

UCH-FC
Biotecnología
H518
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO
PARA EVALUAR LA RESPUESTA TOXICOLÓGICA
PULMONAR PRODUCIDA POR EXTRACTOS ORGÁNICOS
DE MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO TRATADO
CON METANOL USANDO RATAS COMO MODELO DE
ESTUDIO.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Andrés Henríquez Coria



Director de Seminario de Título: Dr. Claudio Hetz Flores

Co- Directores de Seminario:

Dr. Pablo Ruiz R.

Dr. Pedro Oyola T

Septiembre 2009
Santiago - Chile



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO
2009**

ANDRÉS RUBÉN HENRÍQUEZ CORIA

**“IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA EVALUAR LA RESPUESTA
TOXICOLÓGICA PULMONAR PRODUCIDA POR EXTRACTOS ORGÁNICOS
DE MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO TRATADO CON METANOL
USANDO RATAS COMO MODELO DE ESTUDIO”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Claudio Hetz Flores
Director Seminario de Título

Co- Directores Seminario de Título

Dr. Pablo Ruiz Rudolph

Dr. Pedro Oyola Tapia

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente Comisión

Dra. Marta Adonis Parraguéz
Correctora





Nací en Maipú el año 1985, los primeros cinco años de mi vida viví en esta comuna, plagada de buenos recuerdos, inocencia y muchos juegos. Luego con mis padres nos mudamos a Puente Alto, donde transcurrió la mayoría de mi educación básica y toda mi educación media, en el colegio "El Sembrador", ahí aprendí la importancia del estudio, del sacrificio y del trabajo. Luego, gracias a la formación y consejos de mi familia ingresé a la Universidad De Chile donde conocí personas, que sentían las mismas inquietudes que yo. Al terminar el periodo de asignaturas contacté al Doctor Claudio Hetz que me recomendó hacer un seminario aplicado al área ambiental. En este informe se muestran los resultados de este proceso.

"You can fight, without ever winning
but never ever win, without a fight"

RUSH

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al Dr. Claudio Hetz, que confió en mí para desarrollar éste seminario. Del mismo modo agradezco al Dr. Pablo Ruiz por sus consejos y enseñanzas. Agradezco también al numeroso grupo de trabajo del laboratorio de estrés celular y biomedicina: Diego Rojas, Fernanda Lisbona, Gabriela Martínez, Pamela Valdez, Soledad Matus, Melissa Calegaro, Sebastián Zamorano, Luis Gómez, Cristian León, Mauricio Torres, Vicente Valenzuela, Danny Galleguillos y Alexis Martínez por su apoyo, consejos, enseñanzas y la integración que me han dado, que han hecho muy agradable este último año. También agradezco a CONAMA por el financiamiento entregado y a los integrantes de Centro Mario Molina: Pablo Ruiz, Álvaro Ruiz, Gianni López, Pedro Oyola, Jorge Cáceres, Romina Guzmán, Paula Reyes y Claudia Toro, que me aceptaron y ayudaron en mi periodo de seminario.

También quiero agradecer a las personas que alegraron mi estadía en la Universidad especialmente Vicente Oviedo, Mauricio Bustamante, Néstor Plaza y Felipe Espinoza que más que compañeros se convirtieron en mis amigos. También agradecer a todos mis compañeros de la carrera que sin mencionar sus nombres reconozco, aprecio y respeto. Finalmente quiero agradecer a mi familia, a los que están y los que dejaron de estar, todos ellos marcaron en mí importantes reflexiones y fueron influyentes en mis decisiones, sobre todo a mi familia cercana, mi madre Rosa Coria, mi padre José Henríquez y mi hermana Carolina Henríquez.



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
Contaminación Atmosférica	1
Cotaminación y sus efectos en la salud humana.....	4
Toxicidad del MP	6
<i>Uso de animales y evaluación toxicológica:</i>	6
<i>Evaluación experimental del potencial toxicológico del MP:</i>	7
<i>Efectos tóxicos:</i>	7
<i>Toxicidad y componentes del MP:</i>	10
Situación de Santiago	11
<i>Mortalidad y morbilidad en Chile</i>	11
<i>Evidencia toxicológica:</i>	13
<i>Necesidad de realizar una evaluación toxicológica en Santiago:</i>	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Aproximación general.....	18
<i>Descripción de la muestra control:</i>	20
<i>Descripción de los sustratos (EPUs):</i>	20
Descripción del muestreador:	22
<i>Limpieza de las EPUs:</i>	22
<i>Extracción de muestras de material particulado:</i>	24
Evaluación de la toxicidad del MP en ratas	25
<i>Descripción del modelo de estudio:</i>	25
<i>Instilación del MP</i>	25
<i>Lavado broncoalveolar:</i>	27
<i>Conteo Celular:</i>	27
<i>Preparación de muestras para mediciones enzimáticas y proteicas:</i>	28
Diseño experimental:.....	29
Análisis de datos y estadística	31
RESULTADOS	32
Rendimiento de extracción	34
<i>Optimización de número de lavados:</i>	35

<i>Dosis respuesta, cantidad de MP instilado:</i>	36
<i>Tiempo pot-instilación</i>	38
<i>Respuesta frente al DS en las condiciones optimizadas:</i>	40
<i>Relación entre los marcadores de toxicidad evaluados:</i>	42
<i>Variabilidad:</i>	44
Evaluación toxicológica de muestras ambientales.....	46
<i>Inocuidad del sustrato de colección:</i>	46
<i>Marcadores de toxicidad e inflamación para las muestras obtenidas del aire de Santiago</i>	49
DISCUSIÓN	52
Implementación de un método toxicológico	52
Medición de muestras ambientales del aire de Santiago	55
Proyecciones	56
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59





INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación del material particulado dependiendo de su diámetro aerodinámico.....	3
Figura 2. Esquema de los órganos y fenómenos biológicos afectados por el ingreso del material particulado a los pulmones.....	8
Figura 3. Pasos experimentales en la preparación de muestras de MP y su instilación en ratas	19
Figura 4. EPU con MP colectado.....	21
Figura 5. Imagen esquemática del muestreado en cascada utilizado.....	23
Figura 6. Ingreso de una solución de azul de tripan a los pulmones mediante la instilación intratraqueal.....	26
Figura 7. Optimización del número de lavados broncoalveolares.....	35
Figura 8. Curva de dosis respuesta.....	37
Figura 9. Magnitud de las respuestas al variar el tiempo post-instilación.....	39
Figura 10. Magnitud de las respuestas comparando ratas tratadas con DS utilizando los parámetros optimizados versus ratas controles.....	41
Figura 11. Relación entre las magnitudes entregadas por los marcadores al variar la dosis de MP instilado.....	43
Figura 12. Comparación de la desviación estándar entre las ratas tratadas con los parámetros óptimos y las ratas tratadas con la muestra control (NaCl 0,9%).....	45
Figura 13. Comparación entre ratas controles (NaCl 0,9%) y ratas tratadas con la solución obtenida desde una EPU limpia.....	48
Figura 14. Comparación de la respuesta tóxica e inflamatoria producida por el material particulado atmosférico fino y grueso proveniente de Santiago.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Población, mortalidad diaria y concentraciones ambientales de contaminantes (ppb) por ubicación de la estación de monitoreo.....	12
Tabla 2. Diseño experimental.....	30
Tabla 3. Resumen de los resultados.....	33
Tabla 4. Pesos y rendimientos al extraer el MP.....	34



ABREVIATURAS

EPU	Espuma de poliuretano
MP	Material particulado
DS	Hollín de Diesel (Diesel soot)
LBA	Lavado broncoalveolar
FLBA	Fluido del lavado broncoalveolar
LDH	Lactato Deshidrogenasa
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
IL-6	Interleukina 6
EEUU	Estados Unidos
MP10	Material particulado con un diámetro aerodinámico menor a 10 micrómetros
MP2,5	Material particulado con un diámetro aerodinámico menor a 2,5 micrómetros
EOMPTM	Extractos orgánicos de material particulado tratado con metanol
CAPs	Concentrador de partículas
U.A.	Unidades arbitrarias
10 ⁴	10.000
NaCl	Cloruro de Sodio
mmHg	milímetros de mercurio
NIST	National institute of standards and technology
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
EPOC	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas

RESUMEN

Se sabe que la contaminación atmosférica afecta la salud humana y produce un aumento de la mortalidad y la morbilidad por enfermedades respiratorias. En Santiago de Chile esto se manifiesta, principalmente, a las altas concentraciones de material particulado que han generado un problema de salud pública.

Estudiar la toxicidad del MP es de interés porque puede determinarse la toxicidad relativa del MP de Santiago respecto a otras ciudades. También se puede evaluar la efectividad de diversas acciones regulatorias.

En el presente trabajo fue implementado un método de medición de la toxicidad de extractos orgánicos de material particulado tratado con metanol (EOMPTM) usando ratas, que consiste en tres pasos. Primero, la colección del material utilizando un muestreador especial con un flujo de 30 litros por minuto, que utiliza espumas de poliuretano para la colección de material particulado. Además es capaz de separar la fracción gruesa de la fracción fina. Segundo, la muestra de material particulado fue extraída y las ratas fueron expuestas a dichos extractos. Y tercero, la respuesta frente a EOMPTM fue evaluada midiendo proteína total, LDH (lactato deshidrogenasa) y conteo celular en los pulmones de las ratas. El método fue optimizado para encontrar parámetros experimentales adecuados usando una muestra de extractos orgánicos de MP estándar extraído con metanol. Se encontró que una dosis de 1 mg de extractos orgánicos de material particulado estándar extraído con metanol por rata y un tiempo de post-instilación de 24 horas maximizan las respuestas. Con estos parámetros se obtuvo un aumento aproximado de dos veces para los marcadores proteínas totales y LDH; y un aumento de 4 veces para el marcador conteo celular, al comparar ratas

tratadas y ratas controles. Finalmente fue evaluada la toxicidad de extractos orgánicos de muestras de material particulado ambiental de Santiago extraído con metanol con las condiciones previamente optimizadas. La instilación de estas muestras fue capaz de generar respuestas tóxicas para todos los marcadores, el potencial tóxico del material fino fue alrededor de dos veces comparado con el material grueso. Finalmente se concluye que el método implementado es útil para evaluar la toxicidad pulmonar producida por EOMPTM ambiental usando ratas como modelo experimental.

ABSTRACT

It is well known that atmospheric pollution affects human health and leads to an increase in mortality and morbidity because of pulmonary illness. In Santiago, Chile, this has become apparent mainly due to the high particulate matter (PM) concentration which is creating a big health impact on the people.

By studying the PM toxicity is very relevant because it can be used to determine whether Santiago's PM is as toxic as in other cities. Also it can be used to evaluate the effectiveness of regulatory actions.

In this study, it was implemented a method to measure the toxicity of organic extracts of methanol treated PM (OEMTPM) in rats. This method consists in three steps. First of all, the PM collection was done using a special sampler that works with a flow of 30 liters per minute and using polyurethane foams to collect the particulate material. Furthermore, it's possible to separate coarse from fine fractions. Secondly, the PM sample is extracted and rats are exposed to it. And thirdly, the response to OEMTPM was assessed by measuring proteins LDH (Lactate Dehydrogenase) and number of cells in the rat lungs. The method was optimized to find suitable experimental parameters using organic extracts of a standard PM sample. We have found that a dose of 1 mg of OEMTPM and 24 hours as post -instillation time maximized the response. Taking into account these parameters, we have obtained an approximated increase of 2 fold to the total proteins and LDH, and an increase of 4 fold to number of cells, when we compared the treated versus untreated rats. Finally, we have assessed the toxicity of ambient samples of OEMTPM collected in Santiago using the parameters previously optimized. The instillation of these samples was sufficient to generate toxic

response for all markers and the toxic potential of fine PM was approximately two fold the response produced by coarse PM. We have concluded that the implemented method is useful to assess the pulmonary toxicity produced by ambient O₃ and PM_{2.5}, using rats as experimental model.

INTRODUCCIÓN

En Santiago de Chile como en muchas urbes en el mundo, el tema de la contaminación ambiental ha sido por décadas un tema relevante. Esto se debe a un aumento importante en la emisión de contaminantes producto, principalmente, del desarrollo industrial y económico (CONAMA, 2004). El gran interés de la población general y autoridades sobre este tema, está basado en los efectos en salud y medio ambiente que produce la exposición a estos contaminantes (Morales, 2006).

Contaminación Atmosférica

El Material Particulado (MP) corresponde a las partículas en fase sólida o líquida que se encuentran en la atmósfera. La clasificación más ampliamente utilizada corresponde al diámetro aerodinámico. Una partícula con un diámetro aerodinámico "X" se moverá en un gas como una esfera de diámetro "X" de densidad igual a un gramo por centímetro cúbico.

El MP₁₀ corresponde a las partículas con un diámetro aerodinámico menor a 10 µm, mientras que el MP_{2,5} corresponde a las partículas con un diámetro aerodinámico menor a 2,5 µm. El interés en estudiar estas partículas viene dado, en parte, por el hecho de que las partículas con un diámetro menor a 10 µm son inhalables quedando retenidas en las zonas altas (zona torácica) y bajas del sistema respiratorio. Las partículas que poseen un diámetro aerodinámico menor a 2,5 µm, al ser aún más

pequeñas son respirables e ingresan en su totalidad a zonas más profundas del sistema respiratorio donde se produce el intercambio gaseoso.

También, existen fracciones que corresponden a conjuntos de partículas que tienen un tamaño dentro de un rango de diámetros. La fracción gruesa contiene a las partículas con un diámetro aerodinámico menor a $10\ \mu\text{m}$ y mayor a $2,5\ \mu\text{m}$. En cambio la fracción fina contiene a las partículas con un diámetro aerodinámico menor a $2,5\ \mu\text{m}$ y mayor a $0,1\ \mu\text{m}$ (Fig. 1).

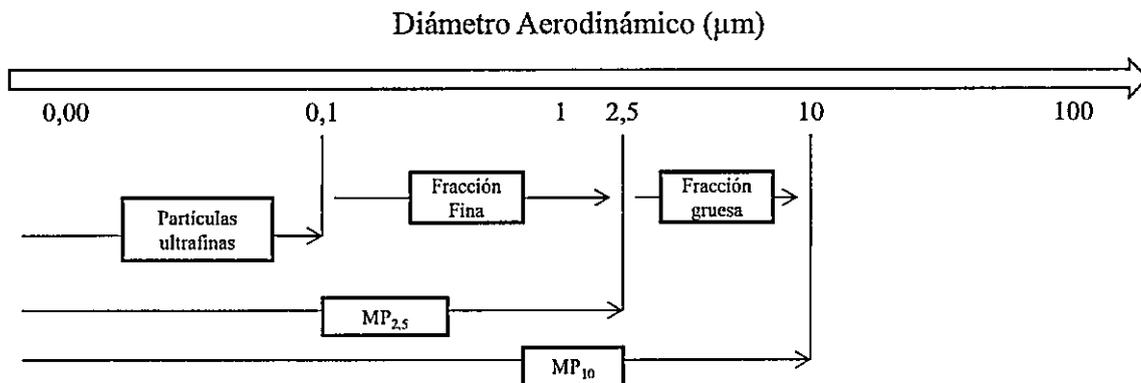


Figura 1: Clasificación del material particulado dependiendo de su diámetro aerodinámico: Se define la fracción gruesa como las partículas con un diámetro aerodinámico contenido entre 10 μm y 2,5 μm y la fracción fina como las partículas con diámetro aerodinámico contenido entre 2,5 μm y 0,1 μm
 Figura Adaptada desde Luftforurening med Partikler- et sundhedsproblem (2007) Denmarks Miljoundersogelser, Aarhus Universitet, forfatternr og Forlaget Hoveland

El MP también puede clasificarse de acuerdo al origen, en este sentido existen emisiones naturales y emisiones provocadas por actividades humanas. Entre las fuentes naturales se destacan los volcanes, los bosques y el rocío del mar. Las fuentes de origen humano generan MP, mayormente, debido a la quema de combustibles fósiles. En este caso las fuentes pueden ser fijas o móviles, entre las fuentes fijas, se destacan las quemas agrícolas, domiciliarias y emisiones industriales, como plantas generadoras de electricidad y fundiciones. Entre las fuentes móviles destacan los vehículos a gasolina o diesel, como los emisores más importantes.

