

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto de la inhalación de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires: alteraciones histomorfológicas, metabólicas y bioquímicas a nivel pulmonar y extrapulmonar en ratones jóvenes y adultos mayores

Orona, Nadia Soledad^{1,2*}; Astort, Francisco^{1,2}; Ferraro, Sebastián Ariel^{1,2}; Maglione, Guillermo Alberto³; Kurtz, Melisa^{1,2}; Agosta, Eduardo Germán¹; Mandalunis, Patricia Mónica³; Morales, Celina⁴; Tasat, Deborah Ruth^{1,3}

¹Laboratorio de Biología Celular del Pulmón, Centro de estudios en Salud y Medio Ambiente, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín. Buenos Aires, Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET).

³Cátedra de Histología y Embriología Humana, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

⁴Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. CABA, Argentina.

Contacto: Orona, Nadia Soledad, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín, Martín de Irigoyen 3100, (1653) San Martín, Buenos Aires, Argentina; naorona@gmail.com

Resumen

Introducción: numerosos estudios han demostrado que la contaminación del aire se asocia a efectos adversos para la salud. Específicamente, datos epidemiológicos muestran asociación entre la exposición al material particulado aéreo (MP) e incrementos en la morbi-mortalidad por enfermedades cardiopulmonares. Las partículas de menor tamaño pueden ser traslocadas desde los pulmones a la circulación y afectar órganos extrapulmonares como corazón e hígado. Sin embargo, el MP no afecta de igual manera a todas las personas, puesto que la edad es un parámetro que puede influir en los efectos del MP sobre la salud. **Objetivo:** estudiar *in vivo*, en dos poblaciones etarias (ratones jóvenes y envejecidos) los mecanismos biológicos mediante los cuales las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) podrían inducir efectos adversos en el sistema respiratorio y en órganos extrapulmonares. **Materiales y Métodos:** se emplearon ratones BALB/c jóvenes (3 meses de edad) o envejecidos (9 meses de edad) y se expusieron mediante instilación intranasal a UAP-BA o ROFA (sucedáneo de la contaminación aérea). Se analizó la respuesta biológica en pulmón, corazón e hígado a nivel metabólico (parámetros oxidativos e inflamatorios), bioquímico (biomarcadores séricos) e histomorfológicos a las 3, 24 y 48 hs post-instilación. **Resultados:** ambos MP provocaron una respuesta inflamatoria local y sistémica. En el pulmón, histológicamente se observó una reducción del área alveolar, en el corazón inflamación epicárdica y en el hígado inflamación y esteatosis con aumento en los niveles de enzimas transaminasas séricas en ambos grupos etarios. **Conclusión:** se demostró que UAP-BA, en un modelo experimental murino, altera no sólo el sistema respiratorio sino también órganos extrapulmonares como corazón e hígado. Por ello, se hipotetizó que UAP-BA podría potencialmente provocar una respuesta biológica adversa similar en individuos jóvenes y adultos que habitan la Ciudad de Buenos Aires.

Palabras Clave: contaminación ambiental aérea urbana, pulmón, corazón, hígado, inflamación, metabolismo oxidativo.

Abstract

Introduction: Numerous studies have shown that air pollution is consistently associated with adverse health effects. Epidemiological data have specifically shown an association between the exposure to air particulate matter (PM) and an increase in cardiorespiratory morbidity/mortality. Smaller particles can be translocated from the lungs into the circulation and affect extrapulmonary organs such as the heart and liver. However, PM does not equally impact all the population, since the effects of MP on health may be influenced by age. **Objective:** to study *in vivo* the biological mechanisms by which Buenos Aires Urban Air Particles (UAP-BA) could induce adverse effects on the respiratory system and extrapulmonary organs of young and adult mice. **Materials and Methods:** young (3 months

old] and adult [9 months old] BALB/c mice were exposed to UAP-BA or ROFA (surrogate of airborne contamination) by intranasal instillation. In the lung, heart and liver, the biological response was assessed metabolically (oxidative and inflammatory parameters), biochemically (serum biomarkers), and histomorphologically at 3, 24 and 48 h post-instillation. Results: both types of PM caused local and systemic inflammatory response. Histologically, we observed a reduction of the alveolar area in the lung, heart epicardial inflammation, and liver inflammation and steatosis with an increase in the levels of serum transaminases in both age groups. Conclusions: we showed in a murine experimental model that UAP-BA altered not only the respiratory system but also extrapulmonary organs such as the heart and liver. Therefore, we hypothesized that UAP-BA could potentially induce similar adverse biological effects on young and adult individuals living in the City of Buenos Aires.

Key words: urban air pollution, lung, heart, liver inflammation, oxidative metabolism.

Introducción

La contaminación atmosférica es una mezcla heterogénea de gases, líquidos y material particulado (MP). Estudios epidemiológicos han mostrado que, en las grandes ciudades, existe una correlación positiva entre la calidad del aire y la salud de sus habitantes [1-4]. Estos estudios muestran asociación entre los niveles de MP y la morbo-mortalidad por enfermedades respiratorias y cardiovasculares [5-10].

El efecto del MP depende de su tamaño y composición fisicoquímica. Cuanto menor es el tamaño del MP, mayor es su reactividad y posible toxicidad [11]. Las partículas aéreas finas (MP_{2,5}) y ultrafinas (MP_{0,1}) pueden impactar directa y localmente a nivel pulmonar o trasladar e impactar en órganos a distancia como corazón e hígado [12,13]. Asimismo, estas partículas ejercen un efecto indirecto y sistémico a través de mediadores oxidativos y/o inflamatorios generados a nivel pulmonar.

En el año 2012, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 3,7 millones de defunciones prematuras, consecuencia principalmente de la exposición al MP, el cual puede impactar en distintos tejidos del organismo causando principalmente asma, bronquitis crónica, arritmia cardíaca, ataques cardíacos y cáncer.

La Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), es una megaciudad con 2.8 millones de habitantes [14], en la que se ha identificado que la fuente primaria de contaminación aérea es la emisión vehicular, siendo esta responsable de más del 90 % de la contaminación ambiental de la ciudad [15]. Previamente, este grupo de trabajo [16] ha encontrado que en ciertas ocasiones el MP_{2,5} de la ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) excede los valores estándares establecidos por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) y por la OMS [17,18].

Si bien el MP afecta a toda la población, la susceptibilidad a la contaminación puede variar con la salud o la edad de los individuos. En este sentido, se identifican a los lactantes, los mayores de 65 años (adultos mayores) y los individuos con fallas cardiorrespiratorias previas como subpoblaciones de riesgo [19-22]. Demográficamente, CABA presenta el índice

de personas mayores de 60 años más alto de nuestro país, alcanzando un 16,4 %. Por lo tanto, el impacto de factores ambientales, como la contaminación aérea en la población envejecida crece en importancia [23].

En este contexto, el objetivo de este trabajo es estudiar *in vivo* en dos poblaciones etarias diferentes (ratones jóvenes y adultos mayores) los mecanismos biológicos, mediante los cuales las partículas aéreas urbanas de Buenos Aires (UAP-BA) podrían inducir efectos adversos en el sistema respiratorio y en órganos extrapulmonares. Para ello, se analizó la respuesta en pulmón, corazón e hígado a la exposición de UAP-BA y un sucedáneo de la contaminación ambiental aérea ROFA (por sus siglas en inglés-Residual Oil Fly Ash) a nivel metabólico (parámetros oxidativos e inflamatorios), bioquímico (biomarcadores séricos) e histomorfológico.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones BALB/c machos jóvenes (1 - 3 meses) y envejecidos (10 - 12 meses) provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en condiciones estándares recibiendo agua y comida *ad libitum* con un ciclo 12:12 horas luz-oscuridad y temperatura ambiente controlada de 22 - 24°C, en el bioterio del Centro de Salud y Medio Ambiente, Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín. Para el uso y cuidado de animales de laboratorio se siguieron las directivas del NIH (National Institute of Health) [24], los lineamientos de la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM) y la normativa de referencia para Bioterios: Disposición N°6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).

Recolección y caracterización del material particulado (UAP-BA y ROFA)

Las partículas Aéreas Urbanas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA) se recolectaron en la zona de Villa del Parque, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, caracterizada por un alto tránsito vehicular principalmente de automóvi-

les y colectivos [25]. Para el muestreo de UAP-BA se utilizó un Mini Vol sampler (Airmetrics, Eugene, OR, USA) de flujo 1,8 L/min en filtros de teflón [47 mm, Sartorius, 0,2 µm]. Los filtros se pesaron (luego de equilibrar su humedad) antes y después de recolectar las partículas para determinar su peso neto, empleando una micro balanza (Mettler M3, precisión de 1 µg), que utiliza una fuente Alfa para remover la carga electrostática.

Las partículas provenientes del residuo volátil de la quema de petróleo, ROFA (Por sus siglas en inglés *-Residual Oil Fly Ash-*) se recolectaron en la planta industrial petrolífera de Mystic River, Everett, MA, USA y son una donación del Dr. J. Godleski, de la Escuela de Salud Pública de Harvard, Boston, MA, USA. Estas partículas son ampliamente utilizadas en toxicología ambiental como análogas de material particulado ambiental aéreo [25-28].

