



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS *in Vitro* DE LAS AEROPARTÍCULAS CONTAMINANTES
(PM) EN LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) Y EN
LA ACTIVIDAD DE LOS RECEPTORES SCAVENGER (RS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

LAURA SEVILLA TAPIA



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. NATALIA MANZANO LEÓN

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Sevilla
Tapia
Laura
58 44 62 36
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301058357

2. Datos del tutor

Dra.
Natalia
Manzano
León

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Irma Aurora
Rosas
Pérez

4. Datos del sinodal 2

Dra. Claudia María
García
Cuellar

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Álvaro Román
Osornio
Vargas

6. Datos del sinodal 4

Biol.
Jesús
Serrano
Lomelín

7. Datos del trabajo escrito

Efectos in Vitro de las aeropartículas contaminantes (PM) en las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y en la actividad de los Receptores Scavenger (RS)
84 p
2011

A mi madre

por todos tus esfuerzos realizados desde siempre
para que pudiera llegar hasta este momento,
por tus consejos y por tus enseñanzas.
Gracias por ser el pilar de mi vida.

A HGH

por tu paciencia y
por el apoyo incondicional
que me has brindado,
por los ánimos que siempre me diste,
sobre todo cuando sentía que no podía más.
¡Ojala sean más logros
los que sigamos compartiendo!

AGRADECIMIENTOS

A la Máxima Casa de Estudios, la UNAM, por brindarme sus instalaciones y la oportunidad de aprender y formarme como la persona que soy. En especial a la Facultad de Ciencias, porque es ahí donde aprendí los pasos iniciales de la ciencia.

A mi tutora, la Dra. Natalia Manzano León por ser una gran Doctora pero sobretodo por ser un gran ser humano. Por la paciencia que mostraste hacia mí, por compartir tus conocimientos y tu experiencia, pero sobre todo por brindarme tu amistad y cariño.

Al Dr. Álvaro Román Osornio Vargas, por brindarme la oportunidad de formarme en su laboratorio, por preocuparse de que cada uno de sus estudiantes culminemos nuestras metas de forma satisfactoria, pero sobre todo por brindarnos su apoyo y por compartir sus conocimientos de forma incondicional.

Al cada uno de los integrantes de mi jurado: al Profesor Jesús Serrano Lomelí por el apoyo brindado para el desarrollo de la parte estadística de este trabajo. Pero más que nada por ser una gran persona y un gran profesor y por transmitir sus conocimientos de forma única. A la Dra. Irma Rosas Pérez por su guía y consejos. A la Dra. Claudia María García Cuellar por el apoyo brindado y por sus comentarios.

Al Dr. Jaime Mas Oliva del IFC, UNAM, y a cada uno de los integrantes de su laboratorio; por prestarnos sus instalaciones, el equipo y el material necesarios para llevar a cabo la obtención de LDL. En especial a pcDr Salvador Damian Zamacona y pcDr Paola Mendoza por el apoyo brindado para el montaje y estandarización de las técnicas de aislamiento y marcaje de las LDLs, así como para la obtención de las fotografías. Gracias por su amistad y las enseñanzas que me brindaron.

Al Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental de la División en Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE, en especial al Dr José Gutiérrez Salinas por las facilidades prestadas para la obtención de las unidades de plasma sanguíneo.

A la Biol Rocío Morales Barcenas por su apoyo técnico incondicional en el manejo del citómetro. Por las enseñanzas y tu tiempo brindado.

A todos los doctores del laboratorio de Toxicología Ambiental del INCan y a mis compañeros y amigos de este mismo lugar de los cuales he aprendido y seguiré aprendiendo grandes enseñanzas. En especial a la QFB Inés Vázquez, IQ Raúl Quintana, Biol. Nalleli, Sra Margarita, porque han hecho que mi estancia en el laboratorio sea más placentera.

A cada uno de mis profesores de carrera y a cada uno de mis maestros de toda la vida, por que gracias a sus enseñanzas he llegado a ser la persona que hoy soy. Además porque gracias a ustedes he podido llegar hasta este importante momento en mi vida. Pero sobretodo porque podré continuar por este camino, sobre los cimientos que ustedes han forjado en mi.

A mis grandes amigos de toda la vida que por falta de espacio no puedo mencionarlos a cada uno pero saben que siempre los llevaré en mi corazón.

A mis amigos de la carrera: Claus, Mirna, Bere, Milka, Rafa, Víctor, Yadira, Dulce, Jorge, Fernando, Aris y Axa, por su amistad y ayuda incondicional, por ser las personas con quienes he aprendido y crecido dentro de esta fortuita y hermosa carrera "BIOLOGÍA" y con quienes además he compartido grandes momentos. Chicos, ¡Ojala que cultivemos nuestra amistad por siempre! En especial a Fer, Macario, Yara y Ale porque al ver el esfuerzo que ustedes le ponen a las cosas me animan a seguir echándole muchas ganas y no decaer en ningún momento.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología Ambiental del Área de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, SS; bajo la dirección de la Dra. Natalia Manzano León y en colaboración con el Dr. Álvaro Román Osornio Vargas.

Así mismo, se contó con la colaboración del Dr. Jaime Mas Oliva del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se recibió una beca del programa Iniciación a la Investigación Científica por parte de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta especialidad (CCINSHAE).

*Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada
sacará a la luz cosas que hoy están ocultas...Llegará una época en la que
nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para
ellos son tan claras...Muchos son los descubrimientos reservados para las
épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros.*

Carl Sagan, Cosmos.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	iii
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Contaminación Atmosférica por PM.....	1
1.2 Efectos de las PM sobre la salud humana.....	3
1.3 Lipoproteínas.....	7
1.4 Receptor Scavenger.....	12
1.5 Macrófagos	14
1.6 Aterosclerosis.....	15
1.7 PM y aterosclerosis.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos particulares.....	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
5.1 Obtención de PM.....	22
5.2 Aislamiento de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL).....	22
5.3 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	25
5.4 Marcaje de LDL con Dil.....	26
5.5 Cuantificación de Proteína LDL.....	27
5.6 Oxidación de LDL por exposición a PM.....	28
5.7 Formación de complejos PM-LDL.....	29
5.8 Cultivos Celulares.....	30
• Línea Celular RAW 264.7.....	30
• Línea Celular CHO.....	30
• Línea Celular CHO-RS.....	30
5.8 Viabilidad Celular.....	31
5.9 Ensayos de Unión e Internalización de LDL-ox-PM a través de los RS.....	31
5.10 Ensayos de Competencia entre LDL-ox-PM y PM por el RS.....	32

5.11 Ensayos para evaluar el efecto de las PM sobre el Receptor LDL (R-LDL).....	33
5.12 Análisis Estadístico.....	33
6. RESULTADOS	35
6.1 Microscopía Electrónica de Transmisión de LDL.....	35
6.2 Oxidación de LDL por exposición a PM.....	37
6.3 Formación de complejos PM-LDL.....	39
6.4 Viabilidad Celular.....	40
6.5 Unión de LDL-ox-PM a los RS	41
6.6 Internalización de LDL-ox-PM a través de los RS	43
6.7 Competencia entre las PM y las LDL-ox-PM por los RS.....	45
6.8 Las PM afectan otros receptores celulares como el R-LDL.....	47
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS.....	55
10. APÉNDICES.....	56
Apéndice I Estadística para los ensayos de viabilidad celular	57
Apéndice II Planteamiento del modelo estadístico para los ensayos de unión e internalización de las LDL-ox-PM.....	58
Apéndice III Estadística para los ensayos de unión.....	59
Apéndice IV Estadística para los ensayos de internalización.....	64
Apéndice V Estadística para los ensayos de competencia y los ensayos para ver si las PM afectan al R-LDL.....	69
11. GLOSARIO.....	72
12. BIBLIOGRAFÍA.....	75

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Análisis de Varianzas
CHO	Células de Ovario de Hamster Chino
CHO-RS	Células CHO transfectadas con el gen del RS-AI bovino
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HDL	High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidad)
IL	Interleucinas
INE	Instituto Nacional de Ecología
LDL	Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad)
LDL-nat	LDL nativas
LDL-ox	LDL oxidadas
LDL-ox-PM	LDL oxidadas por PM
Mø	Macrófago
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
PM	Particulate Matter, aeopartículas contaminantes
PM ₁₀	Material Particulado con diámetro aerodinámico $\leq 10 \mu\text{m}$
PM _{2.5}	Material Particulado con diámetro aerodinámico $\leq 2.5 \mu\text{m}$
PMN	Células Polimorfonucleares
PST	Partículas Suspendidas Totales
PUF	Partículas Ultrafinas con diámetro aerodinámico $\leq 0.1 \mu\text{m}$
R-LDL	Receptor de LDL
RNS	Reactive Nitrogen Species (Especies Reactivas de Nitrógeno)
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
RS	Receptor Scavenger
RS-AI	RS clase A tipo I

ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS

BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albúmina Sérica Bovina
DE	Desviación Estándar
Dil	1,1'-dioctadecil-3, 3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato
DMEM	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTNB	5, 5' -Dithiobis(2-nitro-ácido benzóico)
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético
h	horas
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
KBr	Bromuro de Potasio
MDA	Malondialdehído
µg	microgramos
ml	mililitros
µl	microlitros
µm	micrómetros
mM	milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	nanómetros
PBS	Amortiguador de Fosfatos-Solución salina
PBS-BSA	PBS con albúmina
PMSF	Fluoruro de fenilmetil-sulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
TBA	Ácido Tiobarbitúrico

RESUMEN

La exposición a la contaminación atmosférica por aeropartículas (PM) es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiopulmonares (ECV). Existen evidencias de que las PM pueden mediar algunas afecciones cardiovasculares a través de la inducción, progresión y aceleración de la aterosclerosis. La aterosclerosis es una enfermedad vascular cuya característica principal es el depósito y la infiltración de células (principalmente macrófagos (Mø)), lípidos y otros residuos en la capa interna de la pared de una arteria, que trae como consecuencia la disminución del flujo sanguíneo. Los objetivos principales de este trabajo fueron explorar si las PM pudieran contribuir al desarrollo y/o complicación de la aterosclerosis mediante la oxidación de las LDL, haciéndolas susceptibles de ser unidas e internalizadas por los Receptores Scavenger (RS) de los Mø, así como evaluar los efectos de las PM en la funcionalidad de los RS y de otros receptores celulares como el receptor de LDL (R-LDL).

Para cumplir con estos objetivos, se expusieron LDL a PM de la zona industrial de la Ciudad de México y se observó que las PM son capaces de oxidar a las LDL. Se hicieron ensayos de unión/internalización de LDL-ox por PM en células CHO (Células de Ovario de Hámster Chino, control negativo), CHO-RS (CHO transfectadas con el RS-A) y RAW (Macrófagos). Las LDL-ox-PM fueron unidas e internalizadas por las células CHO-RS y por las RAW, y de forma basal por las CHO. Se determinó si se establecía una competencia entre las LDL-ox y las PM por los RS, pues ambos son ligandos de estos receptores; para ello se hicieron ensayos de unión/internalización de LDL-ox en presencia de PM en los que se observó un decremento en la unión de LDL-ox en RAW (20%) y en CHO-RS (50%), de igual forma la internalización disminuyó en RAW (30%) y en CHO-RS (70%). De manera similar, la unión/internalización de LDL nativas a través del R-LDL disminuyó por la presencia de PM; la unión disminuyó en RAW (40%) y en CHO-RS (60%), mientras la internalización disminuyó en RAW (50%) y en CHO-RS (80%). Concluimos que las PM podrían contribuir al desarrollo de la aterosclerosis al oxidar a las LDL y favorecer su captación a través de los RS. Por otra parte, encontramos que las PM pueden afectar la funcionalidad de receptores celulares como el RS y el R-LDL.

Abstract

Airborne particles present in urban polluted air (Particulate Matter: PM) are a risk factor for cardiopulmonary diseases. There are evidences that PM can mediate some cardiovascular diseases (CD) through induction, progression and acceleration of the atherosclerosis. The atherosclerosis is characterized by blood flow reduction due to accumulation of cells like macrophages (M ϕ), Low Density Lipoproteins (LDL) and others celular debris within the arterial walls. The main objetives of this thesis was to explore if PM can contribute to the development of atherosclerosis through oxidative modification of LDL, rendering susceptible to be bound and internalized by the macrophage Scavenger Receptors (SR). We also evaluated the effects of PM on the funtionality of the SR and other cell receptors, like the LDL receptor (R-LDL).

LDL were exposed to PM obtained from the industrial zone of Mexico City to evaluate if PM oxidized LDL. Cell binding and internalization of ox-LDL-PM was explored using CHO (control), CHO-SR (transfected with SR-AI) and RAW (macrophages) cells. The CHO-SR and RAW cells bound and internalized ox-LDL-PM, whereas CHO did it in minimal form. Since LDL-ox and PM are SR ligands, we performed competition assays using ox-LDL-PM in the presence of PM. Results showed a 20 % and 50% decrease in ox-LDL binding by RAW and on CHO-SR, respectively. Internalization assays also showed 30% and 70% decrements in RAW and CHO-SR cells respectively. The binding/internalization of nat-LDL also decrease in the presence of PM. The binding of LDL-nat by RAW was decreased 40% and 60 % for CHO-SR cells. Internalization decreased 50% and 80% on RAW and CHO-SR cells, respectively. In conclusion, PM could contribute to atherosclerosis development by oxidation of LDL, favoring macrophage uptake mediated by SR also affects other receptors funtionality like Scavenger and LDL receptors.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación atmosférica por aeropartículas (PM)

La contaminación atmosférica es un problema que ha crecido en los últimos años a raíz de una desmedida urbanización (Chen & Kan, 2008). Si bien es cierto que algunos procesos naturales como la actividad volcánica, los incendios y la erosión del suelo, contribuyen a la contaminación aérea, las actividades humanas aún son la principal causa de este problema ambiental (Kampa & Castanas, 2008). La problemática de la contaminación atmosférica debe recibir la suficiente atención, pues amenaza directamente a una gran fracción de la población mundial, impacta la viabilidad de ecosistemas naturales y agrícolas, y contribuye significativamente al cambio climático regional y global (Molina *et al.*, 2007).

Aún cuando existen muchos contaminantes en el aire, todos ellos se agrupan y clasifican de acuerdo a su prevalencia en el ambiente, sus características fisicoquímicas y su potencial de amenaza a la salud pública y al ambiente en dos grupos principales: los contaminantes criterio y los contaminantes no criterio (Suh *et al.*, 2000). Los contaminantes criterio, aunque no son los únicos presentes en la atmósfera, son los que se utilizan para determinar la calidad del aire de las principales ciudades del mundo. Para cada uno de estos contaminantes existen estándares de calidad que determinan aquellas concentraciones que representan un riesgo para la salud.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA por las siglas en inglés: Environmental Protection Agency) en EUA y el Instituto Nacional de Ecología (INE) en México, reconocen al menos seis contaminantes criterio: 1) Bióxido de azufre (SO₂), 2) Bióxido de nitrógeno (NO₂), 3) Monóxido de carbono (CO), 4) Plomo (Pb), 5) Ozono (O₃) y 6) Material Particulado (PM) (EPA 2002; INE 2009).

Las PM conocidas así por las siglas en inglés de "Particulate Matter" son una mezcla compleja y heterogénea de diferentes materiales sólidos y líquidos suspendidos en el aire que varían significativamente en tamaño, forma y composición, dependiendo fundamentalmente de su origen (EPA, 2009). Las

PM se forman por diferentes procesos tanto naturales (como la polinización de las plantas, los incendios naturales, la erosión del suelo), como antropogénicos (abarcando desde la quema de combustibles hasta la fertilización de campos agrícolas). Debido a esta gran heterogeneidad en las fuentes de emisión de las PM, la composición de las mismas incluye un gran número y una muy diversa mezcla de componentes tales como ácidos, nitratos, sulfatos, compuestos orgánicos, metales, carbón orgánico y elemental, partículas de suelo y polvo, endotoxinas, fragmentos de polen y esporas.

Debido a su gran heterogeneidad, a las PM se les clasifica siguiendo diferentes parámetros. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente pueden ser naturales o antropogénicas según su origen, y de acuerdo a su fuente de emisión pueden ser primarias, si son emitidas directamente a la atmósfera, o secundarias, si se forman al reaccionar con otros componentes o contaminantes de la atmósfera. Sin embargo, por razones prácticas y para facilitar la medición de emisiones contaminantes, las PM son caracterizadas de acuerdo a su diámetro aerodinámico. El diámetro aerodinámico es una expresión del comportamiento de una partícula en un fluido como el aire, y está en función del diámetro físico y de la densidad de las partículas.

Siguiendo este último criterio de clasificación encontramos a las Partículas Suspendidas Totales (PST) cuyo diámetro aerodinámico puede ser de hasta 100 μm ; a las PM_{10} cuyo diámetro aerodinámico promedio es \leq a 10 μm , también conocidas como partículas gruesas; a las $\text{PM}_{2.5}$ con diámetros aerodinámicos promedio \leq a 2.5 μm , también conocidas como finas; y finalmente a las $\text{PM}_{0.1}$, también conocidas como Partículas Ultrafinas (PUF) cuyo diámetro aerodinámico promedio es \leq a 0.1 μm (Englert, 2004; EPA,2002; INE, 2009) (Figura 1).

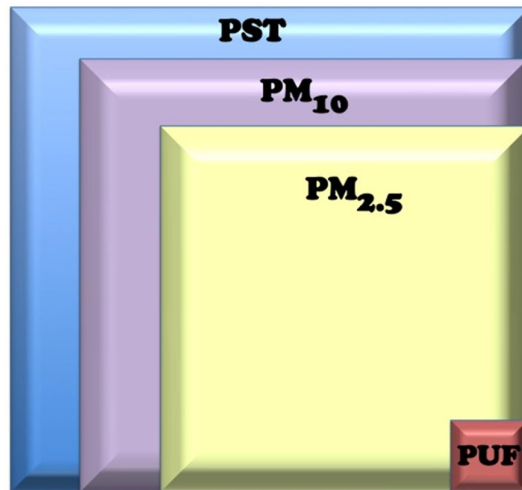


Figura 1. Diagrama de las diferentes fracciones de PM que podemos encontrar en el ambiente. Se observa como las PUF que son las más pequeñas quedan comprendidas dentro de las PM_{2.5}, y estas a su vez forman parte de las PM₁₀, formando todas en conjunto a las PST. *Adaptado de Englert, 2004.*

1.2 Efectos de las PM sobre la salud humana

Las PM causan serios efectos a los organismos en los diferentes ecosistemas: afectan la visibilidad, el clima y el depósito de ácidos, tóxicos y nutrientes. No obstante, sus efectos se han evaluado con frecuencia en la salud humana, principalmente en aquellos grupos vulnerables como las personas con enfermedades cardiovasculares o pulmonares previas, adultos mayores y niños. En muchos casos, los efectos dañinos a la salud causados por las PM se observan aún cuando las concentraciones de masa ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) se encuentran dentro de los niveles aceptables (Samet *et al.*, 2000).

Las PM causan diversos efectos nocivos sobre la salud, los cuales varían según el tiempo de exposición y la dosis (Pope III, 2007). La exposición a corto plazo puede causar desde síntomas temporales como irritación de ojos, mucosas y garganta, hasta exacerbar diversas enfermedades como bronquitis, asma y otras enfermedades respiratorias, así como también generar cambios en la variabilidad del ritmo cardíaco. Por otro lado, la exposición prolongada de los seres humanos a las PM está asociada con un incremento en la morbilidad y en la mortalidad, atribuida en parte a las complicaciones de enfermedades respiratorias y pulmonares previas (Dockery *et al.*, 2001; Donaldson *et al.*, 2001; Pope III *et al.*, 2007; 2002), así

como a algunos tipos de cáncer, como el pulmonar y el de mama (Beeson *et al.*, 1998, Gallus *et al.*, 2008; Nie *et al.*, 2007), pero principalmente a enfermedades cardiovasculares (ECV) (Delfino *et al.*, 2005; Pope III *et al.*, 2004; 2007; Zanobetti *et al.*, 2000).

Aunque se sabe que las PM son un factor de riesgo para diversas enfermedades, los mecanismos biológicos mediante los cuales las partículas ejercen sus efectos adversos sobre la salud humana aún no se conocen por completo. La propuesta actual indica que los efectos de las PM en la salud, podrían estar mediados por el potencial pro-oxidante de estas partículas (Chirino *et al.*, 2010; Donaldson *et al.*, 2003; Mazzoli-Rocha *et al.*, 2010; Montiel-Dávalos *et al.*, 2010; Sánchez-Pérez *et al.*, 2009).