Las emisiones de MP, pueden ser primarias y secundarias. Las emisiones primarias son liberadas a la atmósfera directamente como partículas, mientras que las secundarias son aquellas que se forman en la atmósfera mediante reacciones químicas a partir de precursores gaseosos emitidos por las fuentes. Un ejemplo típico de emisiones secundarias es el sulfato particulado, que se forma en la atmósfera a partir de emisiones de dióxido de azufre gaseoso (Schlesinger y Cassee, 2003).

Contaminación y sus efectos en la salud humana.

Estudios epidemiológicos hechos en las últimas décadas sugieren un nexo entre el aumento en la concentración de material particulado con el aumento de la mortalidad y la prevalencia de enfermedades respiratorias en la población (Dockery y Pope, III, 1994; Ostro y col., 1996; Pope, III y col., 1992). Existen casos extremos que confirman estas observaciones, como la "niebla de Londres" producida en Inglaterra en Diciembre

de 1952, donde se estima que las concentraciones de material particulado produjeron la muerte de alrededor de 4000 personas (Bell y col., 2004).

Se ha estimado mediante estudios epidemiológicos que por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento en la concentración del MP_{10} atmosférico, la mortalidad total de la población aumenta en un 1%, mientras que la mortalidad producida por enfermedades respiratorias aumenta en un 3,4% (Dockery y Pope, III, 1994). Además, se han registrado asociaciones que proponen la existencia de grupos humanos más susceptibles a la acción tóxica del MP, como son los niños y los ancianos. También otros grupos susceptibles al impacto no necesariamente pulmonar del MP son los recién nacidos, enfermos diabéticos e hipertensos (O'Neill y col., 2005; Ha y col., 2003).

Estas investigaciones (Dockery y Pope, III, 1994; Pope, III y Dockery, 2006) han entregado evidencias para normar la concentración del MP_{10} , $\text{MP}_{2,5}$ y de otros contaminantes. Por ejemplo, la EPA (La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) posee normas para 7 contaminantes atmosféricos contenidas en su criterio de calidad del aire ambiental (National Ambient Air Quality Standards (NAAQS)): MP_{10} , $\text{MP}_{2,5}$, monóxido de carbono, plomo, dióxido de nitrógeno, ozono y dióxido de azufre. En Estados Unidos (E.E.U.U.) la norma de 24 horas de MP_{10} corresponde a una concentración máxima de $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$. El estándar 24 horas de $\text{MP}_{2,5}$ corresponde a una concentración máxima de $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y como promedio anual a $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En Chile sólo está normado el MP_{10} y la norma es la misma que posee E.E.U.U.

Toxicidad del MP

Debido a los hallazgos epidemiológicos es de sumo interés estudiar los efectos del MP en un modelo experimental controlado. Estudios con humanos en este sentido son muy complejos, y es por esto que el uso de modelos animales se utiliza para acceder a información cuantitativa sobre el efecto del MP en la salud.

Uso de animales y evaluación toxicológica: Las evaluaciones toxicológicas en animales son de mucha utilidad para aclarar los mecanismos involucrados en el daño producido al sistema respiratorio por exposición al MP. Por ejemplo, en nuestro país se han utilizado animales de experimentación, como ratas, ratones y perros (Gil y Adonis, 1996; Gonzalez y col., 2006; Villarroel y col., 1999). La rata es un modelo ampliamente utilizado y validado para estudios en el sistema respiratorio. Entre sus ventajas como modelo se encuentran la velocidad de reproducción, la reproducibilidad de las respuestas, la facilidad de manejo y muchas similitudes fisiológicas con el ser humano que luego resultan convenientes para extrapolar las respuestas observadas a seres humanos.

La evaluación del potencial toxicológico del MP puede realizarse a través de experimentos *in vivo* (modelos animales), *ex vivo* (modelos de cultivos celulares) e *in vitro*. Los experimentos de exposición a largo plazo son apropiados para representar mejor una respuesta crónica, usando comúnmente un ambiente con concentraciones elevadas de MP. Los experimentos a corto plazo, son más accesibles metodológicamente y permiten la evaluación de la toxicidad de una determinada muestra en un tiempo corto, imitando una respuesta aguda.

Para las evaluaciones *in vivo*, existen variados métodos de exposición del MP, donde los más comúnmente utilizados son la instilación intratraqueal (Brain y col., 1976) y el uso de CAPs o Concentradores de Partículas (Ghio y Huang, 2004). La instilación intratraqueal consiste en introducir una muestra líquida que contiene MP resuspendido, a los pulmones. Los CAPs generan una atmósfera enriquecida en partículas respirables para el animal, dado que utilizan una cámara hermética donde el animal es expuesto de manera aguda o sub-crónica (Ghio y Huang, 2004).

Evaluación experimental del potencial toxicológico del MP: Una aproximación para estudiar muestras atmosféricas es acumular MP en un sustrato adecuado, luego hacer una extracción con algún solvente, después resuspenderlo y luego inyectarlo en las vías respiratorias de las ratas. La introducción del MP en las vías respiratorias se conoce como instilación intratraqueal.

Efectos tóxicos: Basado en evidencia experimental, se ha descrito que la exposición pulmonar aguda y crónica al MP podría generar variadas vías de daño tisular en distintos órganos (Pope y Dockery, 2006) (Fig. 2).

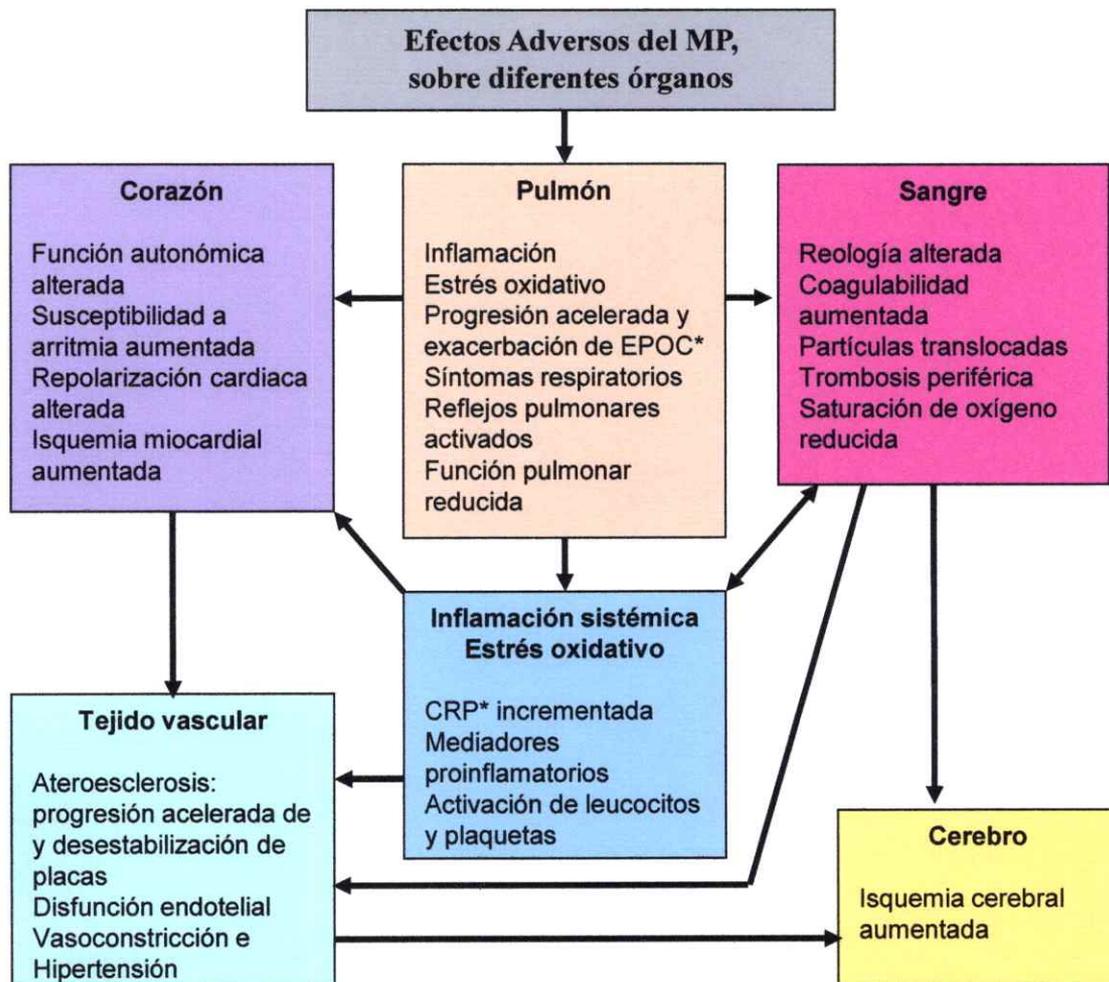


Figura 2: Esquema de los órganos y fenómenos biológicos afectados por la exposición al material particulado: La primera vía de contacto del MP por inhalación son los pulmones, Pope,C.A., III and Dockery,D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. J. Air Waste Manag. Assoc. 56, 709-742.
 * EPOC: Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. CRP: Proteína C- reactiva

Entre estas se destacan la inflamación local y el estrés oxidativo en el tejido afectado. Al entrar el MP en el sistema respiratorio, es común observar la aparición de algún marcador o sustancia biológica que, como consecuencia del deterioro celular, aumenta sus niveles en el sistema. Para evaluar la toxicidad aguda es común la medición de marcadores como la LDH (Lactato Deshidrogenasa). La LDH es una enzima citoplasmática, que gracias a su estabilidad en el medio extracelular, puede ser cuantificada y es un indicador de la destrucción de la membrana celular (Grossblatt, 1989). Cuando una célula se destruye, sus componentes citoplasmáticos, entre estos la LDH, pueden detectarse en el medio extracelular. También la determinación de proteínas totales en el medio extracelular es un indicador del daño celular en el tejido pulmonar (Biologic Markers in Pulmonary Toxicology, 1989). Cuando una célula se destruye el contenido celular interno, enriquecido en proteínas es detectable en el medio extracelular. Este marcador ha sido propuesto como una medida de la permeabilidad endotelial pulmonar en el análisis del lavado broncoalveolar de ratas instiladas con MP_{10} (Li y col., 1997). En cuanto a la inflamación, un marcador adecuado corresponde al conteo de la infiltración de células totales del sistema inmune que migran hacia el pulmón (Tzortzaki y col. 2007; Barnes y col. 2006). Debido a la activación de la respuesta inmune innata, leucocitos, y más específicamente macrófagos, migran hacia la zona de daño, aumentando el número de células totales a nivel pulmonar (Li y col., 1999).

En el caso del estrés oxidativo, se ha descrito que el aumento en los niveles de marcadores enzimáticos como la catalasa y la superóxido dismutasa en pulmones de ratas expuestas a MP, correlaciona con la infiltración de macrófagos al tejido pulmonar (Barnard y col., 1993). A nivel molecular se ha sugerido que los radicales libres

generados por el estrés oxidativo en el tejido pulmonar llevan a la muerte celular, aumentando la permeabilidad del epitelio pulmonar (Ayres y col., 2008).

Toxicidad y componentes del MP: Se ha planteado que los diferentes componentes del MP como metales, nitratos y sulfatos (Ghio y col., 1997) producirían distintas respuestas tóxicas (Kodavanti y col., 1997) y se han propuesto posibles mediadores moleculares del daño celular o citotoxicidad. En este sentido se ha sugerido que compuestos, como los sulfatos y los nitratos, son poco reactivos y no producirían gran daño (Schlesinger y Cassee, 2003) mientras que otros compuestos, como los HAPs (Hidrocarburos policíclicos aromáticos) (Adonis y Gil, 2000; Gil y Adonis, 1996), y los metales tendrían una contribución directa en la toxicidad del MP (Campen y col., 2001; Kodavanti y col., 1998; Nadadur y Kodavanti, 2002; Rice y col., 2001; Adonis y Gil, 2000). Experimentos que analizan el lavado broncoalveolar de ratas intratraquealmente instiladas con muestras de MP estándar, indican una relativa importancia de metales como el níquel y el vanadio en la toxicidad pulmonar (Donaldson y col., 2003). Así lo demuestran ensayos donde se evaluaron marcadores como la LDH, la NAG (N-acetil glucosaminidasa) y la hemoglobina total (Nadadur y Kodavanti, 2002; Kodavanti y col., 1998; Campen y col., 2001). Los metales de transición han sido propuestos como los principales causantes del daño toxicológico a nivel celular en los pulmones y otros órganos (Wolterbeek y col., 2001). Estudios *in vitro* han demostrado una gran capacidad oxidativa de iones de metales en el MP (Ayres y col., 2008).

Además de la composición, también se ha documentado la toxicidad diferencial producida por material fino y grueso. A nivel fisiológico, el material particulado de

menor tamaño produciría una disminución de la capacidad pulmonar debido a que ingresa más profundamente en el sistema respiratorio. En este lugar no existen mecanismos eficientes de limpieza pulmonar (Lippmann y col., 1980; Hinds 1998) y justamente es donde se realiza el intercambio gaseoso.

Situación de Santiago

Santiago se emplaza en una cuenca delimitada geográficamente por la cordillera de la costa al poniente, la angostura de Paine al sur, el cordón de Chacabuco al norte y la Cordillera de Los Andes al oriente, las que obstaculizan la dispersión de contaminantes atmosféricos. Por otro lado, la alta emisión de contaminantes y fenómenos climatológicos como la vagüada costera y la inversión térmica hacen de la capital Chilena una de las ciudades más contaminadas del mundo (World Bank, 2007). Además, la explosión demográfica y el aumento sustancial de las actividades humanas e industrializadas, han aumentado las emisiones de contaminantes a la atmósfera en las últimas décadas (CONAMA, 2004).

Mortalidad y morbilidad en Chile: En Chile se han registrado asociaciones epidemiológicas entre la concentración del MP y la mortalidad en la población. Para Santiago se ha estimado que por cada $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento en el MP_{10} la mortalidad total aumenta en un 0,7%, mientras que la mortalidad producida por enfermedades respiratorias aumenta en un 1,3% (Ostro y col., 1996). Cakmak y col. (2007) en un estudio realizado en Santiago de Chile, encontró un aumento en la mortalidad diaria

estadísticamente significativa para variaciones de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} en meses fríos, mientras que para meses de verano, no se observaron dichas relaciones (tabla 1).

Tabla 1: Población, mortalidad diaria y concentraciones ambientales de contaminantes (ppb) por ubicación de la estación de monitoreo.