El análisis morfológico de las partículas se realizó mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), empleando un microscopio SEM Philips 515. El análisis de la composición química elemental se realizó mediante espectroscopía dispersiva de rayos X (EDX 4100, detector Si/Li y ventana de Be).

Diseño experimental: Modelo de exposición agudo a las partículas ambientales (UAP-BA y ROFA)

Animales, jóvenes o envejecidos, se anestesiaron por vía intraperitoneal (ip) con Xilazina 2 % / Ketamina 50 mg/ml en solución salina (1 ml/Kg de peso corporal), y se instilaron por vía intranasal [29] con una única dosis de 50 µl, por goteo en ambos orificios nasales, de una de suspensión de UAP-BA, ROFA o solución vehículo. Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

- Grupo ROFA (n = 15): se instilaron con una suspensión de ROFA (1 mg/kg de peso corporal) en Buffer Fosfato Salino estéril (PBS, 1X, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) [30].
- Grupo UAP-BA (n = 15): se instilaron con una suspensión de UAP-BA en PBS 1X (1mg/kg de peso corporal) [25].
- Grupo CONTROL (n = 15): se instilaron con un volumen equivalente de PBS 1X utilizado como vehículo en las suspensiones de las partículas.

La eutanasia de los animales se realizó a las 3, 24 o 48 h luego de finalizado el protocolo de exposición. La respuesta biológica se analizó en los tres grupos experimentales mediante los siguientes parámetros: 1) inflamatorios, 2) oxidativos, 3) histológicos y 4) bioquímicos.

Análisis histológico de los tejidos

Se resecaron el pulmón, corazón e hígado de los ratones controles y expuestos al MP, se fijaron en formol (10 %) por no más de 48 horas y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de entre 5 y 7 µm de espesor (micrótomo Reichert-Jung, Nossloch, Alemania) y se colorearon con Hematoxilina y Eosina para evaluar los cambios histológicos generales e identificar los tipos celulares en los infiltrados inflamatorios. Los cortes se observaron en microscopio con

sistema de captura de imágenes (Leica Microsystems AG, Alemania).

La severidad de la lesión en el corazón fue evaluada según los criterios semicuantitativos establecidos por Herman [31]. Este sistema de clasificación se basa en el porcentaje de cardiomiocitos que muestran pérdida miofibrilar, vacuolización citoplasmática e infiltrado inflamatorio:

- Grado 0 = no hay daño;
- Grado 1 = < 5 %;
- Grado 1,5 = 5 - 15 %;
- Grado 2 = 16 - 25 %;
- Grado 2,5 = 26 - 35 %;
- Grado 3 = > 35 %.

El análisis histopatológico se llevó a cabo en el ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, septum y células mesoteliales del epicardio.

La gravedad de la lesión hepática fue evaluada tomando como base los criterios semicuantitativos descritos para la esteatohepatitis no alcohólica [32]. Este sistema de clasificación se basa en la esteatosis, lesión de los hepatocitos e inflamación lobular.

Parámetros inflamatorios

1. **Lavado bronqueo alveolar (BAL):** La técnica del BAL empleada fue desarrollada por Brain [33] y modificada por Tasat y De Rey [34]. A brevedad, se practicó la eutanasia de los animales mediante una sobredosis de Clorhidrato de Ketamina (Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) por vía intraperitoneal e inmediatamente se expuso, canuló y perfundió la tráquea con 1 ml de PBS 1X (frío, libre de Ca y Mg, pH 7,2 - 7,4). Con el fin de obtener una cantidad óptima de células, el lavado con PBS 1X se repitió 12 veces. La suspensión celular se centrifugó durante 10 minutos a 800xg a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en 1 ml de PBS 1X.
2. **Recuento celular total y diferencial:** El recuento de células totales obtenidas en el BAL se realizó en cámara de Neubauer. El recuento celular diferencial se evaluó sobre extendidos celulares (0,5 - 1 x 10⁵ células), los que se fijaron en metanol (10 minutos) y se colorearon con Hematoxilina-Eosina, para poder distinguir las diferentes subpoblaciones celulares: Macrófagos Alveolares (MA), Polimorfonucleares (PMN) y Linfocitos (LIN). El número de MA, PMN o LIN se informó como porcentaje del número celular total.
3. **Determinación de la citoquina proinflamatoria IL-6:** La determinación a nivel sistémico de la citoquina IL-6 en el suero de los animales se realizó mediante la técnica de ELISA (por sus siglas en inglés *-enzyme-linked immunosorbent assay*) (BD Pharmingen, San Diego, USA). En una placa de 96 pocillos se adicionó el anticuerpo de captura contra la citoquina (1 / 250 en carbonato de sodio 0,1 M pH 9,5), durante 12-14 horas a 4°C. Luego se lavó con buffer de lavado (PBS 1X - 0,05 % Tween 20) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y se bloqueó por 1 hora

con buffer de bloqueo 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) en PBS 1X. Posteriormente, la placa se lavó y las muestras y la citoquina patrón se sembraron e incubaron durante 2 horas. El anticuerpo de detección biotinilado (1 / 250 en buffer de bloqueo) se agregó e incubó durante 1 hora. Nuevamente se lavó, adició estreptoavidina conjugada a peroxidasa y luego de 30 minutos y en oscuridad se agregó 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hasta observar color. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 655 nm (Lector de placas -Bio-Rad, PowerPac, Basic).

Metabolismo oxidativo

1. **Generación de especies reactivas del oxígeno:** El estudio de las especies reactivas del oxígeno (ROS), principalmente la producción intracelular del anión superóxido (O_2^-), se realizó en el BAL de los animales de los 3 grupos experimentales mediante el ensayo del nitroazul de tetrazolio (NBT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), según el método descrito por Hedley y Currie [35]. Las células obtenidas en el BAL se incubaron con una solución final de NBT (0,05 % en PBS) bajo agitación en un baño termostático (Dubnoff-Vicking, Argentina) durante 60 minutos a 37°C. Luego, el NBT se descartó y las células se fijaron con p-formaldehído 4 % (MP Biomedicals, Inc., Alemania) durante 10 minutos. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800xg durante 10 min, el sobrenadante se descartó y se agregaron 400 μ l de polivinilpirrolidona (0,1 % en H_2O bidestilada) por muestra. Para todos los grupos experimentales se realizaron extendidos por duplicado y las células fueron cuantificadas por microscopía óptica (Nikon Alphaphot-2 V52, Melville, Nueva York, USA). El resultado se informó como el porcentaje de células reactivas, considerando células reactivas aquellas que redujeron el NBT.

2. **Determinación de antioxidantes: Superóxido Dismutasa y Catalasa:** Para las determinaciones de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa se pesaron y disgregaron los pulmones y corazones de los animales de los tres grupos experimentales mediante disrupción mecánica en PBS 1X (5 ml/gr tejido). Los homogeneizados se centrifugaron 10 min a 800xg a 4°C y los sobrenadantes se guardaron a -20°C hasta su evaluación.

Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD): para la evaluación de la actividad de la SOD, a 2,95 ml de buffer glicina (50 mM, pH= 10,8) se le agregaron 50 μ l de adrenalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (60 mM pH = 2) y se registró la absorbancia a 480nm cada 10 segundos durante 1 minuto (Espectrofotómetro Shimadzu UV-1201V, Tokio, Japón). La SOD es capaz de inhibir la oxidación de la adrenalina a adenocromo, definiéndose una unidad de actividad SOD como la cantidad de enzima de una muestra capaz de causar el 50 % de inhibición. Esta evaluación se determinó, también, luego del agregado de 10 y 30 μ l de homogeneizado de pulmón o corazón, para luego comparar las cinéticas de la oxidación

de la adrenalina en ausencia o presencia de las muestras [36]. La actividad relativa de la SOD se calculó como la capacidad de esta de inhibir la tasa de oxidación de la adrenalina, y los resultados se expresaron como unidades de actividad SOD por mg de proteínas [37].

Actividad de la catalasa (CAT): la determinación de la actividad de la CAT se realizó siguiendo la disminución de H_2O_2 a través de la absorbancia a 240 nm en función del tiempo [38]. Para esta determinación, 30 μ l del homogenizado de pulmón o corazón se agregaron a 2,97 ml de buffer fosfato (100 mM, pH= 7,2) y se midió la absorbancia basal de la muestra a 240 nm. Después, se agregaron 5 μ l de H_2O_2 8,8 M, y la absorbancia se registró cada 10 segundos durante 1 minuto. Esta reacción es de pseudo primer orden, por lo que se grafica el \ln (Abs240nm) en función del tiempo. La cantidad de catalasa de las distintas muestras se calculó a partir de la pendiente de esta curva, que representa el tiempo de vida media de esta enzima. Los resultados se expresan como pmol/mg de proteínas totales.

Parámetros Bioquímicos

El análisis bioquímico a nivel sistémico se realizó en muestras de sangre tomadas de animales de los tres grupos experimentales. La sangre se recolectó por punción cardíaca y se obtuvo el suero por centrifugación a 13800xg durante 10 minutos. Se evaluaron en el perfil lipídico: colesterol total (Col Tot), lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y triglicéridos (TG) y en el perfil enzimático: aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT).