Las propiedades físicas y químicas de las PM como su tamaño, masa, superficie y su compleja composición, son factores que determinan sus efectos biológicos (Osornio-Vargas *et al.*, 2003; Pérez-Rosas *et al.*, 2007). Entre algunos de los componentes de las PM relacionados con sus efectos tóxicos están los metales de transición (Hetland *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 1997), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Lewtas, 1993), las endotoxinas (Imrich, 1999, Osornio-Vargas *et al.*, 2003), el carbón orgánico y el carbón elemental (Kulkarni *et al.*, 2006). A continuación resumiremos algunos de los mecanismos mediante los cuales las PM ejercen sus efectos dañinos.

Por su tamaño aerodinámico las PM₁₀ pueden permanecer en las vías superiores como fosas nasales, laringe y faringe, e inclusive pueden llegar a depositarse en las bifurcaciones de los conductos bronquiales. Mientras que las PM finas (PM_{2.5}) y ultrafinas (PUF) pueden penetrar más profundo en el tracto respiratorio y alcanzar la región alveolar (Lippmann *et al.*, 1980; Brauer *et al.*, 2001). Después del depósito de las PM en estos sitios, se desencadenan múltiples respuestas por parte de las diferentes poblaciones celulares de los pulmones como las células epiteliales, células alveolares, monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (PMN) (Nel, 2005). Entre las respuestas celulares que se sabe, por resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, son inducidas por las PM están:

1) Reducción en la integridad de las barreras epiteliales y endoteliales de los pulmones (Churg *et al.*, 2003), pues algunos componentes de las partículas como los metales pueden inducir lipoperoxidación de las membranas celulares a través de una vía de óxido-reducción. Esto trae como consecuencia un cambio en la integridad y funcionalidad de la membrana y subsecuentemente la muerte celular, la cual puede ser por apoptosis o por necrosis.

2) Daño en los mecanismos de defensa pulmonar. Por un lado las PM incrementan la producción de inmunoglobulinas antígeno-específicas, alteran la reactividad de las vías aéreas a los antígenos y por tanto, incrementan su susceptibilidad a las infecciones microbianas. Por otro lado, las PM afectan la actividad fagocítica de los macrófagos (Mø) alveolares, por consiguiente su función de limpieza también se ve alterada (Obot *et al.*, 2002; Soukup *et al.*, 2000) y además promueven la liberación de sustancias bioactivas (proteasas, citocinas, factores de crecimiento, oxidantes) dentro de los pulmones (Goldsmith *et al.*, 1998).

3) Generación de estrés oxidante (Osornio-Vargas *et al.*, 2003; Sánchez-Pérez *et al.*, 2009; Donaldson *et al.*, 2003). Diversos componentes de las PM (metales, endotoxinas y componentes orgánicos) pueden generar un estrés oxidante a través de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) como el radical anión superóxido (O_2^-) o el radical hidroxilo ($OH\cdot$) o bien compuestos como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Donaldson *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 2003) que pueden dañar a macromoléculas como los lípidos, las proteínas y el DNA (De Vizcaya-Ruiz *et al.*, 2006; García-Cuellar *et al.*, 2002; Sánchez-Pérez *et al.*, 2009).

4) Reducción y/o daño de los mecanismos de defensa antioxidante (Chirino *et al.*, 2010, Sánchez-Pérez *et al.*, 2009).

5) Daños a nivel genético (García-Cuellar *et al.*, 2002) y epigenético (Gilmour *et al.*, 2002), que pueden traer consigo cambios en la expresión de algunos genes.

6) Generación de procesos inflamatorios (Donaldson *et al.*, 2003; Mazzoli-Rocha *et al.*, 2010), a través de la producción de varias citocinas proinflamatorias tales como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-8 (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009, Osornio-Vargas *et al.*, 2003), las cuales pueden inducir la producción de otras citocinas responsables del reclutamiento de células inflamatorias hacia el sitio de deposición de las PM. De este modo, estos mecanismos pueden incrementar la inflamación pulmonar.

Sin embargo, los efectos adversos de las PM no están confinados sólo a los pulmones, sino también tienen efectos extrapulmonares. Estos efectos sistémicos pueden deberse a la diseminación de moléculas de inflamación producidas en los pulmones, o bien a la disociación y translocación de algunos de los componentes de las PM como las partículas de diesel, metales de transición o partículas ultrafinas hacia la circulación sanguínea (Furuyama *et al.*, 2009; Nemmar *et al.*, 2001; 2002; 2004).

A nivel sistémico, el sistema cardiovascular es uno de los más afectados por las PM. En varios reportes se indica que la exposición a PM₁₀ y PM_{2.5} está asociada con morbilidad y mortalidad cardiovascular (Delfino *et al.*, 2005, Pope III, 2004); no obstante, los mecanismos por los cuales las PM inducen episodios cardiovasculares adversos aún no son claros y por tanto es un área de activa investigación. Algunos estudios muestran que las PM median ECV a través de efectos producidos sobre la coagulación y la viscosidad de la sangre (Baccarelli *et al.*, 2007), aumento de la presión sanguínea (Nurkiewicz *et al.*, 2006) y alteraciones en la variabilidad del ritmo cardíaco (Lippmann *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 1997); estos efectos aumentan el riesgo de sufrir apoplejías e infarto al miocardio. Sin embargo, otros autores proponen que la principal vía mediante la cual las PM pueden contribuir a incrementar las ECV es a través de la progresión y aceleración de la aterosclerosis (Araujo *et al.*, 2008; Chen & Nadziejko, 2005; Sun *et al.*, 2005; 2008; Suwa *et al.*, 2002). Enfermedad en la que las lipoproteínas juegan un papel clave. La figura 2 esquematiza algunos de los mecanismos de daño de las PM.

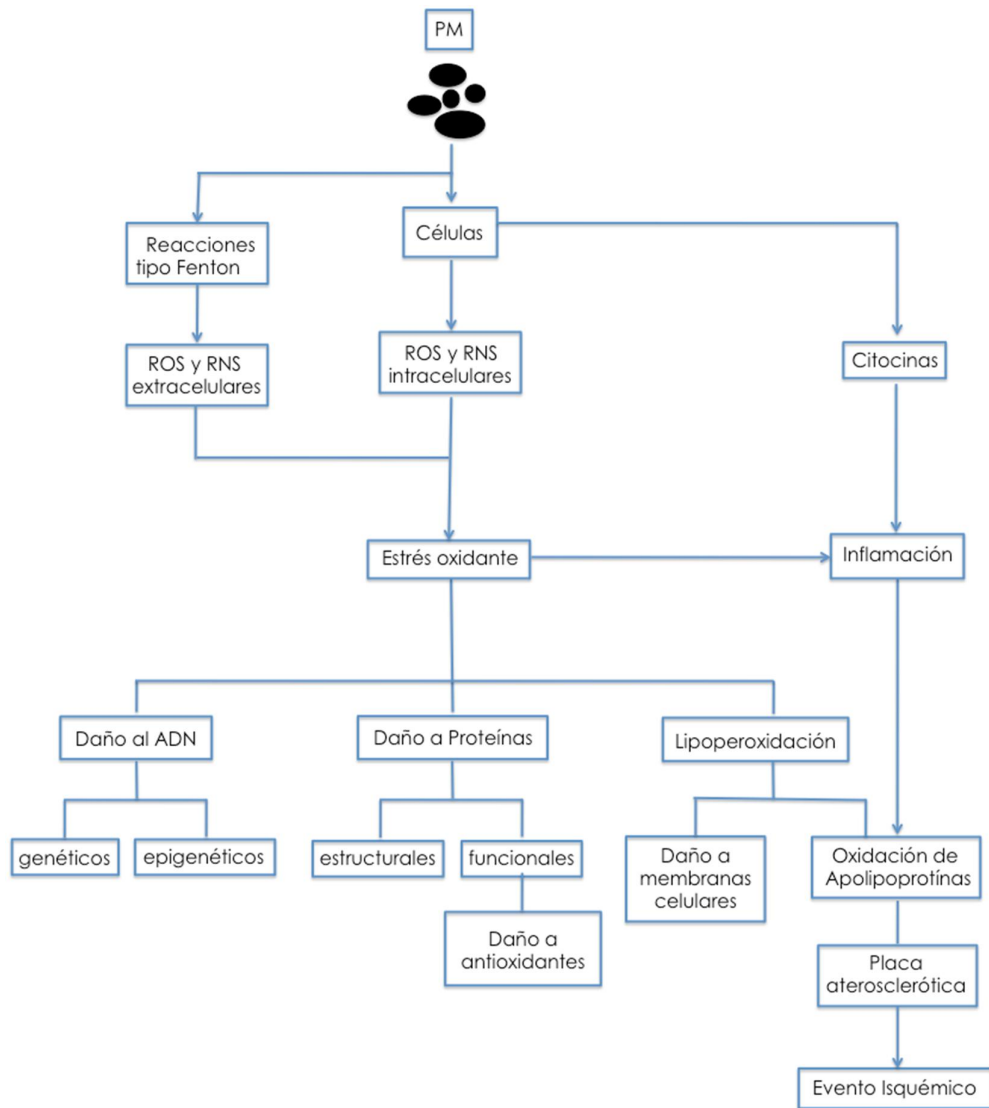


Figura 2. Diagrama que muestra algunos mecanismos mediante los cuales las PM ejercen sus efectos dañinos sobre la salud.

1.3 Lipoproteínas

Las lipoproteínas son transportadores macromoleculares solubles en agua que incorporan a miles de moléculas lipídicas en su interior. La estructura general de las lipoproteínas consiste en una monocapa constituida principalmente de fosfolípidos, una o varias proteínas conocidas como apolipoproteínas y colesterol no esterificado que rodean a un centro hidrofóbico compuesto principalmente de triglicéridos y ésteres de colesterol (Mahley *et al.*, 1984). En la figura 4, se representa un modelo general de la estructura de las lipoproteínas, en especial de las LDL. La función principal

de las lipoproteínas es transportar en el plasma sanguíneo lípidos insolubles en agua, como los ésteres de colesterol, los triacilglicérol; desde el tejido de origen hasta los tejidos en donde serán almacenados o consumidos.

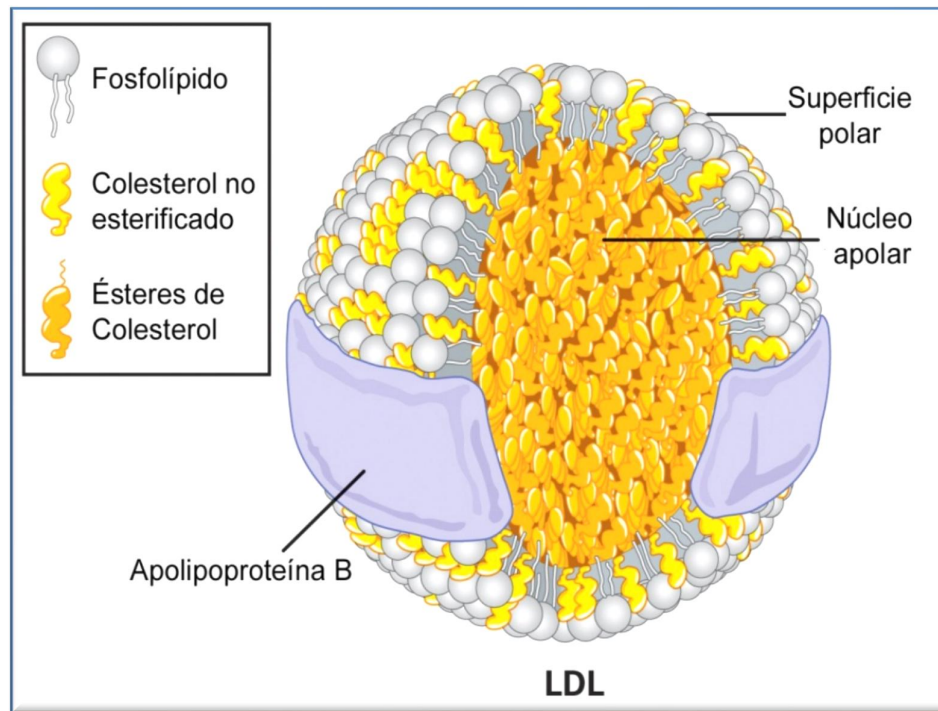


Figura 4. Modelo de Lipoproteína de Baja Densidad (LDL). Conformada por: (1) una cubierta anfipática constituida por una monocapa fosfolipídica, colesterol no esterificado y proteínas, y (2) un núcleo hidrófobo constituido por ésteres de colesterol y triglicéridos. *Tomado de Lodish et al., 2009.*

Existen diversas lipoproteínas plasmáticas que varían en cuanto a su tamaño, composición y función. Estas variaciones en las lipoproteínas se deben principalmente al intercambio de componentes que ocurre entre ellas, con el fin de mantener un equilibrio entre la movilización y el almacenaje de lípidos (Schittmayer & Birner-Gruenberger, 2009). Este intercambio ocurre mientras las diferentes lipoproteínas circulan en la sangre, y son la principal causa de que existan 6 diferentes clases de lipoproteínas, las cuales se han dividido y nombrado de acuerdo con su densidad en: Quilomicrones, Remanentes de Quilomicrones (CRs), VLDL (Lipoproteínas de Muy Baja Densidad), IDL (Lipoproteínas de Densidad Intermedia), LDL (Lipoproteínas de Baja Densidad) y HDL (Lipoproteínas de Alta Densidad) (Mahley et al., 1984). Las características principales de estas lipoproteínas se resumen en el siguiente cuadro.

Lipoproteína Propiedades	Quilomicrón	VLDL	LDL	HDL
Densidad (g/mL)	1.006	0.95-1.006	1.006-1.063	1.063-1.210
Diámetro (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
Proteína (% masa)	2	10	23	55
Fosfolípidos (% masa)	9	18	20	24
Colesterol libre (% masa)	1	7	8	2
Ésteres de colesterol (% masa)	3	12	37	15
Triacilgliceroles (% masa)	85	50	10	4
Principales apolipoproteínas	A, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100	A, C
Principal función fisiológica	Transporte de triglicéridos (Tg) dietarios desde el intestino a los tejidos extrahepáticos (p. ej. Músculo, tejido adiposo).	Transporte de Tg hepáticos hacia los tejidos extrahepáticos.	Transporte del colesterol plasmático al hígado y a los tejidos extrahepáticos	Incorpora el colesterol de los tejidos extrahepáticos y los transporta al hígado y a los tejidos productores de esteroides, así como a otras lipoproteínas

Cuadro 1. Principales Lipoproteínas plasmáticas humanas y algunas de sus propiedades. Se resaltan las LDL y sus propiedades, ya que son de gran interés para este trabajo.

La heterogeneidad de las lipoproteínas no sólo radica en sus características sino también en su papel protector o inductor del desarrollo de ECV. Por ejemplo, las HDL promueven una buena salud vascular, porque movilizan el colesterol de los tejidos e inclusive el de las placas ateroscleróticas, y lo llevan de regreso al hígado en donde es eliminado a través de las sales biliares. Por el contrario, las LDL se consideran antagonistas del sistema circulatorio, debido a que son propensas a unirse y acumularse en la capa íntima de las arterias, en donde pueden desencadenar procesos ateroscleróticos. Estos procesos son el motivo principal por el cual se les estigmatiza como colesterol bueno a las HDL y colesterol malo a las LDL (Daniels *et al.*, 2009).

Se sabe que las altas concentraciones plasmáticas de LDL son un factor de riesgo para la aterogénesis (Kannel *et al.*, 1971); pues, pueden generar daño en el endotelio de las paredes arteriales modificando su permeabilidad y permitiendo la migración de estas lipoproteínas hacia la capa íntima de las arterias (Rader & Puré, 2005). Una vez en la íntima, las LDL son retenidas gracias a la estrecha relación de la apolipoproteína B-100 de las LDL con los proteoglicanos de la matriz extracelular de las células de la pared arterial (Aviram & Fuhrman, 1998). El depósito y retención de LDL en las paredes arteriales, las hace susceptibles de sufrir modificaciones mediante mecanismos tanto enzimáticos como no enzimáticos tales como la autoagregación, formación de complejos inmunes, glicosilación, hidrólisis y oxidación (Young & McEneny, 2001). De todas estas modificaciones, se enfoca un mayor interés en la oxidación de LDL; pues las LDL-ox poseen muchas características pro-aterogénicas (Stocker & Kearney, 2004).

Las LDL-ox se consideran altamente aterogénicas porque: 1) son citotóxicas, lo que lleva a la pérdida de la integridad endotelial, 2) ayudan en el reclutamiento de monocitos circulantes hacia el espacio subendotelial, 3) pueden inducir la expresión de RS en los macrófagos, y por tanto conducir a la formación de células espumosas, 4) inducen la síntesis de factores quimioatrayentes como el MCP-1 (Proteína-1 Quimioatrayente de Monocitos) tanto en células de músculo liso como en células endoteliales, 5) por sí mismas pueden funcionar como quimioatrayentes para monocitos y linfocitos, 6) inhiben la habilidad de los Mø de movilizarse de la íntima, 7) activan la síntesis de enzimas degradadoras de matriz, lo cual puede jugar un papel clave en la inestabilidad de la placa. (Aviram & Fuhrman, 1998; Moore & Freeman, 2006; Young & McEneny, 2001).

En condiciones normales, las células adquieren el colesterol y otros triglicéridos a partir de las lipoproteínas, principalmente LDL, a través del Receptor de LDL (R-LDL). Este receptor une LDL por medio de la ApoB-100 con una alta afinidad. La unión de la LDL a su receptor inicia la endocitosis del complejo ligando-receptor hacia un endosoma en el interior de la célula. Este endosoma se fusiona con un lisosoma, en donde se hidrolizan los ésteres

de colesterol, liberando ácidos grasos y colesterol útiles para ciertos procesos como: síntesis de membranas plasmáticas o de hormonas esteroideas o bien se almacena en forma de gotas de ésteres de colesterol citoplasmático. En los lisosomas, también ocurre la degradación de la apoB-100 hacia aminoácidos, mientras el R-LDL es reciclado y vuelve a la superficie celular para seguir participando en la captación de LDL. Cuando la captación de colesterol es suficiente para cubrir las necesidades metabólicas de la célula, el proceso de endocitosis mediada por el R-LDL se regula por retroalimentación negativa, de esta manera disminuye la síntesis de estos receptores y se evita la acumulación excesiva de colesterol dentro de las células (Brown & Goldstein, 1986; Goldstein *et al.*, 1979) (Figura 5).

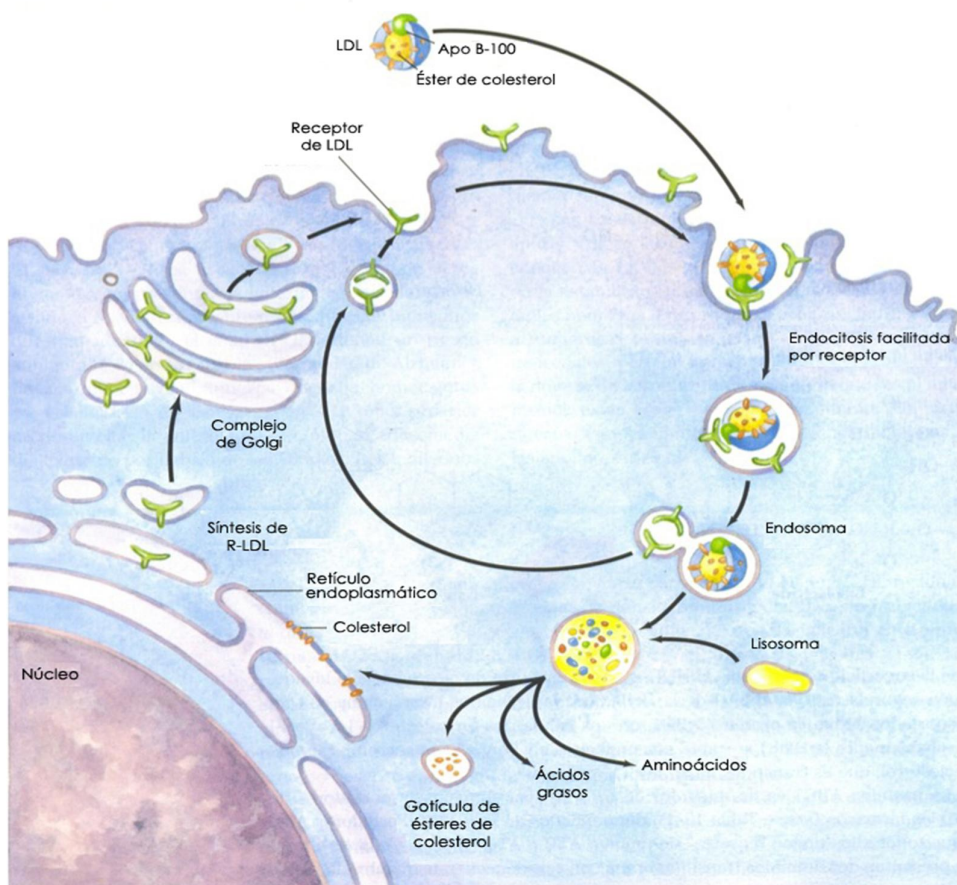


Figura 5. Mecanismo de endocitosis del colesterol mediado a través del Receptor (R-LDL). Tomado de Nelson *et al.*, 2001.

