



Universidad de Valparaíso  
Escuela de Kinesiología  
Facultad de Medicina

---

**EFFECTO DE LAS ESENCIAS DE VAPEADORES, TABACO CON NICOTINA, TABACO SIN NICOTINA, MENTOL CON NICOTINA Y MENTOL SIN NICOTINA SOBRE LÍNEA CELULAR THP-1 DE MONOCITOS HUMANOS.**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA

AUTORES: DIEGO IGNACIO FORJÁN ESPINOZA  
NATALIA BELÉN VILLASECA PAVEZ

PROFESOR GUÍA: CARLOS JARA GUTIERREZ  
MSc., PhD.

PROFESOR CO-GUÍA: MARIA IGNACIA GROSSI MAGNARA  
Klga, Mg.

Escuela de Kinesiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valparaíso

**Valparaíso – Chile  
2022**



Universidad de Valparaíso  
Escuela de Kinesiología  
Facultad de Medicina

---

**EFFECTO DE LAS ESENCIAS DE VAPEADORES, TABACO CON NICOTINA, TABACO SIN NICOTINA, MENTOL CON NICOTINA Y MENTOL SIN NICOTINA SOBRE LÍNEA CELULAR THP-1 DE MONOCITOS HUMANOS.**

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN KINESIOLOGÍA

AUTORES: DIEGO IGNACIO FORJÁN ESPINOZA  
NATALIA BELÉN VILLASECA PAVEZ

PROFESOR GUÍA: CARLOS JARA GUTIERREZ  
MSc., PhD.

PROFESOR CO-GUÍA: MARIA IGNACIA GROSSI MAGNARA  
Klga., Mg.

Escuela de Kinesiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valparaíso

**Valparaíso – Chile  
2022**

## **Dedicatoria**

Luego de este largo proceso tan importante, queremos dedicar esta investigación a nuestras familias y amigos, los cuales fueron un pilar importante durante el desarrollo de este proceso. acompañándonos en los buenos y malos momentos.

También le queremos dedicar este trabajo a toda la ciencia de la salud y a la kinesiología para motivar a seguir con la investigación en diferentes campos de nuestra disciplina.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, queremos agradecer a nuestro profesor guía Carlos Jara Gutiérrez, por su gran apoyo y paciencia durante la realización de esta investigación y entrega de su conocimiento para el desarrollo de esta, también queremos nombrar a la profesora María Ignacia Grossi Bagnara, por su apoyo durante la aplicación de la investigación, además del profesor Joan Villena García y Carlos Viviani González por su ayuda en la resolución de dudas y formar parte de este proceso tan significativo para nosotros.

En último lugar, pero no menos importante, agradecemos a nuestros amigos y familiares que estuvieron presentes entregando su apoyo incondicional y constante animo en los momentos difíciles que se nos fueron presentando.

A todos y cada uno de ellos y ellas, gracias totales.

## **ÍNDICE**

|                                                                                                                                 |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....                                                                                             | 1        |
| II. ABREVIATURAS Y/O SIGLAS.....                                                                                                | 1        |
| III. Resumen.....                                                                                                               | 3        |
| IV. Abstract.....                                                                                                               | 4        |
| <b>CAPÍTULO I</b> .....                                                                                                         | <b>5</b> |
| Introducción. ....                                                                                                              | 5        |
| Marco Teórico .....                                                                                                             | 7        |
| Tabaquismo .....                                                                                                                | 7        |
| Cigarrillos electrónicos ( <i>e-cigarettes</i> ) o Sistemas electrónicos de administración<br>de nicotina ( <i>ENDS</i> ) ..... | 10       |
| Sustancias químicas asociadas.....                                                                                              | 12       |
| Monocito THP-1 humano. ....                                                                                                     | 14       |
| Balance Oxido Reductivo.....                                                                                                    | 15       |
| Estrés oxidativo. ....                                                                                                          | 16       |
| Especies reactivas de Oxígeno ( <i>ROS</i> ). ....                                                                              | 17       |
| Radicales libres. ....                                                                                                          | 18       |
| Muerte Celular. ....                                                                                                            | 21       |
| Daño oxidativo molecular.....                                                                                                   | 23       |
| Metodología. ....                                                                                                               | 26       |

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Tipo de estudio. ....                      | 28 |
| Técnicas e instrumentos. ....              | 28 |
| Procedimientos. ....                       | 30 |
| Recolección de condensado. ....            | 30 |
| Viabilidad celular. ....                   | 31 |
| <i>ROS</i> . ....                          | 32 |
| Potencial de membrana. ....                | 33 |
| Caspasas activas. ....                     | 34 |
| Protocolo para muestras de citómetro. .... | 35 |
| Operacionalización de Variables. ....      | 36 |
| Análisis estadístico ....                  | 37 |
| <b>CAPITULO III</b> .....                  | 38 |
| Resultados. ....                           | 38 |
| Viabilidad Celular. ....                   | 38 |
| <i>Producción de ROS</i> . ....            | 44 |
| Potencial de membrana. ....                | 46 |
| Caspasas Activas. ....                     | 47 |
| <b>CAPITULO IV</b> .....                   | 49 |
| Discusión ....                             | 49 |
| Conclusión ....                            | 54 |

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| <b>CAPITULO V .....</b> | <b>55</b> |
| Bibliografía .....      | 55        |

## I. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Tabla N°1:</u> Técnicas e instrumentos.                                        | 29 |
| <u>Tabla N°2:</u> Procedimiento para calcular viabilidad celular.                 | 31 |
| <u>Tabla N°3:</u> Procedimiento para calcular ROS.                                | 33 |
| <u>Tabla N°4:</u> Procedimiento para calcular potencial de membrana mitocondrial. | 34 |
| <u>Tabla N°5:</u> Procedimiento para calcular caspasas activas.                   | 35 |
| <u>Tabla N°6:</u> Concentración efectiva media ( $EC_{50}$ ).                     | 44 |
| Figura N°1: Porcentaje de viabilidad celular con Tabaco sin nicotina.             | 39 |
| Figura N°2: Porcentaje de viabilidad celular con Tabaco con nicotina.             | 40 |
| Figura N°3: Porcentaje de viabilidad celular con Mentol sin nicotina.             | 41 |
| Figura N°4: Porcentaje de viabilidad celular con Mentol con nicotina.             | 42 |
| Figura N°5: Porcentaje de viabilidad celular a 10 $\mu$ L de cada condensado      | 43 |
| Figura N°6: Respuesta morfológica de las células THP-1.                           | 43 |
| Figura N°7: Porcentaje de células con expresión de producción de ROS.             | 45 |
| Figura N°8: Porcentaje de células con pérdida en el potencial de membrana.        | 47 |
| Figura N°9: Porcentaje de células con expresión de Caspasas Activas.              | 48 |

## II. ABREVIATURAS Y/O SIGLAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

*ENDS: Electronic Nicotine Delivery Systems*

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

*IQOS: I Quit Ordinary Smoking*

MCN: Mentol con nicotina

MSN: Mentol sin nicotina

MINSAL: Ministerio de Salud

*NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor kappa B*

NOS: Óxido nítrico sintasa

*i*NOS: Óxido nítrico sintasa inducible

*e*NOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

*n*NOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

SEAN: Sistemas Electrónicos de Administración de Nicotina

TCN: Tabaco con nicotina

TSN: Tabaco sin nicotina

*ROS: Reactive Oxygen Species*

### III. Resumen

*En el último tiempo ha aumentado el uso de los cigarrillos electrónicos como una alternativa “saludable” para cesar el hábito tabáquico, desconociéndose los efectos a largo y corto plazo que pueden tener en la vía aérea, por lo que el propósito de este estudio es aumentar la evidencia de los efectos.*

**Objetivo:** *Evaluar las alteraciones en el balance redox y la viabilidad celular del monocito THP-1 humano expuestas a condensados de vapeador.*

**Método:** *La presente investigación corresponde a un estudio cualitativo in vitro con diseño experimental con comparación de múltiples muestras independientes.*

*El universo lo conformaron las células THP-1 Humano a las cuales se dividió en 6 muestras (Muestra Control, Muestra Control positivo, Muestra expuesta a Tabaco sin nicotina, Muestra expuesta a Tabaco con nicotina, Muestra expuesta a Mentol sin nicotina y Muestra expuesta a Mentol con nicotina).*

*Para cada muestra se evaluó viabilidad celular, parámetros REDOX (expresión de ROS, permeabilidad de membrana mitocondrial y expresión de caspasas activas).*

**Resultados:** *Respecto a la viabilidad celular, se ve que se sigue un patrón de concentración dependencia en todas las muestras, a excepción de la muestra expuesta a Mentol sin nicotina. Con esta información se determinó como EC<sub>50</sub> 2,5 µL.*

*Para los parámetros REDOX hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p\text{-value} < 0.05$ ) con todas las muestras respecto al grupo control. La muestra expuesta a Tabaco con nicotina presento una mayor expresión de caspasas activas ( $p\text{-value} < 0.05$ ) en comparación con el Grupo control.*

**Conclusiones:** *El “vapear” genera un desbalance REDOX, predominando un estado oxidativo, daños en la membrana mitocondrial y en algunos casos activación de caspasas*

**Palabras claves:** *Vapeador, Esencias, Nicotina, Citotoxicidad, Cese del hábito tabáquico, Monocitos THP-1 humano, especies reactivas de Oxígeno, muerte celular regulada.*

#### IV. Abstract

*In recent times, the use of electronic cigarettes has increased as a "healthy" alternative to quit smoking, ignoring the long and short-term effects they may have on the airway, so the purpose of this study is to increase evidence of effects.*

**Objective:** *To evaluate the alterations in the redox balance and the cell viability of the human THP-1 monocyte exposed to vaping condensates.*

**Method:** *This research corresponds to a qualitative in vitro study with an experimental design with comparison of multiple independent samples.*

*The universe was made up of Human THP-1 cells, which were divided into 6 samples (Control Sample, Positive Control Sample, Sample exposed to Tobacco without nicotine, Sample exposed to Tobacco with nicotine, Sample exposed to Menthol without nicotine and Sample exposed to menthol with nicotine).*

*For each sample, cell viability and REDOX parameters (ROS expression, mitochondrial membrane permeability and expression of active caspases) were evaluated.*

**Results:** *Regarding cell viability, it is seen that a concentration-dependence pattern is followed in all the samples, with the exception of the sample exposed to Menthol without nicotine. With this information, 2.5  $\mu$ L was determined as EC<sub>50</sub>.*

*For the REDOX parameters there were statistically significant differences ( $p$ -value < 0.05) with all the samples compared to the control group. The sample exposed to tobacco with nicotine presented a higher expression of active caspases ( $p$ -value < 0.05) compared to the control group.*

**Conclusions:** *"Vaping" generates a REDOX imbalance, predominantly an oxidative state, damages the mitochondrial membrane and in some cases caspase activation.*

**Keywords:** *Vaper, Essences, Nicotine, Cytotoxicity, Smoking cessation, Human THP-1 monocytes, reactive oxygen species, regulated cell death.*

## CAPÍTULO I

### Introducción.

En la actualidad, el tabaquismo se ha transformado en una epidemia y corresponde a una de las mayores amenazas para la salud pública a nivel mundial. Este hábito que deriva en enfermedad, *“mata a más de 8 millones de personas al año, de las cuales más de 7 millones son consumidores directos y alrededor de 1,2 millones son no fumadores expuestos al humo ajeno, conocidos como fumadores pasivos”* (OMS, 2021).

Al ser una amenaza a la salud pública, la Organización Panamericana de Salud (OPS, 2020) ha iniciado planes de control y prevención para reducir la carga de enfermedad, muerte y gastos económicos generados por el consumo de tabaco.