1. **Perfil lipídico:** Los niveles séricos de Col Tot y TG se cuantificaron por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador COBAS C501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La concentración de C-HDL se determinó mediante métodos de precipitación selectivos que emplean ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio [39].

2. **Perfil enzimático:** Las actividades enzimáticas de ALT y AST fueron determinadas por métodos cinéticos en un autoanalizador Beckman (Beckman Coulter INC, Brea, USA).

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como los valores medios \pm la desviación estándar. Los experimentos se repitieron tres veces para ambos grupos etarios y para todas las variables estudiadas. El tratamiento estadístico se realizó mediante ANOVA (análisis de varianza) de dos factores y según corresponda el post- test de Newman-Keuls o Bonferroni para revelar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$).

Resultados

Caracterización fisicoquímica de las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires

El análisis morfoquímico de las partículas aéreas urbanas de Buenos Aires (UAP-BA) muestra partículas esféricas

de tamaño heterogéneo con predominancia de partículas pequeñas menores a 2,5 micrones ($MP_{2,5}$), presentando un núcleo carbonoso con trazas de algunos metales identificándose principalmente los siguientes elementos: Al, Si, K, Mg, Fe, S, Cl, y Cu (Figura sup 1 y 2).

Análisis Histomorfológico

Histología pulmonar

Con el fin de evaluar posibles alteraciones en el tejido pulmonar de ratones jóvenes o envejecidos expuestos a ROFA o UAP-BA en distintos tiempos, se realizaron análisis de cortes histológicos de pulmón. La instilación aguda de ambas partículas ambientales aéreas provocó alteraciones en la histología pulmonar de ratones jóvenes mostrando una respuesta inflamatoria, caracterizada por una reducción en el espacio aéreo alveolar debido a la infiltración celular compuesta principalmente de linfocitos y células polimorfonucleares (Figura sup 3 A-I). En los animales envejecidos la respuesta inflamatoria se observó focalizada a las 3 horas post-instilación tanto para ROFA (Figura 1B) como UAP-BA (Figura 1C), mientras que a las 24 y 48 horas post-instilación se observó infiltración de tipo difusa (Figura 1E, H, F, I).

Histología Cardíaca

A nivel cardíaco, la exposición a las partículas ambientales aéreas indujo cambios histopatológicos sólo en el ventrículo derecho (VD) de los animales envejecidos (Figura 2). Los corazones de los animales controles presentaron un miocardio y epicardio normal (Grado = 0). Por el contrario, el epicardio del VD de los ratones instilados con ROFA, a las 3 horas post-instilación mostró la presencia focal de células mesoteliales reactivas (Figura 2B), mientras que en el VD de los animales expuestos a UAP-BA se observó dilatación

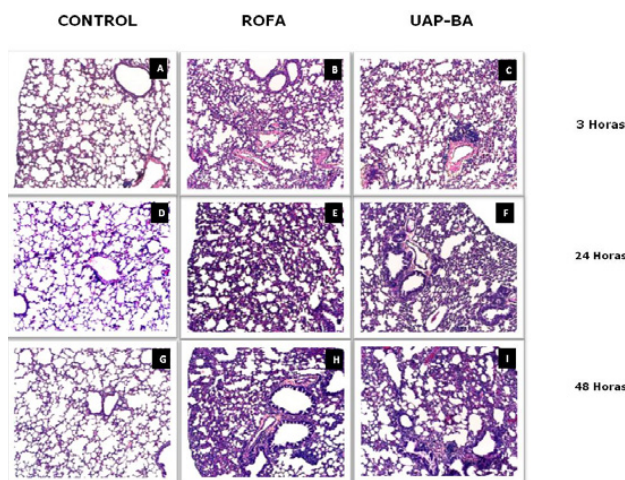
vascular, infiltrado inflamatorio en el epicardio e inflamación intersticial linfocitaria en el miocardio subepicárdico (Grado= 1) (Figura 2C). En ambos grupos de animales expuestos a las partículas, tanto a las 24 como a las 48 horas post-instilación, se observaron alteraciones en el epicardio y el miocardio subepicárdico (Figura 2E-F y H-I). La respuesta en el tiempo dependió del tipo de MP, siendo esta tisular a UAP-BA siempre más temprana que a ROFA.

Histología Hepática

La histología hepática correspondiente a ratones expuestos a ROFA o UAP-BA mostró claras diferencias en el parénquima y en las zonas vasculares en comparación con las correspondientes a ratones controles. La instilación intranasal de partículas ambientales aéreas provocó a nivel hepático inflamación intersticial compuesta principalmente por infiltración de linfocitos (LIN) y polimorfonucleares (PMN), necrosis (N) y esteatosis (S) en todo el parénquima afectando preferentemente la zona 3 (alrededor de la vena central, VC).

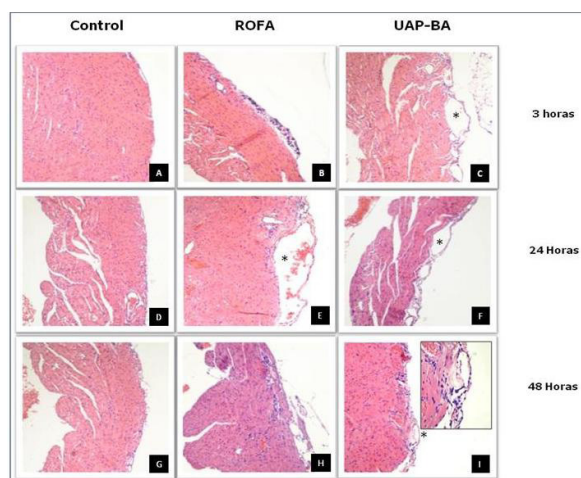
Los hígados de ratones jóvenes expuestos a ambos MP presentaron esteatohepatitis mixta [grado 1] a las 3 horas post- instilación, aumentando marcadamente a las 24 horas post-instilación (Figura sup 4B1-B6). Los hígados de ratones envejecidos controles (Figura 3A) mostraron leve infiltración inflamatoria [grado 0] característica del envejecimiento del hígado, así como en los expuestos a ambos MP se observaron focos aislados de necrosis, infiltración inflamatoria moderada (LIN, PMN) y esteatohepatitis mixta [grado 1] a las 3 horas post- instilación. Esta respuesta leve fue aumentando en gravedad a través del tiempo, observándose a las 48 horas post-instilación una esteatosis

Figura 1. Microfotografías del tracto respiratorio inferior de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo. Coloración H&E. Ori. Mag. 100X.



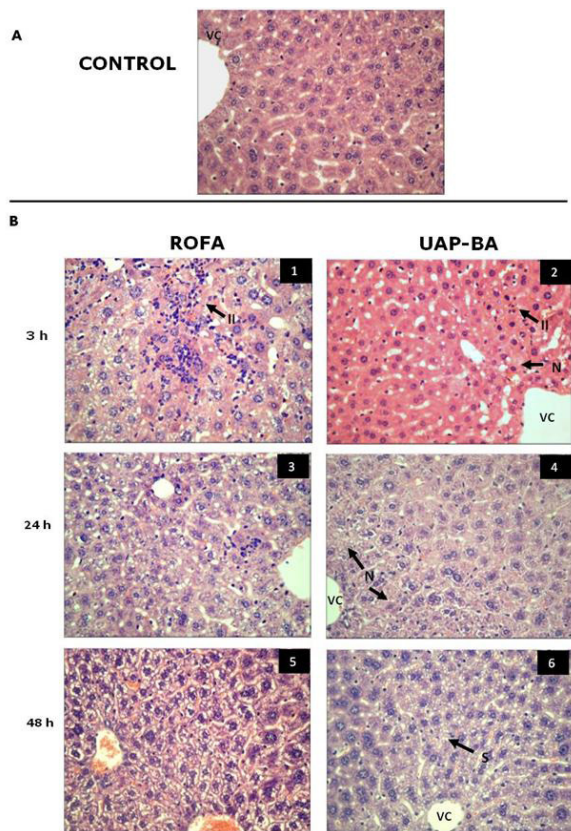
► Nótese el aumento de infiltrado de células inflamatorias para ambas partículas ambientales aéreas y para todos los tiempos ensayados.

Figura 2. Microfotografías del ventrículo derecho de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo. Coloración H&E. Ambos tipos de partículas provocaron reacción inflamatoria del epicardio del ventrículo derecho Mag. Ori. 100X.



► El asterisco (*) muestra dilatación vascular e infiltrado inflamatorio. 6-I: El recuadro destaca la zona afectada con mayor aumento (200X).