Ahora bien, si las LDL han sufrido alguna modificación, estas ya no son reconocidas por el R-LDL, sino por los Receptores Scavenger (RS). Las LDL se convierten en sustrato de los RS a través de la peroxidación lipídica de sus

ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's por sus siglas en inglés), pero principalmente por las modificaciones en las lisinas de la apolipoproteína B-100, que incrementan la carga negativa de la lipoproteína (Zhang *et al.*, 1993), convirtiéndola en una LDL-ox.

1.4 Receptor Scavenger (RS)

Los RS pertenecen a una compleja familia de receptores de membrana, conformada por 8 diferentes clases (A-H) (Moore & Freeman, 2006). Estos receptores no están relacionados estructuralmente, pero comparten la afinidad por una gran variedad de ligandos entre los cuales podemos mencionar polisacáridos como el dextrán sulfato y la fucoidina, fosfolípidos aniónicos, lipoproteínas modificadas, células apoptóticas, péptido β -amiloide, algunos componentes de organismos patógenos, aeropartículas contaminantes y otros tóxicos (Murphy *et al.*, 2005; Zingg *et al.*, 2000). Debido a la variedad de ligandos, los RS están implicados en diversos procesos como la limpieza de células apoptóticas y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, además participan en la inmunidad innata en contra de patógenos, así como en el metabolismo de las lipoproteínas (Moore & Freeman, 2006).

A pesar de que existen varias clases de RS, sólo algunos de ellos son los que reconocen LDL-ox, y además se han detectado en las placas ateroscleróticas: RSA-I, RSA-II, RS-BI, CD36, CD68 y LOX-1 (Terpstra *et al.*, 1999; Greaves & Gordon, 2005; 2009); no obstante, no se conoce con exactitud la función de cada uno de estos RS en los procesos ateroscleróticos. Destacan en importancia los RS clase A (RS-A) tipo I y II, debido a que están directamente involucrados en el desarrollo de células espumosas, al tener como principal ligando a las LDL-ox (Suzuki *et al.*, 1997; Aguilar-Gaytán & Mas-Oliva, 2004) (Figura 6).

Los RS los encontramos principalmente en los M ϕ y células macrofágicas especializadas, como en las células dendríticas y células de Kupffer. Sin embargo, otras células como las células endoteliales, las células de músculo

liso aórtico, células neuronales y queratinocitos también expresan RS. Pero, sólo los Mø y las células de músculo liso pueden desarrollar un fenotipo de célula espumosa.

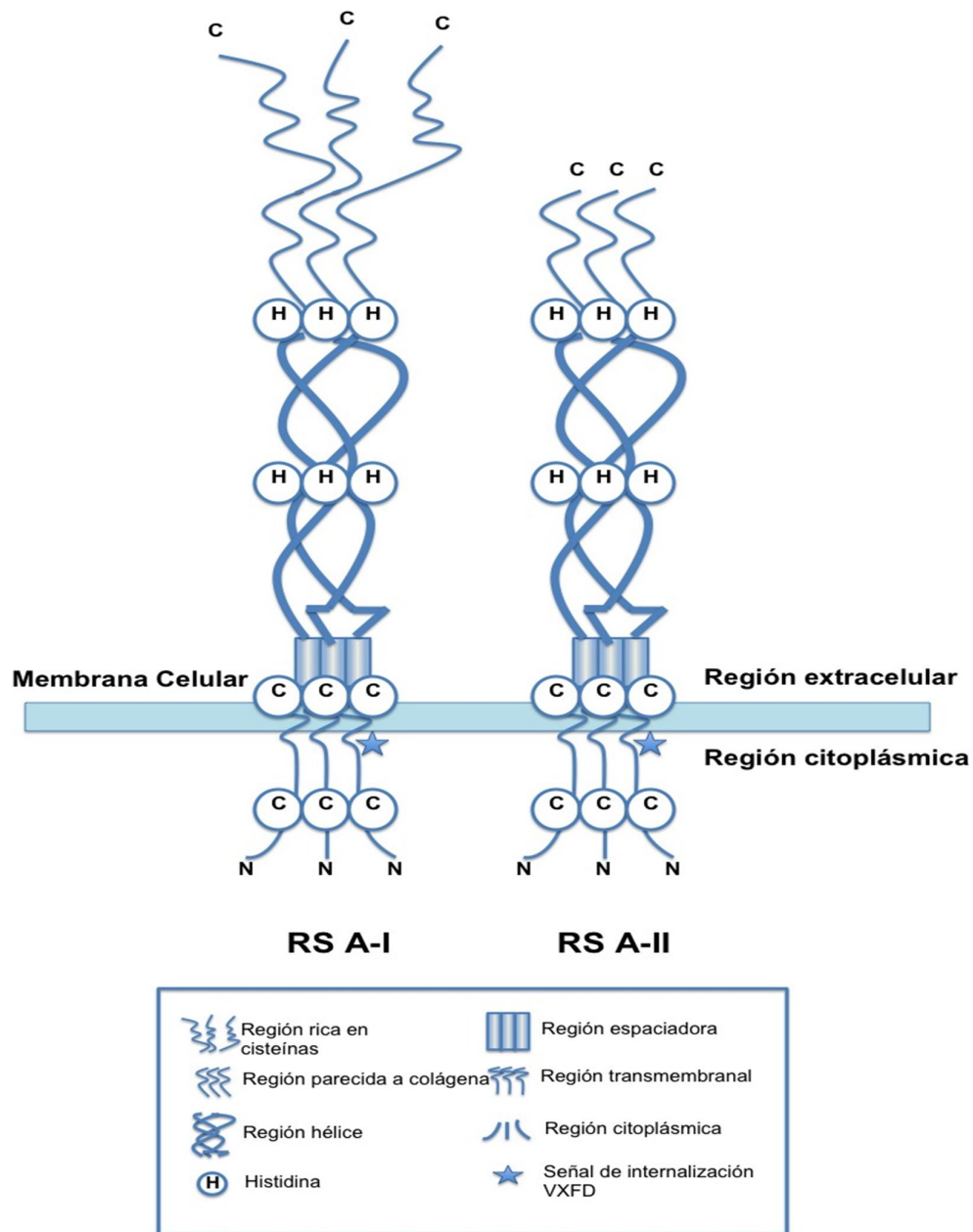


Figura 6. Los RS A tipo I y tipo II, tienen entre sus principales ligandos a las LDL-ox, y son de importancia relevante en los procesos ateroscleróticos, porque están involucrados en el desarrollo de células espumosas. Tomado de Aguilar-Gaytán & Mas-Oliva, 2002.

1.5 Macrófagos (Mø)

Los macrófagos (Mø) son células del sistema inmune, por lo que participan en la inmunidad innata en contra de patógenos y agentes extraños, motivo por el cual a estas células se les considera como la primera línea de defensa de nuestro organismo. Por ejemplo, cuando llegan agentes patógenos y/o tóxicos ambientales como las aeropartículas (PM) a los pulmones, los Mø alveolares remueven o destruyen estos agentes extraños a través de sus RS (Obot *et al.*, 2002).

Estas células son consideradas clave dentro del proceso de la aterogénesis, pues son el principal componente celular de las lesiones ateroscleróticas tempranas y avanzadas (Glass & Witztum, 2001). La importancia de estas células radica en su capacidad para acumular grandes cantidades de lípidos debido a su riqueza en receptores específicos para la captación de LDL modificadas, pues al menos expresan 6 diferentes tipos de RS que contribuyen a la aterogénesis (Greaves & Gordon, 2009). Esta captación de LDL modificadas por parte de los Mø no tiene un mecanismo de retro-inhibición, por tal razón estas células van acumulando de forma progresiva colesterol y otros lípidos que no pueden degradar, causando la conversión de los Mø hacia células espumosas.

La acumulación de lípidos en los Mø provoca la liberación de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que por un lado perpetúan la inflamación y la acumulación de lípidos, y por otro lado funcionan como factores quimioatrayentes de más células del sistema inmune. Aunado a esto, el colesterol acumulado dentro de los macrófagos es tóxico para las células, las cuales al morir liberan al medio extracelular el colesterol de su interior, así como radicales libres y diversas enzimas proteolíticas y lisosomales, que contribuyen a aumentar la lesión del endotelio y a la digestión de la matriz extracelular. Estos mecanismos favorecen la progresión de la aterosclerosis y aumentan la vulnerabilidad de la placa (Yatera *et al.*, 2008).

1.6 Aterosclerosis

La oxidación de LDL está relacionada con diversas enfermedades como la diabetes mellitus, síndromes antifosfolípidicos, lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide. Sin embargo, existe una mayor evidencia de que las LDL-ox están relacionadas de forma más estrecha con el desarrollo de la aterosclerosis (Levitan *et al.*, 2010; Queiroz Mello *et al.*, 2011).

La aterosclerosis es una enfermedad vascular cuya característica principal es el depósito y la retención de células, lípidos y otros residuos en la capa interna de la pared de una arteria (Moore & Freeman, 2006). La acumulación de estos elementos propicia el desarrollo de lesiones conocidas como placas de ateroma. La presencia de estas placas provoca de forma directa o por complicaciones trombóticas una disminución en el diámetro de las arterias, en consecuencia el flujo sanguíneo disminuye y se compromete el suplemento de oxígeno hacia órganos blanco, como el corazón y el cerebro (Stocker & Keaney, 2004). La pérdida de la función del corazón y del cerebro como resultado de un flujo sanguíneo reducido, se conoce como ataque al corazón y apoplejía respectivamente, y son sólo dos de las manifestaciones clínicas más comunes de la aterosclerosis.

La fisiopatología de la aterosclerosis es muy compleja. Hasta cierto punto, la complejidad de esta enfermedad es el resultado de la interacción de múltiples moléculas y diversos tipos celulares como macrófagos, células endoteliales y células de músculo liso, entre otras (Ramsey *et al.*, 2010). Aunado a esto, existen varios factores tanto ambientales (dieta, falta de ejercicio, tabaco, contaminación por PM, etc.) como genéticos (niveles de lipoproteínas, diabetes, etc.) o bien, la presencia de otras enfermedades como la obesidad y la hipertensión que predisponen a la enfermedad. Pero además se puede presentar la interacción entre dos o más de estos factores, complicando aún más esta enfermedad (Libby, 2002; Lusis, 2000; Ramsey *et al.*, 2010). Por otro lado, la complejidad también aumenta debido a que la aterosclerosis progresa a través de múltiples estados, desde estrías grasas tempranas hasta lesiones avanzadas que pueden desencadenar en la ruptura de la placa y complicaciones trombóticas (Libby, 2001) (Figura 3).

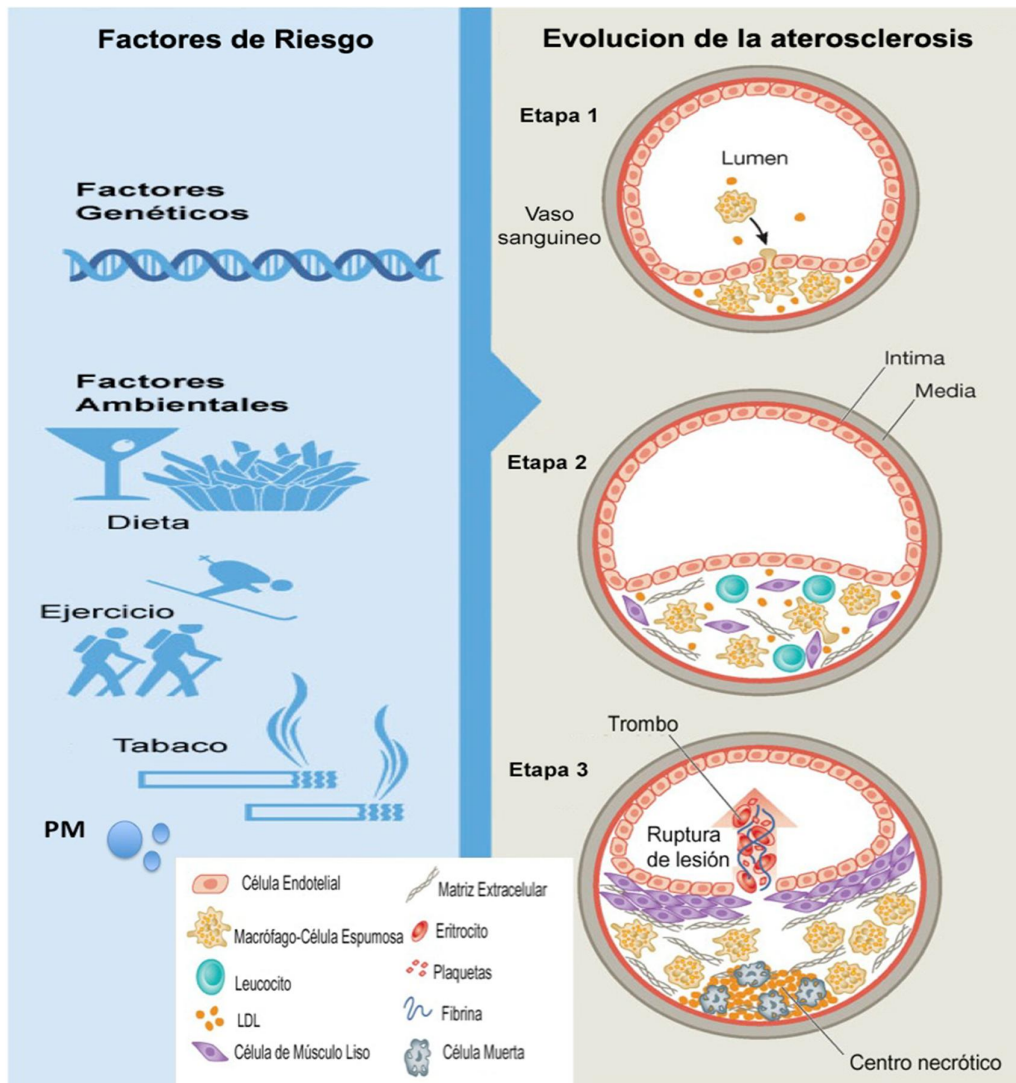


Figura 3. La fisiopatología de la aterosclerosis es muy compleja, involucra la interacción de varios tipos celulares, así como diferentes factores de riesgo que llevan al desarrollo y progresión de la enfermedad a través de diferentes etapas. *Adaptado de Ramsey et al., 2010.*

En la aterosclerosis, el primer cambio observable es la acumulación de lipoproteínas en íntima de las arterias, en donde sufren modificaciones oxidativas. Después de algunos días o semanas, se pueden observar monocitos adheridos a la superficie del endotelio, los cuales migran a través de la monocapa endotelial hacia la íntima, en donde proliferan y se diferencian a macrófagos ($M\phi$). Los $M\phi$ captan a las lipoproteínas oxidadas mediante sus RS (Suzuki *et al.*, 1997). Los $M\phi$ resultantes llenos de lípidos se denominan células espumosas. A medida que las células espumosas macrofágicas se acumulan en la íntima arterial, forman depósitos grasos

conocidos como estrías grasas, constituyendo así las primeras lesiones en el desarrollo de la aterosclerosis. Subsecuentemente, en estas lesiones se acumulan células de músculo liso que migran de la capa media y comienzan a secretar elementos fibrosos provocando un incremento en el tamaño de la placa aterosclerótica e impidiendo el flujo normal de la sangre. Con el tiempo las células espumosas mueren y su contenido rico en lípidos contribuye a formar un centro necrótico dentro de la lesión (Lusis, 2000) (Figura 3).

1.7 PM y aterosclerosis

Existen estudios tanto de tipo epidemiológico como toxicológicos que demuestran que la exposición a PM (PM₁₀, PM_{2.5} y PUF) impacta en las ECV a través del agravamiento de procesos ateroscleróticos. Este tipo de trabajos son importantes y necesarios para tratar de entender cómo las PM afectan al sistema cardiovascular.

En un estudio epidemiológico, Pope y colaboradores (2004) encontraron que la exposición a PM_{2.5} correlacionó con el desarrollo de ECV, así mismo hallaron que la aceleración de la aterosclerosis y la inflamación pulmonar y sistémica pueden ser algunos mecanismos factibles para explicar esta correlación. En otro estudio, también de tipo epidemiológico Künzli *et al.*, (2005) evaluaron el grosor de la capa íntima/media de la carótida de individuos constantemente expuestos a PM_{2.5} y encontraron una asociación positiva. En un estudio más reciente, Jacobs *et al.*, (2011) encontraron una relación entre la exposición crónica a PM y los niveles plasmáticos de LDL-ox, en pacientes diabéticos.

Asimismo, en algunos estudios toxicológicos con modelos animales se evidenció a las PM como un factor de riesgo para la progresión de la aterosclerosis. Suwa y colaboradores (2002) demostraron que al exponer a conejos Watanabe con hiperlipidemia heredable a PM₁₀, éstos desarrollaron lesiones ateroscleróticas más grandes y con un contenido mayor de lípidos en las arterias coronarias y la aorta, comparados con los conejos que no

fueron expuestos a PM₁₀. Además también mostraron que las PM₁₀ indujeron una respuesta inflamatoria de tipo sistémico.

En el 2005 Chen y Nadziejko expusieron a ratones ApoE ^{-/-} (genéticamente susceptibles al desarrollo de lesiones ateroscleróticas porque no poseen apolipoproteína E), de forma subcrónica a un Concentrado de Partículas Ambientales (CAP) PM_{2.5}. Los ratones expuestos mostraron un desarrollo más acelerado de las placas ateroscleróticas que fueron 57% más grandes que las de los animales no expuestos. Por otro lado, Sun y colaboradores en el también mostraron que ratones ApoE ^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasas y expuestos a CAP PM_{2.5}, desarrollaron lesiones ateroscleróticas 58% más grandes que los animales no expuestos.

Yatera *et al.* (2008) expusieron a conejos Watanabe a PM₁₀ y encontraron un aumento en el volumen de las lesiones ateroscleróticas de la aorta torácica y abdominal. Además demostraron que las PM₁₀ promueven el reclutamiento de monocitos circulantes hacia las placas ateroscleróticas, por lo tanto propusieron que este es un paso importante en la progresión de la aterosclerosis inducida por partículas.

Finalmente, también se han reportado efectos proaterogénicos por exposición a PUF. Araujo y colaboradores (2008), quienes trabajaron con ratones ApoE ^{-/-} expuestos tanto a PM_{2.5} como a PUF y demostraron que los ratones expuestos a estas últimas partículas manifestaron lesiones ateroscleróticas de forma más prematura en comparación con los ratones expuestos a PM_{2.5}. Además, las PUF también inhibieron la capacidad antiinflamatoria de las HDL plasmáticas, y produjeron un estrés oxidante sistémico mayor al producido por las PM_{2.5}.

Estos trabajos aportan evidencia de que las PM contribuyen al desarrollo y/o a la progresión de las lesiones ateroscleróticas. Sin embargo, el panorama de la aterosclerosis inducida por PM aún se encuentra muy limitado, por esta razón es importante esclarecer los mecanismos moleculares y celulares por los cuales las PM contribuyen con los procesos ateroscleróticos.

2. JUSTIFICACIÓN

Los habitantes de la Ciudad de México, al igual que los habitantes de muchas de las grandes ciudades, nos encontramos constantemente expuestos a la contaminación atmosférica por aeropartículas (PM) sin saber cómo pueden estar afectando nuestra salud. Varios estudios han demostrado que las PM afectan principalmente al sistema cardiovascular; sin embargo, aun no está completamente claro como las PM inducen episodios cardiovasculares adversos.