Dicho plan ha generado conciencia en la población sobre los riesgos que provoca el tabaco, riesgos tales como ser un factor promotor de patologías crónicas no transmisibles, generar adicción a la nicotina, promover la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), riesgo de generar cáncer pulmonar, producir alteraciones cardiovasculares, entre otras que finalmente llevan a la muerte (OPS, 2017).

Ante el panorama recientemente expuesto, la población ha ido en la tendencia de dejar el cigarrillo convencional a cambio de aparatos aparentemente “saludables”,

entre ellos los vapeadores, cigarrillos electrónicos (*e-cigarettes*), sistemas electrónicos de administración de nicotina (SEAN) o dispositivos electrónicos de liberación de nicotina (*ENDS*, por sus siglas en inglés) (SENDA, 2018). Sin embargo y como afirma la OPS el 2020, *“Frente al consumo de sistemas electrónicos de suministro de nicotina..., que ha venido en auge en los últimos tiempos, la evidencia revela que estos productos son perjudiciales para la salud y no son seguros”*.

Esto ha dado una falsa seguridad ante el uso de estos aparatos, lo que lleva a *“un rápido crecimiento del uso de cigarrillos electrónicos, particularmente entre los jóvenes”* (Kuntic et al., 2020). Sumado a esto, de acuerdo con la OPS (2017) *“Los niños y adolescentes que utilizan cigarrillos electrónicos tienen al menos el doble de probabilidades de fumar cigarrillos más tarde en su vida”*.

Pese a las advertencias sobre el uso de estos dispositivos electrónicos, aún se desconoce el papel y la seguridad de los vapeadores como terapia de reemplazo de nicotina o como alternativa para el cese del hábito tabáquico, *“la cantidad de estudios y la cantidad de información mecanicista son limitadas”* (Kuntic et al., 2020). Por lo que, el propósito de este estudio es aumentar la información respecto a estos sistemas electrónicos de administración de nicotina y sus consecuencias en los tejidos involucrados tanto a nivel celular y molecular.

En busca de evaluar la respuesta de las células del sistema respiratorio ante los condensados de vapeador es que se plantea la pregunta ¿Las células de la línea de Monocito THP-1 humano, que se ven expuestas a condensados de vapeador, activan vías de muerte medidas por caspasas y daño debido al aumento en la

producción de *ROS* (*Reactive oxygen species*), en comparación con las células que no han sido expuestas dentro de un mismo tiempo de estudio?

## **Marco Teórico**

### **Tabaquismo**

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define al tabaquismo como una enfermedad adictiva crónica que evoluciona con recaídas. El responsable de esta adicción es la nicotina, la que actúa a nivel del sistema nervioso central, la cual tiene como característica generar tolerancia, dependencia física y psicológica (Lieberman *et al.*, 2018). Cabe mencionar que actualmente, el tabaquismo es considerado como una pandemia y genera la mayor cantidad de gastos no solo a nivel de salud pública, sino que también al costo del capital humano, producto de su morbilidad (OPS, 2013).

El tabaquismo es la principal causa de enfermedad, discapacidad y muerte prematura prevenible (Bello, 2019) y los fumadores pierden en promedio diez años de esperanza de vida en comparación con los no fumadores (Thun *et al.*, 2013). Como resultado, se ha establecido una relación negativa entre fumar y la calidad de vida, la magnitud de esta relación es directamente proporcional a la cantidad de cigarrillos consumidos, por ejemplo, aquellos que consumen menos de 10 cigarrillos

al día, la expectativa de vida promedio disminuye en 5 años, y el riesgo de padecer cáncer de pulmón aumenta en 20 veces, mientras que los que fuman menos de 4 cigarrillos al día, el riesgo de padecerlo es de 5 veces más en comparación a un no fumador (Grossi et al., 2018).

Por otro lado, el humo consumido de segunda mano parece estar asociado de la misma forma con la calidad de vida, causando así una pérdida de años de vida saludables en los no fumadores (Goldenberg et al., 2014; Grossi et al, 2018). Por lo tanto, dejar de fumar mejora de manera significativa la calidad de vida (Goldenberg et al., 2014).

De acuerdo a las estadísticas a nivel Internacional, según el último informe de la Organización Panamericana de Salud (OPS, 2013), Chile es el país con la mayor prevalencia en América de consumo de tabaco con un 38,7% y a nivel Nacional según la Encuesta Nacional de Salud, el 33,3% de los chilenos son fumadores (Petermann et al., 2017).

El tabaquismo es un factor causal de diversas enfermedades multisistémicas, afectando tanto a fumadores como no fumadores (OMS, 2015). Una de las principales patologías causadas por el consumo de tabaco es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), enfermedad pulmonar con una afectación sistémica, la cual es la responsable de la mayoría de los gastos en salud a nivel mundial (Salvi & Barnes, 2009; Eisner et al., 2010). Además, el consumo de cigarrillos es considerado como uno de los principales factores de riesgos de las cuatro patologías crónicas no transmisibles más prevalentes en la actualidad,

hablamos de las patologías cardiovasculares, cáncer, patologías respiratorias crónicas y diabetes mellitus tipo II (Cascudo *et al.*, 2018).

Las patologías que afectan al sistema respiratorio implican una respuesta inflamatoria en donde hay una activación de células endoteliales, células epiteliales, macrófagos residentes, además de la activación de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos (Colombo *et al.*, 2014).

Colombo relaciona el consumo de cigarrillos y su rol importante en la activación de vías celulares que promueven la inflamación, la cual actúa a través de tres vías:

(I) Producción de moléculas quimiotácticas directamente estimuladas por especies reactivas de oxígeno (*ROS*) presentes en el humo de combustión del cigarrillo.

(II) Activación de diversas vías de señalización intracelular induciendo la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión.

(III) Estimulación de la remodelación de la cromatina que promueve la expresión de diversos genes con un rol proinflamatorio (Colombo *et al.*, 2014).

Como resultado, la inflamación crónica a nivel pulmonar produce un engrosamiento de la pared bronquial, por lo que aumenta la resistencia al paso del aire, sumado a que hay destrucción de alvéolos, disminuyendo la cantidad de unidades donde ocurre el intercambio gaseoso y una disminución de la distensibilidad propia del tejido pulmonar (Paredes *et al.*, 2017). Este proceso inflamatorio a nivel pulmonar genera una respuesta de reparación y remodelación del tejido dañado,

reemplazando la elastina por colágeno, por lo tanto, los componentes elásticos pulmonares se ven disminuidos (Sousa *et al.*, 2019).

Dentro de la composición del humo generado por la combustión del cigarrillo se pueden encontrar 4000 sustancias químicas que son altamente tóxicas, algunas de éstas con alto potencial cancerígeno, además que cada cigarrillo produce 250cc de humo, el que, en su gran mayoría, promueve procesos inflamatorios (MINSAL, 2003).

Debido a un aumento en el acceso a la información y al gran número de investigaciones sobre los daños provocados en el organismo por parte del cigarro, surge como alternativa “saludable” el uso de cigarrillos electrónicos.

### **Cigarrillos electrónicos (*e-cigarettes*) o Sistemas electrónicos de administración de nicotina (*ENDS*)**

Los *e-cigarettes* y los *ENDS* son dispositivos que administran al pulmón un líquido vaporizado que generalmente contiene nicotina y otras sustancias químicas (Lam *et al.*, 2014). El acto de “vapear” se ha presentado como una imitación sin tabaco, que los fumadores pueden usar para reducir la cantidad de cigarrillos que consumen, como una herramienta para dejar de fumar. Existen diferentes tipos de dispensadores, por ejemplo, el cigarrillo electrónico, el vapeador, el IQOS, etc. (Casas *et al.*, 2021).

## **Cigarrillo electrónico.**

Los cigarrillos electrónicos son una alternativa no combustible del tabaco que genera un aerosol inhalable. Este tipo de cigarrillo usa una bobina metálica que es resistente al calor para poder calentar y aerosolizar los líquidos. El contenido se traspasa del tanque a la bobina por una mecha hecha de algodón, sílica o cerámica y el usuario activa este mecanismo presionando un botón o generando un flujo de aire a través del dispensador que permite el paso de electricidad a la bobina (Grana *et al.*, 2014).

Este tipo de cigarrillo fue introducido a principio del año 2000 y desde entonces ha pasado por diversos cambios, en términos de diseño, que permiten mejor control sobre la composición del líquido, concentración de nicotina y como el producto es consumido.

## **Vapeador**

Este dispositivo corresponde a un dispensador que funciona mediante una batería y que libera un vapor (que en ocasiones contiene nicotina) que puede ser inhalado por el usuario. Este dispensador estaría constituido básicamente por 3 elementos: la batería, el atomizador y el cartucho. Cuando el sujeto “vapea” y la batería entra en funcionamiento, el atomizador se calienta, el líquido se vierte en su interior y se convierte en vapor (Jimenez *et al.*, 2014).

## **IQOS**

Proviene del inglés “*I Quit Ordinary Smoking*”, es decir en español, “yo dejo el tabaco habitual, convencional”, por lo que comprende un dispensador híbrido entre el cigarrillo electrónico y el vaporizador, que se comercializa como una alternativa “efectiva” para cesar el consumo tabáquico, además posee diversos colores y formas que llaman la atención en la población juvenil (Bello, 2019).

### **Sustancias químicas asociadas**

Con respecto a las sustancias químicas presentes en los cigarrillos electrónicos, es importante considerar dos aspectos claves. Por un lado, hay que tomar en cuenta las sustancias que están inmersas en el líquido del cargador del *e-cigarette* y por otro lado, las sustancias que emergen luego del calentamiento de dicho líquido (Jimenez *et al.*, 2014).

El líquido con el que se cargan los cigarrillos electrónicos contiene las siguientes sustancias: propilenglicol, glicerina, nicotina (opcional), saborizantes (tabaco, menta, frutas, canela, etc.) y otros aditivos. Algunos líquidos de ciertas marcas de *e-cigarettes*, contienen pequeñas cantidades de nitrosaminas y dietilenglicol (Jimenez *et al.*, 2014).

Con respecto a las sustancias que se emiten del vapor de los cigarrillos electrónicos y que podrían suponer un riesgo para la salud, destacan las siguientes: formaldehído, acetaldehído, acroleínas, entre otras (Goniewicz *et al.*, 2014; Alvear *et al.*, 2017). Además, hay que sumar algunos agentes teratogénicos, aunque en menor cantidad que en los cigarrillos convencionales, estas sustancias tienen disposición a generar efectos nocivos para el organismo, tales como irritación, dermatitis, citotoxicidad y como consecuencia producir enfisema pulmonar y hasta cáncer (Goniewicz *et al.*, 2014; Alvear *et al.*, 2017). Sumado a esto, se han encontrado en el vapor de los cigarrillos electrónicos, metales como níquel, cromo y plomo, los cuales han sido estrechamente vinculados con citotoxicidad celular (Goniewicz *et al.*, 2014; Alvear *et al.*, 2017). La *International Agency for Research on Cancer* el 2022, clasifica a estas sustancias como cancerígenas y probablemente cancerígenas para los humanos (International Agency for Research on Cancer, 2022), sin definir una dosis para un consumo seguro. Cabe destacar que los niveles de níquel encontrados en el vapor de los cigarrillos electrónicos son más elevados que los detectados en el humo de cigarrillos convencionales (Jimenez *et al.*, 2014).