Figura 3. Microfotografías de hígados de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► A: control. B expuestos a las partículas. Ambos tipos de partículas provocaron una reacción inflamatoria. (II) Inflamación Intersticial, Necrosis (N), Esteatosis (E), Vena Central (VC). Mag Orig. 400X

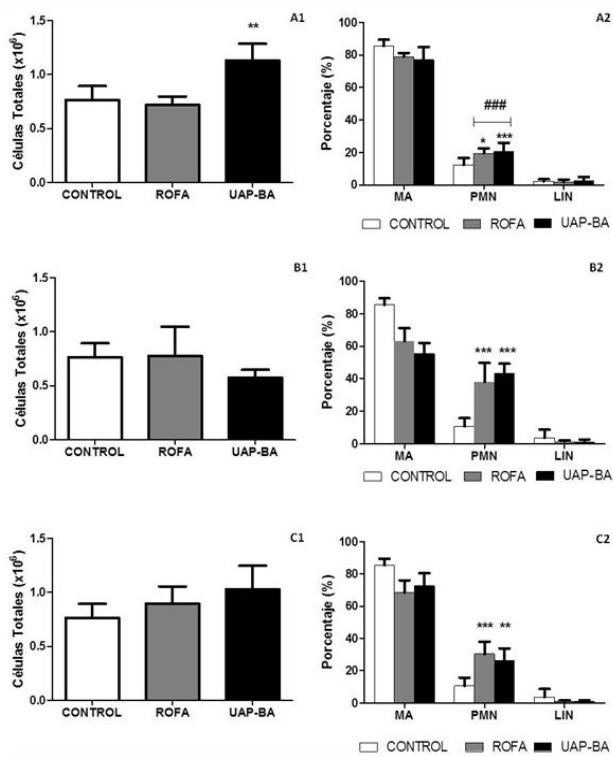
más intensa llegando a clasificarse como de grado 3 (Figura 3B5-B6).

Parámetros inflamatorios a nivel pulmonar Recuento Celular Total y Diferencial en el BAL

El número de células totales (RCT) y la composición celular diferencial (RCD) del lavado bronqueoalveolar (BAL) es un indicador de la respuesta inflamatoria y del reclutamiento de células al sitio de inflamación.

En animales jóvenes, ROFA presentó valores del RCT similares al grupo control para todos los tiempos ensayados (Figura 4A1-C1). En cambio, la exposición a UAP-BA estimuló un aumento significativo del RCT sólo a las 3 horas post-institilación (Figura 4A1). En animales envejecidos, sólo la exposición a ROFA, a las 3 horas post-institilación, estimuló el aumento del RCT respecto de los animales controles (Figura 5A1). A diferencia de ROFA, UAP-BA no provocó un aumento significativo del RCT a través del tiempo (Figura 5A1-C1). Sin embargo, para las dos poblaciones etarias, ambas partículas ambientales aéreas provocaron una alteración en la distribución sub-poblacional, con un aumento significativo de células polimorfonucleares (PMN) respecto del grupo

Figura 4. Recuento Celular Total (RCT) y Diferencial (RCD) en el BAL de ratones jóvenes expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► La figura muestra la biocinética para RCT y RCD. A1 y A2): 3 horas, B1 y B2): 24 horas, C1 y C2): 48 horas post-institilación. MA: macrófagos alveolares, PMN: polimorfonucleares, LIN: linfocitos. Los datos representan el valor medio \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del control. ### $p < 0,001$ entre ROFA y UAP-BA

control para todos los tiempos ensayados (Figura 4 A2-C2 y 5 A2-C2).

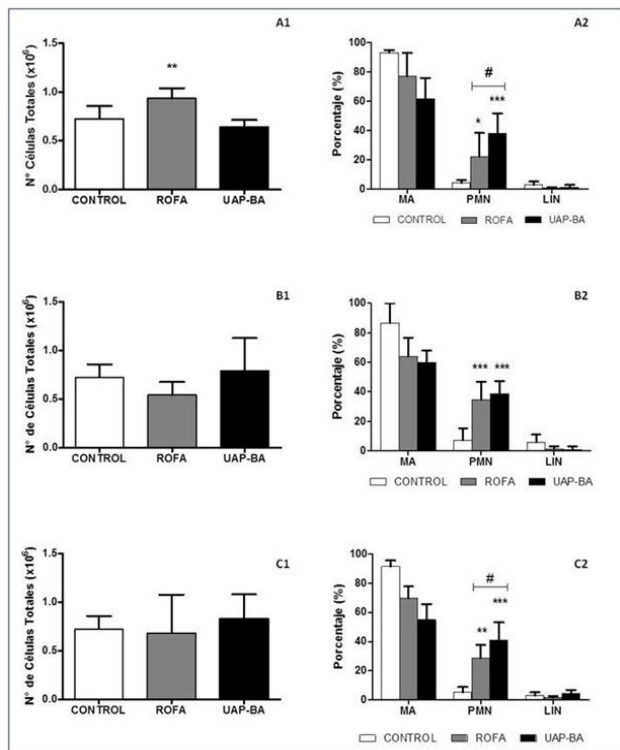
Metabolismo Oxidativo

El metabolismo oxidativo es uno de los parámetros biológicos comúnmente empleados para evaluar la respuesta local al MP. Su desbalance por aumento de especies oxidantes, disminución de especies antioxidantes o ambos, es indicativo de un posible daño a nivel celular. Se evaluó la generación de especies oxidantes en el BAL y la actividad de enzimas antioxidantes a nivel pulmonar y cardíaco.

Generación de Anión Superóxido en el BAL

El análisis de la generación del anión superóxido (O_2^-) en el BAL de ratones BALB/c jóvenes mostró, a las 3 horas post-institilación, un aumento significativo sólo en las células provenientes de ratones expuestos a ROFA. En cambio, a las 24 y 48 horas post-institilación la exposición a ambos MP estimuló significativamente la generación de esta especie reactiva del oxígeno (Figura 6A). En el BAL de los ratones envejecidos, para ambos tipos de partículas ambientales aéreas se observó una respuesta similar y dependiente

Figura 5. Recuento Celular Total (RCT) y Diferencial (RCD) en el BAL de ratones envejecidos expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► La figura muestra la biocinética para RCT y RCD. A1 y A2): 3 horas, B1 y B2): 24 horas, C1 y C2): 48 horas post-inhalación. MA: Macrófagos alveolares, PMN: polimorfonucleares, LIN: linfocitos. Los datos representan el valor medio \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del control. # $p < 0,05$ entre ROFA y UAP-BA.

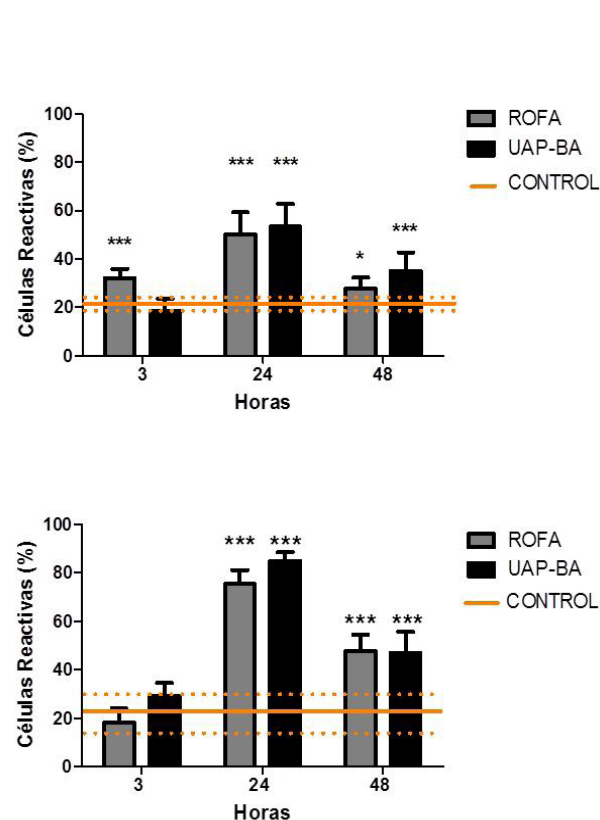
del tiempo. A las 3 horas post-inhalación, no se registraron cambios en la generación de O_2^- en el BAL de los animales expuestos a ROFA o UAP-BA. Sin embargo, a las 24 y 48 horas post-inhalación ambos tipos de partículas estimularon un aumento significativo ($p < 0,001$) en la generación de este radical libre (Figura 6B).

Actividad de enzimas antioxidantes en pulmón y corazón

Con el fin de determinar alteraciones en las defensas antioxidantes, se evaluaron a través del tiempo las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) en homogeneizados de pulmón y corazón de animales controles y expuestos al MP.