Región	Población (10^5)	Muertes no accidentales / día	Muertes cardíacas / día	Muertes respiratorias / día	MP_{10} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Concentraciones promedio de contaminantes		
						O_3	SO_2	CO
Las Condes	5,01	5,17	1,61	0,66	65,02	135,52	9,12	0,92
Cerrillos	8,92	11,22	3,01	1,25	84,81	92,94	12,92	1,15
El Bosque	9,15	11,92	3,15	1,26	86,41	88,02	14,27	1,38
La Florida	13,35	15,52	4,3	1,71	90,22	112,19	13,1	1,43
Independencia	4,21	8,31	2,23	1,1	78,58	89,64	34,06	1,37
Santiago Centro	4,98	8,99	2,83	1,21	82,6	101,72	13,5	1,48
Pudahuel	8,08	8,56	2,08	1,2	91,38	84,94	9,79	1,2
Promedio	53,70 ^a	69,69 ^a	19,21 ^a	8,38 ^a	84,88 ^b	100,13 ^b	14,08 ^b	1,29 ^b

^a Número total sumando los siete centros urbanos. ^b Promedio concentración de contaminantes ponderado por población

Cakmak, S., Dales, R.E., and Vidal, C.B. (2007). Air pollution and mortality in Chile: susceptibility among the elderly. *Environ. Health Perspect.* 115, 524-527.

También, se han registrado asociaciones significativas entre el aumento en la concentración de las fracciones fina y gruesa, y la mortalidad no accidental diaria en Santiago (Cifuentes y col., 2000).

Adicionalmente es sabido que el MP afecta a grupos susceptibles en mayor proporción. Se han hecho mediciones epidemiológicas que relacionan el aumento del MP con un aumento de las visitas médicas y los diagnósticos de enfermedades respiratorias en niños (Ostro y col., 1999; Pino y col., 2004; Potts y col., 2008). También se han encontrado relaciones muy estrechas entre el aumento de la mortalidad en personas ancianas y el aumento en la concentración del MP₁₀ en Santiago (Cakmak y col., 2007).

Respecto a las regulaciones, en Chile se encuentra normado sólo el MP₁₀, la norma es la misma que utiliza USA, pero es sobrepasada frecuentemente. Sin embargo, respecto al MP_{2,5} no existen normativas vigentes a pesar de que ha demostrado ser una de las fracciones más tóxicas (Pino y col., 2004; Schins y col., 2004, Ilabaca y col. 1999).

Evidencia toxicológica: En Chile se han establecido relaciones toxicológicas que asocian las exposiciones al MP con el riesgo de contraer cáncer. Esto se debe parcialmente a los HAPs (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) presentes en las emisiones antropogénicas, que tienen la capacidad de interactuar con el ADN y

producir mutaciones (Adonis y Gil, 2000). Estos estudios utilizan organismos procariontes y eucariontes para evaluar la toxicidad del MP (Gil y col. 2003).

En los últimos años se ha documentado que el MP también podría fomentar la incidencia y agudización de enfermedades que tienen otros orígenes fisiológicos, como son las enfermedades que alteran el funcionamiento respiratorio a través de causas no mutagénicas. La deposición de partículas en las vías respiratorias resultaría en la liberación de mediadores inflamatorios y en el aumento de las especies reactivas de oxígeno que estimulan la liberación de factores inflamatorios sistémicos (Godleski y col., 2000; Tao y col. 2003). También se ha observado una agudización de los síntomas en enfermedades que involucran procesos inflamatorios como el asma, durante periodos de alta concentración de MP (Pino y col., 2004; Bell y col., 2006; Potts y col. 2008; Mackenney y col. 2005).

Necesidad de realizar una evaluación toxicológica en Santiago: En Santiago, la contaminación del aire es un problema que afecta a millones de personas. Actualmente sólo se miden diferentes contaminantes como NO_x , CO_2 , SO_2 , O_3 y entre ellos MP_{10} y del $\text{MP}_{2,5}$ (Red MACAM). Adicionalmente, investigadores chilenos han caracterizado química (Prendez y col. 1984; Toro y Cortes 1997) y biológicamente el MP (Adonis y Gil, 2000), en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Gil y col. 2003)

Es necesario desarrollar modelos para evaluar en forma directa el potencial efecto en salud que genera la exposición al MP, y también determinar que fracciones y componentes son los más nocivos a nivel pulmonar agudo. En esta tesis implementamos un método que permitió evaluar (i) la toxicidad *in vivo* en ratas de una muestra control de extractos orgánicos de MP tratado con metanol (EOMPTM) y (ii) la

toxicidad de muestras de extractos de MP atmosférico tratado con metanol tomadas del aire de Santiago. Este trabajo consistió en montar y evaluar marcadores de toxicidad del sistema respiratorio de ratas expuestas a extractos orgánicos de material particulado tratado con metanol (EOMPTM), además de establecer un método de colección, concentración y administración de estos extractos. Parámetros simples como el daño celular y la infiltración celular fueron monitoreados en los pulmones de animales expuestos a EOMPTM. Por último, los efectos tóxicos e inflamatorios de extractos de la fracción gruesa ($MP_{2,5-10}$) versus la fracción fina ($MP_{0,1-2,5}$) fueron comparados a partir de muestras del aire de Santiago.

El objetivo de esta tesis consiste en el desarrollo de métodos para determinar la toxicidad de uno de los principales contaminantes atmosféricos, el material particulado. Dada la amplitud del tema, en esta introducción se presentarán antecedentes sobre aspectos generales del material particulado, evidencias epidemiológicas y toxicológicas acerca de la acción del material particulado en la salud y finalizará con antecedentes de la ciudad de Santiago y la necesidad evidente de realizar este tipo de estudios.

HIPÓTESIS

La instilación intratraqueal de extractos de material particulado fino, tratado con metanol, proveniente del aire de Santiago produce una respuesta pulmonar tóxica aguda medible en ratas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar una metodología para medir la toxicidad pulmonar aguda en ratas instiladas con extractos orgánicos de material particulado atmosférico extraído con metanol.

Objetivos específicos

- Determinar los parámetros óptimos para la medición de una respuesta tóxica a nivel pulmonar en ratas, de una muestra de material particulado estándar comercial, midiendo marcadores de toxicidad e inflamación.
- Determinar el tiempo de post-instilación óptimo, para detectar una respuesta significativamente mayor en ratas expuestas a extractos orgánicos de MP tratados con metanol que en ratas controles.
- Determinar la dosis de extractos de material particulado tratados con metanol para obtener una respuesta significativamente mayor que las ratas controles en un rango lineal.
- Montar un método que permita coleccionar material particulado en EPU's usando un muestreador que obtiene la fracción fina y gruesa separadamente.
- Evaluar el método de colección de MP y de medición de la respuesta tóxica de extractos de MP tratados con metanol en ratas, comparando dos muestras ambientales de naturaleza distinta colectadas en Santiago.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aproximación general

Para evaluar la toxicidad producida por los extractos orgánicos de MP tratado con metanol (EOMP_{TM}), fueron efectuados dos acercamientos experimentales. El primero consistió en la implementación del método, donde se optimizaron las variables que permitieron encontrar una respuesta medible en ratas tratadas con una muestra estándar comercial de extractos de MP. Después, conociendo las variables adecuadas para la puesta en marcha de los experimentos, fueron evaluadas muestras ambientales obtenidas en Santiago, en esta etapa, además fueron efectuados experimentos de colección y extracción de muestras desde el aire de la capital (Fig 3).

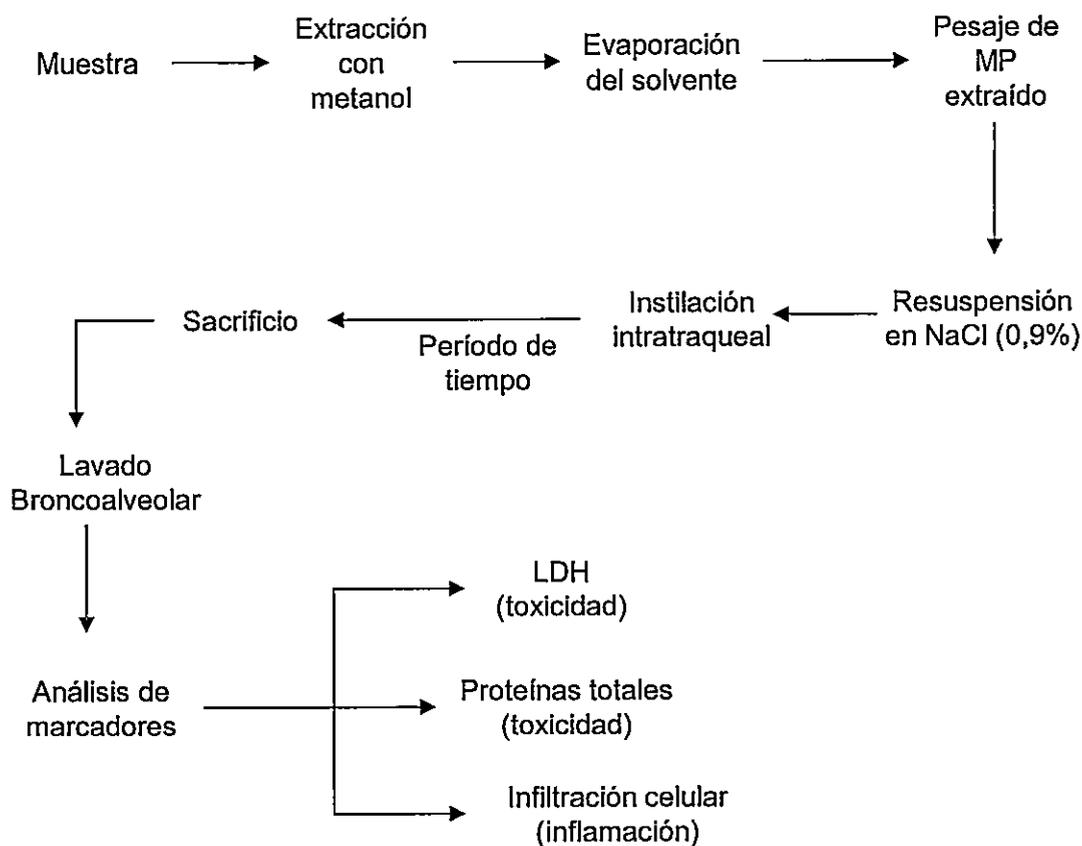


Figura 3: Pasos experimentales en la preparación de muestras de MP y su instilación y análisis en ratas. El esquema resume los pasos necesarios para la obtención de muestras y la realización de ensayos toxicológicos en ratas. El primer paso experimental fue obtener la muestra de MP. Luego el MP fue extraído desde el sustrato usando metanol. Después de evaporarse el metanol, el MP fue resuspendido en NaCl 0.9%, y esta solución fue instilada en los pulmones de las ratas. Las ratas con el MP en sus pulmones fueron sacrificadas y desde el lavado broncoalveolar fueron evaluados marcadores de toxicidad e inflamación.

Descripción de la muestra control: La muestra estándar corresponde al Standard Reference Material® 2975 Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift) del NIST. Esta muestra contiene material particulado colectado desde el tubo de escape de un vehículo diesel liviano. El material particulado de las emisiones diesel se caracteriza por su pequeño tamaño ($MP_{2.5}$) (Mauderly, 2001)

Descripción de los sustratos de colección (Espumas de poliuretano EPUs): La espuma de poliuretano fue escogida como sustrato de retención del material particulado debido a que es un material inerte que no interacciona químicamente con la muestra colectada, (Fig. 4). Las unidades de EPUS fueron instaladas en un muestreador Tox Sampler y el muestreo fue realizado entre el 25 de Junio del 2008 y el 2 de Julio del 2008 en las dependencias del Centro Mario Molina ubicado en la Ciudad Empresarial, Huechuraba, Santiago.

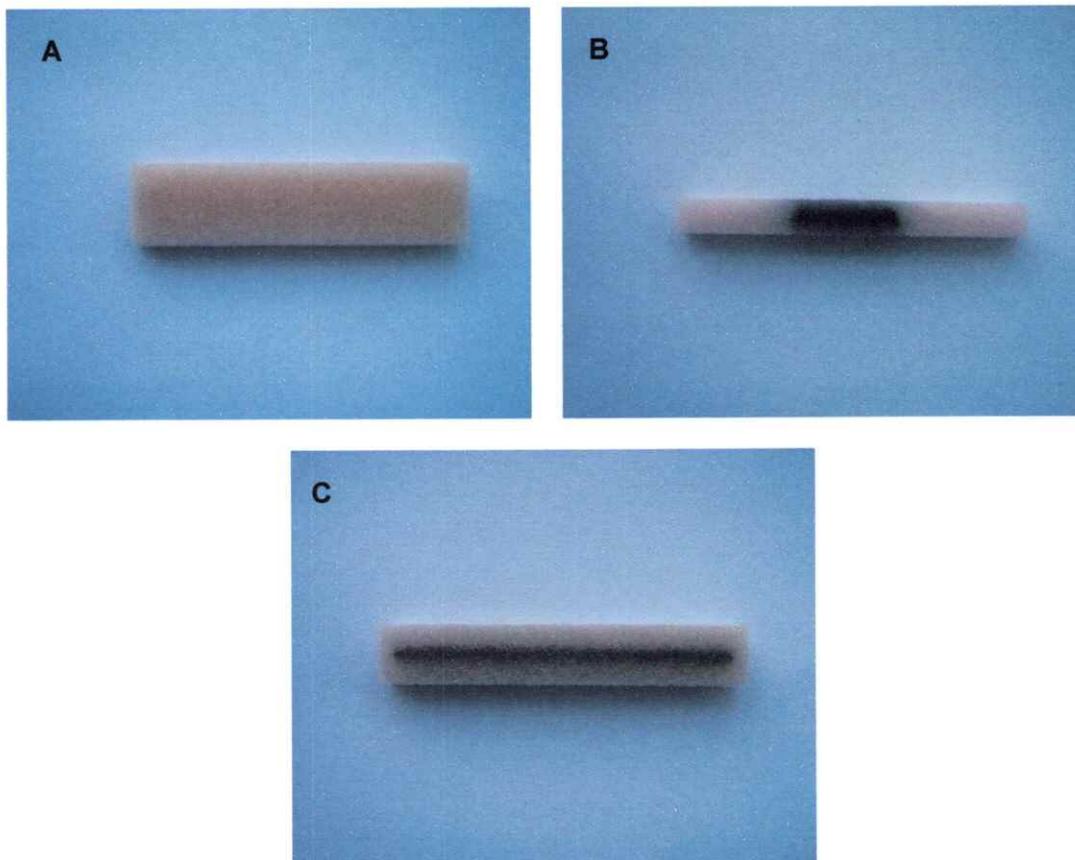


Figura 4: EPU con MP colectado: La espuma de poliuretano (EPU) es un material inerte que no interactúa químicamente con el material particulado colectado. **A)** Una EPU que colecta MP mayor a $10\ \mu\text{m}$, limpio. **B)** Una EPU que colecta material particulado grueso $\text{MP}_{2,5-10}$. **C)** Una EPU que colecta la fracción fina $\text{MP}_{0,1-2,5}$.

Descripción del muestreador: El muestreador (Tox Sampler) (Fig. 5A y B) (Demokritou y col, 2004) consta de 3 partes: el trípode que actúa como soporte del sistema, la bomba que genera un flujo de aire de 40 litros por minuto y los impactadores en cascada (Fig. 5C), que permiten coleccionar material particulado. Estos últimos permiten obtener separadamente en distintas EPU material particulado de radio aerodinámico mayor a 10 micrómetros ($MP > 10$), material particulado grueso que posee un radio aerodinámico entre 10 y 2,5 micrómetros ($MP_{2,5-10}$) y la fracción fina del material particulado que posee un radio aerodinámico entre 2,5 y 0,1 micrómetros ($MP_{0,1-2,5}$).

Limpieza de las EPU: Las EPU o sustratos fueron limpiadas imitando una extracción de MP y manipuladas solo con pinzas. La limpieza fue efectuada con dos solventes, primero con agua nanopura y luego con metanol.