Además, se ha planteado que la composición del aerosol generado depende: 1) de los componentes del líquido que se “evapora”; 2) de las características eléctricas del elemento calentador; y 3) la temperatura alcanzada. El líquido de los cigarrillos electrónicos contiene glicerina vegetal, propilenglicol, glicerina, nicotina, etanol, acetol, óxido de propileno, formaldehído, acetaldehído, acroleína, diacetil, glicerol (Alvear *et al.*, 2017). Sumado a esto, y como consecuencia del uso de este tipo de dispositivos, se ha identificado la producción elevada de radicales libres y/o

especies reactivas de oxígeno (*ROS*), moléculas altamente oxidantes a nivel celular, que pueden llevar a la disfunción de proteínas, membranas y ADN (Lerner *et al.*, 2015). La generación de *ROS* ha sido asociada al tipo de saborizante del líquido usado como vehículo, a la concentración de nicotina que contiene, al tiempo de uso del calentador, etc. (Lerner *et al.*, 2015).

Una de las poblaciones celulares que podría verse afectada por el efecto de los *e-cigarette* y ser responsable de la producción de moléculas proinflamatorias y *ROS*, son los monocitos, (Muthumalage *et al.*, 2018). El sistema respiratorio cuenta con macrófagos residentes en alerta, estos a su vez se diferencian de un monocito, proceso mediado a través de señales celulares como citoquinas.

### **Monocito THP-1 humano.**

En los mamíferos los monocitos son células circulantes que actúan como células presentadoras de antígeno, que activan al sistema inmune en caso de la presencia de patógenos, especialmente ante bacterias Gramnegativas. También, puede cambiar su fenotipo a macrófago cuando existe presencia de algún patógeno invasor (Bosshart & Heinzelmann, 2016).

Para estudios *in vitro*, usando como modelo este linaje celular, es muy común la línea celular THP-1, una línea inmortalizada que viene de la sangre periférica de personas con leucemia monocítica aguda. Dicha línea sirve de elemento

fundamental para el desarrollo de investigaciones donde es crucial este modelo celular de experimentación (Bosshart & Heinzelmann, 2016). Sobre todo, en tejido respiratorio que cuenta con un sistema inmunológico residente que proviene del sistema monocítico, como lo es el macrófago alveolar.

Como respuesta a elementos exógenos (bacterias y xenobióticos), este linaje celular es capaz de generar *ROS* para, a través de un fenómeno denominado “*burst*” oxidativo, vinculado al evento de estrés oxidativo (desbalance redox), degradar al invasor (Kalyanaraman, 2013).

### **Balance Oxido Reductivo.**

El Balance redox en sistemas biológicos se define como el equilibrio entre las sustancias oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Existen dos parámetros muy importantes para evaluar este equilibrio, la capacidad antioxidante total y el estado oxidante total (Maciejczyk *et al.*, 2018). Este concepto es un componente crítico en el proceso de envejecimiento, iniciación y desarrollo de enfermedades con alta mortalidad y morbilidad (aterosclerosis, cáncer, enfermedades autoinmunes, daño por isquemia-reperfusión, entre otras) y estrechamente vinculado con el estrés oxidativo, en donde las *ROS* provocan daño celular directo (Martinez, 2005)

El rol fisiológico de las *ROS* tiene relación con la activación e inhibición de procesos celulares que regulan la concentración hormonal, además de estar involucradas en

la activación enzimática. Por ejemplo, las *ROS* inducen la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) responsable del control de la transcripción del ADN, para la liberación de citoquinas proinflamatorias. Las *ROS* en el sistema inmune actúan mediando respuestas inmunes y ayudando en el mecanismo de defensa contra patógenos, además de participar en la producción de células T reguladoras (Zuo *et al.*, 2015).

Lo anterior se refiere a procesos normales donde las *ROS* contribuyen al buen funcionamiento del sistema. Sin embargo, cuando el equilibrio redox se pierde, se genera estrés oxidativo, dañando biomoléculas importantes como lípidos, proteínas y ADN (Kalyanaraman, 2013).

### **Estrés oxidativo.**

El Estrés Oxidativo se da en las células y tejidos cuando hay un desbalance entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes, particularmente, éste se puede instaurar con un aumento de las sustancias prooxidantes, una disminución de las defensas antioxidantes, o una combinación de ambas (Viada *et al.*, 2017). Esta condición provoca la oxidación de diversos componentes tisulares y celulares tales como lípidos, proteínas y ADN, lo cual puede modificar la función de estas macromoléculas, alterando la función y la integridad celular y tisular (Kalyanaraman, 2013).

Los antioxidantes se definen como cualquier sustancia capaz de disminuir la generación de *ROS*, evitar el daño oxidativo y promover la reparación de las macromoléculas afectadas. En condiciones normales los antioxidantes se encuentran en una concentración suficiente para evitar el daño oxidativo, permitiendo la acción fisiológica de las sustancias oxidantes (Balance redox) (Finkel & Holbrook, 2000). Estas defensas, se adecúan a las demandas sistémicas, aumentando cuando existe una mayor cantidad de sustancias prooxidantes, proceso que muchas veces conlleva a la transcripción de complejos enzimáticos. (Kalyanaraman, 2013).

Todos los organismos cuentan con mecanismos de saneamiento, tanto de las *ROS* como del daño producido por estas, entre los cuales se encuentra el glutatión y su complejo enzimático, las vitaminas C y E, las enzimas catalasa, peroxidasas y superóxido dismutasa, etc. (Kalyanaraman, 2013). Un aumento de los niveles de *ROS* o una disminución en la capacidad antioxidante endógena puede generar procesos celulares que son sensibles a estados redox, como la apoptosis mediada por la vía mitocondrial, secundario a la alteración en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial (Cohen et al., 2015)

A continuación, para comprender de mejor manera se definen las principales especies reactivas de oxígeno y sus roles dentro del organismo.

### **Especies reactivas de Oxígeno (*ROS*).**

El oxígeno es vital para la supervivencia de los organismos aeróbicos y como consecuencia de esta dependencia, de forma normal se generan entre 30-32 moléculas de Adenosín trifosfato (ATP) de una molécula de oxígeno. Durante este proceso, el oxígeno es reducido a una molécula de agua, a través de cuatro reducciones secuenciales, generando radicales libres y/o ROS como intermediarios (Kalyanaraman, 2013). Además, el oxígeno es un cofactor esencial en muchas oxidaciones biológicas, como, por ejemplo, la generación de estas moléculas durante el “*Burst oxidativo*” generado por miembros del sistema inmune, y durante la metabolización de algunos xenobióticos (Kalyanaraman, 2013).

Además, los radicales libres y/o ROS cumplen un rol importante en la proliferación, diferenciación, supervivencia, muerte celular regulada y metabolismo celular, además de la transducción de señales. (Salas-Silva et al., 2017).

### **Radicales libres.**

Dentro de las ROS se encuentran los radicales libres, éstos corresponden a un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en su último orbital. El electrón desapareado del radical libre puede donarse a otra molécula o formar un par electrónico con el electrón de otra molécula, transformando en ambos casos a la otra molécula en radical libre (Carvajal, 2019). A continuación, se mencionarán algunos de los radicales libre y ROS más importantes a nivel fisiológico

### **Anión Radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ).**

Este radical corresponde al radical más abundante a nivel celular, su formación principalmente es en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria (Corrales & Muñoz Ariza, 2012). Esta molécula corresponde al primer paso en la reducción univalente del oxígeno, y es generado por la reducción parcial del oxígeno (Takahashi & Asada, 1983). Además, esta molécula es de carga negativa, con alta reactividad y con una vida útil en el organismo de pocos segundos y es dañina cuando aumenta su biodisponibilidad. (Kalyanaraman, 2013).

Existen procesos normales en el organismo, en donde se produce este radical, por ejemplo, durante el metabolismo aeróbico, la metabolización de sustancias (peroxisomas y citocromo p450), la defensa inmune (NADPH oxidasa-*NOX*, óxido nítrico sintasa inducible-*iNOS*), la regulación del tono vasomotor (NADPH oxidasa-*NOX*, óxido nítrico sintasa endotelial-*eNOS*) y la comunicación nerviosa (óxido nítrico sintasa neuronal-*nNOS*) (Carvajal, 2019).

### **Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ).**

Esta molécula corresponde a una de las *ROS* más estables y abundante en el citoplasma y en la matriz mitocondrial, puede cruzar membranas, afectando sectores aledaños a su génesis. Presenta una actividad reactiva de gran importancia, ya que en presencia de hierro es capaz de formar el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ). Esta molécula se forma a través de una reducción parcial del oxígeno o en la dismutación del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) por la enzima superóxido dismutasa (*SOD*) (Corrales & Muñoz Ariza, 2012).

### **Óxido Nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ).**

Esta molécula corresponde a un radical libre, generado enzimáticamente por la acción de la enzima *NOS* (*iNOS*, *eNOS*, *nNOS*), es permeable a la membrana celular, lo que le permite difundir a las células adyacentes y participar de vías de señalización, dentro de la cual destaca la vasodilatación local. Ante la presencia de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se puede generar peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ).

La disminución de su biodisponibilidad promueve la vasoconstricción, el aumento del estrés de roce y por tanto la generación de placas ateroscleróticas (Farah *et al.*, 2018).

### **Radical Hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ).**

Esta especie radicalaria corresponde a una de las con más alta reactividad, su vida media es corta ( $10^{-9}$  segundos) reaccionando muy rápidamente con blancos celulares como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. A nivel enzimático no hay fuente antioxidante contra esta especie radicalaria, lo que la hace una de las ROS con mayor capacidad de generar daño a nivel celular (Corrales & Muñoz Ariza, 2012).

Todas estas ROS son partícipes de procesos normales vinculados a respuesta inmune y a daño oxidativo, llevando a la activación de procesos de muerte celular regulada como la apoptosis (Tang et al., 2019).

### **Muerte Celular.**

La muerte celular puede ocurrir por múltiples formas de estrés, uno de los cuales es el estrés oxidativo (Tang et al., 2019).

El año 2018 Galluzzi et al., clasificaron en 2 los tipos de muerte celular; la muerte celular accidental (ACD), que es aquella que se desencadena por agresiones físicas, mecánicas y químicas; y la muerte celular regulada que involucra cascadas de señalización definidas que pueden ser inhibidas por fármacos o mecanismos intrínsecos.

En la actualidad, existen 14 vías de muerte regulada (Galluzzi et al., 2018; Tang et al., 2019) y solo dos de estas están reguladas por proteasas denominadas caspasa,

las cuales son el foco de la presente investigación y daremos relevancia a continuación (Galluzzi et al., 2018; Tang et al., 2019).

Como se ha dicho anteriormente cuando las ROS están en equilibrio regulan numerosas funciones en la comunicación celular, sin embargo, cuando esta homeostasis se pierde se producen daños a moléculas que componen a la célula como ADN, fosfolípidos y proteínas dañándola. Esto activa sus vías de muerte, a continuación, se mostrará uno de los mecanismos (Carvajal, 2019).

## **Apoptosis**

La apoptosis se define como *“una forma de muerte celular programada o regulada con cambios morfológicos que difieren de la necrosis”* (Tang et al., 2019). Se caracteriza por el encogimiento del volumen celular, la generación de cuerpos apoptóticos, destrucción del ADN, condensación de la cromatina y una especie de fagocitosis por parte de las células de respuesta inmune, denominada eferocitosis. Este mecanismo se lleva a cabo debido a diferentes alteraciones fisiológicas y patológicas (Tang et al., 2019).

En torno este proceso se han descubierto dos subtipos principales, por un lado, está la vía extrínseca que está mediada receptores de muerte, por ejemplo, FAS o TNFR1, los cuales activan a las caspasas 8 y 10 que dan inicio al proceso apoptótico. También, tenemos a los receptores de dependencia los cuales pueden

iniciar la vía extrínseca a través de la caspasa 9 o a través de la fosforilación de la proteína asociada a muerte quinasa 1 (DAPK1) (Tang *et al.*, 2019).