Los pulmones de animales jóvenes expuestos a ROFA o UAP-BA no presentaron cambios en la actividad de la SOD respecto al grupo control, en ninguno de los tiempos ensayados (Figura 7A). En pulmones de animales envejecidos, la exposición a ROFA, a las 24 horas post-inhalación, provocó un aumento significativo de la actividad de la SOD. Tanto a las 3 como a las 48 horas post-inhalación los valores fueron similares a los basales. Los animales expuestos a UAP-BA no mostraron alteración en la actividad de la SOD para nin-

Figura 6. Generación de Anión Superóxido en células del lavado bronqueoalveolar de ratones jóvenes (A) o envejecidos (B) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio \pm SD. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas

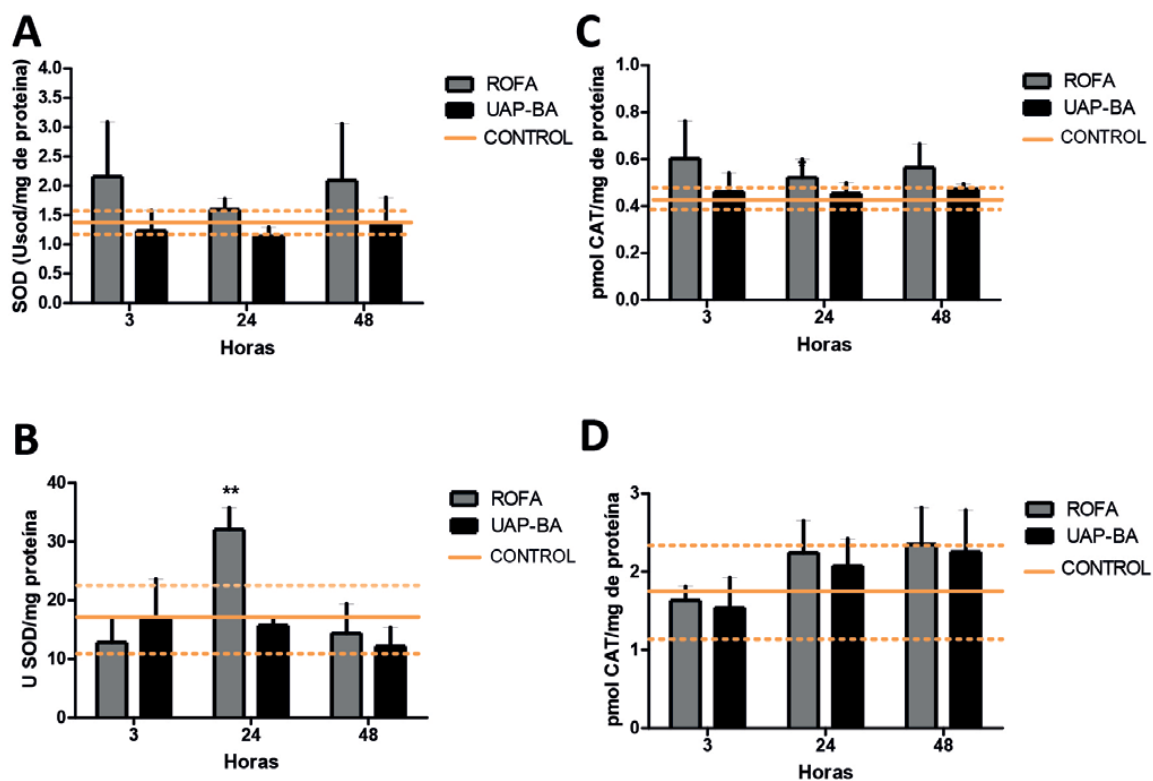
guno de los tiempos ensayados (Figura 7B). Tanto para animales jóvenes (Figura 7C) como envejecidos (Figura 7D) la actividad de la enzima CAT a nivel pulmonar se mantuvo sin cambios respecto del grupo control en el rango de tiempo ensayado.

A nivel cardíaco, los animales jóvenes expuestos al MP presentaron a las 24 horas post-inhalación una disminución de la actividad de la SOD (Figura 8A) y CAT (Figura 8C). En animales envejecidos, la actividad de la SOD aumentó, significativamente, sólo en los ratones expuestos a ROFA a las 24 y 48 horas post-inhalación. De manera similar a lo observado en el pulmón, a nivel cardíaco UAP-BA no provocó variaciones en la actividad de SOD a través del tiempo (Figura 8B). La biocinética de la actividad de la enzima CAT en los corazones de animales expuestos al MP se mantuvo sin cambios respecto del grupo control en el rango de tiempo ensayado (8D).

Respuesta sistémica a la exposición al MP

Con el fin de evaluar el efecto sistémico de ROFA y UAP-BA se dosaron en el suero de ratones controles y expuestos a las partículas ambientales aéreas, el perfil lipídico, enzimá-

Figura 7. Actividad en pulmón de la Superóxido Dismutasa y Catalasa de ratones jóvenes (A, C) o envejecidos (B, D) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio \pm SD. ** $p < 0,01$ respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas.

tico e inflamatorio como indicadores de daño a órganos e inflamación.

Perfil lipídico

El análisis del perfil lipídico de los animales jóvenes (Tabla Sup 1) y envejecidos (Tabla Sup 2) expuestos a ROFA o UAP-BA no mostró cambios en los valores de colesterol total (Col Tot), lipoproteína de alta densidad (C-HDL) o triglicéridos (TG), respecto de los valores correspondientes al grupo control en ninguno de los tiempos ensayados.

Perfil enzimático

Los indicadores sistémicos de posible daño en órganos como hígado y corazón, se evaluaron con un dosaje de los niveles séricos de Alanina aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST) de los animales controles y expuestos a ROFA o UAP-BA.

Los animales jóvenes expuestos a ambos MP mostraron niveles séricos elevados de la enzima AST sólo a las 3 horas post-instilación (Figura 9A). En cambio, la enzima ALT se mantuvo elevada para todos los tiempos estudiados (Figura 9A-C). En los animales envejecidos, la exposición al MP provocó un aumento en el nivel enzimático sérico de ALT a las 3 horas post-instilación, para ambos tipos de partículas

(Figura 9D). La enzima AST se encontró elevada sólo en el suero de los animales expuestos a UAP-BA a las 3 y 48 horas post-instilación (Figura 9D Y F).

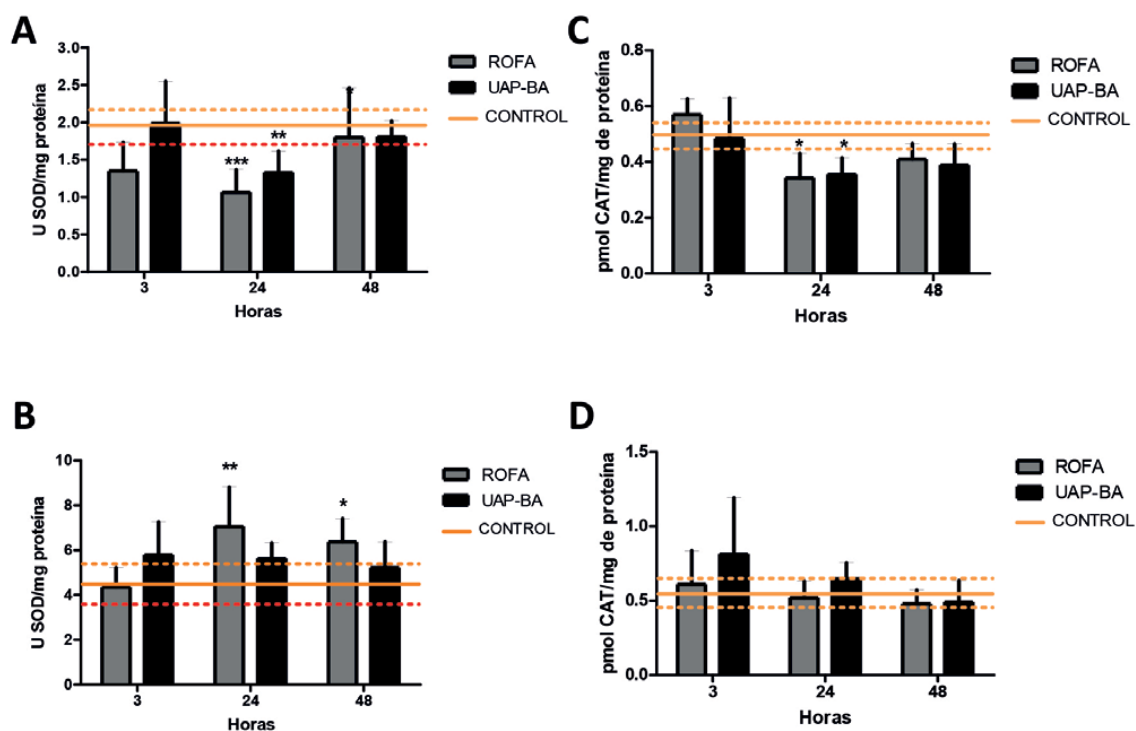
Perfil inflamatorio

Como parámetro de inflamación sistémico, se evaluó la citoquina pro-inflamatoria interleuquina 6 (IL-6) en suero de animales controles y expuestos a ROFA o UAP-BA. Los animales jóvenes expuestos a cualquiera de las partículas ambientales presentaron un aumento en los niveles de IL-6 a las 3 horas post-instilación respecto de los controles, disminuyendo y alcanzando niveles basales a las 24 horas (Figura 10A). En concordancia, en los animales envejecidos ambas partículas ambientales aumentaron significativamente la liberación de esta citoquina a las 3 horas post-instilación. Sin embargo, el aumento provocado por ROFA en los niveles de IL-6 alcanzó su máximo a las 3 horas, manteniéndose significativamente elevada a las 24 horas hasta caer a niveles basales a las 48 horas. (Figura 10B).

