (2013). Introducción a los Diseños Factoriales. In *Diseño y análisis de Experimentos* (Segunda, pp. 170–211). Limusa Wiley.
- Morales, R., & Liao, A. (1999). Amenazas volcánicas en Costa Rica: una estrategia de prevención. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 8(15).
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14291999000200005#5
- Muroya, M., Chang, K., Uchida, K., Bougaki, M., & Yamada, Y. (2012). Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549. *BioScience Trends*, 6(2). <https://doi.org/10.5582/bst.2012.v6.2.70>
- Murugadoss, S., Lison, D., Godderis, · Lode, Van Den Brule, S., Mast, J., Brassinne, F., Sebaihi, N., Peter, ·, & Hoet, H. (1993). Toxicology of silica nanoparticles: an update. *Archives of Toxicology*, 91, 2967–3010. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1993-y>
- Naranjo, D. (2007). *Desarrollo de la Metodología para el análisis de vulnerabilidad ante una eventual erupción del volcán Cotopaxi*.
<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8438/3/CD-0924.pdf>
- 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. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-6-21>
- Nishikimi, M., Appaji Rao, N., & Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849–854.

[https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(72\)80218-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80218-3)

OCHA. (2019). *Natural disasters in latin america and the caribbean*.

https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/documents/files/20191203-ocha-desastres_naturales.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (2005). *Contaminación atmosférica por emisiones volcánicas. Guía de preparativos de salud frente a erupciones volcánicas*.

Osterman, C. J. D., Lynch, J. C., Leaf, P., Gonda, A., Ferguson Bennit, H. R., Griffiths, D., & Wall, N. R. (2015). Curcumin Modulates Pancreatic Adenocarcinoma Cell-Derived Exosomal Function. *PLOS ONE*, *10*(7), e0132845.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132845>

PAHO. (2019). *Health Planning for a Volcanic Crisis*.

https://www.paho.org/disasters/index.php?option=com_content&view=article&id=757:health-planning-in-volcanic-crisis&Itemid=924&lang=en

Park, E.-J., & Park, K. (2009). Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicology Letters*, *184*(1), 18–25.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.012>

Patravale, V., Dandekar, P., & Jain, R. (2012). Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles. In *Nanoparticulate Drug Delivery* (pp. 123–155).

Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781908818195.123>

Pease, J. E., & Sabroe, I. (2002). The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: Implications for therapy. *American Journal of Respiratory Medicine*, *1*(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/BF03257159>

- Perkins, T. N., Shukla, A., Peeters, P. M., Steinbacher, J. L., Landry, C. C., Lathrop, S. A., Steele, C., Reynaert, N. L., Wouters, E. F. M., & Mossman, B. T. (2012). Differences in gene expression and cytokine production by crystalline vs. amorphous silica in human lung epithelial cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-6>
- Peskin, A. V., & Winterbourn, C. C. (2017). Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1. *Free Radical Biology and Medicine*, 103, 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.033>
- Peter, C. J. H., & Baxter, J. (2006). *The respiratory health hazards of volcanic ash: a review for volcanic risk mitigation*. 69, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00445-006-0052-y>
- Petrache Voicu, S., Dinu, D., Sima, C., Hermenean, A., Ardelean, A., Codrici, E., Stan, M., Zărnescu, O., & Dinischiotu, A. (2015). Silica Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 29398–29416. <https://doi.org/10.3390/ijms161226171>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Plasencia, G. (2015). *Plan de contingencia y emergencia del Volcán Cotopaxi*. https://www.usfq.edu.ec/programas_academicos/colegios/cocsa/escuelas/medicina/Documents/plan_de_emergencias_volcan_cotopaxi.pdf
- Plumlee, G., & Ziegler, T. (2007). The Medical Geochemistry of Dusts, Soils, and Other

Earth Materials. *Treatise on Geochemistry*, 9, 1–61. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/09050-2>

Poland, C. A., Miller, M. R., Duffin, R., & Cassee, F. (2014). The elephant in the room: Reproducibility in toxicology. *Particle and Fibre Toxicology*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0042-8>

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. (2005). *Una Comunidad Campesina Conviviendo con el Volcán El Reventador*.