Por otro lado, está la vía intrínseca que se da por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (*MOMP*) permitiendo que proteínas y moléculas de la mitocondria salgan, por ejemplo, el citocromo C o la proteína SMAC, siendo factores pro-apoptóticos, ya que, activan a la caspasa 9 iniciadora. Esta vía se ve inhibida por la acción de BCL2, proteína que ayuda impedir la apoptosis de la célula (Tang *et al.*, 2019).

En ambos casos, las caspasas 3, 6 y 7 denominadas ejecutoras llevan a cabo la apoptosis, debido a que cuando estas se activan las defensas anti apoptóticas no pueden detener el mecanismo de muerte celular, por lo tanto, la célula toma el morfotipo apoptótico y promueve la muerte limpia de la célula que sufre este proceso (Tang *et al.*, 2019).

Aunque todas las *ROS* cumplen una importante función a nivel celular, su elevada producción genera daño oxidativo y corresponde a un riesgo para la integridad celular, tisular, orgánica y sistémica. A continuación, se hablará del daño oxidativo que sufren varias biomoléculas a nivel celular.

### **Daño oxidativo molecular.**

Las *ROS* tienen el potencial de interactuar, desestabilizar y dañar a diversas estructuras celulares, dentro de las cuales destacan: ADN, lípidos y proteínas.

I) Daño oxidativo al ADN: Ocurre un daño oxidativo en los ácidos nucleicos, donde el ADN mitocondrial es más dañado que el ADN nuclear debido a la cercanía del lugar donde se generan *ROS*. Aquí el  $\text{HO}\cdot$  juega un rol importante ya que reacciona directamente en los componentes del ADN, ocurre una pérdida de la continuidad de uniones mono y bicatenarias en el ADN, junto con producir alteraciones en la estructura helicoidal. El daño producido por el radical hidroxilo produce 8-hidroxi desoxiguanosina considerada como biomarcador del daño oxidativo en el ADN, además de estar relacionado como carcinogénesis, mutagénesis y envejecimiento (Phaniendra *et al.*, 2015).

II) Daño oxidativo a lípidos: Dentro de los lípidos de membrana los más susceptibles al daño oxidativo son ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, aquí ocurre la lipoperoxidación, una reacción en cadena iniciada por *ROS*, la cual genera una disminución de la fluidez de la membrana, inactivación de las enzimas y receptores unidos a membrana. La lipoperoxidación ocurre cuando cualquier radical libre ataca y extrae hidrógeno de un grupo metileno en un ácido graso, dando origen a un radical lipídico, el que puede reaccionar con el oxígeno molecular para formar un radical peróxido lipídico, el cual se reordena mediante una reacción para formar endoperoxidos, que finalmente forman malondialdehído (MDA) el cual es un producto final tóxico de la peroxidación de lípidos que causan daño al ADN y proteínas (Phaniendra *et al.*, 2015).

III) Daño oxidativo a proteínas: Las *ROS* oxidan aminoácidos que se encuentran dentro de las proteínas y pueden alterar ciertos enlaces (como puentes disulfuros), lo que da como resultado enlaces cruzados proteína-proteína, generando así una desnaturalización de estas, llevando a una pérdida o alteración de su actividad enzimática y de la función de los receptores y proteínas de transporte. Esta oxidación puede ser producida por diversas *ROS*, dentro de las cuales destacan el  $O_2^{\cdot -}$  e  $HO^{\cdot}$  (Phaniendra *et al.*, 2015).

Esto se relaciona con el uso del vapeador puesto que al analizar el aire exhalado de personas que ocupan el dispositivo, se pudo observar un incremento en el NO, el cual a su vez disminuye la actividad de los macrófagos, entre otras células del sistema inmune (Marques *et al.*, 2021), lo que refuerza el cuestionamiento a la inocuidad de estos aparatos y sus efectos en las células del tracto respiratorio.

## **CAPITULO II**

### **Metodología.**

#### **Pregunta de investigación.**

¿Las células de la línea monocito THP-1 humano que se ven expuestas a condensados de vapeador activan vías de muerte medidas por caspasas y daño debido al aumento en la producción de *ROS (Reactive oxygen species)*, en comparación con las células que no han sido expuestas dentro de un mismo tiempo de estudio?

#### **Hipótesis de investigación.**

El uso de vapeador produce alteraciones en el balance redox y en la viabilidad celular en el monocito THP-1 humano.

#### **Objetivo general.**

Evaluar las alteraciones en el balance redox y la viabilidad celular del monocito THP-1 humano expuestas a condensados de vapeador.

### **Objetivos específicos.**

- Determinar el efecto de los condensados de las esencias de vapeador sabor mentol con nicotina, sin nicotina; sabor tabaco con nicotina y sin nicotina sobre parámetros de oxidación (*ROS* y lipoperoxidación) en la línea celular de monocitos THP-1 humanos.
- Analizar el efecto de los condensados de las esencias de vapeador sabor mentol con nicotina, sin nicotina; sabor tabaco con nicotina y sin nicotina sobre la viabilidad celular (concentración/tiempo dependencia y vía de muerte) en la línea celular de monocitos THP-1 humanos.

### **Población.**

1. Universo: Células residentes del tracto respiratorio.
2. Población: Células de Monocitos THP-1 Humanos.

### **Muestra.**

Las muestras son células de Monocitos THP-1 Humanos expuestas a condensados de tabaco sin nicotina (TSN), condensados de tabaco con nicotina (TCN),

condensados de mentol sin nicotina (MSN), condensados de mentol con nicotina (MCN), control (C) y control positivo (C+).

El tamaño muestral varía entre cada procedimiento.

### **Tipo de estudio.**

Esta investigación corresponde a un estudio cuantitativo *in vitro* con diseño experimental.

### **Técnicas e instrumentos.**

La fase inicial del proceso es recolectar los condensados de esencias de tabaco sin nicotina, tabaco con nicotina, mentol sin nicotina y mentol con nicotina mediante el vaporizador “*Smok vape pen V2*”.

Luego se evalúa la viabilidad celular mediante la prueba de MTT, una vez conseguido los resultados de viabilidad, se determina el mecanismo de muerte celular:

1. Primero se evaluó la cantidad de ROS producido por la exposición de los condensados mediante la prueba de DCFH2-DA.

2. Segundo se realizó la prueba de Rodamina 123 para conocer la variabilidad de potencial de membrana mitocondrial.
3. Tercero se evaluó la cantidad de caspasas activas con la prueba de *Caspase kit*.

Los procedimientos anteriores se llevaron a cabo con los instrumentos expuestos en la **Tabla N°1** donde se menciona la operacionalización de cada implemento utilizado en la investigación, además de sus características técnicas.

Tabla N°1. Técnicas e instrumentos.

| Implemento                                                                                                                                                  | Operacionalización (Características técnicas)                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Vaporizador “ <i>Smok vape pen V2</i> ”<br>Esencias de vaporizador, sabor mentol c/nicotina, sabor mentol s/nicotina, tabaco s/nicotina, tabaco c/nicotina. | Mecanismo por el cual se combustionan las esencias para obtener los condensados.                                                                 |
| Ambú.                                                                                                                                                       | Asimila el pulmón a Volumen corriente (500mL).                                                                                                   |
| Micropipetas.                                                                                                                                               | Gradúan las dosis de condensados y activos en el tratamiento de las células.                                                                     |
| Puntas graduadas para micropipetas.                                                                                                                         | Permiten verter los activos en el medio celular.                                                                                                 |
| Tubos Eppendof.                                                                                                                                             | Implemento utilizado para preservar condensados y activos.                                                                                       |
| Placas de 96 pocillos y placas de 6 pocillos.                                                                                                               | Reservorio de las células antes, durante y posterior al tratamiento.                                                                             |
| Incubadora.                                                                                                                                                 | Lugar donde se preservan las células ya que tiene las condiciones suficientes como la temperatura a 37°C y una presión de CO <sub>2</sub> de 5%. |
| Campana de flujo laminar.                                                                                                                                   | Lugar donde se puede dar tratamiento a las células sin tener riesgo que estas se contaminen con microorganismos.                                 |
| Balanza Analítica.                                                                                                                                          | Permite medir de manera exacta los solutos.                                                                                                      |

|                               |                                                           |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Espátula.                     | Sirve para verter concentraciones pequeñas de solutos.    |
| Vórtex.                       | Mezcla la solución mediante vibración.                    |
| Sonicador.                    | Mezcla la solución con ondas de sonido.                   |
| Tubos falcón.                 | Sirve para trasladar las muestras sin riesgos de derrame. |
| Centrífuga para tubos falcón. | Permite la precipitación del pellet,                      |
| Tubos de citometría.          | Porta la muestra para ser leída en el citómetro de flujo. |
| Citómetro de flujo            | Mide ROS, potencial de membrana y caspasas activas        |
| Lector de placas <i>ELISA</i> | Mide viabilidad celular                                   |

### **Procedimientos.**

#### **Recolección de condensado.**

La condensación es el proceso por el cual se obtiene la muestra líquida de cada esencia luego de vaporizarla con el dispositivo “*Vape Pen V2*”. Se utiliza un ambú, el cual tiene la función de imitar al sistema respiratorio, dado que emula el volumen *tidal* o corriente de una persona (500 ml). El tiempo de combustión es de 8 segundos, con el regulador de paso de aire del vaporizador a máxima capacidad, lo que se considera una vapeada.

Luego de realizar la vapeada se deja condensar por 10 minutos a -20° Celsius, este proceso se repite 3 veces, después se agrupan las microgotas las cuales al formar una gota de 100 µL aproximadamente se recoge con una micropipeta de 200 µL, esto se recolecta en un tubo Eppendorf hasta conseguir 1 mL.

Al cambiar cada esencia, se cambió a su vez el vidrio y la resistencia del vaporizador; además los ambúes se lavaron con agua destilada y jabón, esto con el objetivo de que no se mezclaran los condensados.

Según el cálculo realizado por los investigadores de esta tesis se estima que por cada 3 vapeadas se recolectan 99,9  $\mu\text{L}$  de condensados de las esencias de vapeador.

### **Viabilidad celular.**

El procedimiento para calcular la viabilidad celular se llevó a cabo en placas de cultivo celular de 96 pocillos con 100  $\mu\text{L}$  de medio celular *DMEM*, donde se estima que habitan 5.000 células, las cuales se encuentran en una incubadora a 37° Celsius con una presión de  $\text{CO}_2$  de 5,6%.

El procedimiento contiene en total 22 muestras que se detallarán a continuación en la **Tabla N°2.**

Tabla N°2. Procedimiento para calcular Viabilidad Celular.

| Número | Nombre | Condensado          | Concentración     | Cantidad de pocillos |
|--------|--------|---------------------|-------------------|----------------------|
| 1      | C      | -                   | -                 | 8                    |
| 2      | C+     | Tritón 20%          | 20 $\mu\text{L}$  | 8                    |
| 3      | TS/N   | Tabaco sin Nicotina | 1 $\mu\text{L}$   | 4                    |
| 4      |        |                     | 2,5 $\mu\text{L}$ | 4                    |
| 5      |        |                     | 5 $\mu\text{L}$   | 4                    |
| 6      |        |                     | 7,5 $\mu\text{L}$ | 4                    |
| 7      |        |                     | 10 $\mu\text{L}$  | 4                    |

|    |      |                     |             |   |
|----|------|---------------------|-------------|---|
| 8  | TC/N | Tabaco con nicotina | 1 $\mu$ L   | 4 |
| 9  |      |                     | 2,5 $\mu$ L | 4 |
| 10 |      |                     | 5 $\mu$ L   | 4 |
| 11 |      |                     | 7,5 $\mu$ L | 4 |
| 12 |      |                     | 10 $\mu$ L  | 4 |
| 13 | MS/N | Mentol sin nicotina | 1 $\mu$ L   | 4 |
| 14 |      |                     | 2,5 $\mu$ L | 4 |
| 15 |      |                     | 5 $\mu$ L   | 4 |
| 16 |      |                     | 7,5 $\mu$ L | 4 |
| 17 |      |                     | 10 $\mu$ L  | 4 |
| 18 | MC/N | Mentol con nicotina | 1 $\mu$ L   | 4 |
| 19 |      |                     | 2,5 $\mu$ L | 4 |
| 20 |      |                     | 5 $\mu$ L   | 4 |
| 21 |      |                     | 7,5 $\mu$ L | 4 |
| 22 |      |                     | 10 $\mu$ L  | 4 |

Procedimiento de Viabilidad celular, considerando el numero de la muestra, el nombre, el condensado, concentración y cantidad de pocillos. C= Muestra control; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina.