La propuesta actual indica que los efectos de las PM en la salud, podrían estar mediados por el potencial pro-oxidante de estas partículas. Por ello, en el presente estudio nos centramos en esta característica de las PM, para proponer algunos mecanismos celulares plausibles como la oxidación de lipoproteínas, que pudieran dar sustento biológico a las relaciones en las que asocian incrementos en las enfermedades cardiovasculares con las altas concentraciones de PM.

3. HIPÓTESIS

1. Las PM presentan un gran potencial oxidante, por lo tanto serán capaces de oxidar a las LDL.
2. Las LDL-ox por PM podrán ser reconocidas, unidas e internalizadas por RS.
3. La unión e internalización de LDL-ox-PM a través del RS, se espera que sea mayor en células que sobreexpresan RS, en comparación con células que expresan RS de forma natural.
4. Asimismo, las PM podrían impedir el reconocimiento de ligandos por parte de receptores celulares, por lo tanto se espera que los procesos de unión/internalización de lipoproteínas se vean afectados ante la presencia de PM.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Explorar si las PM pueden oxidar Lipoproteínas de Baja Densidad *in vitro*, haciéndolas susceptibles de ser unidas e internalizadas por los macrófagos a través de los Receptores Scavenger (RS), así como evaluar los efectos de las PM en la funcionalidad de algunos otros receptores celulares.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Explorar el potencial oxidante de las PM sobre las LDL.
2. Evaluar la unión y la internalización de LDL oxidadas por la exposición a PM, a través de los RS.
3. Determinar si se establece una competencia entre las LDL-ox y las PM por el RS, dado que ambos son ligandos de este receptor.
4. Determinar si las PM pueden bloquear e interferir en el reconocimiento de ligandos de otros receptores celulares (R-LDL).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Obtención de PM

Las PM fueron colectadas en la zona Norte de la Ciudad de México, por medio de colectores de partículas de alto volumen (GMW Modelo 1200, Sierra Adersen, Smyrna, GA, USA), empleando membranas de nitrocelulosa con poro nominal de 3 μm (Sartorius Goettingen, Germany). Los muestreos se hicieron durante periodos de 24 horas con un flujo de aire de 1.13 m^3/min ; 3 veces por semana de noviembre del 2004 - abril del 2005.

Las partículas se desprendieron de las membranas mediante un barrido suave con ayuda de un bisturí, siguiendo la técnica descrita por Alfaro-Moreno *et al.*, (2009). Todas las muestras se guardaron en viales libres de endotoxinas, se cubrieron de la luz y se mantuvieron a 4°C en un desecador hasta su uso.

Las muestras de PM se esterilizaron antes de cada experimento y se resuspendieron en medio de cultivo inmediatamente antes de realizar los experimentos.

5.2 Aislamiento de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL)

Las LDL se aislaron a partir de plasma humano, obtenido de donadores sanos y previamente tipificados negativamente para VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana), Sífilis, Brucella, HBsAg (Antígenos de superficie de la Hepatitis B), VCH (Anticuerpos contra la Hepatitis C) y Chagas. Los paquetes de plasma fueron donados por el Dr. José Gutiérrez Salinas del Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE.

El aislamiento de LDL ($\delta=1.019 - 1.063 \text{ g/ml}$) se llevó a cabo mediante el método de ultracentrifugación secuencial utilizando diferentes gradientes de densidad hasta alcanzar una densidad final de 1.063 g/ml ; para ello se siguió

la técnica descrita por Chung *et al.* (1986) y modificada por Aguilar-Gaytán & Mas-Oliva (2003) y que a continuación se describe.

Cada paquete de plasma (~180 ml) se mezcló lentamente con benzamidina (0.01%), inhibidor de tripsina (0.01%), DTNB (1.5 mM), PMSF (1mM) y 1 ampolleta de Gentamicina (80 mg/ml). Posteriormente se adicionó bromuro de potasio (KBr) para ajustar la densidad del plasma.

Los gramos de Bromuro de Potasio (KBr) utilizados para cada uno de los ajustes de la densidad del plasma, se calcularon con base en la siguiente fórmula:

$$\text{g de KBr} = (\text{volumen de plasma}) (\text{factor de conversión de la } \delta)$$

Así, los gramos de KBr para llevar a cabo el primer ajuste de la densidad del plasma de 1.006 g/ml (densidad inicial del plasma) a 1.019 g/ml fueron calculados de la siguiente manera:

$$\text{g de KBr} = (\text{volumen de plasma inicial})(0.01906)$$

Esta mezcla se agitó de manera constante durante 1 h a 4°C y se colocó en tubos QuickSeal de 39 ml (Beckman) los cuales se sellaron con calor, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Utilizando una ultracentrifuga (Beckman, modelo XL-90) y un rotor 70 Ti (Beckman), se llevó a cabo la primera centrifugación a una velocidad de 49 000 rpm a 4°C durante 20 h.

Al finalizar la centrifugación se observaron dos fases: la fracción superior que correspondió a las IDL y a las VLDL; y la inferior contuvo a las LDL y a las HDL. Los tubos fueron cortados con un cortador de tubos (Tube Slicer L.TB-01C, Beckman) para separar ambas fracciones. Se descartó la parte superior y la inferior se ajustó a una densidad de 1.05 g/ml con KBr, en donde:

$$\text{g de KBr} = (\text{volumen de plasma con densidad de } 1.019\text{g/ml})(0.0436)$$

El plasma y el KBr se mezclaron en agitación constante a 4°C durante 1 h. La mezcla se colocó en tubos QuickSeal y se llevó a cabo la segunda centrifugación durante 24 h, bajo las mismas condiciones. Se obtuvieron nuevamente dos fracciones: la superior que contenía a las LDL y la inferior correspondiente a las HDL. Se descartó la fracción inferior, mientras que a la fracción superior se le ajustó nuevamente la densidad con KBr a 1.063 g/ml, en donde:

$$\text{g de KBr} = (\text{volumen de plasma con densidad de } 1.05\text{g/ml})(0.034)$$

El plasma y el KBr se mezclaron en agitación constante a 4° durante 1 h y se colocaron en los tubos QuickSeal. Se llevó a cabo la tercera centrifugación durante 18 h, bajo las mismas condiciones. Se recuperó la fracción superior que contenía a las LDL ($\delta = 1.063 \text{ g/ml}$) y se dializó en una membrana tubular de celulosa (Cellu Sep T1) en un volumen total de 10 litros de amortiguador de diálisis (NaCl 150 mM–EDTA 0.24 mM) durante 48 h, haciendo un cambio del amortiguador a las 24 h. Posteriormente, las LDL se dializaron en 10 litros de PBS para quitar todas las sales que pudieran contener, entre ellas el EDTA, un antioxidante. Después de las diálisis, las LDL se filtraron a través de un filtro de 0.45 μm (Millipore) y se cuantificó la cantidad de proteína LDL por medio del método del ácido bicinconínico. Las LDL se guardaron a 4°C hasta su uso.

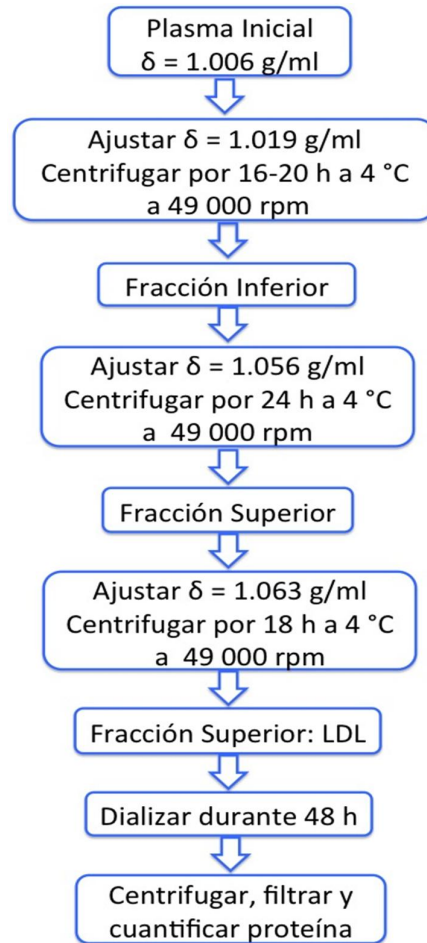


Figura 7. Diagrama de aislamiento de lipoproteínas LDL a través del método de centrifugación diferencial.

5.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

Para verificar que las lipoproteínas obtenidas por medio de la técnica de ultracentrifugación diferencial correspondieran a la fracción de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL), se observó una muestra en un Microscopio Electrónico de Transmisión (MET), para determinar si su diámetro oscilaba entre 18-25nm, diámetro característico de las LDL.

Para ello, se preparó una dilución 1:1000 de la muestra de LDL en NaCl-EDTA, que fue teñida con acetato de uranilo al 2% (Tinción negativa) y observada con un Microscopio Electrónico de Transmisión JEM-1200 EX II JEOL a 70 kV, con un aumento de 60 000 X.

5.4 Marcaje de LDL con Dil

Las LDLs se marcaron con el colorante fluorescente Dil (1,1'-dioctadecil-3, 3, 3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato), siguiendo la metodología de Innerarity, et al. (1986) y que a continuación se describe.

Se reajustó la concentración inicial de las muestras de LDL a una concentración de 2 mg de proteína LDL/ml, para ello se utilizó una solución de NaCl 0.15M – EDTA 0.01%.

Posteriormente se adicionaron 2 ml de NaCl 0.15M – EDTA 0.01% por cada mg de proteína LDL y se agregaron 150 μ L de Dil por cada mg de proteína, el cual se encontraba diluido en DMSO a una concentración de 3mg/ml. Esta mezcla se dejó incubando 20 h a 37°C en agitación constante.

Después de este tiempo, la muestra se filtró con un filtro (Millipore) de 5 μ m. Se ajustó la densidad a 1.063g/ml agregando 0.0834 g de KBr por cada ml de solución, y se dejó agitando 1h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla se colocó en tubos de policarbonato (Beckman) de 3 ml y se centrifugó a 4°C a una velocidad de 49 000 rpm durante 18 h utilizando una ultracentrífuga (Beckman, modelo TLX) y un rotor 50 Ti (TLA100.4).

Después de la centrifugación se recuperó una capa de aspecto aceitoso color rosa, formada en la parte superior de los tubos y que correspondía a las LDL marcadas. Esta muestra se dializó en una membrana tubular T1 (Cellu Sep) durante 24 h a 4°C en 4 litros del amortiguador de diálisis (NaCl 0.15 M – EDTA 0.01%) y posteriormente se hizo una última diálisis en 4 litros de PBS durante 24h para remover el exceso de sales y el EDTA.

La muestra obtenida se filtró con un filtro (Millipore) de 0.45 μ m y se cuantificó. Las LDL-Dil se guardaron a 4°C protegidas de la luz hasta su uso.

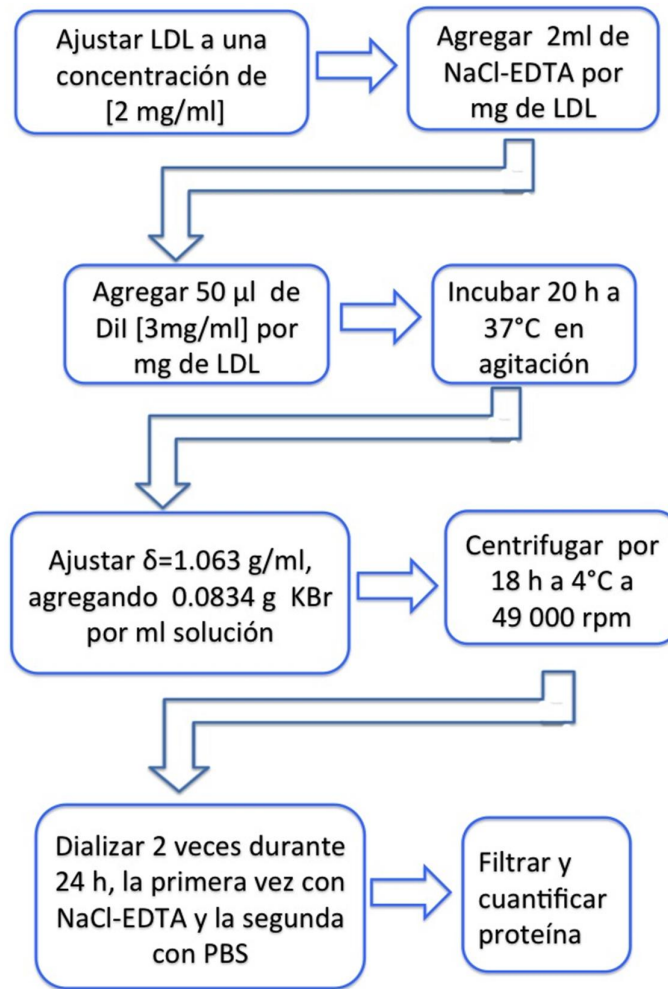


Figura 8. Diagrama del marcaje de LDL con el colorante fluorescente Dil (1,1'-dioctadecil-3, 3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato).

5.5 Cuantificación de Proteína LDL

La cuantificación de la concentración de proteína LDL contenida en cada una de las muestras de LDL se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinconónico (BCA).

Este método es una técnica colorimétrica que utiliza el BCA para la detección del Cu^{+1} , el cual se forma cuando el Cu^{+2} es reducido al unirse a las uniones peptídicas de las proteínas presentes en un ambiente alcalino. El producto de esta reacción genera una coloración púrpura que se forma por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso (Cu^{+1}). Este

complejo exhibe una fuerte absorbanza a 562 nm la cual es lineal con el incremento de las concentraciones de proteína (Smith PK, *et al.* 1985).

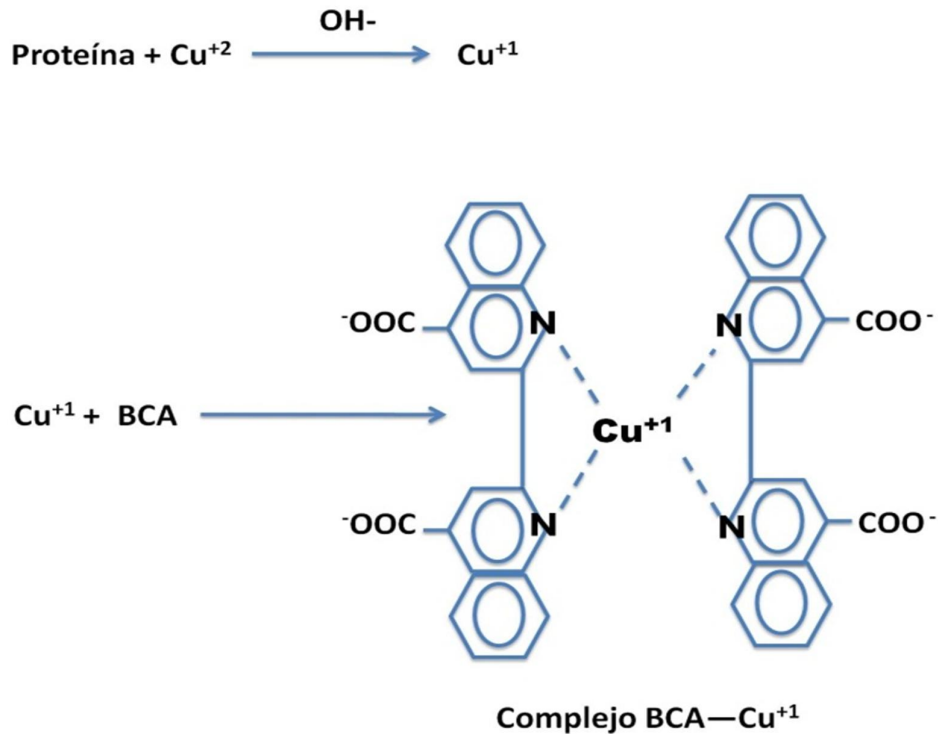


Figura 9. Formación de complejo púrpura con BCA y el ion cuproso generado de la reacción de biuret. Tomado de Smith et al., 1985.

Por este método se cuantificaron las LDL-nat inmediatamente después de que fueron obtenidas por ultracentrifugación, las LDL marcadas con el Dil (LDL-Dil), así como las LDL una vez que fueron oxidadas con PM y con H₂O₂ (LDL-ox).

5.6 Oxidación de LDL por exposición a PM

La oxidación de LDL se llevó a cabo incubando a las LDL con diferentes concentraciones de PM₁₀ (0, 20, 40, 80 µg de PM₁₀/mg de proteína LDL), se usó un control negativo del experimento (LDL sin ningún tratamiento) y un control positivo (LDL expuestas a 1mM de H₂O₂). Todos los tratamientos fueron incubados durante 24 h a 37°C, en agitación constante.

La oxidación de LDL fue evaluada por el método del Ácido Tiobarbitúrico (TBA), usando un kit disponible comercialmente (Northwest, Vancouver, WA). Esta técnica permite cuantificar la peroxidación de lípidos al medir la concentración de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS); en específico medimos la concentración de malonaldehído (MDA), un producto secundario de la oxidación de lípidos.

El fundamento de la técnica de TBARS es hacer reaccionar la muestra a analizar con ácido tiobarbitúrico en un medio ácido. En este caso, el MDA reacciona con el TBA, formando un complejo TBA-MDA, un cromógeno que absorbe a 532 nm. La concentración de MDA es proporcional a la absorción (Halliwell & Chirico, 1993).

Para esta técnica se tomaron 80 μ l de cada muestra y se le agregaron 250 μ l de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.4% y 250 μ l ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Las muestras se calentaron a 100°C durante 20 minutos y posteriormente se centrifugaron. Los sobrenadantes se leyeron en un lector de placas (Genios plus Tecan Trading AG, Switzerland) a una longitud de onda de 532 nm. Las concentraciones de MDA se determinaron con base en una curva estándar de MDA que se hizo en cada uno de los experimentos. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y se representan como nanomolas de MDA/mg de proteína.

5.7 Formación de complejos PM-LDL

Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar la posible formación de complejos entre LDL y PM, los cuales pudieran interferir en las evaluaciones hechas en el citómetro de flujo, descritos más adelante. Para estos experimentos se incubaron LDL-nat ó LDL-ox-PM marcadas fluorescentemente, con PM₁₀. Las suspensiones contenían 20 μ g/ml de lipoproteínas y 40 μ g/cm² (equivalentes a 80 μ g/ml) de partículas, resuspendidas en PBS. Las muestras se incubaron 4 h a 4 y 37°C, y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se determinó la fluorescencia del sobrenadante que contenía a las LDL-Dil-nat o a las LDL-Dil-ox-PM, así

como la del botón previamente resuspendido en PBS, con el fin de detectar a las lipoproteínas que pudieron haber quedado adheridas a las PM. Las muestras fueron analizadas con un lector de placas (Genios plus Tecan Trading AG, Switzerland) a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de detección de 580 nm.

5.8 Cultivos Celulares

- **Línea Celular RAW 264.7**

La línea celular RAW 264.7, monocitos/macrófagos de ratón (*Mus musculus*), se obtuvo de la ATCC (American Type Culture Collection). Estas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y con penicilina (50 U/ml)/estreptomicina (50 µg/ml)/fungizona (0.25 µg/ml). Se mantuvieron a 37 °C, en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂.

- **Línea Celular CHO**

La línea celular CHO son Células de Ovario de Hámster Chino, obtenidas de la ATCC. Esta línea celular se usó como control negativo, dado que no expresan el gen del RS-AI. Las células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's)/ F-12 (Nutriment Mixture F-12) (50/50, v/v), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y se usaron como antibióticos penicilina (50U/ml)/estreptomicina (50 µg/ml) y fungizona (0.25 µg/ml). Se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera con 95% de aire y 5% de CO₂.

- **Línea Celular CHO-RS**

La línea celular CHO-RS son Células de Ovario de Hámster Chino transfectadas de forma estable con el gen del RS-AI bovino, por lo que se usaron como control positivo. La línea celular provino del laboratorio del Dr. Mas del IFC, UNAM, a quien le fueron donadas por el Dr. Robert Pitas del Instituto Gladstone de Enfermedades Cardiovasculares en San Francisco, California, EUA. Estas células se cultivaron de la misma forma que las células

CHO, pero usando geneticina (500µg/ml) como antibiótico, ya que son resistentes a dicho antibiótico y fungizona (0.25 µg/ml). Esto se realizó con el fin de evitar el crecimiento de las células CHO en los cultivos de CHO-RS.