Ray, A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*, 4(2). <https://doi.org/10.15406/moji.2016.04.00121>

Red Internacional de Riesgos para la Salud Volcánica. (2019). *Los peligros de las Cenizas Volcánicas para la salud. Guía para el público*. https://www.ivhhn.org/images/pamphlets/Health_Guidelines_Spanish_WEB.pdf

Reiriz, J. (2014). *Sistema Respiratorio: Anatomía*. [https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/97/Sistema respiratorio.pdf?1358605430](https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/97/Sistema%20respiratorio.pdf?1358605430)

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>

Rosselli, M., Keller, P., & Dubey, R. (1998). Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*, 4(1), 3–24. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.1.3>

Ruggieri, F., Fernández-Turiel, J. L., Saavedra, J., Gimeno, D., Polanco, E., & Naranjo,

- J. A. (2011). Environmental geochemistry of recent volcanic ashes from the Southern Andes. *Environmental Chemistry*, 8(3), 236–247.
<https://doi.org/10.1071/EN10097>
- Sandoval Pineda, J. F., Ochoa Corona, F., & Torres Rojas, E. (2017). Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 42–52.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57114>
- Santarlaschi, V., Cosmi, L., Maggi, L., Liotta, F., & Annunziato, F. (2013). IL-1 and T helper immune responses. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4, Issue JUL). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00182>
- Secretaria de Gestión de Riesgos. (2015). *Plan de contingencia nacional de la amenaza de erupción del volcán “Cotopaxi” en las provincias de Cotopaxi, Napo y Pichincha*. <https://www.gestionderiesgos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/08/PLAN-DE-CONTINGENCIA-NACIONAL-VOLCAN-COTOPAXI.pdf>
- Sedeek, M., Nasrallah, R., Touyz, R. M., & Hébert, R. L. (2013). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: Friend and foe. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(10), 1512–1518.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2012111112>
- Sepúlveda, C., & Puente, J. (2000). Natural Killer cells and the innate immune system in infectious diseases. *Revista Medica de Chile*, 128(12), 1361–1370.
<https://doi.org/10.4067/s0034-98872000001200009>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: Reaccion en cadena de la Polimerasa. *INECC*, 35(2), 53–73.

- Shen, J., Xu, S., Zhou, H., Liu, H., Jiang, W., Hao, J., & Hu, Z. (2017). IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep41067>
- Sierra, M. (2012). Las cenizas, gases volcánicos y la salud respiratoria. In *Editorial Neumol Cir Torax* (Vol. 71, Issue 2). www.medigraphic.org.mx
- Sierra, M., Vargas, C., Bobadilla, K., & Aztatzi, O. (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*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73283>
- Sigma Aldrich. (2018). *SOD Determination Kit*.
- Sigma Aldrich. (2020). *In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based*. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/tox7bul.pdf>
- Skuland, T., Låg, M., Gutleb, A. C., Brinchmann, B. C., Serchi, T., Øvrevik, J., Holme, J. A., & Refsnes, M. (2020). Pro-inflammatory effects of crystalline- And nano-sized non-crystalline silica particles in a 3D alveolar model. *Particle and Fibre Toxicology*, 17(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00345-3>
- Sociedad Ecuatoriana de Pediatría. (2007). *Guía práctica para el Manejo de Enfermedades Agudas producidas por la Ceniza Volcánica*. 8(2), 59–77. https://issuu.com/sep-pichincha/docs/vol.8_no.2-2007/62
- Strickler P., A., Lagos K., M. I., & González M., B. (2006). Deficiencia congénita de complemento: C3 y C4. Comunicación de un caso clínico. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 22(2), 119–125. <https://doi.org/10.4067/s0717->