A todas las muestras expuestas se les da un tiempo de incubación de 24 horas, luego son marcadas con MTT donde se les administra 10  $\mu$ L del fluoróforo y después de 4 horas se le administra 100  $\mu$ L de *Buffer* salino, se deja por dos noches y se ven los resultados en el lector de placas *ELISA* a una longitud de onda de 595 nm.

### **ROS.**

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente incubadas a 37° Celsius.

En este experimento hay 7 muestras que se detallarán a continuación en la **Tabla N°3.**

Tabla N°3. Procedimiento para calcular ROS.

| Número | Nombre | Condensado          | Concentración | Marcaje |
|--------|--------|---------------------|---------------|---------|
| 1      | CS/M   | -                   | -             | -       |
| 2      | CC/M   | -                   | -             | Si      |
| 3      | C+     | AAPH 4mM            | 40 µL         | Si      |
| 4      | TS/N   | Tabaco sin nicotina | 50 µL         | Si      |
| 5      | TC/N   | Tabaco con nicotina | 50 µL         | Si      |
| 6      | MS/N   | Mentol sin nicotina | 50 µL         | Si      |
| 7      | MC/N   | Mentol con nicotina | 50 µL         | Si      |

Muestra los números de la muestra, nombre, condensado, concentración y marcaje. CS/M= Control sin marcar; CC/M= Control marcado; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina.

A todas las muestras expuestas se les dieron 18 horas de incubación para luego ser marcadas con 10 µL DCFH2-DA (1mM), luego se deja reposar durante 1 hora a 37° Celsius.

### **Potencial de membrana.**

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente incubadas a 37° Celsius.

En este experimento hay 7 muestras, que se detallarán en la **Tabla N°4**.

Tabla N°4. Procedimiento para calcular potencial de membrana mitocondrial.

| Número | Nombre | Condensado          | Concentración | Marcaje |
|--------|--------|---------------------|---------------|---------|
| 1      | CS/M   | -                   | -             | -       |
| 2      | CC/M   | -                   | -             | Si      |
| 3      | C+     | FCCP 100 $\mu$ M    | 40 $\mu$ L    | Si      |
| 4      | TS/N   | Tabaco sin nicotina | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 5      | TC/N   | Tabaco con nicotina | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 6      | MS/N   | Mentol sin nicotina | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 7      | MC/N   | Mentol con nicotina | 50 $\mu$ L    | Si      |

Muestra los detalles de las muestras del procedimiento de Potencial de membrana, señalando números de la muestra, nombre, condensado, concentración y marcaje. CS/M= Control sin marcar; CC/M= Control marcado; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina.

A todas las muestras expuestas se les dieron 24 horas de incubación para luego ser marcadas con 5  $\mu$ L de Rodamina123 (1  $\mu$ M) y se deja reposar una hora a 37°C.

### **Caspasas activas.**

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente incubadas a 37° Celsius.

En este experimento hay 7 muestras, que se detallarán en la Tabla N°5.

Tabla N°5. Procedimiento para calcular caspasas activas.

| Número | Nombre | Condensado                  | Concentración | Marcaje |
|--------|--------|-----------------------------|---------------|---------|
| 1      | CSM    | -                           | -             | -       |
| 2      | CCM    | -                           | -             | Si      |
| 3      | C+     | Staurosporina<br>10 $\mu$ M | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 4      | TSN    | Tabaco sin<br>nicotina      | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 5      | TCN    | Tabaco con<br>nicotina      | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 6      | MSN    | Mentol sin<br>nicotina      | 50 $\mu$ L    | Si      |
| 7      | MCN    | Mentol con<br>nicotina      | 50 $\mu$ L    | Si      |

Muestra los detalles de la muestra del procedimiento de Caspasas activas señalando números de la muestra, nombre, condensado, concentración y marcaje. CS/M= Control sin marcar; CC/M= Control marcado; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina.

En este procedimiento se deja en tratamiento a células durante 24 horas, luego las muestras que deban ser marcadas reciben 10  $\mu$ L de *Caspase kit* (5  $\mu$ M), luego se deja reposar 30 minutos a 37°.

### **Protocolo para muestras de citómetro.**

Los últimos tres procedimientos, tienen esta fase en común:

1. Se extrae el medio celular para verterlo en un tubo falcón, agregando 1 ml de *buffer PBS* 1x.
2. Los tubos falcón se introducen en la centrifuga para tubos falcón durante 10 minutos a 1500 rpm para obtener el *pellet*.

3. Una vez decantado el *pellet*, se retira el sobrenadante y se vierte 1 ml de *buffer PBS 1x* para disolver la muestra y llevarla al tubo para citómetro de flujo.
4. Finalmente, las muestras se introducen en el citómetro de flujo para evaluar la respuesta de las células al tratamiento expuesto.

### **Operacionalización de Variables.**

En el tratamiento de condensados de esencia de vaporizador, la concentración se mide en mili moles (mM) y micro moles ( $\mu\text{M}$ ) y el volumen en microlitros ( $\mu\text{L}$ ); mientras que el tiempo se mide en horas y minutos.

Los resultados obtenidos en el procedimiento de viabilidad celular serán vistos en porcentaje (%) de células vivas luego del tiempo de exposición y junto con ello saber la concentración efectiva media ( $EC_{50}$   $\mu\text{L/mL}$ ), es decir a la concentración en la que muere el 50% de las células.

En el caso de los procedimientos de *ROS*, potencial de membrana y caspasas activas, los resultados se obtendrán en porcentaje (%), es decir el porcentaje de células que tuvo un aumento de las variables.

## **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el software *Statistica*, programa en el cual se insertaron los datos obtenidos en cada experimento, para cada variable se realiza una prueba de normalidad, donde *p-value* no muestra el estadígrafo por insuficiencia en la cantidad de datos, por lo que se asume que son datos no paramétricos, comparación de múltiples muestras independientes con la prueba *Kruskal Wallis Anova* para datos no paramétricos con el propósito de definir diferencias significativas (*p-value* < 0,05) entre cada condensado con el control.

Además del análisis anteriormente relatado, mediante la prueba *post Hock Tuckey* se comparan los tratamientos entre si pudiendo definir diferencias significativas (*p-value* < 0,05).

### **CAPITULO III**

#### **Resultados.**

El presente estudio se dividió en dos partes, la primera se utilizó para determinar la viabilidad celular donde se consigue sacar el  $EC_{50}$  (concentración efectiva media) y la segunda para determinar el mecanismo de muerte de las células.

#### **Viabilidad Celular.**

El procedimiento para calcular la viabilidad celular se llevó a cabo en placas de cultivo celular de 96 pocillos con 100  $\mu$ L de medio celular *DMEM*, donde se estima que habitan 5.000 células. El procedimiento contiene en total 22 muestras que se detallan en la **Tabla N°2.**

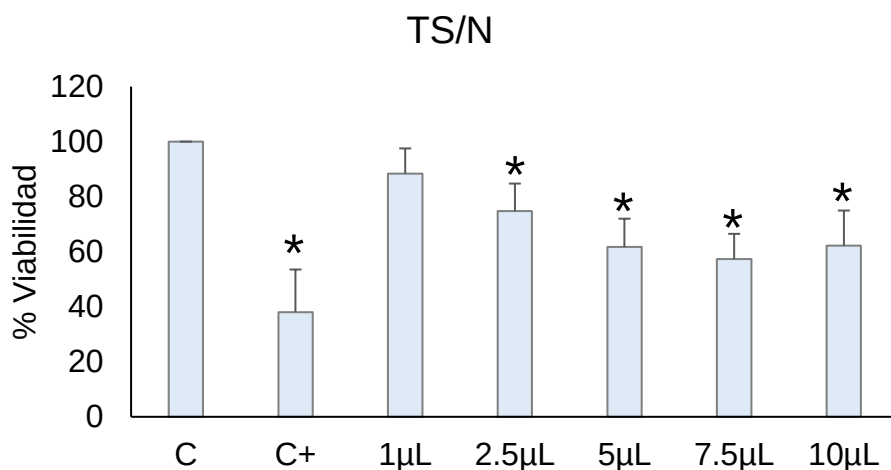
Luego de ser incubadas y marcadas con MTT, se dejan por dos noches para ser leídas por el lector de placas *ELISA*.

A continuación, se visualiza un gráfico por cada esencia y sus respectivas concentraciones.

#### **Tabaco sin nicotina.**

En la **Figura N°1** se observa que la respuesta de las células THP-1 a diferentes concentraciones de la esencia de tabaco sin nicotina es en su mayoría dependiente de la concentración administrada, donde a los 7,5 µL se ve una disminución más notoria en el porcentaje de la viabilidad celular y a los 10 µL esta vuelve a subir.

**Figura N°1. Porcentaje de viabilidad celular con Tabaco sin nicotina (TS/N).**

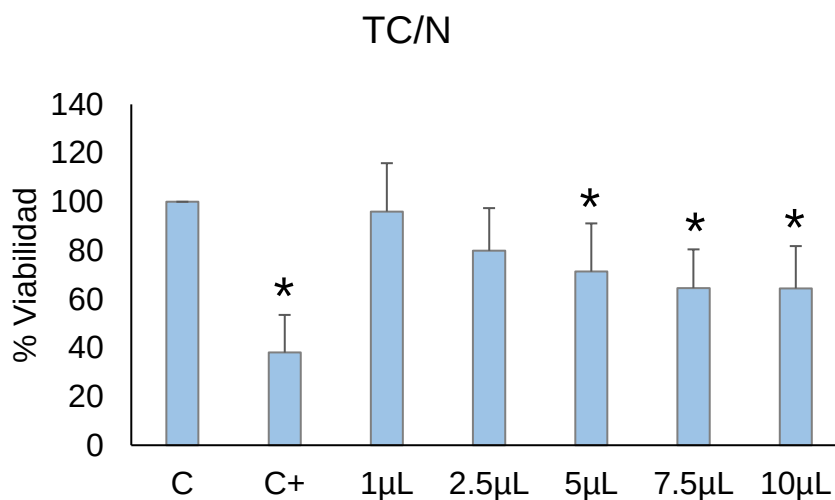


C= Muestra control; C+= Control positivo; \*= Diferencia significativa ( $p<0.05$ ) con respecto a muestra control.

#### Tabaco con nicotina.

En la **Figura N°2** se expone la respuesta de las células THP-1 a diferentes concentraciones de la esencia de tabaco con nicotina. En este se puede apreciar que el porcentaje de viabilidad celular depende de la concentración, en este caso se ve que a los 10 µL hay menos viabilidad celular.