5.9 Viabilidad Celular

Estos ensayos se hicieron para evaluar la viabilidad de las células expuestas a las mismas condiciones en las que se realizaron los experimentos de unión e internalización de LDL-ox; así como los de competencia, descritos más adelante y cuyas concentraciones tanto de lipoproteínas (0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg de proteína LDL/ml), como de PM (40 µg/cm²) pudieran ser letales para las células.

La determinación de la viabilidad celular se llevó a cabo mediante la técnica de exclusión del colorante azul tripán (Sigma Chemicals). A cada 20 µl de células resuspendidas en PBS se les adicionó un volumen igual de la solución de azul tripán al 0.4%. Las células viables fueron contadas usando una cámara de Neubauer y un microscopio óptico. Se obtuvo el promedio de 3 mediciones independientes por cada alícuota de células.

5.10 Ensayos de Unión e Internalización de LDL-ox-PM a través de los RS

Para llevar a cabo los ensayos de unión e internalización de LDL-ox por PM, las LDL-Dil fueron oxidadas con 80 µg de PM₁₀/mg LDL durante 24 h a 37°C. Las LDL-ox-PM fueron re-cuantificadas por el método del BCA, antes de ser usadas para estos ensayos en las líneas celulares. Las líneas celulares se cultivaron en placas de 24 pozos (con un área de 2 cm² por pozo). Las células se incubaron a 37°C durante 1h en medio libre de SFB. Posteriormente se les adicionaron las siguientes concentraciones de LDL-ox-PM marcadas fluorescentemente: 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 µg de proteína LDL/ml. En paralelo, se realizaron experimentos utilizando las mismas concentraciones crecientes de LDL-Dil-ox-PM pero en presencia de un exceso (10X) de LDL nativas (LDL-nat) sin marca fluorescente, para evitar la internalización de LDL-Dil que no hubieran logrado oxidarse por las PM; así como un exceso (10X) de LDL-ox

por H₂O₂ con el fin de evitar las uniones inespecíficas de las LDL-Dil-ox por PM a otros receptores celulares. Las células con los ligandos respectivos se dejaron interaccionar durante 4 h a 4°C, para el caso de los ensayos de unión y a 37°C para los ensayos de internalización.

Transcurrido el periodo de incubación, las células fueron lavadas 5 veces con PBS-albúmina [2mg/ml], para remover el ligando no unido. Un último lavado fue realizado solo con PBS. Posteriormente, las células fueron removidas por medio de un barrido suave. Con la ayuda de un citómetro de flujo (Becton-Dickinson, NJ, USA), se evaluó la fluorescencia emitida por las LDL-Dil unidas e internalizadas por las células a través de los RS.

Para expresar los datos de unión e internalización específica, se calculó la diferencia entre los valores de fluorescencia total emitida por las células que unieron o internalizaron a las LDL-Dil a través de los RS (en ausencia de excesos de LDL) y la fluorescencia emitida por las células que unieron/internalizaron LDL-Dil en presencia de un exceso de lipoproteínas. Los datos finales fueron expresados en unidades relativas de fluorescencia, con el fin de homogenizar la variabilidad de la fluorescencia de las diferentes muestras, pues para cada una de las repeticiones de cada ensayo las LDL pertenecían al menos a 3 donadores diferentes.

5.11 Ensayos de Competencia entre LDL-ox-PM y PM por el RS

Los ensayos de competencia se llevaron a cabo de manera similar a los ensayos de unión e internalización; la diferencia radicó en que las células fueron incubadas con 20 µg/ml de LDL-Dil-ox por PM y además con 40 µg/cm² de PM durante 4 h a 4°C (unión) y a 37°C (internalización). Paralelamente se hicieron ensayos similares pero con un exceso 10X de LDL-nat sin marca y LDL-ox por H₂O₂ para evitar las uniones inespecíficas. La fluorescencia de las células que unieron o internalizaron a las LDL-Dil-ox por PM a través de los RS, se evaluó por citometría de flujo. Los valores de fluorescencia de las células en presencia de excesos de lipoproteínas se

restaron a los valores de fluorescencia total para obtener la fluorescencia real. Los datos finales se expresaron en unidades relativas de fluorescencia.

5.12 Ensayos para evaluar el efecto de las PM sobre el Receptor LDL (R-LDL)

Estos ensayos se hicieron para evaluar el posible efecto de las PM sobre la funcionalidad de otros receptores celulares, además de los RS. Para estos experimentos, se incubaron células RAW y CHO-RS con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-Dil-nat y con 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de PM durante 4 h a 4°C (unión) y a 37°C (internalización). Paralelamente se hicieron ensayos similares pero con un exceso 10X de LDL-nat y LDL-ox por H_2O_2 , ambas sin marca, para evitar las uniones inespecíficas. La fluorescencia emitida por las células que unieron o internalizaron a las LDL-Dil-nat a través de los R-LDL se evaluó por citometría de flujo de manera similar a lo descrito anteriormente.

5.13 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis descriptivo básico e inferencial basado en análisis de varianzas. Los ensayos de unión/internalización de LDL-ox se analizaron mediante un ANOVA factorial para evaluar el efecto de la concentración de LDL-ox y de la línea celular, así como la interacción entre ambos factores (concentración de LDL-ox*línea celular). Posterior a esto, se aplicaron pruebas de comparación múltiple (Prueba de Scheffe) para determinar los efectos de cada factor; o bien, contrastes ortogonales para hallar los efectos debidos a la interacción entre ambos factores.

Por otro lado, los ensayos de viabilidad celular se evaluaron con un ANOVA de una vía. Mientras que los ensayos de competencia se analizaron por medio de pruebas de t-student, en donde se compararon los resultados de unión e internalización de LDL-ox y LDL-nat en presencia de PM, con respecto a un control (unión/internalización de LDL-ox y LDL-nat sin PM). Cuando fue necesario, las variables fueron transformadas con el fin de homogenizar las varianzas. Los análisis se realizaron con el software SPSS 13.0 para Windows y

las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05.

La figura 10 resume las pruebas estadísticas aplicadas a los ensayos experimentales de este trabajo.

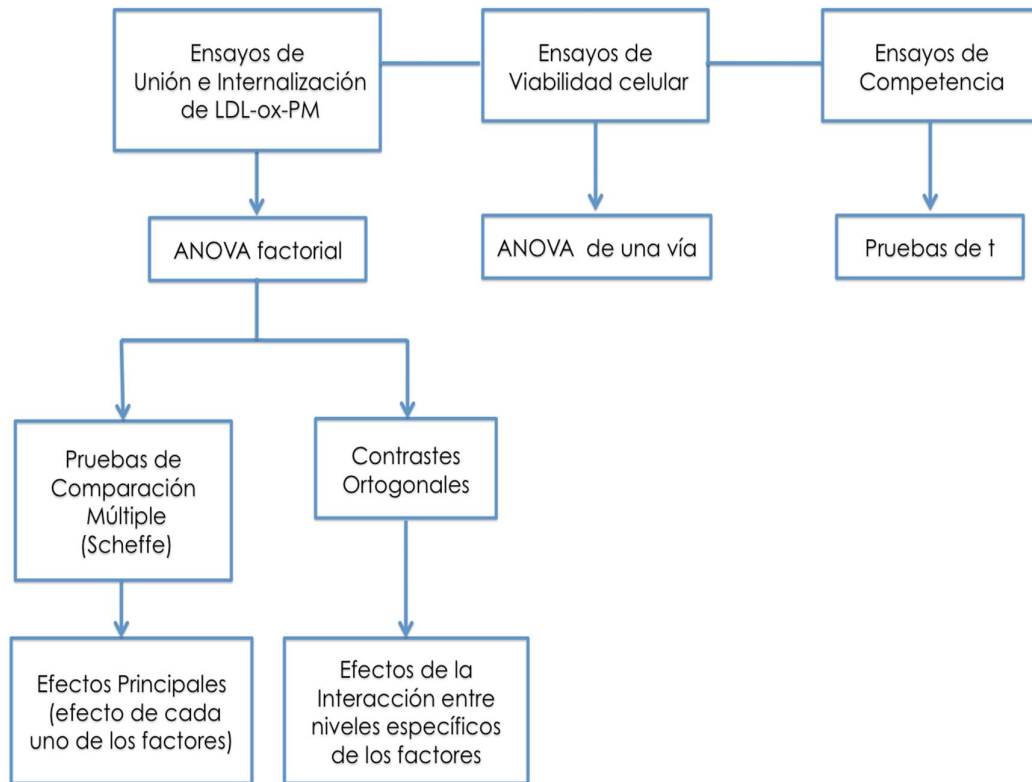


Figura 10. Diagrama de las pruebas estadísticas aplicadas a cada uno de los ensayos experimentales realizados en este trabajo.

6. RESULTADOS

6.1 Microscopía Electrónica de Transmisión de LDL

Para poder determinar la homogeneidad de las muestras de lipoproteínas obtenidas mediante el método de ultracentrifugación diferencial, éstas se observaron a través de un Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

La figura 11 muestra lipoproteínas con un diámetro aproximado de 25 nm. Este dato confirma que las lipoproteínas obtenidas pertenecían a la fracción de LDL, cuyo diámetro oscila entre 18-25 nm. Sin embargo, también se puede observar parte de la heterogeneidad de una muestra de lipoproteínas, pues se lograron visualizar algunas partículas lipoproteicas de mayor tamaño, que pudieran corresponder a las VLDL (Lipoproteínas de Muy Baja Densidad, con un diámetro 30-80 nm); así como también partículas de menor tamaño que probablemente correspondían a las HDL (Lipoproteínas de Alta Densidad, con un diámetro de 5-12 nm). Sin embargo, cabe recalcar que la mayoría de las lipoproteínas fueron LDL. Este fue un paso importante que permitió continuar con el trabajo, enfocado específicamente en estas partículas lipoproteicas, las LDL.

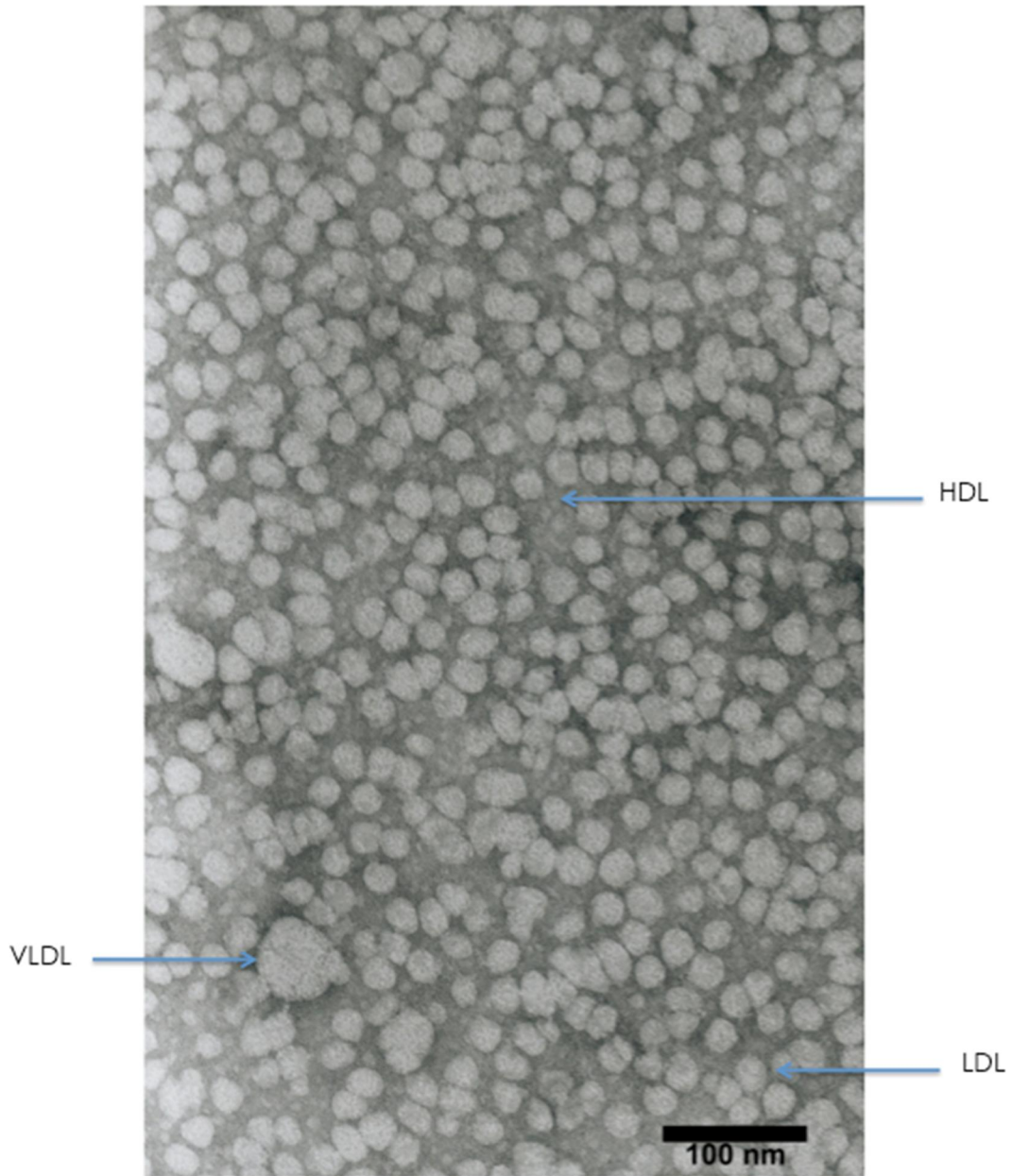


Figura 11. Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) visualizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), a una dilución 1:1000.

6.2 Oxidación de LDL por exposición a PM

La oxidación de las LDL por exposición a PM se evaluó por el método del Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Esta técnica permite medir la peroxidación de lípidos, al detectar la concentración de MDA (malondialdehído); un producto secundario de la peroxidación lipídica, la concentración de MDA se expresó en nanomoles de MDA por miligramo de proteína (nmoles MDA/mg proteína LDL).

Los niveles de MDA para las LDL no expuestas (control negativo) fueron de 0.7 nM MDA/mg proteína, mientras que para las LDL expuestas a 1 mM de H₂O₂ fueron de 1.13 nM MDA/mg proteína. Estos datos demuestran que las LDL sin ningún tratamiento tienen un grado de oxidación basal. Por otro lado, la exposición de LDL a concentraciones crecientes de PM (20, 40 y 80 µg de PM₁₀/mg LDL) generó niveles de MDA de 0.97, 1.26 y 1.55 nM MDA/mg proteína respectivamente; que fueron 38, 78 y 120 % mayores comparado con los niveles de MDA obtenidos en las LDL no expuestas a PM. Estos resultados comprueban que las PM por sí mismas, son capaces de oxidar a las LDL de una forma dependiente de la concentración (Figura 12).

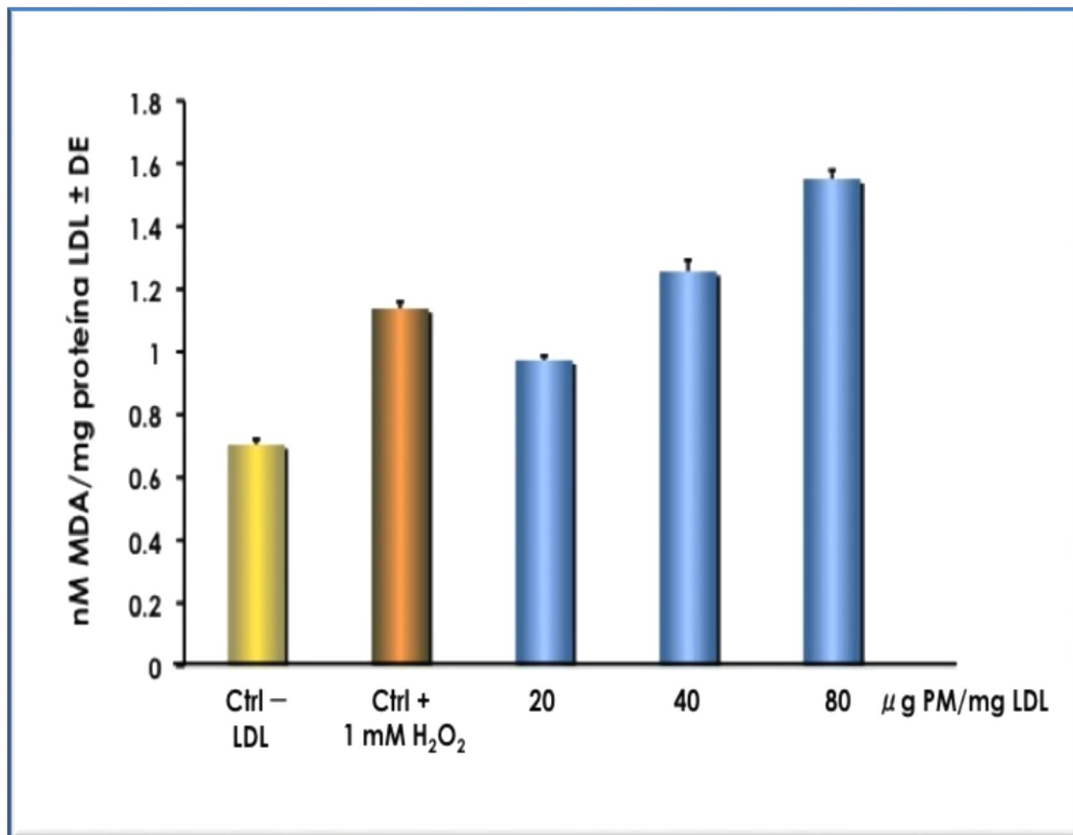


Figura 12. Oxidación de LDL por exposición a concentraciones crecientes de PM (20, 40 y 80 μg PM/mg proteína LDL), control negativo (sólo LDL), control positivo (LDL expuestas a 1 mM de H₂O₂), evaluada a través de la generación de MDA.

6.3 Formación de complejos PM-LDL

Se evaluó la posible formación de complejos entre las PM y las LDL-nat o bien entre las PM y las LDL-ox-PM, marcadas fluorescentemente, con el fin de demostrar la posible interferencia con las evaluaciones de citometría de flujo de los ensayos de competencia y los ensayos del efecto de las PM sobre los R_LDL, descritos más adelante (6.7 y 6.8).

La figura 13 muestra que menos del 10% de las LDL-nat ó de las LDL-ox-PM formaron complejos con las PM; es decir sólo un porcentaje muy bajo de las LDL (tanto nativas como oxidadas) fue retenido por las PM en el botón. Con base en esto podemos decir que en los en donde los cultivos celulares se incubaron con LDL y PM al mismo tiempo, hubo un 10% de fluorescencia que se perdió en las lecturas de citometría de flujo, atribuido a la unión inespecífica entre las LDL y las PM. Sin embargo, esta perdida en los niveles de fluorescencia fue bajo, y por tanto no intervinieron de forma significativa con los resultados de los ensayos de competencia y los ensayos del efecto de las PM sobre los R-LDL.

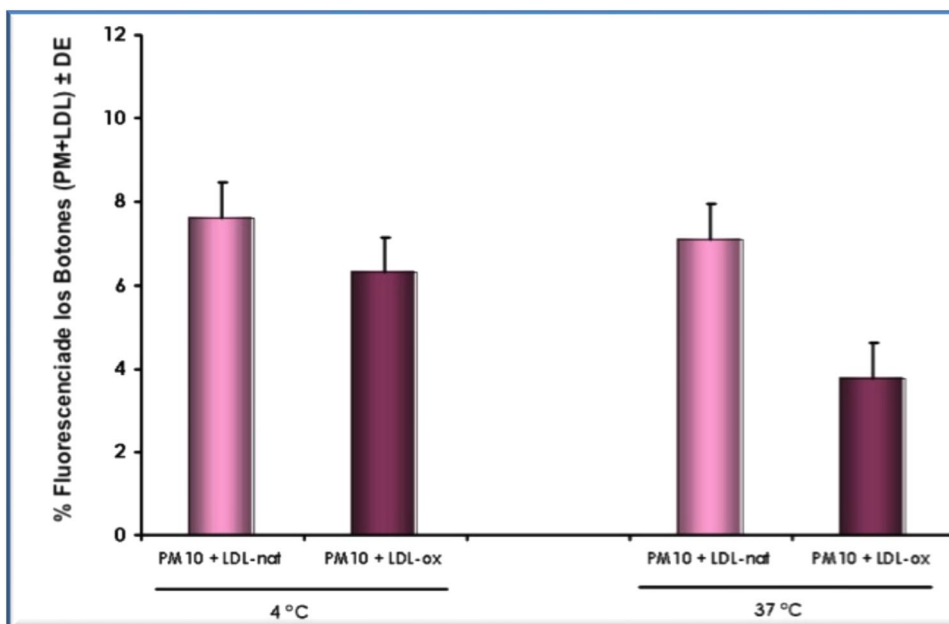


Figura 13. Formación de complejos PM-LDLnat y PM-LDLox a 4°C (temperatura a la que se hicieron los ensayos de unión) y 37 °C (temperatura a la que se hicieron los ensayos de internalización), usando 40 µg/cm² de PM₁₀ y 20 µg/ml de LDL-nat ó de LDL-ox-PM, durante 4 h.