Los materiales de limpieza fueron lavados con metanol para no contaminar las EPU. Los materiales ocupados fueron pinzas sin borde dentado, tijeras de acero y material de vidrio.

El primer lavado fue realizado en agua nanopura efectuando sonicaciones sucesivas de 60 min, 15 min y 15 min. Entre cada sonicación las EPU fueron saturadas con metanol debido a que este solvente es capaz de embeber completamente la superficie del sustrato. El segundo lavado fue realizado con metanol efectuando sonicaciones sucesivas de 60 min y 15 min. Luego de estos pasos, las EPU fueron secadas a 37°C y guardadas a temperatura ambiente en oscuridad.

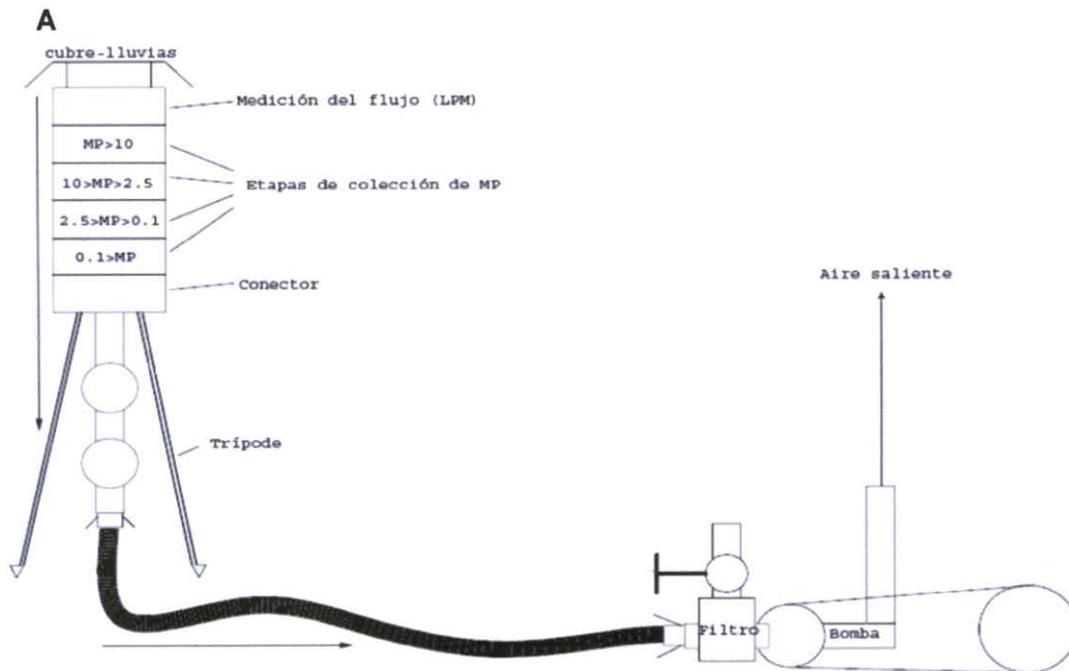


Figura 5: Imagen esquemática del muestreador en cascada utilizado: El muestreador que fue usado, posee como partes fundamentales las siguientes: las etapas de colección del MP que son las encargadas de separar el MP dependiendo de su tamaño, el trípode que es la estructura encargada de dar soporte al muestreador y la bomba que genera un flujo de aire constante que pasa por las etapas de colección del MP. A) Se observan los diversos componentes del muestreador que utiliza las EPU's como el sustrato de colección del material particulado. El sentido del flujo de aire está indicado con flechas (Chemical vol guidance 2004). B) La fotografía del muestreador instalado en las dependencias del Centro Mario Molina. C) Las etapas de colección del MP.

Extracción de muestras de material particulado atmosférico: El MP fue extraído con metanol desde las EPU. Para las muestras de Diesel se siguió el mismo protocolo de extracción de las EPUS.

Los EPU. conteniendo MP fueron retirados del muestreador después de una semana y colocados en una placa de petri cubierta con papel aluminio. Posteriormente se dejaron en condiciones ambientales durante 24 horas, sin tapa, luego dejadas ambientar durante 24 horas (sin tapa). La humedad o la pérdida de material volátil pueden ser factores de variabilidad en los pesajes efectuados, ya que las EPU. no fueron dejadas en desecadores. El contenido de MP en cada EPU fue estimado pesando las EPU. antes y después de la colección de MP. Una vez pesadas, las EPU. fueron cortadas con tijeras limpias, y los trozos fueron resuspendidos en metanol. Las EPU. resuspendidas en metanol fueron sonicadas en un sonicador de baño (50/60 Hz), Astrasonic Ultrasonic Cleaner, durante 30 minutos, a una temperatura inferior a 30°C. Transcurrido el tiempo de sonicación, el MP resuspendido en metanol fue dejado en oscuridad durante el tiempo necesario para evaporar todo el solvente (aproximadamente 24 horas). La pérdida de materia orgánica podría ser parte del error en la evaluación de la oxidadad aguda. Luego las EPU. extraídas fueron guardadas en placas de petri en oscuridad a -80° C para posibles extracciones futuras.

El MP extraído desde la EPU fue pesado en el vaso de precipitado. El MP seco y pesado en el vaso de precipitado fue resuspendido en NaCl 0,9% hasta alcanzar la concentración requerida. Una vez resuspendida, la muestra fue cubierta con papel de aluminio y congelada a -80°C hasta el día del experimento.

Evaluación de la toxicidad del MP en ratas

Descripción del modelo de estudio: Se utilizaron Ratas Sprague Dawley machos de aproximadamente 9 semanas que pesan entre 250 y 270. Las ratas fueron alimentadas con pellet y agua *ad libitum*. Además el peso del animal fue registrado previo a su utilización.

Instilación de los extractos de MP: Las ratas fueron anestesiadas usando isoflurano al 5%, mantenidas con oxígeno durante tres minutos con una presión de 1,5 mmHg en un vaporizador de uso veterinario (Table Top Laboratory Animal System 901806 and Mobile Laboratory Animal anesthesia System 901807/901809; VetEquip, Inc Rev.0703), y luego las ratas fueron posicionadas de manera vertical e instiladas intratraquealmente vía oral con extractos de MP en diferentes dosis para determinar la dosis óptima con la ayuda de una cánula de punta redondeada de medidas 22 G, 3', 1 ¼ mm bola Poper and sons. En todos los experimentos se agregó un volumen total de 0,5 ml por rata.

La visualización de la tráquea, vía oral, fue hecha usando una lámpara de alta potencia, que no calienta la zona iluminada. Para asegurar la introducción traqueal y no esofágica de la solución, se realizó una instilación de prueba con azul de tripan (Fig. 6). Como control, los pulmones fueron teñidos de un color azulado inmediatamente después del momento del sacrificio.



Figura 6: Ingreso de una solución de azul de tripan a los pulmones mediante la instilación intratraqueal. Para validar la correcta entrega del MP a los pulmones de las ratas, una solución de 5 ml de azul de tripan 0,4% fue instilada intratraquealmente en una rata anestesiada. Inmediatamente después, la rata fue sacrificada para examinar sus pulmones. Como se observa en la figura, los pulmones fueron teñidos de color azul debido a la presencia del colorante, validando así el ingreso de las soluciones al sistema respiratorio.

Lavado broncoalveolar: Transcurrido el tiempo post-institación (12, 24 o 48 horas) las ratas fueron anestesiadas con 1 µl de la mezcla ketamina (100 mg/ml) / xilazina (20 mg/ml), en proporciones 2:1 por cada gramo de peso del animal. Luego la zona abdominal fue cortada en forma de U, generando un delantal en el abdomen del animal, que posteriormente fue desplazado hacia arriba. Luego el animal fue exanguinado por la aorta a nivel abdominal y la tráquea fue sostenida con una pinza para exponer la cavidad torácica hasta observar los pulmones y el corazón. Una cánula de punta redondeada fue introducida por la boca hasta la tráquea, luego la tráquea fue ligada con la cánula en su interior. Los pulmones fueron insuflados con 5 ml de NaCl 0,9 % utilizando una llave de tres pasos para evitar la pérdida de fluido. Luego de 1 minuto, un volumen similar o inferior de solución salina enriquecida en extracto pulmonar fue recuperado. Posterior al estudio de optimización de lavado, se realizaron 3 lavados por rata para el resto del estudio. Cada lavado fue analizado separadamente para determinar la concentración de proteínas, el contenido de Lactato Deshidrogenasa y de células totales.

Infiltración Celular: Los FLBA obtenidos fueron agitados vigorosamente en un vortex, y luego una alícuota de 20 µl fue extraída y mezclada con 20 µl de azul de tripan. La solución fue observada al microscopio óptico en una cámara de Neubauer. La infiltración celular total fue expresada en 10^4 células por ml, y calculada como la media aritmética entre los tres conteos provenientes de los FLBA.

Preparación de muestras para mediciones enzimáticas y proteicas: Las muestras de los FLBAs fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto (r.p.m.), durante 5 minutos. Del sobrenadante fueron extraídos 1000 μ l, los que fueron centrifugados nuevamente a 10.000 r.p.m., durante 5 minutos. Desde este segundo sobrenadante fueron colectados 900 μ l y congelados a -80°C para los posteriores análisis de concentración de proteínas y actividad de LDH

Para determinar la concentración de proteínas totales fue usado el kit BCA (Thermos BCA Protein Assay Kit cat: 23225). Una muestra estándar de seroalbumina de bovino (BSA) de concentración conocida fue empleada para generar una curva de calibración. Las concentraciones de proteínas fueron determinadas midiendo la absorbancia a 562 nm. La cantidad total de proteína fue determinada como el cociente entre la suma de la cantidad de proteína (μ g) encontrada en los 3 FLBAs y el volumen total (μ l) de los 3 FLBAs.

Para la determinación de la actividad LDH fue utilizado un kit comercial (BioVision LDH cytotoxicity assay cat: K311-400). Debido a la carencia de un estándar, los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias, correspondientes a la absorbancia por ml determinada en un tiempo fijo de reacción de 30 minutos. Por esta razón fueron utilizados 50 μ l de la mezcla de soluciones disponibles en el kit, más 20 μ l de las muestras. La concentración fue determinada en Unidades Arbitrarias (U.A.) por ml usando un espectrofotómetro capaz de leer placas de ELISA de 96 pocillos, y la absorbancia a 490 nm. La cuantificación total de la LDH fue calculada como el cociente entre la suma de la absorbancia (U.A.) encontrada en los 3 FLBA y el volumen total (ml) de los 3 FLBA.

Diseño experimental:

Para cada experimento independiente, las ratas tratadas y las ratas controles (tratadas con NaCl 0,9%) fueron sacrificadas simultáneamente. Además, los promedios y errores estándar fueron calculados para cada tratamiento. Primero, la cantidad de material particulado a instilar por rata fue optimizada efectuando curvas de dosis respuesta con un tiempo de post-instilación constante. Luego el tiempo post-instilación fue optimizado manteniendo constante la dosis escogida en el experimento anterior. Finalmente, la respuesta de muestras atmosféricas colectadas en Santiago fue evaluada ocupando los parámetros optimizados (Tabla 2)

Tabla 2: Diseño experimental

Experimento	Tipo	Descripción	Grupos
1	Preliminar	Elección del número de lavados a efectuar por rata	2 grupos: Ratas tratadas con 3 mg de DS (N= 2) y 2 ratas controles (N= 2). Tiempo post-instilación de 24 horas
2	Optimización	Curva de Dosis-respuesta	4 grupos: Ratas tratadas con 0,5 mg de DS (N= 6), tratadas con 1 mg de DS (N= 24), tratadas con 3 mg de DS (N= 5) y ratas controles, tratadas sólo con NaCl 0,9% (N= 30). Tiempo post-instilación de 24 horas
3	Optimización	Tiempo post-instilación	3 grupos: Ratas tratadas con tiempos de post-instilación de 12 horas (N= 6), 24 horas (N= 24) y 48 horas (N= 4). Dosis de 1 mg de DS por rata
4	Muestras ambientales	Determinar la inocuidad de las EPU	2 grupos: Ratas tratadas con el volumen extraído desde una EPU limpia (N= 4) y ratas control, tratadas con NaCl 0,9% (N= 30). Tiempo de post-instilación de 24 horas
5	Muestras ambientales	Evaluar la toxicidad de la fracción fina y la fracción gruesa en muestras atmosféricas de Santiago.	3 grupos: Ratas tratadas con la fracción gruesa (N= 3), tratadas con la fracción fina (N= 4) y ratas control, tratadas con NaCl 0,9% (N= 30). Dosis de 1 mg por rata y tiempo de post-instilación de 24 horas

Experimentos de optimización y de análisis de muestras ambientales fueron realizados en este trabajo. Los experimentos de optimización fueron realizados para ajustar las variables que influyen en la determinación de una respuesta tóxica significativa en los pulmones de las ratas. Los experimentos de muestras ambientales fueron realizados para determinar la toxicidad causada por muestras de MP atmosférico colectado en Santiago.

Análisis de datos y estadística

Para determinar las posibles diferencias significativas entre tratamientos fueron usados dos test estadísticos principalmente. La T de student no paramétrico (test de Mann Whitney) con dos colas, para la comparación de dos grupos y el test ANOVA no paramétrico (test de Krustal Wallis), para la comparación entre tres o más grupos. Debido al bajo número de mediciones en cada grupo, no fue posible suponer una distribución normal por lo que utilizamos test no paramétricos. En todos los gráficos los promedios y el error estándar fueron presentados, excepto que se indique lo contrario.

RESULTADOS

El objetivo inicial de este estudio fue definir las condiciones óptimas de medición de la toxicidad del MP en ratas, instiladas con extractos de MP. Fueron evaluados dos variables para obtener una respuesta: (i) La variable cantidad de MP instilado (evaluación dosis respuesta) y (ii) la variable tiempo post-instilación, que corresponde al tiempo que el MP yace en los pulmones hasta el sacrificio de las ratas y posterior análisis del tejido. La respuesta producida por muestras atmosféricas de material fino y material grueso fue evaluada. Todas las magnitudes de las respuestas de los grupos de ratas tratadas en los experimentos preliminares, de optimización y de muestras atmosféricas se encuentran detalladas en la Tabla 3. En esta tabla se puede observar la magnitud de los marcadores analizados al ajustar la dosis y el tiempo post-instilación, la máxima respuesta en un rango lineal fue observada al utilizar 1 mg de extractos de MP y 24 horas como tiempo post-instilación. Además se puede observar la mayor toxicidad producida en ratas tratadas con material particulado atmosférico fino versus ratas tratadas con material particulado atmosférico grueso.

Tabla 3: Resumen de los resultados

Muestra	MP por rata (mg)	tiempo post-instilación (horas)	Número de ratas	promedio y error estándar						
				Proteína (µg/µl)	error estándar proteína (µg/µl)	LDH (U.A./ml)	error estándar LDH(U.A./ml)	(células/ml) E4	error estándar (células/ml) E4	
Optimización Dosis-respuesta	DS	0.0	24	30	0.263	0.028	0.311	0.046	356	56
	DS	0.5	24	6	0.389	0.079	0.482	0.115	496	156
	DS	1.0	24	24	0.582	0.049	0.541	0.065	1370	198
	DS	3.0	24	5	0.773	0.107	0.777	0.101	873	84
Optimización del tiempo post-instilación	DS	1.0	12	6	0.363	0.077	0.467	0.057	401	41
	DS	1.0	24	24	0.582	0.049	0.541	0.065	1370	198
	DS	1.0	48	4	0.279	0.047	0.496	0.099	386	74
respuestas usando parámetros optimizados	DS	0.0	24	30	0.263	0.028	0.311	0.046	356	56
	DS	1.0	24	24	0.582	0.049	0.541	0.065	1370	198
Muestras atmosféricas obtenidas en Santiago	DS	0.0	24	30	0.263	0.028	0.311	0.046	356	56
	Fracción gruesa	1.0	24	3	0.627	0.188	0.446	0.081	417	152
	Fracción Fina	1.0	24	4	0.327	0.068	0.973	0.274	1007	355

Todos los resultados obtenidos se muestran en la tabla como promedio y error estándar de todos los marcadores evaluados en los distintos experimentos. Experimentos de implementación y de muestras atmosféricas fueron ejecutados durante el desarrollo de este trabajo.