Discusión

La acción de las partículas en la salud depende no sólo de la composición química sino también de la concentración, tiempo de exposición a las mismas y del grupo etario

Figura 8. Actividad en corazón de la Superóxido Dismutasa y Catalasa de ratones jóvenes (A, C) o envejecidos (B, D) expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Las barras representan el valor medio \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del control. El valor del control se representa como una línea llena y el intervalo de dispersión como dos líneas punteadas.

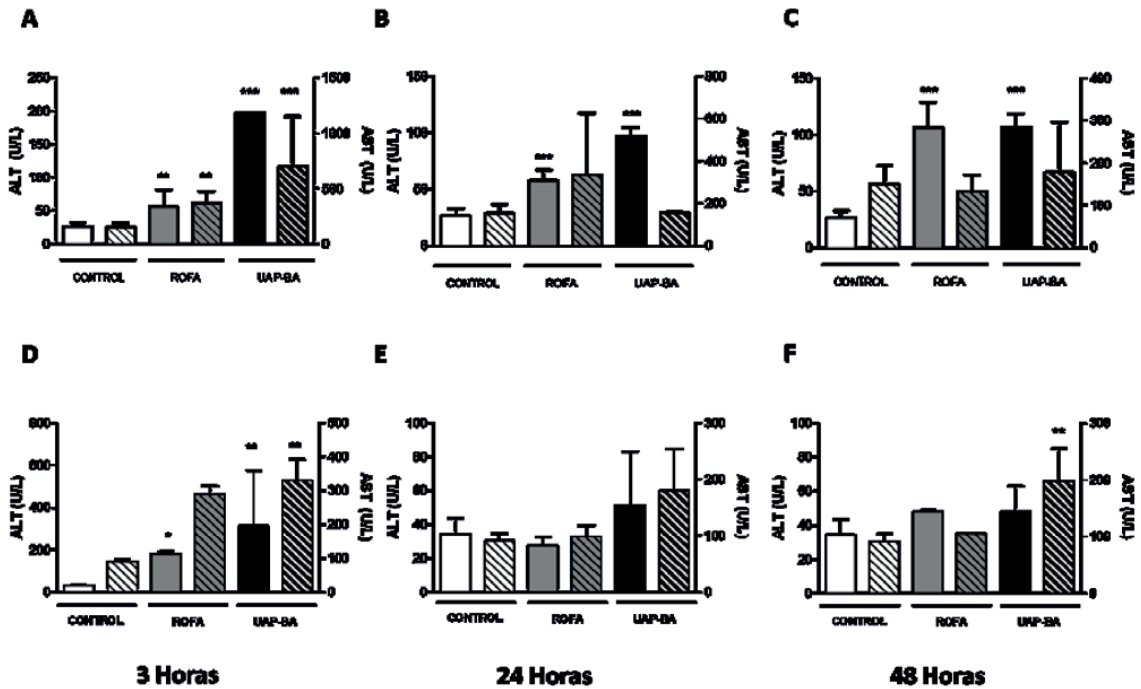
A nivel pulmonar, encontramos que en animales jóvenes expuestos a las partículas aéreas de la Ciudad de Buenos Aires (UAP-BA), el recuento celular total (RCT) aumentó sólo tempranamente (3 horas post-inhalación). Sin embargo, el porcentaje de polimorfonucleares (PMN) aumentó para todos los tiempos ensayados en las dos poblaciones etarias. En concordancia, la histología pulmonar mostró disminución del área alveolar debida a la infiltración de células inflamatorias. Por lo tanto, tal como sucede en otras megaciudades como Milano y Sao Paulo [40-42], en Buenos Aires las partículas urbanas causaron respuesta inflamatoria a nivel pulmonar en las dos poblaciones etarias estudiadas.

Las partículas ambientales aéreas, principalmente las ultrafinas, pueden actuar a nivel local sobre el sistema respiratorio como a distancia, llegando a órganos como hígado, corazón, bazo, cerebro [11,43-48]. Por ello, además de evaluar la respuesta local a nivel pulmonar, también se evaluó a nivel cardíaco y hepático la respuesta directa o indirecta al MP. En este sentido, encontramos que UAP-BA y ROFA, desencadenaron una respuesta de tipo inflamatoria caracterizada por infiltración leucocitaria en corazón e hígado, dilatación de los vasos en el epicardio cardíaco y zonas de necrosis a nivel hepático. Es importante señalar que a nivel cardíaco las señales indicativas de un proceso inflamatorio

aparecieron siempre más tempranamente en los animales expuestos UAP-BA que en los animales expuestos a ROFA. Esta respuesta podría ser consecuencia de diferencias en el tamaño aerodinámico y forma de estas dos partículas. Dado que UAP-BA es más pequeña que ROFA, UAP-BA podría translocarse rápidamente al sistema vascular, ejerciendo su efecto más tempranamente en órganos a distancias.

La respuesta inflamatoria en el sistema cardiorrespiratorio podría deberse a un desbalance oxidativo previo [49], por ello se abordó el análisis del metabolismo oxidativo en pulmón y corazón de los animales jóvenes y envejecidos expuestos al MP. En este contexto, a nivel pulmonar se comprobó que ambas partículas, independientemente de su composición química incrementaron la generación de anión superóxido (O_2^-) en animales jóvenes y envejecidos. Es conocido que los metales son inductores de la generación de radicales libres [50], por eso, se sugiere que son los metales presentes en ROFA [51,52] los que, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), inducen la expresión de mediadores inflamatorios provocando injuria pulmonar [28,51,53] y cardíaca [54,55]. No obstante, MacNee y Donaldson [56] propusieron que los metales presentes en el MP no son los únicos responsables de desencadenar desbalance oxidativo. En este sentido. UAP-BA

Figura 9. Concentración sérica de ALT (U/L) y AST (U/L) a través del tiempo. Ratones jóvenes (A, B, C) o envejecidos (D, E, F) controles (barras blancas), expuestos a ROFA (barras grises) o expuestos a UAP-BA (barras negras).



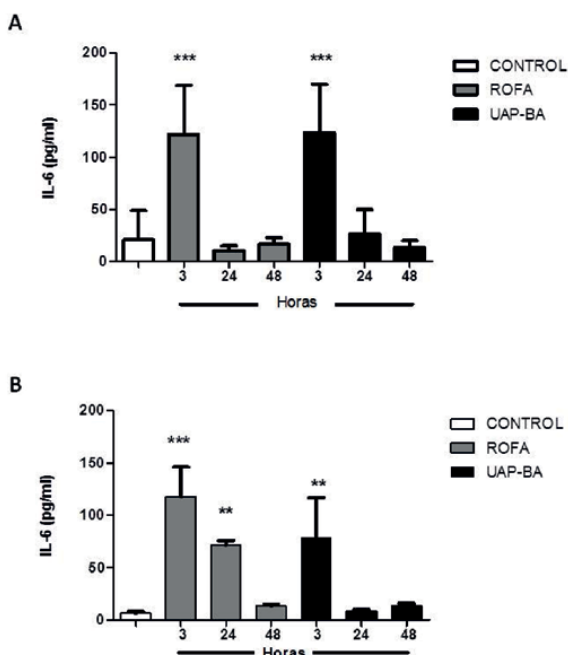
► Las barras representan el valor medio \pm SD. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del control

se caracteriza por presentar alto contenido de compuestos volátiles orgánicos y bajas trazas metálicas. Estos resultados avalan la hipótesis de MacNee y Donaldson, la que sostiene que para los animales expuestos a UAP-BA, la vía de activación de señalización intracelular para la producción de ROS podría deberse a la fracción orgánica. En cuanto a la respuesta antioxidante, UAP-BA en ambas poblaciones no movilizó las enzimas SOD y CAT, sugiriendo un posible desbalance oxidativo a nivel pulmonar. Cabe destacar que, aunque en animales envejecidos ROFA movilizó la SOD (24 horas post-institación), histológicamente se observó daño a nivel pulmonar. A nivel cardíaco, para ambos MP, se encontró una reducción en la actividad de la SOD y CAT (24 horas post-institación) en animales jóvenes que mostraron alteración del metabolismo oxidativo. Sin embargo, en animales envejecidos la respuesta antioxidante fue dependiente del MP. Sólo ROFA movilizó SOD para compensar un posible aumento de especies activas del oxígeno evitando así el desbalance oxidativo. En cuanto a UAP-BA, la ausencia de respuesta antioxidante sumada a la rápida respuesta inflamatoria a nivel cardíaco sugeriría que este MP, posiblemente debido a su menor tamaño aerodinámico, posee un grado de toxicidad mayor que ROFA.