6.4 Viabilidad celular

Para determinar si la exposición de las diferentes líneas celulares a las LDL-ox-PM y a las PM tenía algún efecto citotóxico, se examinó la viabilidad de las células CHO, CHO-RS y RAW expuestas durante 4 h a diferentes concentraciones de LDL-ox-PM (2.5-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), o bien a 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL-ox-PM en presencia de 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} .

Los resultados mostraron que la viabilidad de las células CHO, CHO-RS y RAW disminuyó en menos de un 13% después de la exposición a concentraciones crecientes de LDL-ox. Estos decrementos en la viabilidad fueron dependientes de la concentración de LDL-ox-PM. La disminución más importante en la viabilidad ocurrió en los cultivos celulares de CHO-RS (12.9%) y RAW (12.6%), cuando estos además de ser incubados con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL-ox-PM, también fueron incubados con 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM. No obstante, ningún cambio en la viabilidad fue estadísticamente significativo (Apéndice II, cuadros).

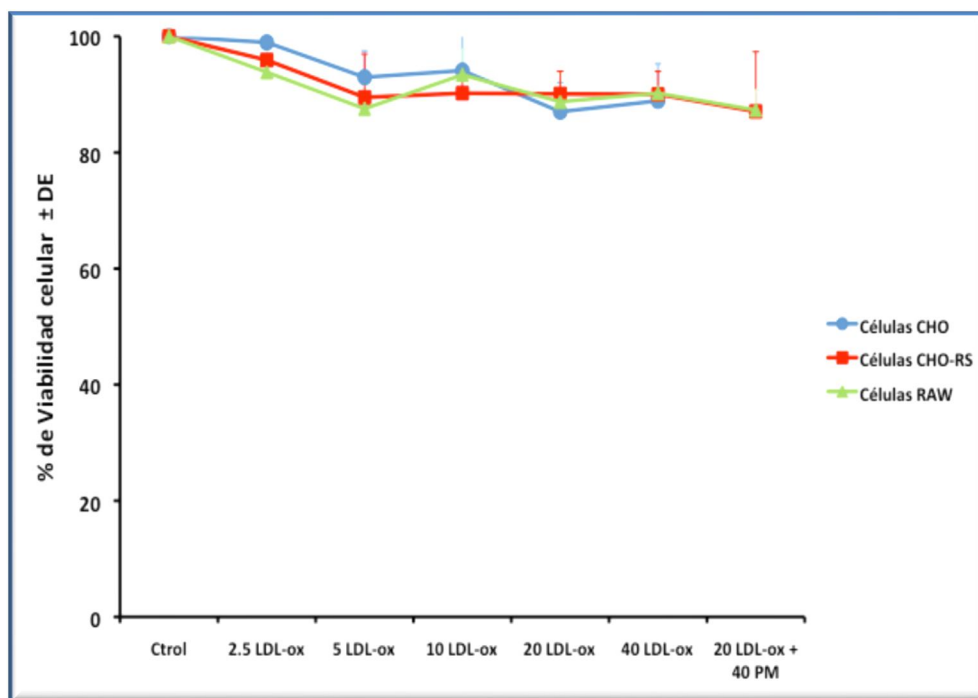


Figura 14. Viabilidad de células CHO, CHO-RS y RAW expuestas a concentraciones crecientes de LDL-ox-PM (0-40 $\mu\text{l}/\text{ml}$) ó a 20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de LDL-ox y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM, durante 4 h a 37C. Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes \pm DE.

6.5 Unión de LDL-ox-PM a los RS de diferentes líneas celulares

Las lipoproteínas modificadas químicamente son ligandos de los RS (Rader & Puré, 2005). Por ello, en este estudio se determinó si las LDL previamente oxidadas por exposición a PM, eran reconocidas y unidas por los RS de las células CHO (control negativo), CHO-RS (sobreeexpresan RS-AI) y RAW264.7 (macrófagos).

El ANOVA factorial aplicado a estos ensayos, mostró que la unión de LDL-ox-PM a los RS se debió al efecto tanto del tipo celular, como a la concentración de LDL [LDL]; así mismo, los efectos de interacción también fueron significativos (Tipo celular*LDL) ($p < 0.05$) (Apéndice III, cuadro 7).

Por un lado, encontramos que las LDL-ox-PM fueron unidas por las células CHO-RS, RAW y también por las células CHO, en un proceso dependiente de la concentración. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de unión a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox con respecto al control (sin LDL-ox) ($*p < 0.05$), en cada una de las tres líneas celulares utilizadas (Figura 15a), (Apéndice III, cuadro 8 y 10).

Por otro lado, los niveles de unión de LDL-ox-PM fueron diferentes para cada una de las líneas celulares. Como se esperaba, la unión de LDL-ox-PM al RS de las células CHO-RS (control positivo) con la sobre-expresión del RS AI, fue de casi el doble con respecto a las células CHO (control negativo) sin expresión del RS-AI, esta diferencia fue estadísticamente significativa; e inclusive con respecto a las células RAW264.7 (monocitos/macrófagos) que presentan RS de manera natural, diferencia que también fue significativa. Sin embargo, no hubo diferencias entre los niveles de unión de LDL-ox-PM de las células CHO y RAW (Figura 15b), (Apéndice III, cuadro 9). Para determinar a partir de que concentración de LDL-ox-PM se daban las diferencias entre las líneas celulares, se realizaron contrastes ortogonales, los resultados mostraron que las diferencias se dieron a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox. (Apéndice III, cuadro 10).

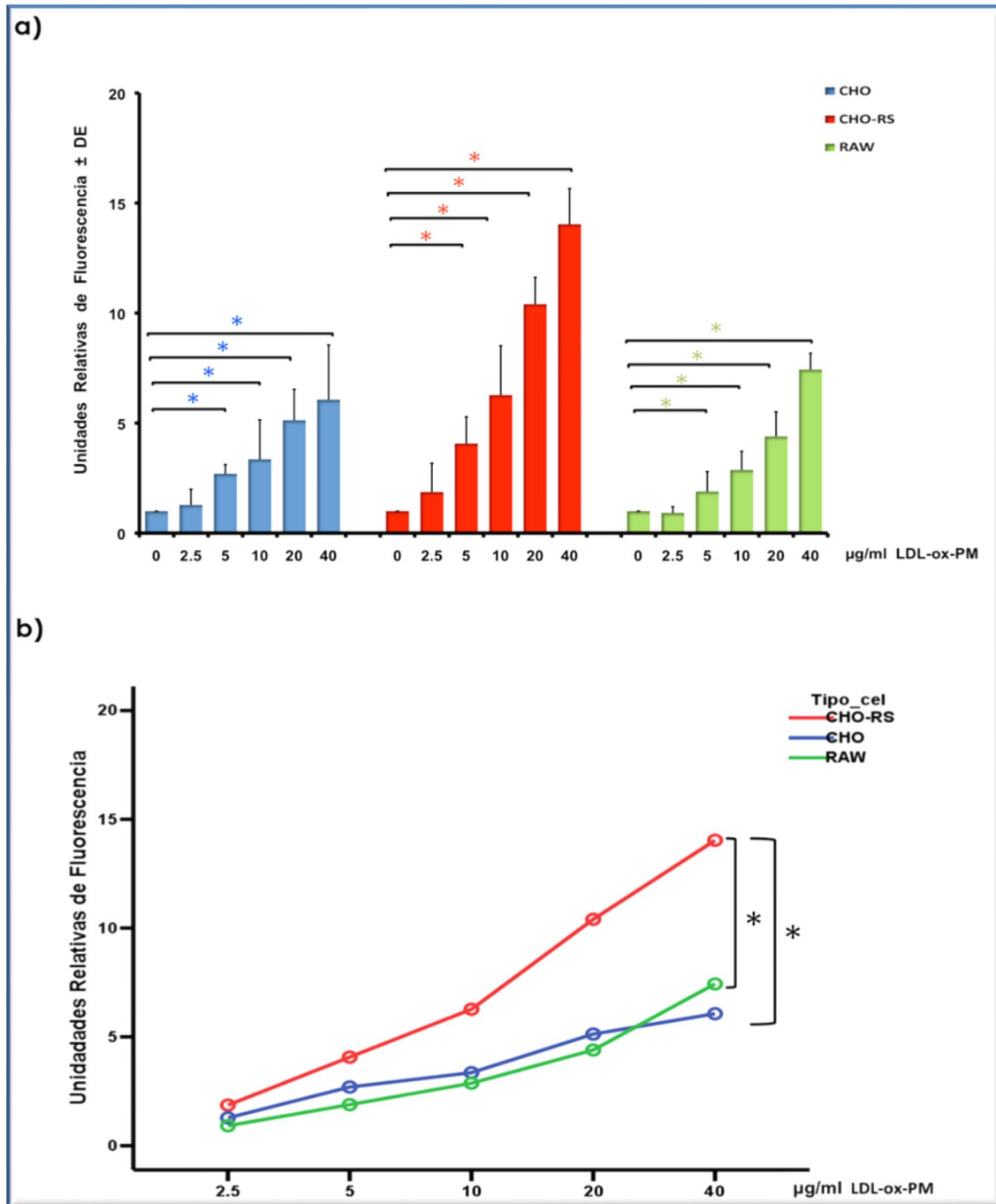


Figura 15. Unión de LDL-ox-PM al RS de diferentes líneas celulares: Células CHO, que no expresan ningún tipo de RS (Control negativo), Células CHO-RS, transfectadas de forma estable con el gen del RS AI (control positivo) y Células RAW264.7, monocitos/macrófagos de ratón. **a)** Diferencias en los niveles de Unión de acuerdo a la concentración de LDL-ox-PM, comparadas con su respectivo control ($*p < 0.05$, Pruebas de comparación múltiple (Scheffe) y Contrastes Ortogonales). **b)** Diferencias en los niveles de unión de LDL-ox-PM en las tres líneas celulares estudiadas ($*p < 0.05$, Pruebas de comparación múltiple (Scheffe) y Contrastes Ortogonales). Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes \pm DE, y se encuentran expresadas en unidades relativas de fluorescencia.

6.6 Internalización de LDL-ox-PM a través de los RS de diferentes líneas celulares.

Se determinó la cantidad de ligando (LDL-ox-PM) internalizado por las células CHO (control negativo), CHO-RS (sobrexpresan RS-AI) y RAW264.7 (macrófagos) a través de sus RS, fenómeno que es de nuestro interés porque puede ser capaz de desencadenar respuestas fisiológicas.

El ANOVA factorial aplicado a estos ensayos mostró que la internalización de las LDL-ox-PM a través de los RS se debió al efecto tanto del tipo celular como a la concentración de LDL [LDL], así mismo los efectos de interacción entre ambos factores (Tipo celular*LDL) también fueron significativos ($p < 0.05$), (Apéndice IV, cuadro 13).

Por un lado encontramos que la internalización de LDL-ox-PM a través de los RS en las tres líneas celulares; fue dependiente de la concentración de lipoproteínas, así a mayor cantidad de LDL-ox-PM el proceso de internalización fue mayor. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de internalización de LDL-ox-PM a partir de la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox con respecto al control (sin LDL-ox) en cada una de las tres líneas celulares utilizadas ($*p < 0.05$) (Figura 16a), (Apéndice IV, cuadro 14 y 16).

Por otro lado, también se encontraron diferencias significativas en los niveles de internalización de LDL-ox-PM entre las células CHO-RS y las células CHO ($*p < 0.05$) y entre las células RAW y las células CHO ($*p < 0.05$). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la internalización de LDL-ox-PM entre las células CHO-RS y las células RAW ($p > 0.05$) (Figura 16b), (Apéndice IV, cuadro 15). Para determinar a partir de que concentración de LDL-ox-PM se daban las diferencias entre las líneas celulares se realizaron contrastes ortogonales, los resultados mostraron que las diferencias se dieron a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox. (Apéndice IV, cuadro 16).

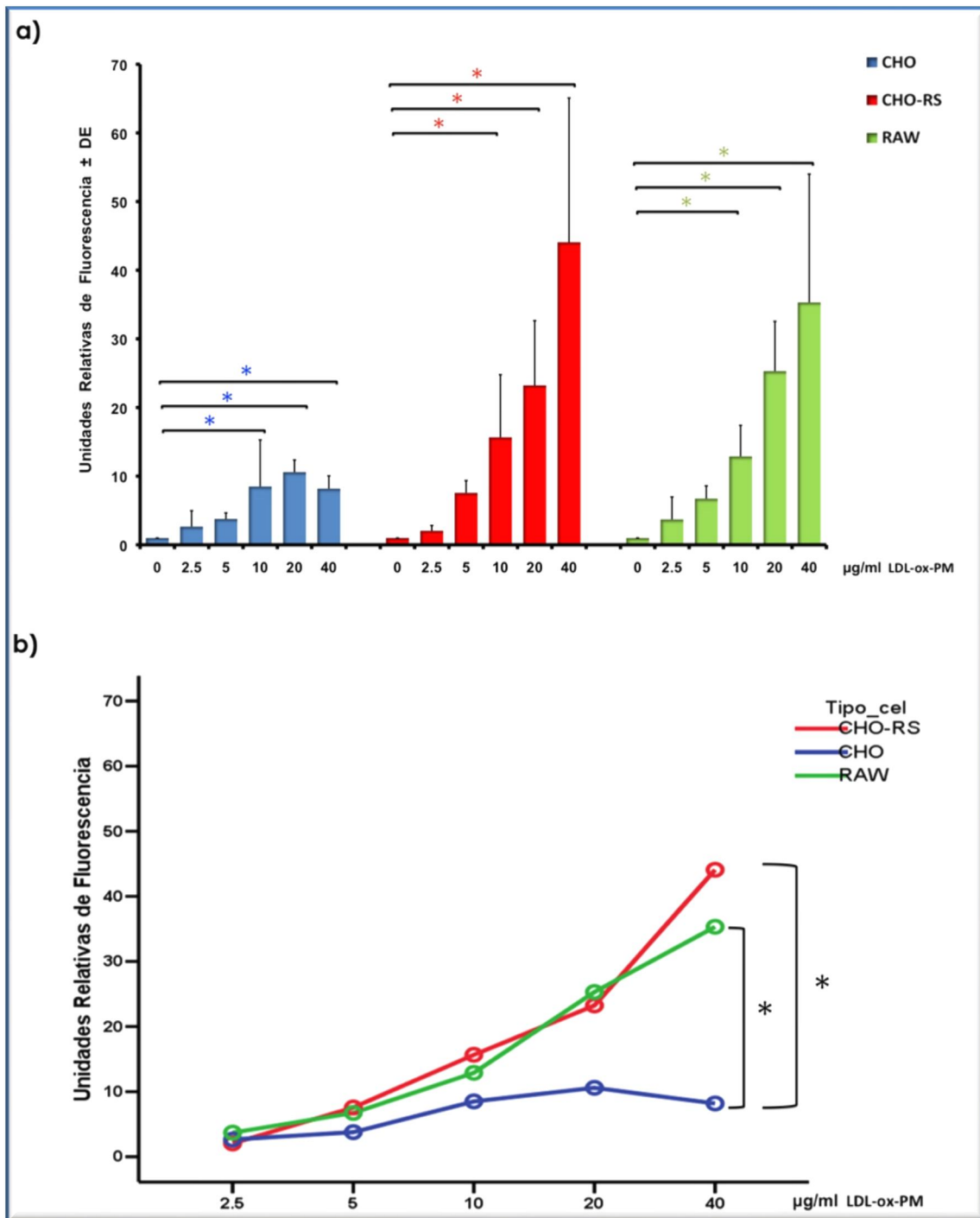


Figura 16. Internalización de LDL-ox-PM a través del RS de diferentes líneas celulares: Células CHO, que no expresan ningún tipo de RS (Control negativo), Células CHO-RS, trasfectadas de forma estable con el gen del RS AI (control positivo) y Células RAW264.7, monocitos/macrófagos de ratón. **a)** Diferencias en los niveles de Internalización de acuerdo a la concentración de LDL-ox-PM, comparados con su respectivo control ($*p < 0.05$, Pruebas de comparación múltiple (Scheffe) y Contrastes Ortogonales). **b)** Diferencias en los niveles de internalización de LDL-ox-PM entre las tres líneas celulares estudiadas ($*p < 0.05$, Pruebas de comparación múltiple (Scheffe) y Contrastes Ortogonales). Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes \pm DE, y se encuentran expresadas en unidades relativas de fluorescencia.

6.7 Competencia entre las PM y las LDL-ox-PM por el RS

Debido a que tanto las LDL-ox como las PM son ligandos del Receptor Scavenger, se determinó si las PM y las LDL-ox-PM compiten por este receptor durante los procesos de unión e internalización. Para ello, se hicieron ensayos de unión e internalización de LDL-ox-PM en células CHO-RS y RAW usando 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-Dil-ox en presencia de 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de PM.

La presencia de las PM en los cultivos celulares indujo un decremento significativo en los procesos de unión e internalización de LDL-ox-PM. En las células CHO-RS, el efecto fue más evidente, en estas células la unión de LDL-ox-PM disminuyó significativamente ($*p < 0.05$) en un 50% en presencia de PM. De igual forma, la internalización se vio afectada cuando las PM estuvieron presentes, disminuyendo significativamente ($*p < 0.05$) en un 70% (Figura 17a), (Apéndice V).

En el caso de las células RAW, la unión de LDL-ox-PM disminuyó en un 20%, por la presencia de PM, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa. En cambio, la internalización de LDL-ox-PM en células RAW disminuyó significativamente ($*p < 0.05$) en un 30% por efecto de las PM (Figura 17b), (Apéndice V).

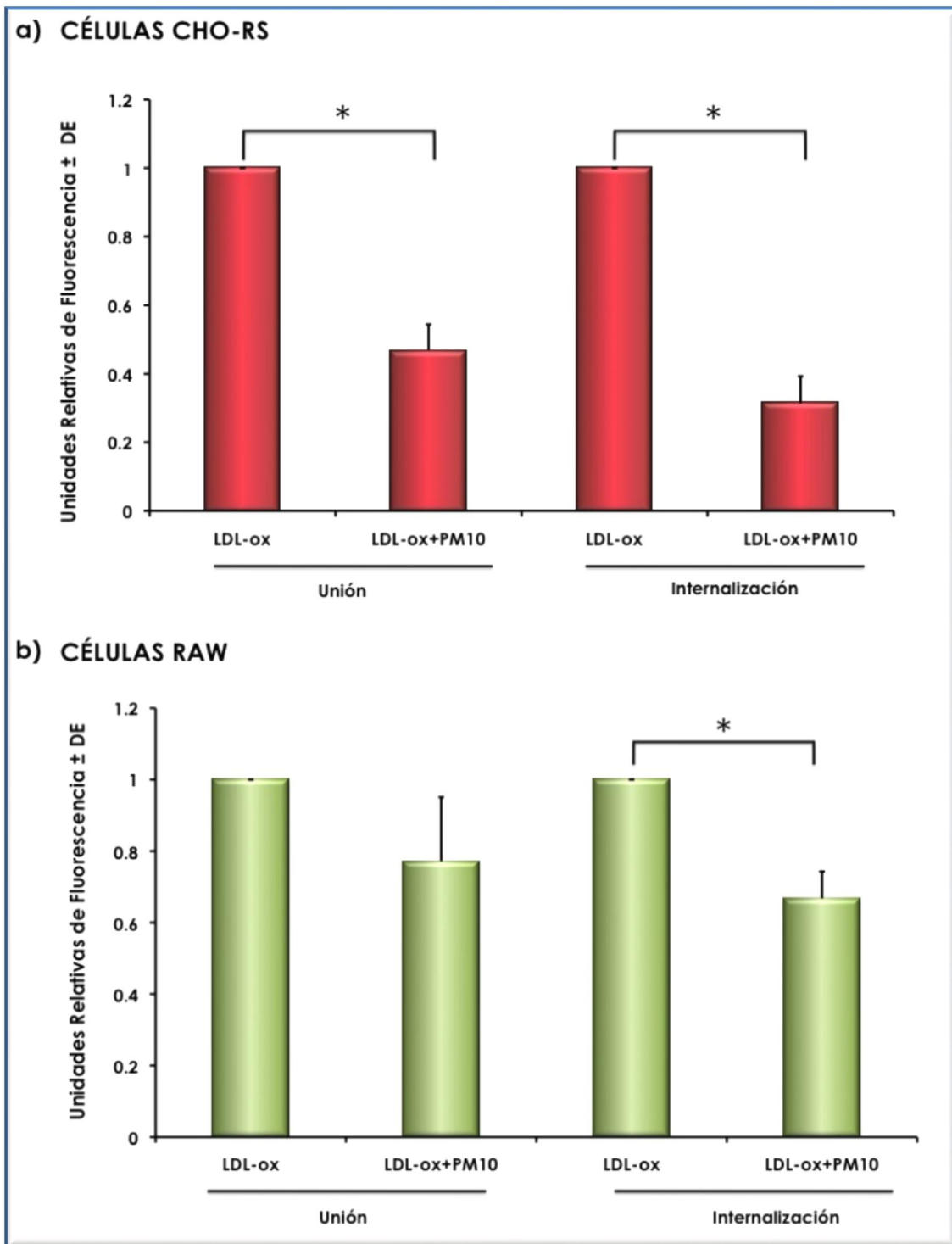


Figura 17. Competencia entre LDL-ox-PM y PM por el RS en **a)** células CHO-RS y **b)** células RAW264.7. Las células fueron incubadas durante 4 h con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox-PM y 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de PM. Los datos fueron comparados con las células control (incubadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-ox-PM en ausencia de PM). Las gráficas representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$, Prueba de t.