Rendimiento de extracción: Con los valores de el peso del MP en la EPU y el peso del MP en el vaso de precipitado fue posible obtener un porcentaje de rendimiento de extracción que fue calculado como (MP en la EPU / MP en el vaso de precipitado) x 100. Todas las mediciones fueron hechas cinco veces, y con esto obtuvimos el error involucrado en cada pesaje (Tabla 4).

Tabla 4: Pesos y rendimientos al extraer el MP

Fracción de MP	MP obtenido en EPU (mg)	MP extraído desde las EPU (mg)	Rendimiento de extracción (%)
PM > 10	1,44	1,34	93,1
2,5 < PM < 10	4,82	3,34	69,3
0,1 < PM < 2,5	9,50	8,64	90,9

El sustrato de colección del MP (EPU) fue pesado limpio, para luego obtener el peso del sustrato sólo. También fue pesado con el MP para obtener el peso del sustrato con la muestra. Para obtener la cantidad de MP colectado, ambos pesos fueron sustraídos. Luego el MP fue extraído usando metanol, y pesado. Entre las cantidades colectadas y extraídas, fue obtenido el rendimiento de extracción presentado en la tabla.

Optimización de número de lavados: Primero cuantificamos la actividad del LDH en dos ratas tratadas durante 24 horas con 3 mg de extractos orgánicos de DS tratado con metanol y dos ratas controles tratadas con NaCl 0.9%. Sólo fueron apreciadas diferencias respecto a los controles entre el primer, segundo y tercer lavado. Entre el cuarto y séptimo lavado, no fueron observadas diferencias notables, definiendo así un total de tres lavado por rata (Fig. 7).

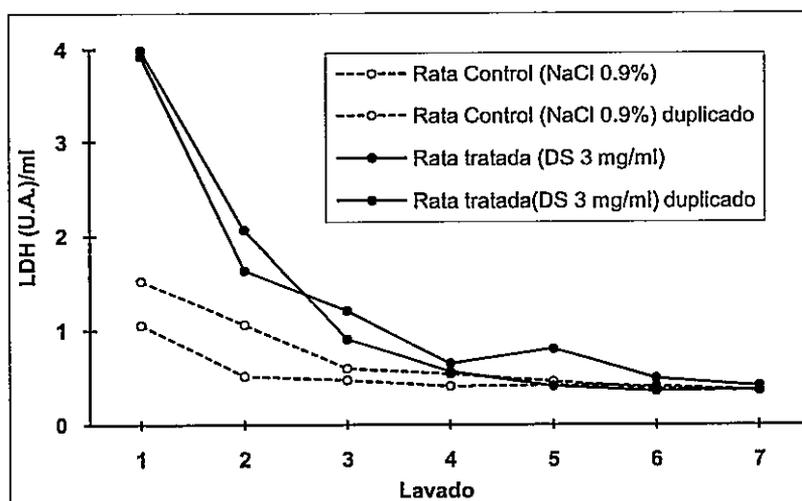


Figura 7: Optimización del número de lavados broncoalveolares.

Diferencias notables, no significativas, para el marcador LDH fueron observadas entre ratas tratadas y ratas controles sólo para los 3 primeros lavados sucesivos. Desde el cuarto al séptimo lavado, las ratas controles y las ratas tratadas entregan respuestas muy parecidas y de baja amplitud donde no fueron observadas diferencias.

Dosis respuesta, cantidad de MP instilado: Cuatro grupos de ratas fueron comparados y tratados con cantidades de extractos orgánicos de DS tratado con metanol de 0 mg (N=30); 0,5 mg (N=6); 1 mg (N=24) y 3 mg (N=5) por un tiempo de post-instilación de 24 horas (Fig. 8). Luego de realizar los lavados broncoalveolares, fueron analizados los niveles de LDH, la concentración de proteínas totales y la infiltración de células.

Una saturación de la respuesta fue observada para los tres marcadores al utilizar 3 mg de extractos de DS instilado por rata (Fig. 8). Las respuestas entre 0 y 1 mg de extractos de DS fueron relativamente lineales, donde la mayor linealidad fue obtenida para el marcador proteínas totales entre la dosis de extractos de DS empleada y la respuesta (Fig. 8A). El marcador LDH también presentó linealidad hasta 1 mg de extractos de DS instilado (Fig. 8B). Sin embargo, la respuesta obtenida al analizar células totales, no presentó la misma cinética que los demás marcadores de toxicidad, con un comportamiento menos lineal. Además, en este caso observamos que la respuesta de infiltración celular obtenida con 3 mg de extractos de DS instilado fue menor que la obtenida con 1 mg de extractos de DS (Fig. 8C).

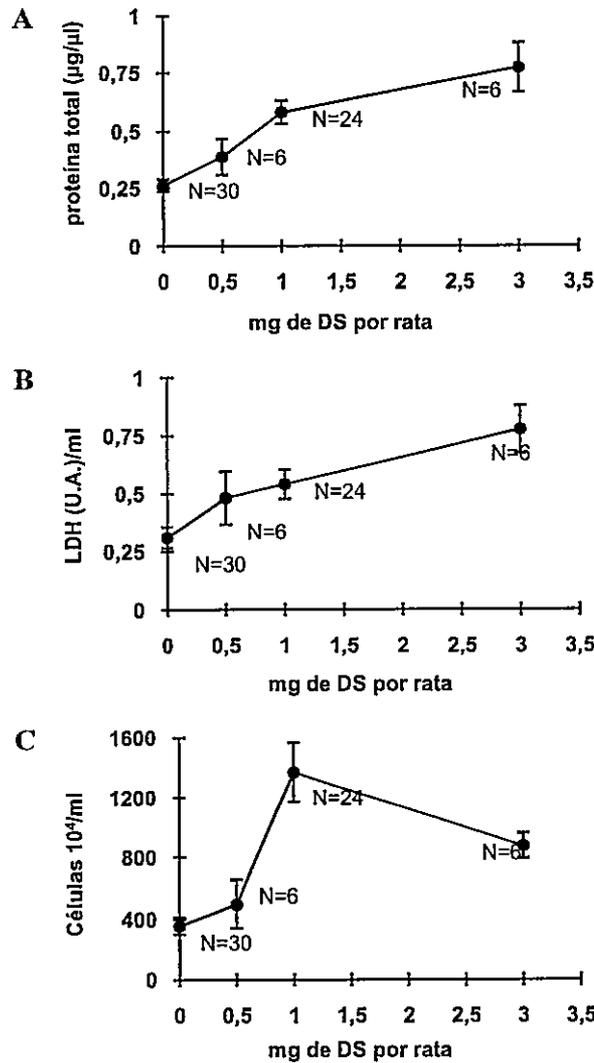


Figura 8: Curvas de dosis respuesta: La respuesta fue evaluada al tratar cuatro grupos de ratas con diferentes cantidades de extractos de DS. Las cantidades de DS instiladas fueron de 0; 0,5; 1 y 3 mg en 500 µl de solución salina por rata. Los volúmenes del lavado broncoalveolar fueron colectados 24 horas después de la instilación. Los gráficos muestran los promedios y errores estándar para cada grupo de ratas.

A) Análisis de la toxicidad como concentración de proteína (µg/µl): La concentración de proteínas fue medida utilizando el método BCA. La concentración fue calculada para cada lavado broncoalveolar y los valores obtenidos para cada volumen fueron promediados. Un R^2 igual a 0,9932 fue obtenido entre 0 y 1 mg de DS, indicando una linealidad entre esas cantidades instiladas.

B) Niveles de la respuesta de LDH (U.A./ml) en el lavado broncoalveolar: Los niveles de la LDH fueron medidos utilizando el kit comercial BioVision LDH cytotoxicity assay. Las absorbancias fueron medidas luego de 30 minutos en oscuridad a 37°C. El valor de las absorbancias fue expresado en unidades arbitrarias por ml (U.A./ml). Un R^2 igual a 0,9267 entre 0 y 1 mg de DS fue obtenido, indicando una linealidad entre esas cantidades instiladas.

C) Comparación de la infiltración celular a los pulmones: La infiltración de células a los pulmones fue medida contando el número de células usando azul de tripan 0.4%. El valor de la concentración de células fue expresado en células 10⁴/ml. Un R^2 entre 0 y 1 mg de DS igual a 0,851 fue obtenido, indicando una relativa linealidad entre esas cantidades instiladas.

N = Número de ratas por grupo

Tiempo post-instilación: Para encontrar el tiempo post-instilación que maximice las respuestas de toxicidad, tres grupos de ratas fueron comparados con tiempos de post-instilación de 12 (N=6), 24 (N=24) y 48 (N=4) horas. Todas las ratas fueron tratadas con 1 mg de extractos orgánicos de DS tratado con metanol y los resultados presentados en la Fig. 9. La respuesta máxima fue observada a las 24 horas post-instilación para los tres marcadores estudiados. Además, las respuestas relativas obtenidas a las 12 y 48 horas fueron similares para cada marcador.

En el caso de las proteínas (Fig. 9A) fue posible encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos de 24 y 48 horas. Al comparar los tratamientos de 48 y 12 horas, y los de 12 y 24 horas, no fueron observadas diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Para el marcador LDH (Fig. 9B) no fueron observadas diferencias significativas al comparar los tratamientos de 48 y 12 horas; los de 12 y 24 horas, y los de 24 y 48 horas. El aumento a las 24 horas para este marcador fue mucho menor. Finalmente para el infiltración celular fue posible detectar diferencias significativas ($p < 0.05$) al comparar el número de células infiltradas al pulmón entre los tratamientos de 12 y 24 horas, y de 24 y 48 horas, no así al comparar los tratamientos de 12 y 48 horas donde diferencias significativas no fueron observadas (Fig. 9C).

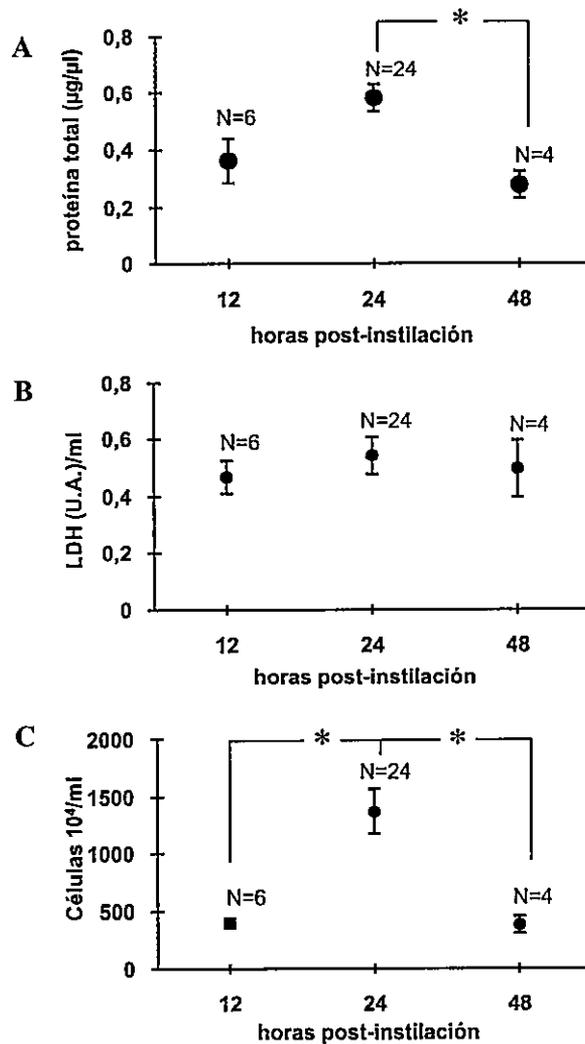


Figura 9: Magnitud de las respuestas al variar el tiempo post-instilación: La respuesta producida por el DS fue evaluada al tratar tres grupos de ratas con 12, 24 y 48 horas de tiempo post-instilación. Todas las ratas fueron instiladas con 1 mg de extractos de DS resuspendido en 500 µl de solución salina. Cada punto del gráfico representa el valor promedio y el error estándar de un grupo de ratas.

A) Medición de la toxicidad como concentración de proteína en el lavado broncoalveolar: La concentración de proteínas fue estimada utilizando el método BCA. El máximo de la respuesta fue observado a las 24 horas post-instilación, además diferencias significativas fueron obtenidas al comparar el tratamiento 24 horas post-instilación versus el tratamiento 48 horas post-instilación.

B) Medición de la toxicidad como niveles de la LDH en el lavado broncoalveolar: Los niveles de la LDH fueron medidos utilizando el kit comercial BioVision LDH citotoxicity assay. Cada lavado broncoalveolar fue expresado en unidades arbitrarias por ml (U.A./ml). El máximo de la respuesta fue observado a las 24 horas post-instilación, además diferencias significativas no fueron apreciadas al comparar grupos.

C) Medición de la inflamación como infiltración de células en el lavado broncoalveolar: La infiltración de células a los pulmones fue medida contando el número de células. El máximo de la respuesta fue observado a las 24 horas post-instilación, además diferencias significativas fueron obtenidas al comparar el tratamiento 24 horas post-instilación versus el tratamiento 48 horas post-instilación, y al comparar el tratamiento 24 horas post-instilación versus el tratamiento 12 horas post-instilación.

* = $p < 0,05$; N = Número de ratas por grupo

Respuesta frente al DS en las condiciones optimizadas: Basado en los resultados anteriores definimos que las condiciones óptimas de medición de la toxicidad de los extractos orgánicos de DS tratado con metanol fueron: 1 mg de material instilado con un tiempo de post-instilación de 24 horas y lavado en triplicado, ya que con estos parámetros una respuesta lineal y significativa fue obtenida para todos los marcadores.

La diferencia de respuesta fue evaluada entre ratas controles, instiladas con NaCl 0,9%, y ratas tratadas con extractos de DS utilizando los parámetros óptimos encontrados. Para esto dos grupos de ratas fueron comparados: un grupo control instilado con NaCl 0.9% y un grupo tratado con los parámetros óptimos de medición (Fig. 10). En las mediciones de todos los marcadores fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ratas tratadas con DS y las ratas controles. Para los marcadores proteína total (Fig. 10A) y LDH (Fig. 10B), el grupo tratado duplicó la magnitud del grupo control ($0,263 \pm 0,028 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ versus $0,582 \pm 0,049 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0,311 \pm 0,046 \text{ U.A./ml}$ versus $0,541 \pm 0,065 \text{ U.A./ml}$, respectivamente). En cambio para el marcador células totales (Fig. 10C), el grupo tratado cuadruplicó la magnitud entregada por el grupo control ($356 \pm 56 \text{ células } 10^4/\text{ml}$ versus $1370 \pm 198 \text{ células } 10^4/\text{ml}$).