El desarrollo de enfermedades cardiovasculares y eventos cardíacos agudos asociados al MP [5,6-57] podría involucrar una respuesta sistémica [13]. Es por eso, que se estudió la respuesta sistémica a ROFA y UAP-BA mediante

biomarcadores séricos como la citoquina proinflamatoria interleuquina IL-6 (IL-6), y las enzimas Alanino aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST) en animales jóvenes y envejecidos. Respecto de la IL-6, se encontró un incremento en los niveles séricos de esta citoquina a las 3 horas post-exposición en animales expuestos a ROFA o UAP-BA de ambos grupos etarios. Este efecto está asociado a un aumento en la proporción de PMN y generación de ROS en el BAL, indicativo de un proceso inflamatorio pulmonar. En este sentido, Yu [58] demostró que la IL-6 juega un papel crítico en la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar en ratones luego de la exposición a contaminantes aéreos. En relación con las transaminasas, la enzima ALT es un conocido marcador de hepatotoxicidad y la AST de hepatotoxicidad y/o enfermedades cardiovasculares [59]. Si bien ambas enzimas responden al daño hepático, la concentración de ALT en suero es el biomarcador más común y mejor establecido para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad hepática aguda y crónica [60]. En animales jóvenes, la exposición a las partículas provocó aumento significativo en los niveles de ambas enzimas al menor tiempo estudiado (3 horas post-institación). Estos resultados concuerdan con los publicados por Pan [61] donde reportan un aumento en los niveles de ALT en individuos expuestos a $MP_{2,5}$, además sugieren que la exposición a largo plazo aumenta el riesgo de cáncer de hígado, siendo la base de la patogénesis la inflamación crónica. Por otro lado, los animales expuestos a

Figura 10. Niveles séricos de IL-6 a través del tiempo. Ratones jóvenes (A) o envejecidos (B) controles, expuestos a ROFA o a UAP-BA.



► Las barras representan el valor medio \pm SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto del control.

ROFA recién a las 48 horas presentaron en su suero valores de ALT tres veces superior a los valores normales. Nuevamente, estas diferencias temporales podrían deberse al menor tamaño aerodinámico de UAP-BA. En animales envejecidos, sólo se encontró un aumento temprano (3 horas post-inhalación) en los niveles séricos de AST, coincidiendo con las alteraciones hepáticas y cardíacas observadas histológicamente.

En conclusión, los resultados obtenidos *in vivo* indican que la exposición aguda a ROFA y UAP-BA, independientemente del grupo etario, provocan una respuesta inflamatoria y oxidativa a nivel pulmonar. Asimismo, la liberación de mediadores inflamatorios y oxidativos pulmonares o las partículas *per se* pueden llegar a la circulación e impactar a nivel sistémico y en órganos a distancia.

Por ello, se sostiene la hipótesis de que UAP-BA podría potencialmente provocar una respuesta biológica adversa, similar en individuos jóvenes y adultos que habitan la Ciudad de Buenos Aires.

Referencias bibliográficas

1. Pope CA, 3rd. Mortality effects of longer term exposures to fine particulate air pollution: review of recent epidemiological evidence. *Inhalation toxicology*. 2007;19 Suppl 1:33-8. doi: 10.1080/08958370701492961.
2. Pope CA, 3rd, Bates DV, Raizenne ME. Health effects of particulate air pollution: time for reassessment? *Environmental health perspectives*. 1995;103(5):472-80.
3. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T, Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1998;102(4 Pt 1):539-54.
4. Kunzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, et al. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment. *Lancet*. 2000;356(9232):795-801. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02653-2.
5. Schwartz J, Wypij D, Dockery D, Ware J, Zeger S, Spengler J, et al. Daily diaries of respiratory symptoms and air pollution: methodological issues and results. *Environmental health perspectives*. 1991;90:181-7.
6. Brunekreef B, Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *The European respiratory journal*. 2005;26(2):309-18. doi: 10.1183/09031936.05.00001805.
7. Schwela D. Air pollution and health in urban areas. *Reviews on environmental health*. 2000;15(1-2):13-42.
8. Dockery DW. Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 4:483-6.
9. Moshhammer H, Hutter HP, Hauck H, Neuberger M. Low levels of air pollution induce changes of lung function in a panel of schoolchildren. *The European respiratory journal*. 2006;27(6):1138-43. doi: 10.1183/09031936.06.00089605.
10. Gauderman WJ, Vora H, McConnell R, Berhane K, Gilliland F, Thomas D, et al. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *Lancet*. 2007;369(9561):571-7. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60037-3.
11. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultra-fine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2002;65(20):1531-43. doi: 10.1080/00984100290071658.
12. Brook RD, Rajagopalan S. Particulate matter air pollution and atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2010;12(5):291-300. doi: 10.1007/s11883-010-0122-7.
13. Franklin BA, Brook R, Arden Pope C, 3rd. Air pollution and cardiovascular disease. *Current problems in cardiology*. 2015;40(5):207-38. doi: 10.1016/j.cpcardi.2015.01.003.
14. INDEC CNhwicgaactp.

15. Bogó H, M. Otero, P. Castro, M.J. Azafrán, A. Kreiner, E.J. Calvo and R.M. Negri. Study of atmospheric particulate matter in Buenos Aires city. *Atmos Environ*. 2003;37:1135-47
16. Martin S, Dawidowski L, Mandalunis P, Cereceda-Balic F, Tasat DR. Characterization and biological effect of Buenos Aires urban air particles on mice lungs. *Environmental research*. 2007;105(3):340-9. doi: 10.1016/j.envres.2007.04.009.
17. EPA. PM Standards. The US Environmental Protection Agency. 2011.
18. WHO. Air Quality and Health. 2008.
19. Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Archives of environmental health*. 1995;50(2):159-63. doi: 10.1080/00039896.1995.9940893.
20. Braga AL, Zanobetti A, Schwartz J. Do respiratory epidemics confound the association between air pollution and daily deaths? *The European respiratory journal*. 2000;16(4):723-8.
21. Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, et al. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: Morbidity and mortality from air pollution in the United States. Research report. 2000;94(Pt 2):5-70; discussion 1-9.
22. Pope CA, 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environmental health perspectives*. 2000;108 Suppl 4:713-23.
23. Abrutzky R, Dawidowski L, Murgida A, Natenzon CE. [Air contamination in the Autonomous City of Buenos Aires: the current risk or future climate change, a false option]. *Ciencia & saude coletiva*. 2014;19(9):3763-73.
24. NIH Publication - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.
25. Orona NS, Ferraro SA, Astort F, Morales C, Brites F, Boero L, et al. Acute exposure to Buenos Aires air particles (UAP-BA) induces local and systemic inflammatory response in middle-aged mice: A time course study. *Environmental pollution*. 2016;208(Pt A):261-70. doi: 10.1016/j.envpol.2015.07.020.
26. Marchini T, Magnani ND, Paz ML, Vanasco V, Tasat D, Gonzalez Maglio DH, et al. Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;274(2):274-82. doi: 10.1016/j.taap.2013.11.013.
27. Delfosse VC, Tasat DR, Gioffre AK. In vivo short-term exposure to residual oil fly ash impairs pulmonary innate immune response against environmental mycobacterium infection. *Environmental toxicology*. 2015;30(5):589-96. doi: 10.1002/tox.21936.
28. Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environmental health perspectives*. 2002;110 Suppl 1:89-94.
29. Southam DS, Dolovich M, O'Byrne PM, Inman MD. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;282(4):L833-9. doi: 10.1152/ajplung.00173.2001.
30. Marchini T, Magnani N, D'Annunzio V, Tasat D, Gelpi RJ, Alvarez S, et al. Impaired cardiac mitochondrial function and contractile reserve following an acute exposure to environmental particulate matter. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(3):2545-52. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.012.
31. Herman EH, Zhang J, Chadwick DP, Ferrans VJ. Comparison of the protective effects of amifostine and dexrazoxane against the toxicity of doxorubicin in spontaneously hypertensive rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2000;45(4):329-34. doi: 10.1007/s002800050048.
32. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(42):5286-96.
33. Brain JD. The respiratory tract and the environment. *Environmental health perspectives*. 1977;20:113-26.
34. Tasat DR, de Rey BM. Cytotoxic effect of uranium dioxide on rat alveolar macrophages. *Environmental research*. 1987;44(1):71-81.
35. Hedley DW, Currie GA. Monocytes and macrophages in malignant melanoma. III. Reduction of nitroblue tetrazolium by peripheral blood monocytes. *British journal of cancer*. 1978;37(5):747-52.
36. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2001;388(2):261-6. doi: 10.1006/abbi.2001.2292.
37. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *The Journal of biological chemistry*. 1969;244(22):6056-63.
38. Maehly AC, Chance B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of biochemical analysis*. 1954;1:357-424.
39. Warnick GR, Mayfield C, Benderson J, Chen JS, Albers JJ. HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg²⁺ and by dextran sulfate-Mn²⁺-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method. *American journal of clinical pathology*. 1982;78(5):718-23.
40. Farina F, Sancini G, Battaglia C, Tinaglia V, Mantecca P, Camatini M, et al. Milano summer particulate matter (PM₁₀) triggers lung inflammation and extra pulmonary adverse events in mice. *PloS one*. 2013;8(2):e56636. doi: 10.1371/journal.pone.0056636.
41. Farina F, Sancini G, Mantecca P, Gallinotti D, Camatini M, Palestini P. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection. *Toxicology letters*. 2011;202(3):209-17. doi: 10.1016/j.