**Figura N°2. Porcentaje de viabilidad celular con Tabaco con nicotina (TC/N).**

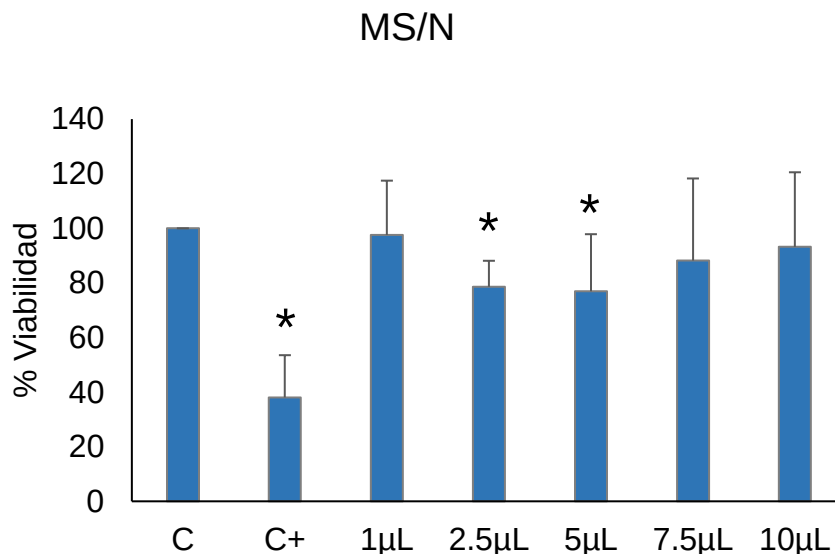


C= Muestra control; C+= Control positivo; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

#### Mentol sin nicotina.

En la **Figura N°3** se expone la respuesta de las células THP-1 a diferentes concentraciones de la esencia de mentol sin nicotina. En este se aprecia que no existe dependencia de la concentración para disminuir la viabilidad celular, en este caso a los 5 µL hay una menor viabilidad celular.

**Figura N°3. Porcentaje de viabilidad celular con Mentol sin nicotina (MS/N).**

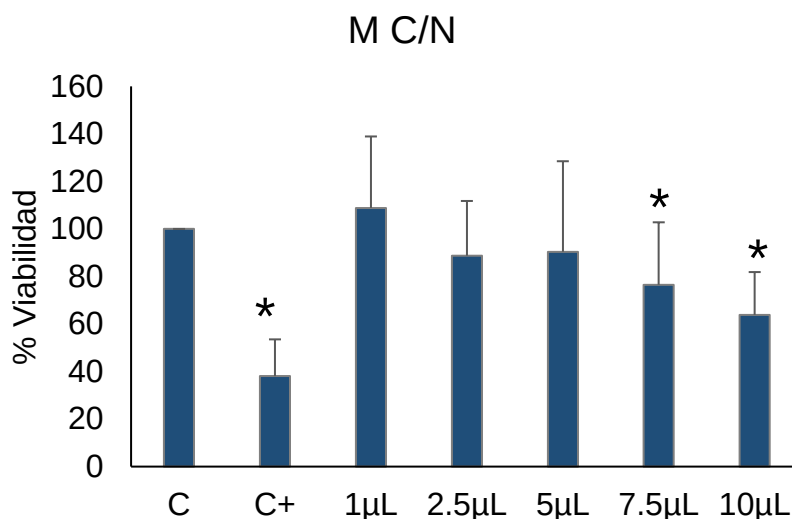


C= Muestra control; C+= Control positivo; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

#### Mentol con nicotina.

En la **Figura N°4** se expone la respuesta de las células THP-1 a diferentes concentraciones de la esencia de mentol con nicotina. En este caso se ve que la viabilidad celular depende en su mayoría de la concentración, donde a los 10 µL hay menos viabilidad celular que en el resto de las concentraciones.

**Figura N°4. Porcentaje de viabilidad celular con Mentol con nicotina (MC/N).**



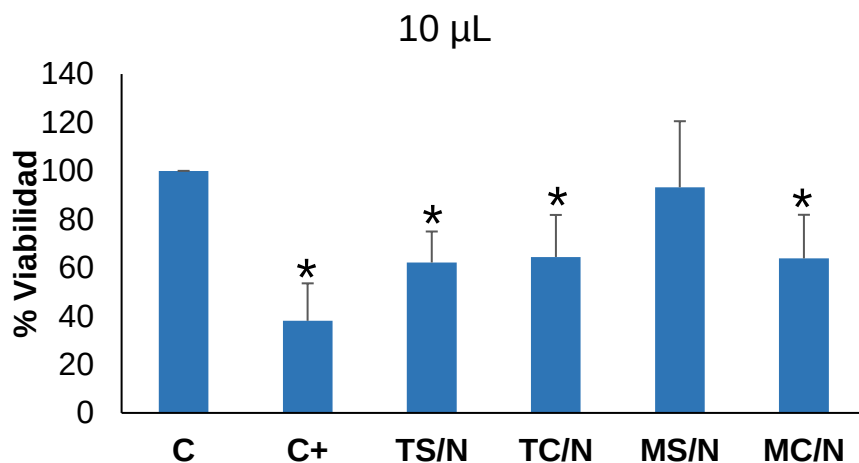
C= Muestra control; C+= Control positivo; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

#### Viabilidad celular a 10 µL de condensado.

Se realizó un análisis cuantitativo (**Figura N°5**) y cualitativo(**Figura N°6**) específico a esta cantidad de condensado puesto que corresponde a la más alta del experimento de viabilidad celular y además es considerado un tercio de una bocanada (33,3 µL), por lo que permitiría comparar de manera más exacta con lo que se vapea normalmente.

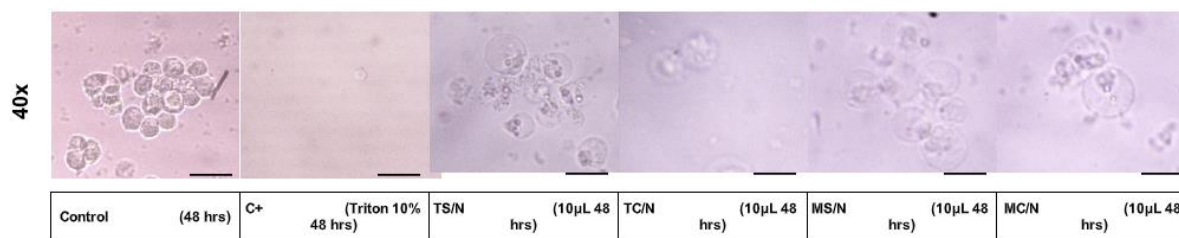
En la **Figura N°5** se expone la respuesta de las células THP-1 a la concentración de 10 µL de cada esencia. En este se observa que la esencia de tabaco sin nicotina a la misma concentración que los otros condensados genera una mayor disminución en la viabilidad celular, además se aprecia que a la misma concentración la esencia de mentol sin nicotina, tiene un alto porcentaje de viabilidad celular.

**Figura N°5. Porcentaje de viabilidad celular con 10 µL de cada condensado.**



C= Muestra control; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

**Figura N°6. Respuesta morfológica de las células THP-1.**



Escala de la barra= 30 µm

C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina. La escala de la barra corresponde a 30µm.

En la **Figura N°6**. Se aprecian imágenes tomadas por microscopio electrónico a un aumento de 40X en las células THP-1 sometidas a distintas esencias a una concentración de 10 µL tras 48 horas de exposición. En estas se puede ver que, respecto del control las células aumentan en volumen, polarizando su núcleo,

teniendo una apariencia similar a la necrosis, además de disminuir el número de células visualizadas en la misma área.

**Tabla N°6. Concentración Efectiva Media ( $EC_{50}$ ).**

|             | $EC_{50}$ ( $\mu$ L) |       |      |
|-------------|----------------------|-------|------|
| <b>TS/N</b> | 1,87                 | $\pm$ | 0,26 |
| <b>TC/N</b> | 2,45                 | $\pm$ | 0,59 |
| <b>MS/N</b> | 2,17                 | $\pm$ | 0,41 |
| <b>MC/N</b> | 2,65                 | $\pm$ | 0,35 |

TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina.

La **Tabla N°6** muestra la concentración en la que muere la mitad de las células ante la exposición de cada esencia. Aquí se determinó como  $EC_{50}$  2,5  $\mu$ L.

Para los siguientes experimentos se utilizó el  $EC_{50}$  a la misma concentración, es decir, como los pocillos son de 2 mL la “dosis” que se entregó a cada muestra fue de 50  $\mu$ L. De esta forma se mantiene la proporción del medio celular y de la esencia.

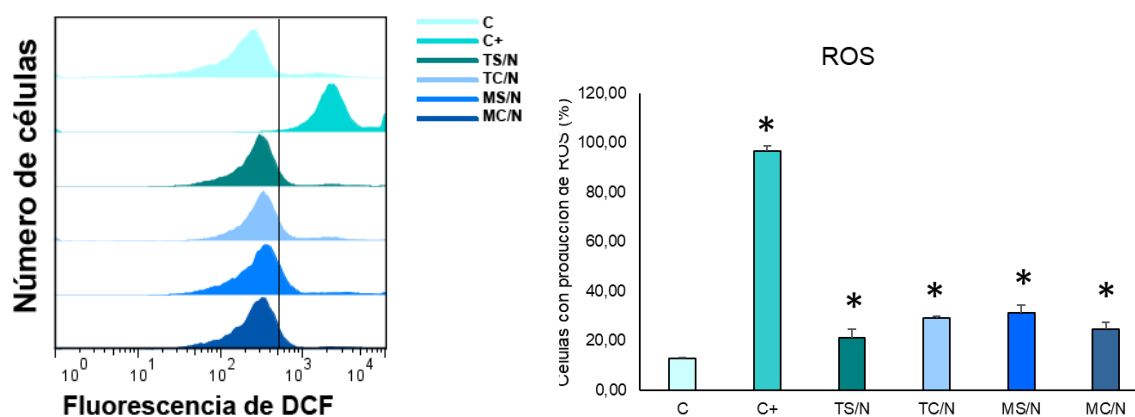
### ***Producción de ROS.***

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente. En este

experimento hay 7 muestras que se detallaron en la **tabla N°3** en la sección de metodología.

En la **Figura N°7** se muestra la respuesta en cuanto a la producción de *ROS* en las células THP-1 ante la exposición de las diferentes esencias. En el gráfico de histogramas la línea vertical muestra el 5% de las células controles con la mayor cantidad de producción de *ROS*. A la izquierda de la línea vertical significa que la producción de *ROS* es parecida al control (producción baja) y a la derecha de la línea vertical significa una alta producción de *ROS*. Pudiendo evidenciar que no hay grandes diferencias entre cada esencia respecto del control.

**Figura N°7. Porcentaje de células con expresión de producción de *ROS*.**



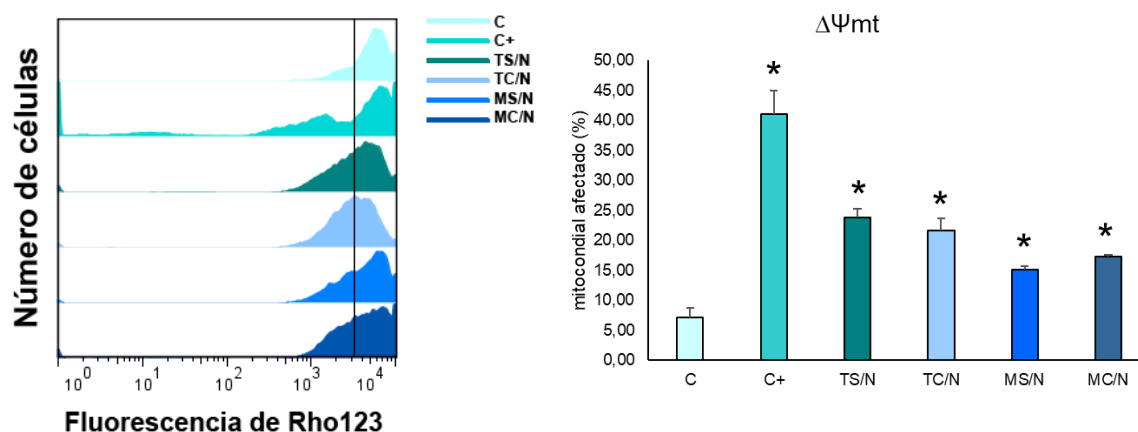
En la imagen de la izquierda se ve un histograma, DCF= Dicloro fluoresceína. En la imagen de la derecha C= Muestra control; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

## **Potencial de membrana.**

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente. El procedimiento tiene un total de 7 muestras, que se detallaron en la **Tabla N°4** en la sección de metodología.