73482006000200008

- 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>
- Tharmalingam, S., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Lemire, J., & Appanna, V. D. (2017). Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biological Chemistry*, *398*(11), 1193–1208. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0152>
- Tomašek, I., Horwell, C. J., Bisig, C., Damby, D. E., Comte, P., Czerwinski, J., Petri-Fink, A., Clift, M. J. D., Drasler, B., & Rothen-Rutishauser, B. (2018). Respiratory hazard assessment of combined exposure to complete gasoline exhaust and respirable volcanic ash in a multicellular human lung model at the air-liquid interface. *Environmental Pollution*, *238*, 977–987. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.115>
- Toulkeridis, T., & Zach, I. (2017). Wind directions of volcanic ash-charged clouds in Ecuador – implications for the public and flight safety. *Geomatics, Natural Hazards and Risk*, *8*(2), 242–256. <https://doi.org/10.1080/19475705.2016.1199445>
- Trinidad, S., & Concha, I. (2018). Estructura y funciones del sistema respiratorio. *Neumología Pediátrica*, *13*(3), 101–106. https://www.neumologia-pediatrica.cl/wp-content/uploads/2018/10/3_estructura.pdf
- Troncoso, L., Bustillos, J., Romero, J. E., Guevara, A., Carrillo, J., Montalvo, E., Izquierdo, T., Troncoso¹, L., & Bustillos¹, J. (2017). Hydrovolcanic ash emission

between August 14 and 24, 2015 at Cotopaxi volcano (Ecuador): Characterization and eruption mechanisms. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 14, 228–241. <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2017.05.032>

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(11), 2563–2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>

Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S24–S32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>

Twigg, H. (2015). Antibody-Mediated Lung Defenses and Humoral Immunodeficiency. In J. Elias, R. Kotloff, J. Fishman, A. Pack, & R. Senior (Eds.), *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders* (Fifth, pp. 303–317). <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201506-336OT>

Unno, H., Futamura, K., Morita, H., Kojima, R., Arae, K., Nakae, S., & Ida, H. (2014). *Silica and Double-Stranded RNA Synergistically Induce Bronchial Epithelial Apoptosis and Airway Inflammation*. 51(3), 344–353. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0281OC>

Vallejo, S. (2011). *Distribución de Cenizas Volcánicas Holocénicas-Tardías en la costa del Ecuador*. Escuela Politécnica Nacional.

Vallyathan, V., Robinson, V., & Reasor, M. (1984). Comparative in vitro cytotoxicity of volcanic ashes from mount st. Helens, el chichon, and galunggung. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 14(5–6), 641–654. <https://doi.org/10.1080/15287398409530614>

- Vega, G. (2008). Inflamación. In *Rev Fac Med UNAM* (Vol. 51). www.medigraphic.com
- Voicu, S., Balas, M., Stan, M., Trică, B., Serban, A., Stanca, L., Hermenean, A., & Dinischiotu, A. (2019). Amorphous Silica Nanoparticles Obtained by Laser Ablation Induce Inflammatory Response in Human Lung Fibroblasts. *Materials*, *12*(7), 1026. <https://doi.org/10.3390/ma12071026>
- Whitsett, J. A., Kalin, T. V., Xu, Y., & Kalinichenko, V. V. (2019). Building and Regenerating the Lung Cell by Cell. *Physiological Reviews*, *99*(1), 513–554. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2018>
- Wilson, M. R., Stone, V., Cullen, R. T., Searl, A., Maynard, R. L., & Donaldson, K. (2000). In vitro toxicology of respirable Montserrat volcanic ash. In *Occup Environ Med* (Vol. 57). www.occenvmed.com
- Wu, J., Han, Y., Zou, X., Zhu, K., Wang, Z., Ye, X., Liu, Y., Dong, S., Chen, X., Liu, D., Wen, Z., Wang, Y., Huang, S., Zhou, Z., Zeng, C., Huang, C., Zheng, S., Du, X., Huang, X., ... Yang, G. (2019). Silica nanoparticles as an enhancer in the IL-1 β -induced inflammation cycle of A549 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *41*(2), 199–206. <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1569046>
- Yano, E., Takeuchi, A., Nishii, S., Koizumi, A., Poole, A., Brown, R., & Johnson NF, Evans PH, Y. Y. (1985). In vitro biological effects of volcanic ash from Mount Sakurajima. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *16*, 127–135.
- Yu, M., Zheng, X., Witschi, H., & Pinkerton, K. (2002). The Role of Interleukin-6 in Pulmonary Inflammation and Injury Induced by Exposure to Environmental Air Pollutants. *Toxicological Sciences*, *68*(2), 488–497. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.2.488>

- Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27–37.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, L., Wang, X., Cueto, R., Effi, C., Zhang, Y., Tan, H., Qin, X., Ji, Y., Yang, X., & Wang, H. (2019). Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biology*, 26. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>