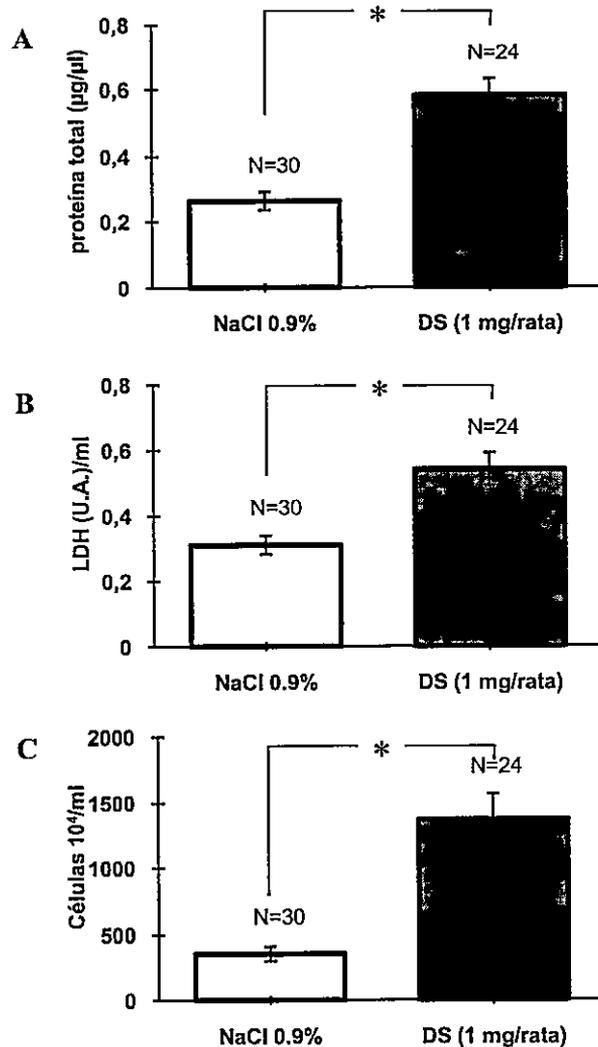


Figura 10: Magnitud de las respuestas comparando ratas tratadas con DS utilizando los parámetros optimizados versus ratas controles: La respuesta fue evaluada en las condiciones optimizadas, comparando 2 grupos de ratas. Un grupo fue tratado con los parámetros optimizados de medición: 1 mg de extractos de DS resuspendido en 500 µl de solución salina por rata y 24 horas de tiempo post-instilación. Un grupo control fue tratado en las mismas condiciones, pero sin agregar extractos de DS a sus pulmones (NaCl 0.9%). Cada barra del gráfico representa el valor promedio y el error estándar de un grupo de ratas. Diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron encontradas para los marcadores proteína total, LDH e infiltración celular.

A) Medición de la toxicidad como concentración de proteína en el lavado broncoalveolar usando los parámetros optimizados: La concentración de proteínas fue estimada utilizando el método BCA. Diferencias significativas fueron encontradas con un valor $p < 0,0001$.

B) Medición de la toxicidad como niveles de LDH en el lavado broncoalveolar, usando los parámetros optimizados: Los niveles de la LDH fueron medidos utilizando el kit comercial BioVision LDH cytotoxicity assay. Diferencias significativas fueron encontradas con un valor $p = 0,0007$.

C) Medición de la inflamación como infiltración de células en el lavado broncoalveolar, usando los parámetros optimizados: La infiltración de células a los pulmones fue medida contando el número de células. Diferencias significativas fueron encontradas con un valor $p < 0,0001$.

* = $p < 0,05$; N = Número de ratas por grupo

Relación entre los marcadores de toxicidad evaluados: Las magnitudes de los valores de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versus LDH (U.A./ml) fueron comparadas entre sí variando la dosis y manteniendo el tiempo post-instilación de 24 horas. Una relación lineal fue obtenida entre las respuestas observadas para estos parámetros a dosis de 0; 0,5; 1 y 3 mg de extractos orgánicos de DS tratado con metanol, con un coeficiente de correlación de 0.946 (Fig. 11A). Esto coincide con la teoría de que ambos marcadores indican toxicidad pulmonar, ya que la lisis celular libera LDH y otras proteínas citosólicas al medio, aumentando las concentraciones extracelulares de manera proporcional. Por otro lado, al comparar los marcadores LDH versus infiltración celular (Fig. 11B) y proteína total versus infiltración celular (Fig. 11C) no fue observada una correlación lineal, esto sucede probablemente por la disminución obtenida para la magnitud entregada por el infiltración celular a los 3 mg de extractos de DS instilado.

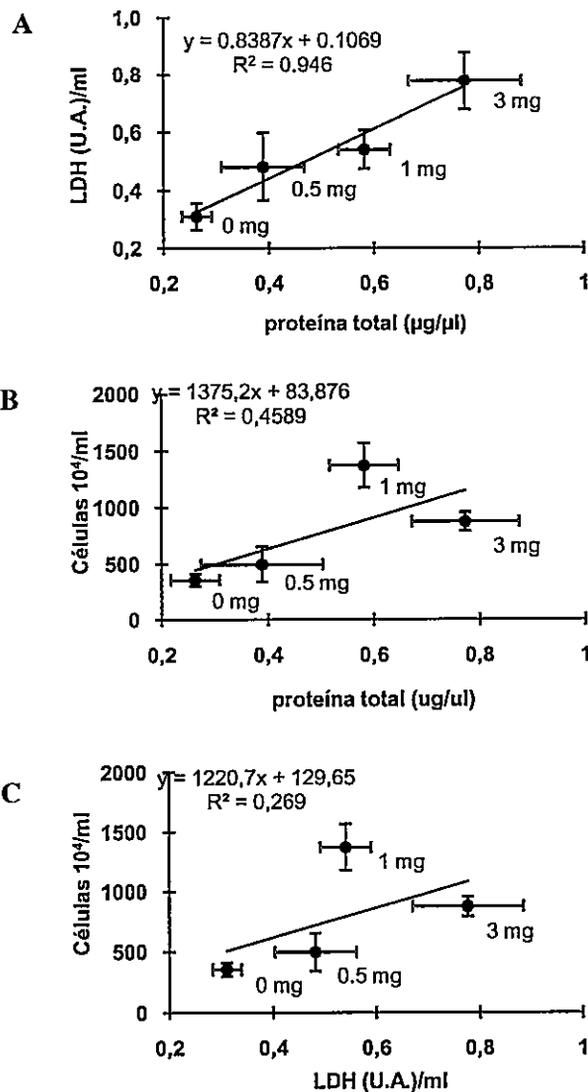


Figura 11: Relación entre las magnitudes entregadas por los marcadores al variar la dosis de MP instilado. Los marcadores fueron correlacionados entre pares. Las magnitudes de los marcadores fueron medidos usando 24 horas como tiempo post-instilación y cuatro cantidades distintas de extractos DS: 0; 0,5; 1 y 3 mg en 500 µl de solución salina por rata.

A) Relación entre LDH y proteína total al variar la dosis de MP instilado: Cuatro grupos de ratas fueron tratados con cantidades distintas de extractos de DS: 0; 0,5; 1 y 3 mg en 500 µl de solución salina con un tiempo de post-instilación de 24 horas. En todos los grupos fue evaluada la concentración de proteína y los niveles de LDH, las magnitudes de ambos marcadores fueron relacionados. Una relación lineal fue observada entre LDH y proteína total R^2 igual a 0,946.

B) Relación entre infiltración celular y proteína total al variar la dosis de MP instilado: Cuatro grupos de ratas fueron tratados con cantidades distintas de extractos de DS: 0; 0,5; 1 y 3 mg en 500 µl de solución salina con un tiempo de post-instilación de 24 horas. En todos los grupos fue evaluada la infiltración celular y la concentración de proteína total, las magnitudes de ambos marcadores fueron relacionados. Entre infiltración celular y LDH no fue observada una relación lineal.

C) Relación entre infiltración celular y LDH al variar la dosis de MP instilado: Cuatro grupos de ratas fueron tratados con cantidades distintas de extractos de DS: 0; 0,5; 1 y 3 mg en 500 µl de solución salina con un tiempo de post-instilación de 24 horas. En todos los grupos fue evaluada la infiltración celular y los niveles de LDH, las magnitudes de ambos marcadores fueron relacionados. Entre infiltración celular y LDH no fue observada una relación lineal.

N = Número de ratas por grupo

Variabilidad: Las varianzas, como porcentaje del promedio para el grupo de ratas controles y el grupo de ratas tratadas con las condiciones óptimas de medición fueron comparadas. (Fig. 12). Para los tres marcadores (proteína total, LDH y infiltración celular) no fue observada una diferencia notoria entre ambos tratamientos, lo que sugiere solo una variabilidad mínima producida posiblemente por errores en el procedimiento experimental.

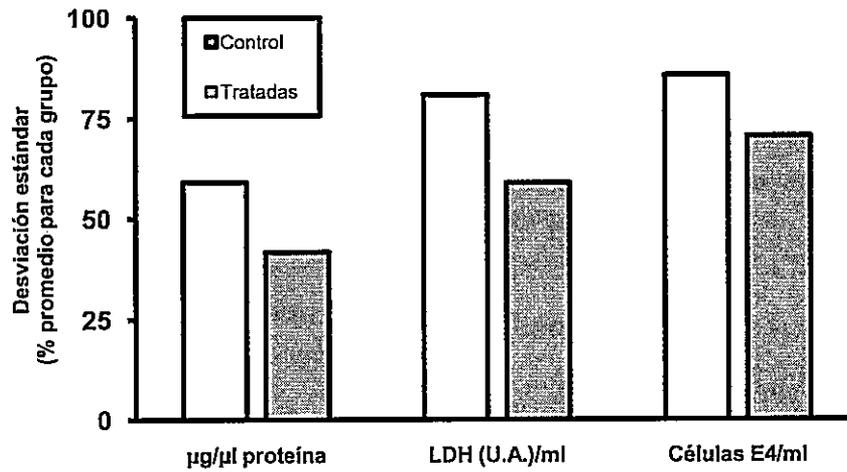


Figura 12: Comparación de la desviación estándar entre las ratas tratadas con los parámetros óptimos y las ratas tratadas con la muestra control (NaCl 0,9%): Para comparar la variabilidad entre el grupo de ratas tratadas con los parámetros optimizados, es decir 1 mg de DS y 24 horas de tiempo post-instilación y el grupo de ratas controles (instiladas con NaCl 0,9%) con un tiempo de post instilación de 24 horas, las desviaciones estándar de ambos grupos fueron graficadas como el porcentaje del promedio de cada uno. Tomando en consideración los datos de la figura 10, diferencias notables entre los grupos de ratas no fueron observadas para ningún marcador indicando que el método implementado no genera variabilidad.

Evaluación toxicológica de muestras ambientales

Con el objeto de determinar el posible efecto tóxico de muestras provenientes del aire, se compararon muestras ambientales obtenidas en el Centro Mario Molina.

Inocuidad del sustrato de colección: Con el fin de determinar la posible contribución tóxica de componentes distintos al material particulado en el método empleado, se evaluó el lavado de un grupo de ratas instiladas con el extracto obtenido desde una EPU limpia. De esta manera fue medida la toxicidad relativa de los componentes y trazas remanentes de solvente, producto del método de extracción empleado (EPU, metanol, contaminantes, etc.). La solución control obtenida fue instilada en ratas para evaluar los niveles de proteína total, LDH e infiltración celular. Todos estos marcadores fueron medidos en el lavado broncoalveolar, 24 horas después de haber instilado 500µl de solución (Fig. 13).

Las magnitudes obtenidas para el marcador proteínas totales fueron similares entre ratas instiladas con NaCl 0,9% y ratas tratadas con la solución extraída desde la EPU limpia (control) ($0,263 \pm 0,028 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0,229 \pm 0,016$ respectivamente) (Fig. 13A). Asimismo, las respuestas obtenidas para el marcador LDH en las mismas condiciones fueron equivalentes ($0,311 \pm 0,046 \text{ U.A./ml}$ para ratas instiladas con NaCl 0,9% y $0,319 \pm 0,035 \text{ U.A./ml}$ para ratas instiladas con la solución control, (Fig. 13B). Finalmente, las magnitudes para el marcador infiltración celular fueron similares entre ratas instiladas con NaCl 0,9% y ratas tratadas con la solución control ($356 \pm 56 \text{ células } 10^4/\text{ml}$ y $388 \pm 97 \text{ células } 10^4/\text{ml}$ respectivamente) (Fig. 13C). En resumen, no fue posible detectar diferencias significativas entre ratas tratadas con la solución control y ratas instiladas

con NaCl 0,9% indicando que las EPU's representan un material inerte y por lo tanto no constituyen un factor de riesgo de toxicidad, siendo útil como soporte de MP.

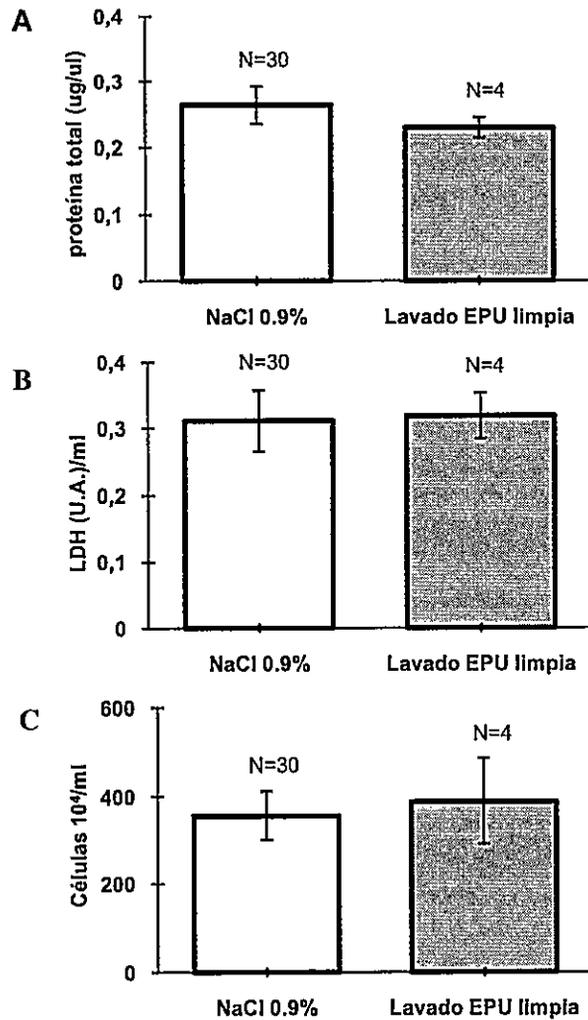


Figura 13: Comparación entre ratas controles (NaCl 0,9%) y ratas tratadas con la solución obtenida desde una EPU limpia: Para determinar que el efecto producido por el material particulado atmosférico no es un artefacto de la técnica, fue necesario evaluar la contribución del sustrato de colección de MP (EPU) a la toxicidad. Para esto, dos grupos de ratas fueron comparadas, un grupo tratado con NaCl 0,9% y otro grupo tratado con el líquido obtenido al lavar una EPU limpia. Para todos los marcadores no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas que indiquen algún aporte de la EPU al efecto tóxico medido. En los gráficos cada barra representa el valor promedio y el error estándar de un grupo de ratas

A) Comparación de la toxicidad como concentración de proteínas totales: La concentración de proteínas fue estimada utilizando el método BCA. Entre el grupo tratado con NaCl 0,9% y el grupo tratado con la solución obtenida desde una EPU limpia no existe una diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,9787$.

B) Comparación de la toxicidad como concentración de LDH: Los niveles de la LDH fueron medidos utilizando el kit comercial BioVision LDH cytotoxicity assay. Entre el grupo tratado con NaCl 0,9% y el grupo tratado con la solución obtenida desde una EPU limpia no existe una diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,2091$.

C) Comparación de la inflamación como concentración de células totales: La infiltración de células a los pulmones fue medida contando el número de células. Entre el grupo tratado con NaCl 0,9% y el grupo tratado con la solución obtenida desde una EPU limpia no existe una diferencia estadísticamente significativa, $p = 0,3778$.