6.8 Las PM afectan otros receptores celulares como el R-LDL

Para determinar si las PM afectan la funcionalidad de otros receptores celulares diferentes a los RS, se estudiaron los efectos de las PM sobre los procesos de unión e internalización de LDL-nat a través del R-LDL. Para ello, se incubaron a las células CHO-RS y RAW con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-nat en presencia de 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de PM.

Las PM afectaron la funcionalidad del R-LDL, puesto que tanto la unión como la internalización de LDL-nat fueron afectadas cuando las células CHO-RS y RAW se incubaron con LDL-nat en presencia de PM. Los procesos de unión e internalización de LDL-nat fueron afectados de forma más evidente en las células CHO-RS, en estas células la unión de LDL-nat disminuyó significativamente ($*p<0.05$) en un 60% en presencia de las PM. Del mismo modo, la internalización de LDL-nat se vio disminuida en un 80% por efecto de las PM ($*p<0.05$) (Figura 18a), (Apéndice V).

En cambio, en las células RAW la unión de LDL-nat disminuyó significativamente en un 40% cuando estas fueron incubadas en presencia de PM, mientras que la internalización de LDL-nat se vio significativamente disminuida en un 50% por efecto de las PM ($*p<0.05$) (Figura 18b), (Apéndice V).

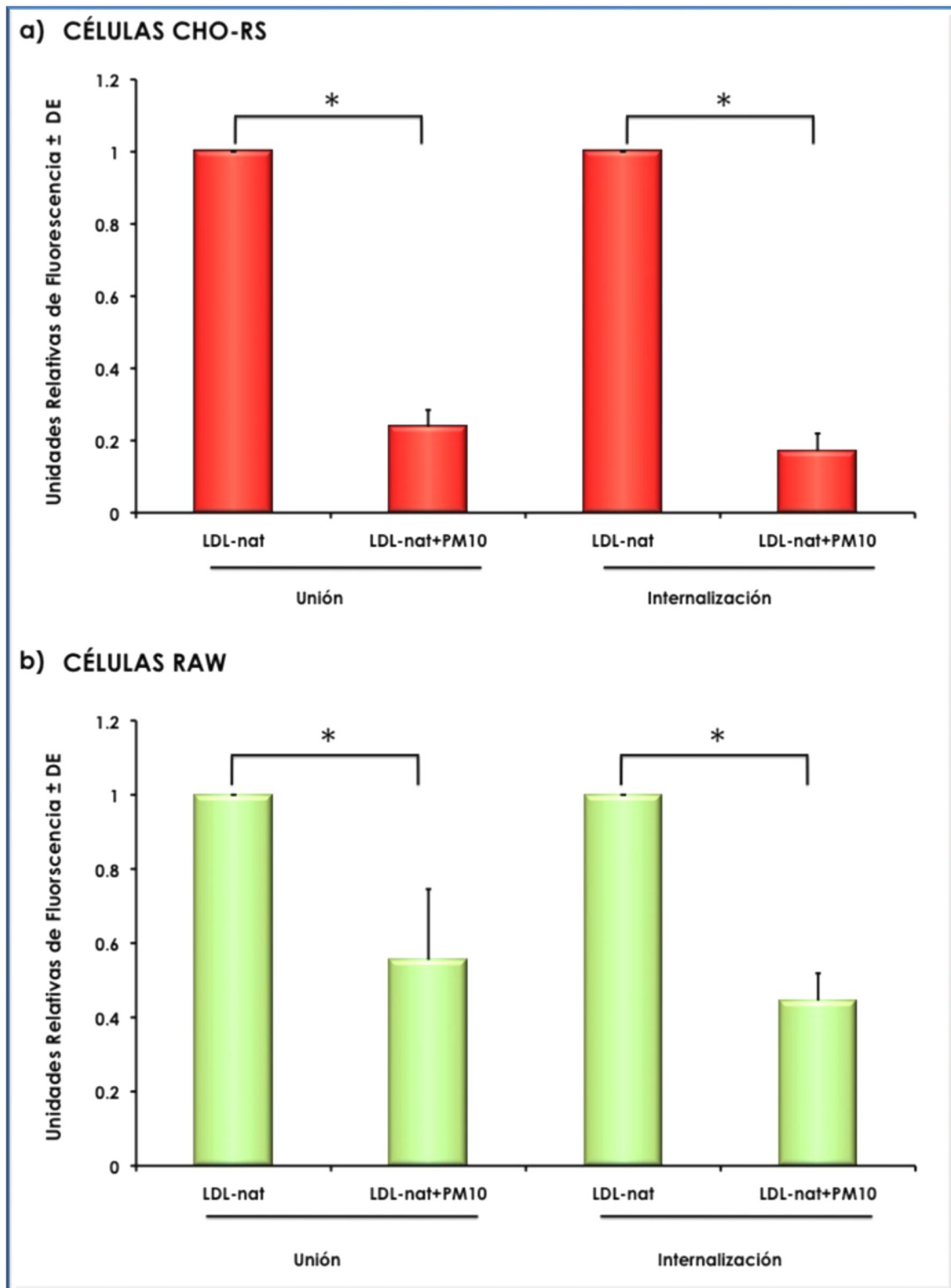


Figura 18. Las PM afectan la funcionalidad del R-LDL en **a)** células CHO-RS y **b)** células RAW264.7. Las células fueron incubadas durante 4 h con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-nat y 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de PM. Los datos fueron comparados con las células control (incubadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de LDL-nat en ausencia de PM). Las gráficas representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm DE. * $p < 0.05$, Prueba de t.

7. DISCUSIÓN

El tamaño y la composición de las PM son características importantes que determinan sus efectos sobre la salud. Cada tamaño de PM está constituido por componentes químicos diferentes, y por consiguiente generan diferentes efectos dañinos. Algunos autores consideran que las PM₁₀ son las partículas más tóxicas (Castillejos *et al.*, 2000; Monn & Becker 1999; Osornio-Vargas *et al.*, 2003; Pozzi *et al.*, 2003; Schins *et al.* 2002). Sin embargo, actualmente se está centrando un mayor interés en las PM_{2.5} y las partículas ultrafinas, pues se considera que representan un mayor riesgo a la salud (Diociaiuti *et al.*, 2001; Hsiao *et al.*, 2000; Krewski *et al.*, 2000; Schwartz 2001; Schwartz *et al.*, 1999; Vincent *et al.* 2001). Sin embargo, en este trabajo sólo se utilizaron PM₁₀ debido a que esta fracción incluye una mezcla de diferentes tamaños. Pero, además, previamente se evaluó el potencial oxidante de las PM₁₀ y PM_{2.5} sobre las LDL y los efectos fueron muy similares (datos no mostrados).

Otro factor importante dentro de la toxicidad de las PM es su composición. Varios de sus componentes tanto de tipo inorgánico como orgánico, incluyendo los biogénicos, se consideran responsables de los efectos dañinos de las PM (Pope & Dockery, 2006). Algunas evidencias toxicológicas han demostrado que las PM ejercen sus efectos adversos a través de su potencial oxidante (Chirino *et al.*, 2010; Montiel-Dávalos *et al.*, 2010; Nurkiewicz *et al.*, 2006; Sánchez-Pérez *et al.*, 2009; Valavanidis *et al.*, 2005), el cual puede estar dado por algunos de sus componentes como los metales de transición, las endotoxinas y los HAP; pues generan especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS), tales como el anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido nítrico (NO[·]) y peroxinitrito (OHOO⁻) que se consideran altamente oxidantes (Donaldson *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1997, Tao *et al.*, 2003).

Por tal razón, en este estudio propusimos que el potencial oxidante de las PM podría ser un factor de riesgo asociado a diferentes enfermedades. Por ello, era importante evaluar si las PM eran capaces de generar lipoperoxidación de las LDL, ya que la oxidación de LDL se asocia con enfermedades como la diabetes mellitus, síndromes antifosfolípidicos, lupus eritematoso sistémico y

artritis reumatoide. Sin embargo, existe una mayor evidencia de que las LDL-ox están relacionadas de forma más estrecha con el desarrollo de la aterosclerosis (Levitan *et al.*, 2010; Queiroz Mello *et al.*, 2011).

Así, con el primer resultado de este estudio se demostró que las PM tienen el potencial de oxidar a las LDL *in vitro* (Figura 12). Quizá la oxidación de LDL por exposición a las PM, se deba a la participación de alguno de sus componentes como los metales de transición que se sabe están presentes en las PM, como el Fe, Cu, Zn, Va, Ni y Pb (Osornio-Vargas *et al.*, 2003; Rosas-Pérez *et al.*, 2007). Pues de hecho, existen reportes de que la oxidación de LDL *in vitro*, es acelerada por la presencia de iones como Fe³⁺ y Cu²⁺ (Björkerud & Björkerud, 1998). Pero además, como ya se mencionó anteriormente, las endotoxinas y los HAP también pueden estar participando en la oxidación de las LDL a través de la generación de ROS y RNS.

Aunque a la fecha no existen estudios sobre los mecanismos de oxidación de las LDL *in vivo* por efecto de las PM, en este estudio proponemos a la oxidación de las LDL como un evento dependiente de que las PM o alguno de sus componentes como los metales de transición y las PUF puedan diseminarse desde el pulmón hacia la circulación sistémica (Nemmar *et al.*, 2004) y logren alcanzar a las LDL en el plasma sanguíneo, como ocurre con algunos componentes del cigarrillo (Yamaguchi *et al.*, 2001; 2004), o bien dentro de las paredes arteriales y por tanto oxidarlas de forma directa. Además, estos mismos componentes podrían generar eventos de estrés oxidante e inflamación sistémica, favoreciendo así la oxidación indirecta de las LDL.

Como se ha mencionado antes, una vez que las LDL son oxidadas, éstas ya no pueden ser reconocidas por el receptor de LDL, en su lugar son reconocidas por los RS de los Mø (Steinberg *et al.*, 1997). En este trabajo, las LDL oxidadas por PM fueron unidas e internalizadas por los RS de las células RAW (macrófagos), así como por los RS-AI sobreexpresados en las células CHO-RS (Figuras 15 y 16). Como se esperaba, las células CHO-RS unieron de manera significativa más LDL-ox-PM comparadas con las células RAW

(Figuras 15a y 16a). Sin embargo, en lo referente a la internalización de estas lipoproteínas modificadas, no hubo diferencias estadísticas entre los niveles de internalización de las células CHO-RS y las RAW (Figuras 15b y 16b).

Sin bien es cierto que las células CHO-RS sobre-expresan al RS-AI, y quizá por ello unan mayores cantidades de LDL-ox-PM; se debe recordar que las células RAW son Mø. Los Mø presentan varios tipos de RS como MARCO (Receptor de Mø con estructura tipo Colágena), RS-BI, CD36, CD68 y LOX-1, con la capacidad de reconocer LDL-ox, así como receptores Tipo Toll (TLR) como el TLR-4, los cuales también se han visto expresados por los Mø dentro de las lesiones ateroscleróticas (Hirano *et al.*, 1999; Nakata *et al.*, 1999, Dhaliwal & Steinbrecher, 1999; Rader & Puré, 2005). De esta forma, las células RAW podrían estar llevando a cabo la endocitosis de LDL-ox-PM a través de diferentes RS y TLR, lo que haría este proceso más eficiente. Sin embargo, a pesar de que los macrófagos (RAW) tienen una mayor variedad de RS no unen LDL-ox-PM como se esperaría e inclusive son sobrepasadas significativamente por las CHO-RS. Pero, cuando se compararon los niveles de internalización de LDL-ox-PM entre RAW y CHO-RS, no se encontraron diferencias significativas (Figura 16b). Esto quizá se deba a que la dinámica intramolecular asociada a la endocitosis, no sea la misma entre ambas líneas celulares.

Con respecto a las células CHO (RSA⁻), se observaron niveles bajos de unión e internalización de LDL-ox-PM (Figura 15a y 16a). Esta unión e internalización basal, previamente reportada por Aguilar-Gaytán & Mas-Oliva en el 2003 puede estar relacionada con el origen ovárico de estas células y por tanto con la presencia del RS-BI. Estos receptores además de localizarse en Mø, también se encuentran en hepatocitos y células de tejidos esteroideogénicos, como glándulas suprarrenales, ovarios y testículos, las cuales tiene una demanda continúa de colesterol (Moore & Freeman, 2006; Terpstra *et al.*, 2000). Además, los receptores RS-BI de forma similar a los RS de la clase A, pueden reconocer LDL-ox (Rader & Puré, 2005) e inclusive, se han visto expresados por las células espumosas dentro de las lesiones ateroscleróticas (Nakata *et al.*, 1999). Por esta razón, es probable que las células CHO estén

reconociendo, uniendo e internalizando de forma basal a las LDL-ox-PM a través de los RS-BI.

Otra de las aportaciones importantes de este estudio, fue el demostrar que las PM afectan la funcionalidad de receptores celulares como los RS y los R-LDL. La interacción directa de las PM con las células, inhibió significativamente los procesos de unión e internalización de LDL-ox-PM (Figura 17) y de LDL-nat (Figura 18), sugiriendo en primera instancia que las PM compiten por los RS y los R-LDL. Estos resultados evidencian que las PM pueden afectar a diversos receptores celulares, trayendo con ello efectos drásticos sobre la función celular. Por ejemplo, pueden afectar la capacidad endocítica de los Mø, los cuales son la primera línea de defensa de nuestro organismo; y como consecuencia se alteraría la respuesta inmune innata (Monn *et al.*, 2002). Pero, estos efectos perjudiciales no sólo se limitarían a los Mø, sino también afectarían a otras estirpes celulares que entren en contacto con las PM, como a las células epiteliales y endoteliales.

Una posibilidad factible para lo observado con ambos receptores celulares (RS y R-LDL), es que las PM por su tamaño (μm) generen un impedimento estérico, bloqueando a los receptores celulares e impidiendo sus funciones de reconocimiento, unión e internalización de sus ligandos de manera normal.

No obstante, otra posibilidad por determinar en estudios futuros, es que las PM no solo compitan o bloqueen a los receptores Scavenger y/o a los R-LDL, sino que además estén dañando a dichos receptores, quizá generando alguna modificación química en ellos. Aguilar-Gaytán en el 2004, determinó que el estrés oxidativo producido por TBH (ter-butil hidroperóxido) disminuyó de forma importante la internalización de LDL-acetiladas a través de los RS-AI y propuso que se debía a una oxidación directa del receptor. Así pues, las PM por sí mismas o mediante la generación de estrés oxidante, pueden dañar a los receptores celulares. Probablemente, de forma similar como ocurre con las LDL, las PM pueden inducir algún daño oxidante en los

receptores propiciando un cambio conformacional en ellos, y como consecuencia ya no puedan reconocer y unir a sus ligandos.

De igual forma, las PM no sólo pueden afectar a los lípidos sino también a las proteínas de las membranas celulares modificando su estructura y por tanto la fluidez de la membrana celular. Esta última posibilidad es apoyada por los trabajos de Beretta y colaboradores, quienes en el 2007 reportaron que la fracción orgánica de los detritus de neumáticos, que constituyen entre un 5-7% de las PM₁₀ y un 2% de las PM_{2.5}, causan un desensamblaje en puntos discretos de la membrana plasmática de células A549. Estos cambios en la membrana plasmática podrían estar alterando la dinámica de los receptores celulares provocando que el reconocimiento y la endocitosis de ligandos no este ocurriendo adecuadamente.

Existen evidencias del daño citotóxico tanto de las LDL-ox (Björkerud & Björkerud, 1998); así como de las PM (Alfaro-Moreno *et al.*, 2002; Montiel-Dávalos *et al.*, 2010) en diferentes líneas celulares. Este hecho resultaba otra posibilidad para poder explicar la disminución en los procesos de unión e internalización de LDL-ox y LDL-nat a través de los RS y los R-LDL. Por tal razón, para descartar una muerte celular excesiva inducida por las LDL-nat, las LDL-ox-PM y las PM se evaluó la viabilidad celular (por exclusión con azul tripán). Los resultados mostraron que las LDL-nat, las LDL-ox-PM y las PM disminuyeron ligeramente la viabilidad en los tres cultivos celulares (CHO, CHO-RS y RAW). Es importante recalcar que la mayor disminución en la viabilidad ocurrió en células CHO-RS (12.9%) y RAW (12.6%) cuando las células fueron expuestas al mismo tiempo a LDL-nat ó LDL-ox-PM y a PM. Sin embargo, esta disminución no fue significativa, quizá porque los tiempos de exposición nunca fueron mayores a 4 h. Estos resultados son muy similares a lo reportado por Obot *et al.* (2002), quienes determinaron que la exposición a PM durante 4 h, provocó una disminución en la viabilidad de Mø menor al 10%.

En resumen (Figura 19), los resultados del presente estudio muestran que las PM pueden oxidar a las LDL. Además, las LDL-ox-PM son reconocidas, unidas e internalizadas por RS de células que los expresan (por ejemplo:

macrofágos). Así, este sería un mecanismo plausible para poder explicar la hipótesis de que las PM pueden tener el potencial de agravar la enfermedad aterosclerótica al promover la oxidación de las LDL y su subsecuente captación por los Mø.

Nuestros datos también nos llevaron a demostrar que las PM afectan los procesos de reconocimiento y endocitosis de ligandos mediada por receptores como los RS y los R-LDL. Este último resultado, nos deja ver que las PM pueden afectar de forma seria la funcionalidad de las células. Por ejemplo, las PM al bloquear a los RS podrían disminuir la inmunidad innata, al impedir el reconocimiento adecuado de patógenos. Asimismo, las PM podrían generar una muerte celular al impedir el reconocimiento de sustancias vitales para las células (como aminoácidos, glucosa, lípidos, factores de crecimiento y/o de diferenciación, etc.).

No obstante, aún son necesarios estudios *in vivo* para verificar y complementar estos hallazgos.