- toxlet.2011.01.031.
42. Riva DR, Magalhaes CB, Lopes AA, Lancas T, Mauad T, Malm O, et al. Low dose of fine particulate matter (PM_{2.5}) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhalation toxicology*. 2011;23(5):257-67. doi: 10.3109/08958378.2011.566290.
 43. Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109(21):2655-71. doi: 10.1161/01.CIR.0000128587.30041.C8.
 44. Brook RD. Cardiovascular effects of air pollution. *Clinical science*. 2008;115(6):175-87. doi: 10.1042/CS20070444.
 45. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environmental health perspectives*. 2001;109 Suppl 4:547-51.
 46. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001;164(9):1665-8. doi: 10.1164/ajrccm.164.9.2101036.
 47. Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, Schulz H, et al. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2002;65(20):1513-30. doi: 10.1080/00984100290071649.
 48. Khandoga A, Stampfl A, Takenaka S, Schulz H, Radykewicz R, Kreyling W, et al. Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation*. 2004;109(10):1320-5. doi: 10.1161/01.CIR.0000118524.62298.E8.
 49. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology*. 2003;109(3):250-65.
 50. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*. 2005;12(10):1161-208.
 51. Schroeder WH, Dobson M, Kane DM, Johnson ND. Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review. *Japca*. 1987;37(11):1267-85.
 52. Ferraro SA, Yakisich JS, Gallo FT, Tasat DR. Simvastatin pre-treatment prevents ambient particle-induced lung injury in mice. *Inhalation toxicology*. 2011;23(14):889-96. doi: 10.3109/08958378.2011.623195.
 53. Dreher K, Jaskot R, Kodavanti U, Lehmann J, Winsett D, Costa D. Soluble transition metals mediate the acute pulmonary injury and airway hyperreactivity induced by residual oil fly ash particles. *Chest*. 1996;109(3 Suppl):33S-4S.
 54. Cozzi E, Hazarika S, Stallings HW, 3rd, Cascio WE, Devlin RB, Lust RM, et al. Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2006;291(2):H894-903. doi: 10.1152/ajpheart.01362.2005.
 55. Kim JB, Kim C, Choi E, Park S, Park H, Pak HN, et al. Particulate air pollution induces arrhythmia via oxidative stress and calcium calmodulin kinase II activation. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012;259(1):66-73. doi: 10.1016/j.taap.2011.12.007.
 56. MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM₁₀ and ultrafine particles with special reference to COPD. *The European respiratory journal Supplement*. 2003;40:47s-51s.
 57. Brook RD. You are what you breathe: evidence linking air pollution and blood pressure. *Current hypertension reports*. 2005;7(6):427-34.
 58. Yu M, Zheng X, Witschi H, Pinkerton KE. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;68(2):488-97.
 59. Minuk GY. Canadian Association of Gastroenterology Practice Guidelines: evaluation of abnormal liver enzyme tests. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 1998;12(6):417-21.
 60. Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology*. 2014;147(4):765-83 e4. doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.018.
 61. Pan WC, Wu CD, Chen MJ, Huang YT, Chen CJ, Su HJ, et al. Fine Particle Pollution, Alanine Transaminase, and Liver Cancer: A Taiwanese Prospective Cohort Study (REVEAL-HBV). *Journal of the National Cancer Institute*. 2016;108(3). doi: 10.1093/jnci/djv341.

Figuras Complementarias

Tabla 1 sup. Perfil lipídico sérico de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.

Perfil lipídico (mg/dl)			
	Col Tot	C-HDL	TG
Control	139,0±32,8	87,8±15,7	214,6±46,9
ROFA _{3h}	123,7±24,1	88,8±13,8	126,6±31,3
UAP-BA _{3h}	127,0±12,3	94,0±1,5	122,0±1,0
ROFA _{24h}	138,3±4,2	95,7±10,2	152,7±44,3
UAP-BA _{24h}	153,3±16,1	104,7±2,5	183,7±75,9
ROFA _{48h}	106,0±22,8	78,0±5,8	148,8± 20,9
UAP-BA _{48h}	106,4±12,1	88,0±11,3	199,2±32,2

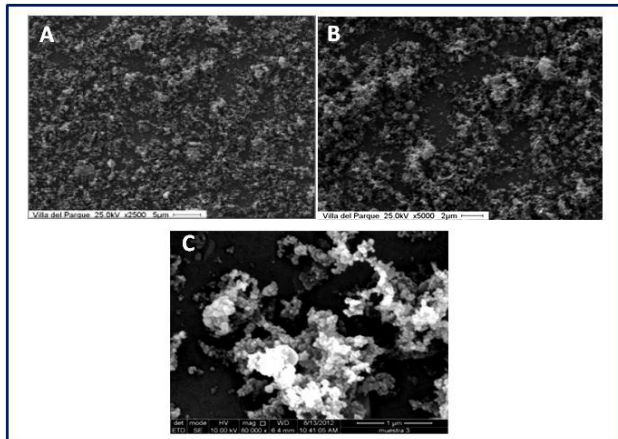
► Los valores representan las medias ± SD.

Tabla sup 2. Perfil lipídico sérico de ratones envejecidos controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.

Perfil lipídico (mg/dl)			
	Col Tot	C-HDL	TG
Control	100,4±19,6	82,8±16,9	198,2±56,9
ROFA _{3h}	112,0±24,2	97,5±21,4	193,0±9,2
UAP-BA _{3h}	104,0±16,2	92,0±11,5	150,5±28,3
ROFA _{24h}	117,8±17,8	91,5±18,5	155,0±44,9
UAP-BA _{24h}	97,2±12,9	72,7±6,6	196,5±70,1
ROFA _{48h}	85,0±10,3	76,0±0,1	113,0± 8,8
UAP-BA _{48h}	109,5±3,5	83,0±2,3	93,5±30,4

► Los valores representan las medias ± SD.

Figura 1 sup. Análisis morfológico de UAP-BA. Microscopía electrónica de Barrido (MEB) de UsuAP-BA.



► A). Mag. Orig. 2500X. B) Mag. Orig. 5000X. y C) Mag. Orig 80000X.

Figura 2 sup. Análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) de las partículas aéreas de Buenos Aires (UAP-BA).

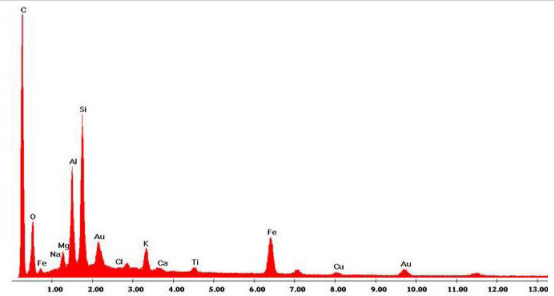
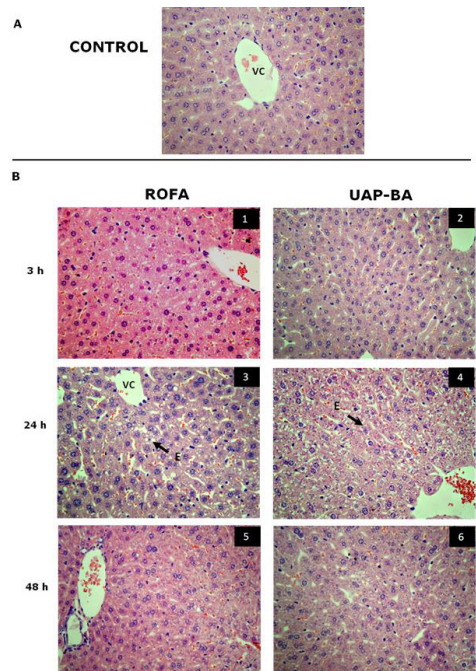
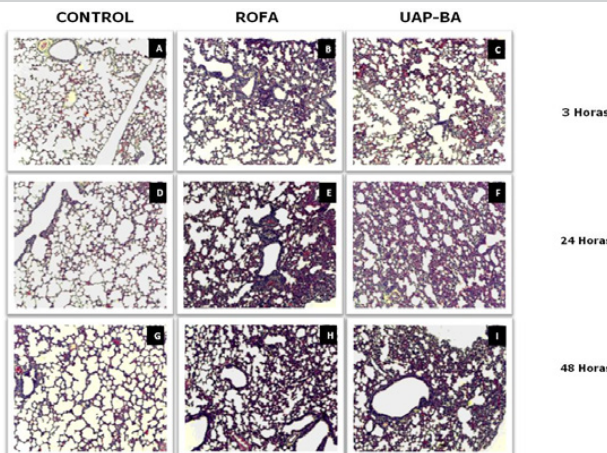


Figura 4 sup. Microfotografías de hígados de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► A: control. B expuestos a las partículas. Ambos tipos de partículas provocaron esteatosis (E). Vena Central (VC). Mag Orig. 400X

Figura 3 sup. Microfotografías del tracto respiratorio inferior de ratones jóvenes controles y expuestos a ROFA o UAP-BA a través del tiempo.



► Coloración H&E. Ori. Mag. 100X. Nótese el aumento de infiltrado de células inflamatorias para ambas partículas ambientales aéreas en todos los tiempos ensayados.