N = Número de ratas por grupo

Marcadores de toxicidad e inflamación para las muestras obtenidas del aire de Santiago: Las respuestas producidas por los extractos orgánicos tratados con metanol de la fracción gruesa MP_{2,5-10} y la fracción fina MP_{0,1-2,5} fueron comparadas utilizando muestras obtenidas del aire de Santiago en la ciudad empresarial durante una semana (desde el 25 de Junio del 2008 hasta el 2 de Julio del 2008).

La mayor respuesta para el marcador proteínas totales fue obtenida al instilar extractos del material particulado fino ($0,627 \pm 0,188 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Fig. 14). Los extractos del material particulado fino arrojaron una magnitud significativamente mayor ($p < 0,05$) de alrededor de 2,5 veces respecto al nivel del grupo control ($0,263 \pm 0,028 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Asimismo, los extractos provenientes de la fracción fina entregaron una magnitud aproximadamente 2 veces mayor que el grupo tratado con los extractos provenientes de la fracción gruesa ($0,327 \pm 0,068 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Fig. 14A), indicando que los extractos provenientes de la fracción fina tienen un potencial tóxico más alto que los extractos provenientes de la fracción gruesa, pero no estadísticamente significativa.

Para el marcador LDH las respuestas fueron similares a las obtenidas para el marcador proteínas totales, consistente con la calibración del método utilizando extractos de DS. La mayor respuesta obtenida fue observada para los extractos provenientes del material particulado fino ($0,973 \pm 0,274 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), con un nivel 3 veces mayor que el grupo control ($0,311 \pm 0,046 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) ($p < 0,05$) y 2 veces mayor que el grupo tratado con extractos provenientes de la fracción gruesa ($0,446 \pm 0,081 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Fig. 14B). Finalmente, fue posible observar el mismo patrón de aumento para el marcador infiltración celular hacia los pulmones. Para esta medición, la mayor respuesta inflamatoria fue obtenida para extractos de material particulado fino y fue de $1007 \pm 355 \text{ células } 10^4/\text{ml}$ con un nivel 3 veces mayor que el grupo control de valor

356, \pm 56 células 10^4 /ml ($p < 0,05$) y 2.5 veces mayor que el grupo tratado con extractos provenientes de la fracción gruesa (416 ± 152 células 10^4 /ml) (Fig. 14C). Al comparar los grupos de ratas tratadas con extractos de material particulado fino, extractos de material particulado grueso y controles instilados con NaCl 0.9% los resultados fueron los siguientes: para proteínas ($0,327 \pm 0,068$; $0,229 \pm 0,016$ y $0,263 \pm 0,028$), para LDH ($0,446 \pm 0,081$; $0,319 \pm 0,035$ y $0,311 \pm 0,046$) y para infiltración celular hacia los pulmones (416 ± 152 ; 388 ± 97 y 356 ± 56). Solo hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar el grupo control versus el grupo tratado con extractos de MP fino para los marcadores proteína y células totales.

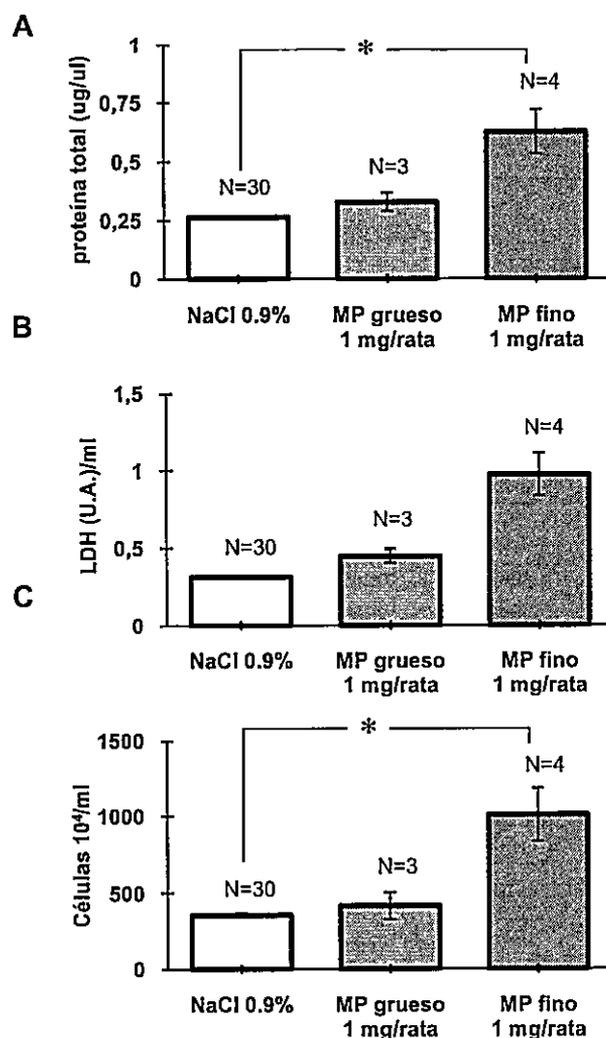


Figura 14: Comparación de la respuesta tóxica e inflamatoria producida por material particulado atmosférico fino y grueso proveniente de Santiago. Los efectos tóxicos de la fracción fina y la fracción gruesa obtenida en el Centro Mario Molina, Huechuraba, Santiago fueron comparados para todos los marcadores, utilizando los parámetros optimizados en la etapa de implementación del método. Cada punto del gráfico representa el valor promedio y el error estándar de un grupo de ratas

A) Comparación de la toxicidad producida por muestras atmosféricas como concentración de proteína (µg/µl): La concentración de proteínas fue estimada utilizando el método BCA. Diferencias significativas fueron encontradas entre el grupo control y el grupo tratado con material fino, indicando un mayor potencial tóxico de la fracción fina.

B) Comparación de la toxicidad producida por muestras atmosféricas como niveles de LDH: Los niveles de la LDH fueron medidos utilizando el kit comercial BioVision LDH citotoxicity assay. Diferencias significativas fueron encontradas entre el grupo control y el grupo tratado con material fino, indicando un mayor potencial tóxico de la fracción fina.

C) Comparación de la inflamación producida por muestras atmosféricas como concentración de células totales: La infiltración de células a los pulmones fue medida contando el número de células. Diferencias estadísticamente significativas no fueron encontradas al comparar entre pares de grupos.

* = $p < 0,05$; N = Número de ratas por grupo

DISCUSIÓN

Los objetivos iniciales de esta tesis fueron encontrar las condiciones adecuadas donde la respuesta frente a la exposición de ratones a extractos orgánicos de MP tratado con metanol fuera máxima, para así determinar la cantidad de MP necesaria para obtener una respuesta significativa en un rango lineal. De esta manera, una vez establecidas estas condiciones, determinamos el potencial tóxico de muestras ambientales obtenidas desde el aire de Santiago.

Implementación de un método toxicológico

Al comparar los resultados obtenidos en las ratas tratadas con extractos orgánicos de DS tratado con metanol utilizando las condiciones óptimas de medición (24 horas de tiempo post- instilación, 1 mg de dosis y 3 lavados broncoalveolares analizados) con las ratas controles, fue posible observar que el aumento de la magnitud de LDH y de proteína total liberada hacia el lumen del pulmón fue de alrededor de dos veces respecto al grupo de ratas tratadas con solución salina. Al comparar las diferencias relativas para la infiltración celular, fue posible observar diferencias de cuatro veces respecto al grupo de ratas tratadas con una solución salina. Fue posible determinar que existe una mayor magnitud de respuesta sistémica para el marcador de inflamación medido como infiltración celular hacia el pulmón de ratas expuestas a extractos orgánicos de DS tratado con metanol. Este marcador podría tener una ventaja en comparación a los marcadores de toxicidad, ya que posibilita una mayor resolución o diferenciación entre ratas tratadas y no tratadas con extractos orgánicos

de MP tratado con metanol, existiendo un mayor rango para interpolar magnitudes provenientes de muestras atmosféricas.

Al medir los marcadores analizados en distintos tiempos post-instilación, fue posible observar que la magnitud de la respuesta aumentó significativamente entre las 12 y las 24 horas post-instilación. Probablemente los procesos necesarios para que ocurra la inflamación en el tejido pulmonar, la migración de células del sistema inmune innato hasta los pulmones, y el daño celular, toman varias horas después de la exposición frente al MP (Zhang y col. 2002). Posiblemente durante este tiempo la maquinaria de defensa del organismo frente a los extractos de MP es activada, ejerciendo su efecto citotóxico mediante muerte celular del tejido pulmonar. Consistente con nuestro estudio, existen trabajos que han encontrado un máximo de la respuesta sistémica frente a diferentes extractos de MP obtenido de diferente manera a las 24 horas post-instilación, esto medido como influjo de neutrófilos hacia el pulmón de ratas tratadas con CAPs (Saldiva y col., 2002; Salvi y col., 1999). A las 48 horas post-instilación, la respuesta sistémica frente a extractos orgánicos de MP tratado con metanol fue muy similar a la medición hecha a las 12 horas. Esto podría deberse a que en este período ya se ha activado la maquinaria de limpieza que posee el pulmón frente a los extractos instilados (Hinds 1998; Lippmann y col., 1980). Este proceso remueve los extractos de MP del pulmón gracias a la mucosidad presente, la que arrastra las partículas hasta regiones superiores del sistema respiratorio.

Tomando en consideración otros trabajos publicados, los tiempos óptimos definidos para el sacrificio de los animales expuestos a extractos de material particulado para observar efectos en la permeabilidad epitelial fue de 8 horas para ratas instiladas con un inductor inflamatorio (Li y col., 1998) y de 24 horas para el tratamiento con extractos de material particulado (Gerlofs-Nijland y col., 2005; Seagrave y col., 2006).

Considerando un flujo respiratorio de 0,214 litros por minuto para ratas en reposo (Brown y col., 2005) estimamos que la cantidad de un miligramo de extractos orgánicos de MP fino tratado con metanol utilizado representa el volumen que una rata respiraría durante tres meses, suponiendo una concentración de $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para la fracción fina. Usando los mismos parámetros, decidimos exponer ratas a una cantidad de un miligramo de extractos de MP de fracción gruesa extraída con metanol equivalente a 16 días de respiración suponiendo una concentración de $115 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para la fracción gruesa. Además es importante considerar que las ratas utilizadas en nuestro estudio recibieron el contenido de los extractos de MP fino y grueso extraído con metanol directo a sus pulmones. A pesar de que esta aproximación puede resultar alejada de la realidad, la necesidad de evaluar respuestas estadísticamente significativas y en un tiempo razonable de experimentación justifica este acêrcamiento. De otro modo, este tipo de experimentos requerirían un número muy alto de animales y técnicas mucho más sofisticadas para el análisis del impacto de extractos de MP en el sistema respiratorio.

Por otro lado, existen trabajos que han evaluado la toxicidad de muestras atmosféricas de aire (0,32 mg de un extracto de material particulado) usando ratas como modelo de experimentación donde no fueron encontradas respuestas tóxicas para marcadores como proteínas totales y LDH (Schins y col., 2004). Sin embargo, fueron encontradas diferencias significativas en los niveles de marcadores de inflamación como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-6 en ratas expuestas a dichos extractos. Lo que indicaría que el mecanismo de respuesta inflamatoria posiblemente se induce con menores dosis de extractos de MP comparado con una la respuesta tóxica sistémica. Estos datos son consistentes con las

magnitudes de las respuestas obtenidas en las ratas que fueron tratadas con extractos orgánicos de DS tratado con metanol en nuestro trabajo.

Medición de muestras ambientales del aire de Santiago

Además de implementar y optimizar el método de colección y exposición de ratas a extractos orgánicos de MP tratado con metanol, desde Santiago fueron evaluadas muestras de material grueso y fino usando el método de colección descrito en esta tesis. Un mayor potencial tóxico e inflamatorio del extracto orgánico proveniente del material fino tratado con metanol fue encontrado en comparación con los extractos orgánicos provenientes de fracción gruesa tratada con metanol al instilar 1 mg de extractos de MP por rata con 24 horas de tiempo post-instilación. (Fig. 14).

Diferencias estadísticamente significativas para los marcadores proteína total y LDH fueron encontradas entre el grupo de ratas tratadas con 1 mg extractos de material fino versus el grupo control. Este hallazgo encuentra respaldo en una serie de mediciones toxicológicas y epidemiológicas descritas anteriormente que sugieren al MP fino como más tóxico que el MP grueso (Pope, III y Dockery, 2006).

Es importante aclarar que en este trabajo fueron comparados los efectos producidos por cantidades similares de extractos de material fino y material grueso. En el ambiente, las concentraciones relativas de cada fracción pueden variar entre sí. Por ejemplo, trabajos en EEUU (Dockery y Pope, III, 1994) han descrito mediciones que relacionan el MP_{10} y $MP_{2,5}$ como $MP_{10} = MP_{2,5} / 0,6$. En Chile se han encontrado relaciones similares, donde en estaciones cálidas la relación entre las fracciones del

MP es de $MP_{10} = MP_{2,5} / 0,4$, mientras que en estaciones frías la relación corresponde a $MP_{10} = MP_{2,5} / 0,6$. (Koutrakis y col., 2005).

Es interesante destacar que sólo fue evaluada la contribución de la fracción fina ($MP_{0,1-2,5}$) en la toxicidad, descontando la fracción ultrafina ($MP_{0,1}$). La fracción ultrafina ha recibido notoria atención en los años recientes porque tiene también efectos claros en la salud (Seaton y col., 1999). Incluso existen evidencias que indican que éste material podría pasar directamente a la sangre por medios no fagocíticos (Geiser y col., 2005) y atacar a una gran variedad de órganos (Pope, III y Dockery, 2006). Entre ellos se encuentra el corazón, donde la viscosidad, la coagulación y la oxigenación de la sangre resultan alterados en experimentos realizados en humanos (Dockery y col., 2005; Pope, III y col., 1999; Pope, III y col., 2004; Rodriguez Ferreira Rivero y col., 2005; Seaton y col., 1999; Utell y col., 2002) y ratas (Watkinson y col., 1998).

Proyecciones

El método implementado y optimizado en esta tesis podría ser utilizado para evaluar y monitorear constantemente la toxicidad del material particulado de Santiago y así determinar el potencial de riesgo a efectos adversos para la salud de la población. La información obtenida con este tipo de evaluaciones podría ser contrastada con estudios epidemiológicos locales, para así obtener información sobre las posibles variables que influirían en la toxicidad de una muestra de material particulado como son la composición, la fracción, el lugar de muestreo, la estación del año, las fuentes emisoras, entre otras. Es importante destacar que la CONAMA financió este estudio dado su interés en fomentar estudios más profundos sobre el impacto en salud del MP,

además de estudios sobre la concentración y la composición del MP. Posiblemente, nuestros resultados serán utilizados para futuras legislaciones sobre las normas de medición del MP en Santiago y regiones, y eventualmente para la implementación de una norma de MP_{2,5}.

Como trabajo futuro especulamos que sería útil realizar mejoras en el método empleado para medir el efecto sistémico de extractos de MP y así aumentar el impacto de estas determinaciones. Por ejemplo, podrían utilizarse marcadores más sensibles, que generen respuestas de mayor magnitud frente a extractos de MP. En este sentido reacciones que revelen estrés oxidativo o inflamación serían apropiadas en nuestro sistema experimental de exposición al MP *in vivo*. Finalmente sería interesante implementar métodos de medición del potencial toxicológico en otros órganos, que resultan afectados por extractos de MP, como es por ejemplo el corazón.