En la **Figura N°8** se aprecia la pérdida del potencial de membrana mitocondrial de las células THP-1 expuestas a las diferentes esencias. En la figura de histograma la línea vertical muestra el 5% de las células controles que muestran indemnidad. A la izquierda de la línea vertical significa que existe pérdida del potencial de membrana mitocondrial, A la derecha significa que se mantiene el potencial de membrana mitocondrial. En este sentido, en el gráfico se ve que el resto de las muestras presentan un aumento aparentemente significativo en la pérdida del potencial de membrana.

**Figura N°8. Porcentaje de células con pérdida en el potencial de membrana.**



En la imagen de la izquierda se ve un histograma, Rho123= Rodamina123. En la imagen de la derecha  $\Delta\Psi_{mt}$ = Potencial de membrana mitocondrial; C= Muestra control; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

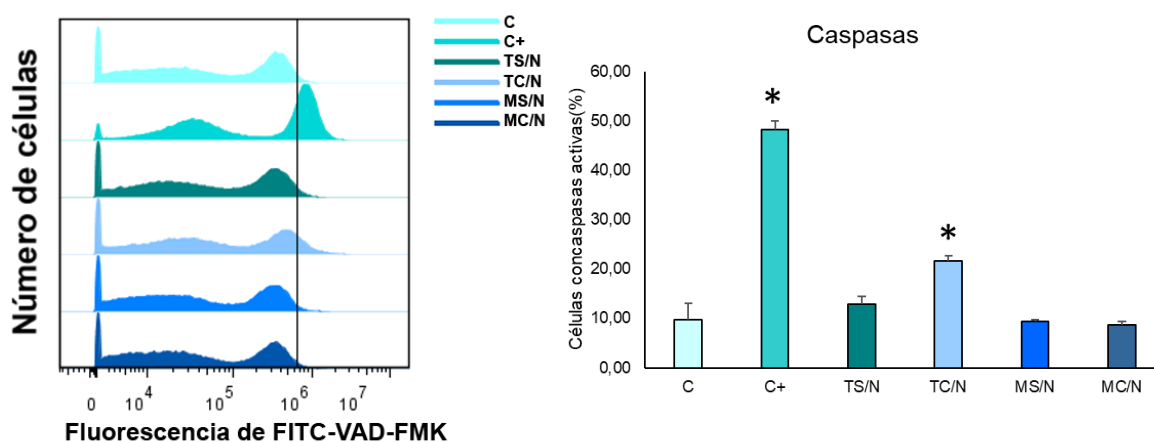
### Caspasas Activas.

Este procedimiento se lleva a cabo en placas de cultivo celular de 6 pocillos con 2 mL de medio celular *DMEM* donde hay 200.000 células aproximadamente. El procedimiento tiene un total de 7 muestras, que se detallaron en la **Tabla N°5** de la sección de metodología

En la **Figura N°9** se exhibe la respuesta en cuanto a la producción de caspasas activas de las células THP-1 expuestas a las diferentes esencias. En el gráfico de histogramas la línea vertical muestra el 5% de las células controles con mayor producción de caspasas activas, a la izquierda de la línea vertical significa que la

producción de caspasas activas es pequeña, a la derecha de la línea vertical significa que hay una mayor producción de caspasas activas. En comparación a esto se ve que el resto de las muestras no presentan un aumento significativo en la producción de caspasas, sin embargo, en base al esquema se puede interpretar que la esencia de tabaco con nicotina provoca más producción de caspasas activas que los otros condensados.

**Figura N°9. Porcentaje de células con expresión de Caspasas Activas.**



C= Muestra control; C+= Control positivo; TS/N= Tabaco sin nicotina; TC/N= Tabaco con nicotina; MS/N= Mentol sin nicotina; MC/N= Mentol con nicotina; \*= Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a muestra control.

## **CAPITULO IV**

### **Discusión**

Este estudio tuvo el propósito de cuestionar la inocuidad de los cigarrillos electrónicos, ya que en el último tiempo se ha visto un incremento exponencial en su uso (OPS, 2020) y comercialización no regulada, sin tener la suficiente evidencia sobre sus consecuencias.

Por lo que a través de este estudio se pudo evidenciar el efecto de las esencias de los cigarrillos electrónicos sobre el porcentaje de viabilidad celular, expresión de ROS, caspasas activas y pérdida del potencial de membrana sobre las células de monocito TPH-1 humano.

Los monocitos, según Yamasaki, son células que transitan en el torrente sanguíneo que pueden pasar a través de los epitelios para ser células residentes de diferentes tejidos, incluyendo el pulmón, donde cambian su fenotipo a macrófagos alveolares, los cuales, al ser primera línea, cumplen roles esenciales en la remoción de desechos celulares y en la protección del sistema respiratorio ante diferentes patógenos. Además, estas células son responsables de liberar factores proinflamatorios al procesar material particulado manteniendo cuadros de inflamación crónica, como, por ejemplo, EPOC. (Yamasaki et al., 2018).

Los macrófagos residentes del pulmón al metabolizar la materia inhalada generan inputs positivos a la médula ósea para aumentar la cantidad de monocitos reclutándolos en el pulmón y luego hacerlos macrófagos residentes (Yamasaki et al., 2018), de esta forma se refuerza la respuesta inmunitaria a los componentes exógenos presentes en la vía aérea. Por lo que, el monocito THP-1 humano sirvió para simular la respuesta de estas células ante la exposición de los condensados de cigarrillo electrónico.

En este sentido, los resultados obtenidos en los experimentos de viabilidad celular pudieron evidenciar que con los cuatro condensados de vapeador la sobrevivencia celular fue concentración dependiente, ya que, se apreció una disminución en la viabilidad celular entre la exposición a 1  $\mu\text{L}$  y 5  $\mu\text{L}$ , lo que permitió obtener la  $EC_{50}$  que corresponde a 2,5  $\mu\text{L}$ . Es decir, un 7,5% de una bocanada de vapeador (33,3  $\mu\text{L}$ ), que corresponde a una inspiración de 8 segundos completando un total de 500 mL de aire, descrita en la sección de metodología.

El hecho de que la muerte celular haya sido dependiente de la concentración se correlaciona con los efectos indeseados dados por el consumo repetitivo y constante de los ingredientes de los condensados, como lo es la glicerina vegetal, propilenglicol, nicotina, etanol, formaldehído (Alvear et al., 2017), entre otros. La *International Agency for Research on Cancer* el 2022, clasifica a estas sustancias como cancerígenas y probablemente cancerígenas para los humanos (IARC, 2022). Además, estas sustancias al ser calentadas por el vapeador, aumentan enormemente la citotoxicidad para los monocitos THP-1 humano (Ma et al., 2021).

los cuales producen efectos altamente perjudiciales para la salud respiratoria de la persona como lo es un aumento de la obstrucción bronquial, tos, aumento de la percepción de esfuerzo, etc. (ACS, 2019).

Las consecuencias físicas mencionadas anteriormente se relacionan con el efecto que se produce al calentar el solvente del vaporizador donde se generan partículas de distintos tamaños las cuales producen impactos adversos, estas partículas se clasifican según tamaño en: partículas gruesas, finas y ultra finas (Marques et al., 2021) estas últimas debido a su tamaño y peso, son capaces de penetrar profundamente en el tracto respiratorio, es decir al alveolo, donde pueden ser absorbidas por el torrente sanguíneo, realizando de efectos perjudiciales a nivel de sistema circulatorio como alteración en la función plaquetaria, aumento de rigidez arteria, etc. (Benowitz et al., 2017; Marques et al., 2021).

Como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio se puede visualizar una disminución de la viabilidad celular, por lo que se realizaron 3 experimentos, el primero buscó evaluar la producción de *ROS*, posteriormente se comprobaron distintas las vías de muerte, como la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de las caspasas activas.

En el caso de la producción de *ROS*, se vieron diferencias significativas en todas las muestras en comparación al grupo control, lo que se relaciona el estudio de Ma (Ma et al., 2021) esto quiere decir que las células entran en estrés oxidativo al estar en contacto con los condensados y esto puede llevar a cabo una lipoperoxidación, como una alteración a la estructura de diferentes órganos celulares, incluyendo el

genoma, lo que activa diferentes vías de muerte celular (Tang et al., 2019). Recordar que las *ROS* tienen el potencial de interactuar, desestabilizar y dañar a diversas estructuras celulares (Phaniendra et al., 2015).

En el caso del experimento de potencial de membrana mitocondrial los resultados revelaron que hubo una diferencia significativa de los monocitos THP-1 en comparación al grupo control, dando a entender que hay pérdida en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que permite la salida de proteínas mitocondriales al citosol pudiendo iniciar la apoptosis intrínseca (Tang et al., 2019). Es importante considerar que este mecanismo lleva consigo la activación de caspasas. Esto llevó a evaluar la cantidad de células con activación de esta vía de muerte.

El experimento de caspasas activas mostró que sólo las células expuestas a tabaco con nicotina (TC/N) presentaron diferencias significativas respecto del control, esto quiere decir que este grupo en particular aparentemente se activa la vía de muerte por apoptosis intrínseca. Mientras que en las otras muestras no hubo activación de caspasas, pero si hubo pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo que se podría tratar de una necrosis dependiente del poro de transición mitocondrial (Tang et al., 2019), la cual es gatillada por un aumento de las *ROS* (Robichaux et al., 2022) o bien se podría tratar de una inducción a necrosis, sin embargo esta vía de muerte no se pudo comprobar, ya que no se pudo evaluar la actividad de RIPK1, RIPK3 o de MLKL (Tang et al., 2019).

Mediante microscopio, se visualizó que la morfología celular de los monocitos THP-1 cambió respecto al control, según el condensado que se le aplicó, la célula obtuvo características similares a necrosis, ya que hubo “*hinchazón*” de los organelos subcelulares (Tang et al., 2019). Lo cual se puede apreciar en la **Figura N°6** en la sección de resultados. En un estudio realizado el año 2022 se pudo apreciar que el uso de tabaco promueve daño en el ADN deteniendo el ciclo celular en G1 y/o G2 lo que aumentó la muerte celular a través de necrosis y apoptosis (Emma et al., 2022).

En consecuencia, de todo lo expuesto anteriormente, el equipo investigador plantea la necesidad de continuar esta línea de investigación, ya que, este estudio no considera otras líneas celulares residentes del tracto respiratorio, como neumocitos u otros sistemas del cuerpo, como el sistema circulatorio. Al mismo tiempo, se desconoce con exactitud los ingredientes de los condensados y el efecto de otras esencias más artificiales.

Por otro lado, no se sabe el impacto que tiene el realizar los experimentos con células dentro de medio celular y no en un contexto más similar al del tracto respiratorio ya que hay estudios en los que si se manifiesta diferencias entre experimentos en medio celular y otros métodos (Emma et al., 2022).