CONCLUSIONES

- El método montado en esta tesis para evaluar la toxicidad pulmonar causada por extractos orgánicos de MP ambiental tratado con metanol fue implementado exitosamente utilizando ratas como modelo de experimentación.
- Los parámetros óptimos de medición fueron determinados empleando una muestra estándar de material particulado, determinando que 1 mg de extractos de MP tratado con metanol instilado por rata permite mediciones significativas transcurridas 24 horas post-instilación.
- Las muestras de aire colectadas en Santiago generaron una respuesta tóxica bajo las condiciones optimizadas en esta tesis. La fracción fina del material particulado produjo una mayor respuesta tóxica que la fracción gruesa del material particulado.

BIBLIOGRAFÍA

Adonis, M. and Gil, L. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and mutagenicity of inhalable particulate matter in Santiago, Chile. *Inhal. Toxicol.* 12, 1173-1183.

Ayres, J.G., Borm, P., Cassee, F.R., Castranova, V., Donaldson, K., Ghio, A., Harrison, R.M., Hider, R., Kelly, F., Kooter, I.M., Marano, F., Maynard, R.L., Mudway, I., Nel, A., Sioutas, C., Smith, S., Baeza-Squiban, A., Cho, A., Duggan, S., and Froines, J. (2008). Evaluating the toxicity of airborne particulate matter and nanoparticles by measuring oxidative stress potential--a workshop report and consensus statement. *Inhal. Toxicol.* 20, 75-99.

Barnard, M.L., Gurdian, S., and Turrens, J.F. (1993). Activated polymorphonuclear leukocytes increase low-level chemiluminescence of isolated perfused rat lungs. *J. Appl. Physiol.* 75, 933-939.

Barnes, P.J., Chowdhury B., Kharitonov S.A., Magnussen H., Page, C.P., Postma D. and Saetta, M. (2006). Pulmonary Biomarkers in Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am J Respir Crit Care Med* Vol 174. pp 6-14, 2006

Bell, M.L., Davis, D.L., and Fletcher, T. (2004). A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ. Health Perspect.* 112, 6-8.

Bell, M.L., Davis, D.L., Gouveia, N., Borja-Aburto, V.H., and Cifuentes, L.A. (2006). The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environ. Res.* 100, 431-440.

Brain, J.D., Knudson, D.E., Sorokin, S.P., Davis, M.A., (1976). Pulmonary Distribution of Particles Given by Intratracheal Instillation or by Aerosol Inhalation. *Environmental Research.* 11, 13-33.

Brown, J.S., Wilson, W.E., and Grant, L.D. (2005). Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. *Inhal. Toxicol.* 17, 355-385.

Cakmak, S., Dales, R.E., and Vidal, C.B. (2007). Air pollution and mortality in Chile: susceptibility among the elderly. *Environ. Health Perspect.* 115, 524-527.

Campen, M.J., Nolan, J.P., Schladweiler, M.C., Kodavanti, U.P., Evansky, P.A., Costa, D.L., and Watkinson, W.P. (2001). Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transition metals: a potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol. Sci.* 64, 243-252.

Cifuentes, L.A., Vega, J., Kopfer, K., and Lave, L.B. (2000). Effect of the fine fraction of particulate matter versus the coarse mass and other pollutants on daily mortality in Santiago, Chile. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 50, 1287-1298.

CONAMA. 2004. Chile, Ejemplos de Desarrollo Sustentable, Gobierno De Chile, Comisión Nacional de Medio Ambiente.

Demokritou, P., Lee, S. J., Ferguson, S., and Koutrakis, P. (2004). A Compact Multistage (Cascade) Impactor for the Characterization of Atmospheric Aerosols, *J. Aerosol Sci.* 35:281–299.

Donaldson, K., Stone, V., Borm, P.J.A., Jimenez, L.A., Gilmour P.S., Schins, R.P., Knaapen, A.M., Rahman, I., Fauz, S.P., Brown, D.M. and MacNee, W. (2003). Oxidative stress and Calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 34, No. 11, pp. 1369–1382

Dockery, D.W., Luttmann-Gibson, H., Rich, D.Q., Link, M.S., Mittleman, M.A., Gold, D.R., Koutrakis, P., Schwartz, J.D., and Verrier, R.L. (2005). Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. *Environ. Health Perspect.* 113, 670-674.

Dockery, D.W. and Pope, C.A., III (1994). Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health* 15, 107-132.

Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H., V, Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 1555-1560.

Gerlofs-Nijland, M.E., Boere, A.J., Leseman, D.L., Dormans, J.A., Sandstrom, T., Salonen, R.O., van, B.L., and Cassee, F.R. (2005). Effects of particulate matter on the pulmonary and vascular system: time course in spontaneously hypertensive rats. *Part Fibre. Toxicol.* 2, 2.

Ghio, A.J. and Huang Y.T., (2004). Exposure to Concentrated Ambient Particles (CAPs): A Review. *Inhal. Toxicol.* 16, 53-59.

Ghio A.J., Meng, Z.H., Hatch G.E., Costa D.L. (1997). Luminol-Enhanced Chemiluminescence After in vitro Exposures of Rat Alveolar Macrophages to Oil Fly Ash is Metal Dependent. *Inh Toxi*, 9:255–271.

Gil, L. y Adonis M. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and mutagenic activities of organic extracts from airborne particles in Santiago De Chile . *Indoor Built Environ.*, 5, 155-164.

Gil, L., Martínez, V., Riquelme, R., Ancic, P., González, G., Rodríguez, L. and Adonis, M. (2003). Occupational and Environmental Levels of Mutagenic OAHs and Respirable Particulate Matter Associated With Diesel Exhaust in Santiago, Chile. *J Occup Environ Med.* 45, 984 - 992.

Godleski, J.J., Verrier, R.L., Koutrakis, P., Catalano, P., Coull, B., Reinisch, U., Lovett, E.G., Lawrence, J., Murthy, G.G., Wolfson, J.M., Clarke, R.W., Nearing, B.D., and Killingsworth, C. (2000). Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. *Res. Rep. Health Eff. Inst.* 5-88.

González S., Dussaubat N. y Oyarzún M. Effect of intermittent 0.25 ppm ozone exposure in rats with bleomycin-induced pulmonary damage. European Respiratory Society Annual Congress, Escolomo, Suecia, 14-18 Sept 2006

Grossblatt, (1989) *Biologic Markers in Pulmonary Toxicology*, Subcommittee on Pulmonary Toxicology Committee on Biologic Markers, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C.

Ha, E.H., Lee, J.T., Kim, H., Hong, Y.C., Lee, B.E., Park, H.S., and Christiani, D.C. (2003). Infant susceptibility of mortality to air pollution in Seoul, South Korea. *Pediatrics* 111, 284-290.

Hinds, William. 1998. *Aerosol Technology Properties, behaviour, and Measurement of Airborne Particles*. John Wiley & Sons (eds.), *Respiratory Deposition*, pp 233-254 Bio. Chapman and Hall, New York.

Ilabaca, M., Olaeta, I., Campos. (1999) Association between levels of fine particulate and emergency visits for pneumonia and other respiratory illness among children in Santiago, Chile. *J. Air Waste Manag. Assoc.*, 48: 174-83

Kodavanti, U.P., Jaskot, R.H., Costa, D.L and Dreher K.L. (1997). Pulmonary Proinflammatory Gene Induction Following Acute Exposure To Residual Oil Fly Ash: Roles Of Particle-Associated Metals. *Inh Toxi*, 9:679-701.

Kodavanti, U.P., Hauser, R., Christiani, D.C., Meng, Z.H., McGee, J., Ledbetter, A., Richards, J., and Costa, D.L. (1998). Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* 43, 204-212.

Koutrakis, P., Sax, S.N., Sarnat, J.A., Coull, B., Demokritou, P., Oyola, P., Garcia, J., and Gramsch, E. (2005). Analysis of PM₁₀, PM_{2.5}, and PM_{2.5-10} concentrations in Santiago, Chile, from 1989 to 2001. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 55, 342-351.

Li, X.Y., Brown, D., Smith, S., MacNee, W., and Donaldson, K. (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal. Toxicol.* 11, 709-731.

Li, X.Y., Donaldson, K., and MacNee, W. (1998). Lipopolysaccharide-induced alveolar epithelial permeability: the role of nitric oxide. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 157, 1027-1033.

Li,X.Y., Gilmour,P.S., Donaldson,K., and MacNee,W. (1997). In vivo and in vitro proinflammatory effects of particulate air pollution (PM10). *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl 5, 1279-1283.

Lippmann,M., Yeates,D.B., and Albert,R.E. (1980). Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br. J. Ind. Med.* 37, 337-362.

Luftforurening med Partikler- et sundhedsproblem (2007) Denmarks Miljoundersogelser, Aarhus Universitet, forfatternr og Forlaget Hoveland

Mackenney, J.,Oyarzún, M. J., Diaz, P.V., Bustos, P., Amigo H., Rona R.J. (2005). Prevalence of asthma, atopy and bronchial hyperresponsiveness and their interrelation in a semi-rural area of Chile. *INT J TUBERC LUNG DIS* 9(11):1288–1293

Mauderly,J.L. (2001). Diesel emissions: is more health research still needed? *Toxicol. Sci.* 62, 6-9.

Morales, Raul G.E.. 2006. Contaminación atmosférica urbana, Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago. Editorial Universitaria.

Morales, Raul G.E.. 2006. Contaminación atmosférica urbana, Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago, Capitulo 9 "Efectos del material particulado y del ozono sobre el sistema respiratorio". Editorial Universitaria

Nadadur,S.S. and Kodavanti,U.P. (2002). Altered gene expression profiles of rat lung in response to an emission particulate and its metal constituents. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65, 1333-1350.

O'Neill,M.S., Veves,A., Zanobetti,A., Sarnat,J.A., Gold,D.R., Economides,P.A., Horton,E.S., and Schwartz,J. (2005). Diabetes enhances vulnerability to particulate air pollution-associated impairment in vascular reactivity and endothelial function. *Circulation* 111, 2913-2920.

Ostro,B., Sanchez,J.M., Aranda,C., and Eskeland,G.S. (1996). Air pollution and mortality: results from a study of Santiago, Chile. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 6, 97-114.

Ostro,B.D., Eskeland,G.S., Sanchez,J.M., and Feyzioglu,T. (1999). Air pollution and health effects: A study of medical visits among children in Santiago, Chile. *Environ. Health Perspect.* 107, 69-73.

Pino,P., Walter,T., Oyarzun,M., Villegas,R., and Romieu,I. (2004). Fine particulate matter and wheezing illnesses in the first year of life. *Epidemiology* 15, 702-708.

Pino, P., Oyarzún. M., Walter. T. Adonis. M. and Ortiz. J. (1998). Genotoxicidad y concentración de metales del material particulado respirable intradomiciliario en Santiago sur-oriente. *Rev. Chil. Enf. Respir.*, 14:219 (Resumen).

Pope C. A. III (2000) Review: *Aerosol Sci. Tech.* 32, 4-14.

Pope,C.A., III, Burnett,R.T., Thurston,G.D., Thun,M.J., Calle,E.E., Krewski,D., and Godleski,J.J. (2004). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109, 71-77.

Pope,C.A., III and Dockery,D.W. (2006). Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 56, 709-742.

Pope,C.A., III, Schwartz,J., and Ransom,M.R. (1992). Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Arch. Environ. Health* 47, 211-217.

Pope,C.A., III, Verrier,R.L., Lovett,E.G., Larson,A.C., Raizenne,M.E., Kanner,R.E., Schwartz,J., Villegas,G.M., Gold,D.R., and Dockery,D.W. (1999). Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am. Heart J.* 138, 890-899.

Potts J.F., Rona R.J., Oyarzun M.J., Amigo, H., and Bustos, P. (2008). Indoor Risk Factors for Cough and Their Relation to Wheeze and Sensitization in Chilean Young Adults *American Journal of Public Health.* Vol 98, No. 4 680-686

Préndez, M., Ortiz, J.L., Cortés, E. y Cassorla, V. (1984). Elemental Composition of Airborne Particulate Matter in Santiago City, Chile, 1976. *Journal of the air pollution Control Association.* 34: 54-56

Rice,T.M., Clarke,R.W., Godleski,J.J., Al-Mutairi,E., Jiang,N.F., Hauser,R., and Paulauskis,J.D. (2001). Differential ability of transition metals to induce pulmonary inflammation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 46-53.

Rodriguez Ferreira Rivero,D.H., Sasaki,C., Lorenzi-Filho,G., and Nascimento Saldiva,P.H. (2005). PM(2.5) induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ. Res.* 99, 262-266.

Saldiva,P.H., Clarke,R.W., Coull,B.A., Stearns,R.C., Lawrence,J., Murthy,G.G., Diaz,E., Koutrakis,P., Suh,H., Tsuda,A., and Godleski,J.J. (2002). Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165, 1610-1617.

Salvi,S., Blomberg,A., Rudell,B., Kelly,F., Sandstrom,T., Holgate,S.T., and Frew,A. (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 159, 702-709.

Schins,R.P., Lightbody,J.H., Borm,P.J., Shi,T., Donaldson,K., and Stone,V. (2004). Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 1-11.

Schlesinger, R.B. and Cassee, F. (2003). Atmospheric secondary inorganic particulate matter: the toxicological perspective as a basis for health effects risk assessment. *Inhal. Toxicol.* 15, 197-235.

Seagrave, J., McDonald, J.D., Bedrick, E., Edgerton, E.S., Gigliotti, A.P., Jansen, J.J., Ke, L., Naeher, L.P., Seilkop, S.K., Zheng, M., and Mauderly, J.L. (2006). Lung toxicity of ambient particulate matter from southeastern U.S. sites with different contributing sources: relationships between composition and effects. *Environ. Health Perspect.* 114, 1387-1393.

Seaton, A., Soutar, A., Crawford, V., Elton, R., McNerlan, S., Cherrie, J., Watt, M., Agius, R., and Stout, R. (1999). Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 54, 1027-1032.

Tao, F., Gonzalez-Flecha, B. and Kobzik, L. (2003). Reactive Oxygen Species in Pulmonary Inflammation By Ambient Particulates. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 35, No. 4, pp. 327-340, 2003

Toro, P. y Cortés, E. (1997). Assessment of the chemical characteristics and sources of airborne particulate matter in Santiago, Chile. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.* 221: 127-136

Tzortzaki, E.G., Lambiri, I., Vlachaki, E. and Siafakas, N.M., (2007). Biomarkers in COPD. *Current Medicinal Chemistry.* 14, 1037-1048.

Utell, M.J., Frampton, M.W., Zareba, W., Devlin, R.B., and Cascio, W.E. (2002). Cardiovascular effects associated with air pollution: potential mechanisms and methods of testing. *Inhal. Toxicol.* 14, 1231-1247.

Villarreal L., Couve E., Dussaubat N. y Oyarzún M., Effect of ozone exposure on type II pneumocytes and Clara cells in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Proceedings Joint Meeting British Physiological Society and Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Pucón, 13-16 Noviembre, 1999.*

Watkinson, W.P., Campen, M.J., and Costa, D.L. (1998). Cardiac arrhythmia induction after exposure to residual oil fly ash particles in a rodent model of pulmonary hypertension. *Toxicol. Sci.* 41, 209-216.

Wolterbeek, H.T. and Verburg, T.G. (2001). Predicting metal toxicity revisited: general properties vs specific effects. *The Science of the Total Environment* 279:87-115

World Bank, 2007 World Development Indicators.

Zhang D.D.; Hartsky M.A.; Warheit D.B. (2002). Time Course Of Quartz and TiO₂ Particle-Induced Pulmonary Inflammation and Neutrophil Apoptotic Responses In Rats. *Experimental Lung Research*, Volume 28, Number 8: 641-670(30)