Tampoco se pudo comprobar en su totalidad que la vía de muerte fuese necrosis, por no poseer el inhibidor de necrosis Cefalosporina A, por lo que, en este sentido se guio la investigación mediante bibliografía.

Por último, se desconocen los efectos que tendrá el uso repetitivo y mantenido en el tiempo del vapeador, debido a que la alza en su consumo aún es muy reciente.

Se invita a la comunidad científica a investigar el uso de vapeador, ya que podría significar un problema sanitario severo dentro de los próximos años.

### **Conclusión**

En base a los resultados obtenidos en la investigación se puede concluir que el uso de vapeador provoca citotoxicidad en el monocito THP-1, llevando a una disminución en la viabilidad celular con un aumento significativo de *ROS* y pérdida del potencial de membrana, permitiendo interpretar que el uso de los cigarrillos electrónicos es nocivo para la salud y no debe considerarse una alternativa saludable.

## **CAPITULO V**

### **Bibliografía**

- ACS. (2019). *Riesgos para la salud de los cigarrillos electrónicos*. <https://www.cancer.org/es/saludable/mantengase-alejado-del-tabaco/riesgos-%0Apara-la-salud-debido-al-tabaquismo/riesgos-para-la-salud-debido-a-los-%0Acigarrillos-electronicos.html%0A>
- Alvear, G., Santibáñez, L., Ramírez, V., & Sepúlveda, R. (2017). Cigarrillos electrónicos. *Rev Chil Enferm Respir*, 118–130. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rcher/v33n2/0717-7348-rcher-33-02-0118.pdf>
- Bello S., S. (2019). Productos de tabaco calentado con especial referencia a IQOS. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 35(3), 225–231. <https://doi.org/10.4067/s0717-73482019000300225>
- Benowitz, N., & Fraiman, J. (2017). Cardiovascular effects of electronic cigarettes. *HHS*, 14(8), 447–456. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.36> Cardiovascular
- Bosshart, H., & Heinzelmann, M. (2016). THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*, 4(21), 4–7. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.53>
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91–100. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091)
- Casas, F., Núñez, E., Pino, C., & Vallejos, N. (2021). *Descripción de variables sociodemográficas de usuarios de dispensadores electrónicos de nicotina*. Universidad de Valparaíso.
- Cascudo, N., Benítez, C., Ranero, V., & Álvarez, E. (2018). Causas, consecuencias y prevención del tabaquismo. *Geroinfo*, 13(3), 1–18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/geroinfo/ger-2018/ger181d.pdf>
- Cohen, M. D., Vaughan, J. M., Garrett, B., Prophete, C., Horton, L., Sisco, M., Kodavanti, U. P., Ward, W. O., Peltier, R. E., Zelikoff, J., & Chen, L. C. (2015). Acute high-level exposure to WTC particles alters expression of genes associated with oxidative stress and immune function in the lung. *Journal of Immunotoxicology*, 12(2), 140–153. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.914609>

- Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, N., Aldini, G., Rossi, R., & Dalle - Donne, I. (2014). Fisiopatología de la exposición al humo del tabaco: percepciones recientes de la proteómica comparada y redox. *Revisiones de Espectrometría de Masas*, 33(3), 183–218.
- Corrales, L. C., & Muñoz Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*, 10(18), 213. <https://doi.org/10.22490/24629448.1010>
- Eisner, M. D., Anthonisen, N., Coultas, D., Kuenzli, N., Perez-Padilla, R., Postma, D., Romieu, I., Silverman, E. K., & Balmes, J. R. (2010). An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(5), 693–718. <https://doi.org/10.1164/rccm.200811-1757ST>
- Emma, R., Caruso, M., Campagna, D., Pulvirenti, R., & Li Volti, G. (2022). El impacto de los cigarrillos de tabaco, los productos de vapeo y los productos de tabaco para calentar en el estrés oxidativo. *Antioxidantes*, 11(9), 1829. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3390/antiox11091829>
- Farah, C., Michel, L. Y. M., & Balligand, J. L. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews Cardiology*, 15(5), 292–316. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Goldenberg, M., Danovitch, I., & IsHak, W. W. (2014). Quality of life and smoking. *American Journal on Addictions*, 23(6), 540–562. <https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2014.12148.x>
- Goniewicz, M. L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., Prokopowicz, A., Jablonska-Czapla, M., Rosik-Dulewska, C., Havel, C., Jacob, P., & Benowitz, N. (2014). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tobacco Control*, 23(2), 133–139. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859>
- Grana, R., Benowitz, N., & Glantz, S. A. (2014). E-cigarettes: A scientific review. *Circulation*, 129(19), 1972–1986. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667>

- Grossi, M. I., & Valenzuela, M. T. (2018). *Dependencia física a la nicotina en estudiantes que fumen cigarrillos mentolados y no mentolados de tres carreras de kinesiología de la V región.*
- International Agency for Research on Cancer. (2022). *Agents Classified by the IARC Monographs , Volumes 1 – 116* (Issue 026148, pp. 1–36).
- Jimenez Ruiz, C. A., Solano Reina, S., de Granda Orive, J. I., Signes-Costa Minaya, J., de Higes Martinez, E., Riesco Miranda, J. A., Altet Gómez, N., Lorza Blasco, J. J., Barrueco Ferrero, M., & de Lucas Ramos, P. (2014). El cigarrillo electrónico. Declaración oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) sobre la eficacia, seguridad y regulación de los cigarrillos electrónicos. *Archivos de Bronconeumología*, 50(8), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.02.006>
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, 1(1), 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.014>
- Kuntic, M., Oelze, M., Steven, S., Kröller-Schön, S., Stamm, P., Kalinovic, S., Frenis, K., Vujacic-Mirski, K., Jimenez, M. T. B., Kvandova, M., Filippou, K., Al Zuabi, A., Brückl, V., Hahad, O., Daub, S., Varveri, F., Gori, T., Huesmann, R., Hoffmann, T., ... Münzel, T. (2020). Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: Evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *European Heart Journal*, 41(26), 2472-2483A. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz772>
- Lam, D. C. L., Nana, A., & Eastwood, P. R. (2014). Electronic cigarettes: “Vaping” has unproven benefits and potential harm. *Respirology*, 19(7), 945–947. <https://doi.org/10.1111/resp.12374>
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D. J., McIntosh, S., Robinson, R., & Rahman, I. (2015). Vapors produced by electronic cigarettes and E-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS ONE*, 10(2), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116732>
- Liberman, K., Van Schuerbeek, P., Herremans, S., Meysman, M., De Mey, J., & Buls, N. (2018). The effect of nicotine patches on craving in the brain: A functional MRI study on heavy smokers. *Medicine (United States)*, 97(39). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012415>
- Ma, T., Wang, X., Li, L., Sun, B., Zhu, Y., & Xia, T. (2021). Electronic cigarette aerosols induce oxidative stress-dependent cell death and NF-κB mediated acute lung inflammation in mice. *HHS*, 95(1), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02920-1>Electronic
- Maciejczyk, M., Żebrowska, E., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2018). Redox

- balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6940515>
- Marques, P., Piqueras, L., & Sanz, M. J. (2021). An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respiratory Research*, 22(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12931-021-01737-5>
- Martinez, G. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(3), 0–0. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300009)
- MINSAL. (2003). *La cesación del consumo de tabaco*.
- Muthumalage, T., Prinz, M., Ansah, K. O., Gerloff, J., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2018). Inflammatory and oxidative responses induced by exposure to commonly used e-cigarette flavoring chemicals and flavored e-liquids without nicotine. *Frontiers in Physiology*, 8(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01130>
- OMS. (2021). *Tabaco*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco%0A>
- OPS. (2013). *Informe sobre Control del Tabaco*. Organización Panamericana de la Salud. [www.paho.org/chi/index.php?option=com\\_content&view=article&id=551:informe-sobre-control-de-tabaco-para-la-region-de-las-americas-2013&Itemid=300](http://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=551:informe-sobre-control-de-tabaco-para-la-region-de-las-americas-2013&Itemid=300).
- OPS. (2017). Estrategia y Plan de Acción para fortalecer el control del Tabaco en la Región de las Américas 2018-2022. In *Organización Panamericana de la Salud* (Issue 2011). <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34441/CSP29-11-s.pdf;jsessionid=2B6488D9B4626DD9AD57E899B6454D39?sequence=2>
- OPS. (2020). *Los cigarrillos electrónicos son perjudiciales para la salud*. <https://www.paho.org/es/noticias/23-5-2020-cigarrillos-electronicos-son-%0Aperjudiciales-para-salud%0A>
- Paredes, C. S., Bello, L. M., & Bermúdez, V. (2017). Factor de necrosis tumoral como marcador inflamatorio en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 36(1), 22–24.
- Petermann, F., Durán, E., Labraña, A. M., Martínez, M. A., Leiva, A. M., Garrido-Méndez, A., Poblete-Valderrama, F., Díaz-Martínez, X., Salas, C., & Celis-

- Morales, C. (2017). Factores asociados al desarrollo de obesidad en Chile: resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 TT - Risk factors for obesity: analysis of the 2009-2010 Chilean health survey. *Rev. Méd. Chile*, 145(6), 716–722. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872017000600716](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872017000600716)
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Robichaux, D., Harata, M., Murphy, E., & Karch, J. (2022). Mitochondrial permeability transition pore-dependent necrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 124, 47–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2022.11.003>
- Salas-Silva, E. S., Simoni-Nieves, A., Miranda-Labra, R. U., & Gómez-Quiroz, L. E. (2017). Fundamentos de la señalización redox: Lecciones de los sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico*, 41(June), 108–115. [https://www.researchgate.net/publication/317039141\\_Fundamentos\\_de\\_la\\_se\\_nalizacion\\_redox\\_Lecciones\\_de\\_los\\_sistemas\\_generadores\\_de\\_especies\\_re\\_activas\\_de\\_oxigeno](https://www.researchgate.net/publication/317039141_Fundamentos_de_la_se_nalizacion_redox_Lecciones_de_los_sistemas_generadores_de_especies_re_activas_de_oxigeno)
- Salvi, S. S., & Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 374(9691), 733–743. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61303-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61303-9)
- SENDA, M. del interior y salud. (2018). Décimo Tercer Estudio Nacional de Drogas en Población General de Chile, 2018. In *Observatorio Chileno de Drogas*. <https://www.senda.gob.cl/wp-content/uploads/2020/02/ENPEG-2018.pdf>
- Sousa, C., Rodrigues, M., Carvalho, A., Viamonte, B., Cunha, R., Guimarães, S., de Moura, C. S., Morais, A., & Pereira, J. M. (2019). Diffuse smoking-related lung diseases: insights from a radiologic-pathologic correlation. *Insights into Imaging*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0765-z>
- Takahashi, M. A., & Asada, K. (1983). Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 226(2), 558–566. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90325-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90325-9)
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
- Thun, M. J., Carter, B. D., Feskanich, D., Freedman, N. D., Prentice, R., Lopez, A. D., Hartge, P., & Gapstur, S. M. (2013). 50-Year trends in smoking-related mortality in the United States. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 68(7), 516–517. <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31829a8444>

- Viada, E., Gómez, L., & Campaña, I. (2017). Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico*, 21(1), 1–14.
- Yamasaki, K., & Van Eeden, S. F. (2018). Lung macrophage phenotypes and functional responses: Role in the pathogenesis of COPD. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms19020582>
- Zuo, L., Zhou, T., Pannell, B. K., Ziegler, A. C., & Best, T. M. (2015). Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly. *Acta Physiologica*, 214(3), 329–348. <https://doi.org/10.1111/apha.12515>