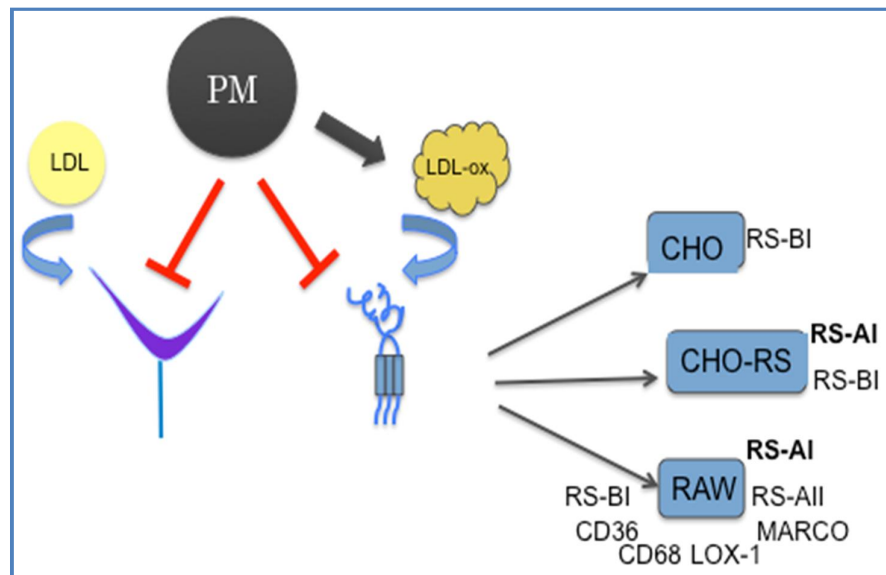


Figura 19. Efectos de las PM inducidos sobre las LDL, los RS y los R-LDL. 1) Las aeropartículas (PM) tienen la capacidad de oxidar a las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL). 2) Una vez que las LDL han sido oxidadas por las PM (LDL-ox-PM), son reconocidas, unidas e internalizadas por los Receptores Scavenger (RS) de aquellas células que los expresan (por ejemplo: CHO, CHO-RS y RAW). 3) Las PM interfieren en el reconocimiento y la funcionalidad de los Receptores de LDL (R-LDL).

8. CONCLUSIONES

- Las PM son capaces de oxidar a las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) de forma dependiente de la concentración.
- Las LDL-ox por PM son reconocidas, unidas e internalizadas por los RS.
- Las PM afectan la funcionalidad de receptores celulares como el RS y el R-LDL.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar en un sistema *in vivo* cómo las PM o sus componentes estarían oxidando a las LDL.
- Determinar si otros RS además del RS-AI, podrían estar participando en la unión e internalización de LDL-ox-PM.
- Determinar cómo las PM están afectando la funcionalidad de los receptores celulares (RS y R-LDL). (Impedimento estérico, modificaciones químicas y/o modificaciones estructurales).
- Determinar en diferentes modelos celulares, algunas consecuencias asociadas al bloqueo de diversos receptores celulares a través de las PM.

10. APÉNDICES

APÉNDICE I

PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LOS ENSAYOS DE VIABILIDAD

Para estos ensayos se hicieron ANOVAs, en donde se comparó los porcentajes de viabilidad celular de las células CHO, CHO-RS y RAW expuestas a concentraciones crecientes de LDL-ox-PM (2.5-40 µg/ml), o bien a 20 µg/ml de LDL-ox-PM en presencia de 40 µg/cm² de PM₁₀, con respecto a su respectivo control (células sin ningún tratamiento). Para estos ensayos las hipótesis a probar fueron:

H₀: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7$

H₁: al menos una μ es diferente

El estadístico de prueba es "F", el nivel de significancia $\alpha=0.05$

Los valores críticos son:

Para CHO: $F_{tab}(5, 12 \text{ gl}; \alpha=0.05) = 3.11$

Para CHO-RS y RAW : $F_{tab}(6, 14 \text{ gl}; \alpha=0.05) = 2.85$

Por lo tanto, se rechaza H₀ si el valor de la F_{cal} es mayor que las F_{tab} , para cada caso.

ANOVA para CHO a 37°C

Viabilidad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	101.117	5	20.223	.194	.959
Within Groups	1252.619	12	104.385		
Total	1353.737	17			

Cuadro 2. ANOVA para los ensayos de viabilidad de las células CHO expuestas a concentraciones crecientes de LDL-ox-PM (2.5-40 µg/ml) durante 4 h a 37°C. Como la $F_{cal}=0.194$ es menor que la $F_{tab}(5, 12 \text{ gl}; \alpha=0.05)=3.11$; asimismo $p>0.05$, aceptamos H₀ y por tanto podemos decir que la disminución en la viabilidad de estas células no es significativa.

ANOVA para CHO-RS a 37°C

Viabilidad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	125.774	6	20.962	.511	.790
Within Groups	574.161	14	41.011		
Total	699.935	20			

Cuadro 3. ANOVA para los ensayos de viabilidad de las células CHO-RS expuestas a concentraciones crecientes de LDL-ox-PM (2.5-40 µg/ml) o bien a 20 µg/ml de LDL-ox-PM en presencia de 40 µg/cm² de PM₁₀ durante 4 h a 37°C. Como la $F_{cal}=0.511$ es menor que la $F_{tab}(6, 14 \text{ gl}; \alpha=0.05)=2.85$; asimismo $p>0.05$, aceptamos H₀ y por tanto podemos decir que la disminución en la viabilidad de estas células no es significativa.

ANOVA para RAW a 37°C

Viabilidad					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	75.796	6	12.633	.238	.957
Within Groups	744.479	14	53.177		
Total	820.276	20			

Cuadro 4. ANOVA para los ensayos de viabilidad de las células RAW expuestas a concentraciones crecientes de LDL-ox-PM (2.5-40 µg/ml) o bien a 20 µg/ml de LDL-ox-PM en presencia de 40 µg/cm² de PM₁₀ durante 4 h a 37°C. Como la $F_{cal}=0.238$ es menor que la $F_{tab}(6, 14 \text{ gl}; \alpha=0.05)=2.85$; asimismo $p>0.05$, aceptamos H₀ y por tanto podemos decir que la disminución en la viabilidad de estas células no es significativa.

APÉNDICE II

DISEÑO DE UN MODELO ESTADÍSTICO PARA LOS ENSAYOS DE UNIÓN E INTERNALIZACIÓN DE LDL-ox-PM

En este estudio se obtuvieron datos de los niveles de unión/internalización de LDL-ox-PM (expresados en unidades relativas de fluorescencia) de acuerdo a las diferentes concentraciones de LDL-ox-PM usadas (0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox), y de acuerdo al tipo celular (CHO, CHO-RS y RAW). Con base a los datos obtenidos, se quiso dar respuesta a las siguientes preguntas:

- 1) ¿Los niveles de unión/internalización varían según la concentración de LDL-ox?
- 2) ¿Los niveles de unión/internalización difieren dependiendo de la línea celular?
- 3) ¿Existe interacción entre la concentración de LDL-ox y la línea celular?

Por lo que, para el análisis estadístico de estos resultados se decidió realizar Pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) factorial.

En un ANOVA factorial es posible estudiar simultáneamente los efectos de dos o más variables. Cada una de las variables de interés reciben el nombre de *factores*, mientras que a las diferentes categorías de cada uno de los factores se les conocen como *niveles*. En un experimento factorial no solo es posible estudiar los efectos de factores individuales, sino también, la interacción entre los factores.

En este estudio hubo dos factores que afectaron la unión/internalización de LDL-ox-PM:

Factor A: concentraciones de LDL-ox-PM

Niveles del factor A: (6 niveles: 0, 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox)

Factor B: líneas celulares

Niveles del factor B: (3 niveles: CHO, CHO-RS y RAW)

Con ello, el modelo factorial propuesto fue el siguiente:

$$Y = \mu + \alpha + \beta + \varepsilon$$

En donde:

Y= niveles de unión/internalización de LDL-ox-PM

μ = constante

α = efecto debido a las concentraciones de LDL-ox-PM

β = efecto debido al tipo celular

$\alpha\beta$ = efecto debido a la interacción de α y β

ε = efecto del error experimental

Las Hipótesis a probar fueron:

a) $H_0: \alpha_1=\alpha_2=\alpha_3=\alpha_4=\alpha_5=\alpha_6=0$

H_1 : No todas las $\alpha_i=0$

b) $H_0: \beta_1=\beta_2=\beta_3=0$

H_1 : No todas las $\beta_j=0$

c) H_0 : Todas las $(\alpha\beta)_{ij}=0$

H_1 : No Todas las $(\alpha\beta)_{ij}=0$

Sea $\alpha=0.05$

APÉNDICE III

PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LOS ENSAYOS DE UNIÓN DE LDL-ox-PM

Estadísticos Descriptivos

Dependent Variable: Fluorescencia transf squ

[LDL]	Tipo cel	Mean	Std. Deviation	N
2.5	CHO-RS	1.3152	.45343	3
	CHO	1.0992	.33006	3
	RAW	.9512	.15132	3
	Total	1.1218	.33089	9
5.0	CHO-RS	2.0007	.31745	3
	CHO	1.6389	.12631	3
	RAW	1.3479	.32925	3
	Total	1.6625	.36946	9
10.0	CHO-RS	2.4791	.43220	3
	CHO	1.7794	.53454	3
	RAW	1.6822	.25355	3
	Total	1.9802	.52531	9
20.0	CHO-RS	3.2212	.19320	3
	CHO	2.2514	.30186	3
	RAW	2.0845	.27773	3
	Total	2.5190	.57788	9
40.0	CHO-RS	3.7422	.21653	3
	CHO	2.4274	.50671	3
	RAW	2.7243	.13516	3
	Total	2.9646	.66114	9
Total	CHO-RS	2.5517	.93599	15
	CHO	1.8392	.58789	15
	RAW	1.7580	.66426	15
	Total	2.0496	.81186	45

Cuadro 5. Estadísticos descriptivos (Media y Desviación Estándar) de tres experimentos independientes para los ensayos de unión de diferentes concentraciones de LDL-ox-PM, en tres líneas celulares: CHO, CHO-RS y RAW.

ANOVA factorial para los ensayos de unión de LDL-ox-PM

Una de las condiciones para poder aplicar una prueba de ANOVA, es que la variabilidad entre las muestras debe ser similar, por lo que para probar esta condición se realizó la prueba de Levene.

Algunos datos fueron transformados ($\sqrt{\quad}$) antes de hacer las pruebas de ANOVA, para satisfacer la condición de igualdad de varianzas en todas las replicas.

Dependent Variable: Fluorescencia transf_squ

F	df1	df2	Sig.
1.385	14	30	.220

Cuadro 6. Prueba de Levene, que indica que la variabilidad entre los grupos es similar, puesto que P_{val} ($p= 0.220$) $> \alpha=0.05$, por lo que se puede aceptar H_0 , es decir que hay igualdad de varianzas.

Dependent Variable: Fluorescencia

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	548.600 ^a	14	39.186	21.086	.000
Intercept	1056.540	1	1056.540	568.527	.000
LDL	346.283	4	86.571	46.584	.000
Tipo_cel	139.043	2	69.522	37.410	.000
LDL * Tipo_cel	63.273	8	7.909	4.256	.002
Error	55.751	30	1.858		
Total	1660.891	45			
Corrected Total	604.351	44			

Cuadro 7. ANOVA factorial para los ensayos de Unión de LDL-ox-PM, muestra que la unión de LDL-ox se debió al efecto de la concentración de LDL [LDL] ($p < 0.05$), del tipo celular ($p < 0.05$), así como al efecto de la interacción entre ambos factores (LDL*Tipo celular) ($p < 0.05$).

Dado que en el ANOVA factorial ($p < 0.05$) para α , β y $\alpha\beta$, se rechaza H_0 para cada uno de estos factores. Cuando se rechaza $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = \alpha_5 = \alpha_6$, se concluye que existen diferencias en la unión de LDL-ox-PM entre los niveles de A, es decir, entre las concentraciones de LDL-ox-PM. De manera análoga, cuando se rechaza $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$, se concluye que existen diferencias en la unión de LDL-ox-PM entre los niveles de B, es decir, entre las líneas celulares usadas. Cuando se rechaza $H_0: \text{Todas las } (\alpha\beta)_j = 0$, se concluye que los factores A y B interactúan, es decir, diferentes combinaciones de los niveles de los dos factores producen diferentes efectos.

Con estos resultados, decidimos realizar por un lado Pruebas de Comparación Múltiple, en específico se aplicaron Pruebas de Scheffe, con el fin de hallar las diferencias dentro de cada uno de los factores; por otro lado, se realizaron Contrastes Ortogonales con el fin de hallar las diferencias ocurridas entre algunas de las posibles interacciones.

Pruebas de comparación múltiple para la concentración de LDL: Prueba de Scheffe

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Fluorescencia_transf_squ

Scheffe

(I) [LDL]	(J) [LDL]	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2.5	5.0	-.5406*	.15525	.033	-1.0498	-.0314
	10.0	-.8584*	.15525	.000	-1.3676	-.3492
	20.0	-1.3972*	.15525	.000	-1.9064	-.8880
	40.0	-1.8428*	.15525	.000	-2.3520	-1.3335
5.0	2.5	.5406*	.15525	.033	.0314	1.0498
	10.0	-.3178	.15525	.399	-.8270	.1915
	20.0	-.8566*	.15525	.000	-1.3658	-.3474
	40.0	-1.3021*	.15525	.000	-1.8114	-.7929
10.0	2.5	.8584*	.15525	.000	.3492	1.3676
	5.0	.3178	.15525	.399	-.1915	.8270
	20.0	-.5388*	.15525	.034	-1.0480	-.0296
	40.0	-.9844*	.15525	.000	-1.4936	-.4752
20.0	2.5	1.3972*	.15525	.000	.8880	1.9064
	5.0	.8566*	.15525	.000	.3474	1.3658
	10.0	.5388*	.15525	.034	.0296	1.0480
	40.0	-.4456	.15525	.111	-.9548	.0637
40.0	2.5	1.8428*	.15525	.000	1.3335	2.3520
	5.0	1.3021*	.15525	.000	.7929	1.8114
	10.0	.9844*	.15525	.000	.4752	1.4936
	20.0	.4456	.15525	.111	-.0637	.9548

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Cuadro 8. Prueba de Scheffe, esta prueba muestra que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los niveles de unión de LDL-ox-PM según la concentración usada. Estas diferencias se hallaron a partir de la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ proteína LDL con respecto a la concentración de LDL-ox-PM más baja (2.5 $\mu\text{g/ml}$ proteína LDL), y por tanto con respecto al control (sin LDL-ox-PM).

Pruebas de comparación múltiple para el tipo celular: Prueba de Scheffe

Scheffe

(I) Tipo_cel	(J) Tipo_cel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CHO-RS	CHO	.7124*	.12025	.000	.4027	1.0221
	RAW	.7936*	.12025	.000	.4840	1.1033
CHO	CHO-RS	-.7124*	.12025	.000	-1.0221	-.4027
	RAW	.0812	.12025	.797	-.2284	.3909
RAW	CHO-RS	-.7936*	.12025	.000	-1.1033	-.4840
	CHO	-.0812	.12025	.797	-.3909	.2284

Cuadro 9. Prueba de Scheffe, aplicada para determinar donde se hallaban las diferencias en los niveles de unión de LDL-ox entre las diferentes líneas celulares usadas. Esta prueba muestra que hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión de LDL-ox-PM entre las células CHO-RS y CHO ($*p < 0.05$) y entre las células CHO-RS y RAW ($*p < 0.05$); sin embargo no hubo diferencias entre las células CHO y RAW.

Contrastes Ortogonales

Estas pruebas se hicieron para determinar si hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión de LDL-ox-PM según la concentración de LDL usadas y de acuerdo al tipo celular, es decir de acuerdo a la interacción entre ambos factores (LDL*tipo celular). El cuadro 10 muestra los contrastes realizados, para los ensayos de unión de LDL-ox-PM.

En el contraste 1, se evaluó las diferencias entre las células CHO y las células RAW en todas las concentraciones de LDL-ox usadas, con este contraste se confirma que no hay diferencias en los niveles de unión de LDL-ox entre estas dos líneas celulares (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05), por lo que en los demás contrastes se compararon a las células CHO-RS contra estas dos líneas celulares (CHO y RAW para las cuales estadísticamente no hay diferencias).

En el contraste 2 y 3 se evaluaron las concentraciones 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox respectivamente, de la línea celular CHO-RS con respecto a las líneas celulares CHO y RAW, y no se hallaron diferencias significativas (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión para las concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox entre las células CHO-RS con respecto a las células CHO y RAW. (Contrastes 4-6, en donde la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

El contraste 7 muestra que hay diferencias en la unión de LDL-ox entre las células CHO y CHO-RS. Además, el contraste 8 muestra que también hay diferencias entre las células RAW y CHO-RS (la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

Los contrastes 9 y 10 muestran que no hay diferencias en los niveles de unión de LDL-ox para las concentraciones de 2.5 y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox respectivamente, de la línea celular CHO-RS con respecto a la línea celular CHO (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05). Pero sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión para las concentraciones de 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox entre las células CHO-RS con respecto a las células CHO. (Contrastes 11-13, en donde la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

Nombre de tratamientos y totales																					
# Contraste	CHO ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					RAW ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					CHO-RS ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					Q= $\sum c_i Y_i$ *	r $\sum c_i^2$	SC(Q)= Q ² /r $\sum c_i^2$	CM error	Fcal= SC Q/SC error	F 1, 30 gl; (0.05)
	2.5	5	10	20	40	2.5	5	10	20	40	2.5	5	10	20	40						
1	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	0	0	0	0	0	1.2189	30	0.050	0.108	0.459	4.17
2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-2	0	0	0	0	-1.7398	18	0.168		1.557	
3	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-2	0	0	0	-3.044	18	0.515		4.766 ★	
4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-2	0	0	-4.4896	18	1.120		10.369 ★	
5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-2	0	-6.3194	18	2.219		20.543 ★	
6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-2	-6.9983	18	2.721		25.194 ★	
7	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-11.905	30	4.724		43.744 ★	
8	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-10.6861	30	3.806		35.245 ★	
9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-0.6479	6	0.070		0.648	
10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-1.0855	6	0.196		1.818	
11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-2.0991	6	0.734		6.800 ★	
12	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	-2.9092	6	1.411		13.061 ★	
13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-3.9444	6	2.593		24.010 ★	
Σ	4	4	4	4	4	1	1	1	1	1	-5	-5	-5	-5	-5						

Cuadro 10. Contrastes ortogonales realizados para determinar las diferencias en los niveles de unión entre las diferentes concentraciones de LDL-ox-PM en las diferentes líneas celulares (CHO, RAW y CHO-RS). (* $p < 0.05$) Diferencias estadísticamente significativas.

APÉNDICE IV

PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LOS ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN DE LDL-ox-PM

Estadísticos descriptivos

Dependent Variable: Fluorescencia Transf SQRT

[LDL]	Tipo cel	Mean	Std. Deviation	N
2.5	CHO-RS	1.4135	.26147	3
	CHO	1.5024	.76503	3
	RAW	1.8059	.81519	3
	Total	1.5740	.60108	9
5.0	CHO-RS	2.7369	.32869	3
	CHO	1.9345	.22900	3
	RAW	2.5771	.36496	3
	Total	2.4161	.45684	9
10.0	CHO-RS	3.8418	1.16156	3
	CHO	2.7715	1.10682	3
	RAW	3.5554	.60689	3
	Total	3.3896	.98283	9
20.0	CHO-RS	4.7487	1.01136	3
	CHO	3.2463	.27897	3
	RAW	4.9968	.71258	3
	Total	4.3306	1.03682	9
40.0	CHO-RS	6.5185	1.54367	3
	CHO	2.8473	.33568	3
	RAW	5.8125	1.51826	3
	Total	5.0594	2.01150	9
Total	CHO-RS	3.8519	1.98520	15
	CHO	2.4604	.85697	15
	RAW	3.7495	1.71050	15
	Total	3.3539	1.68186	45

Cuadro 11. Estadísticos descriptivos (Media y Desviación Estándar) de tres experimentos independientes para los ensayos de internalización de diferentes concentraciones de LDL-ox por PM, en tres líneas celulares: CHO, CHO-RS y RAW

ANOVA factorial para los ensayos de internalización de LDL-ox-PM

Una de las condiciones para poder aplicar una prueba de ANOVA, es que la variabilidad entre las muestras debe ser similar, por lo que para probar esta condición se realiza la prueba de Levene.

Dependent Variable: Fluorescencia Transf SQRT

F	df1	df2	Sig.
2.286	14	30	.028

Cuadro 12. Prueba de Levene que indica que hay variabilidad entre los grupos, la Pval ($p=0.028$)
 $\alpha=0.05$.

Dependent Variable: Fluorescencia Transf SQRT

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	102.533 ^a	14	7.324	10.020	.000
Intercept	506.200	1	506.200	692.562	.000
LDL	71.204	4	17.801	24.355	.000
Tipo_cel	18.043	2	9.021	12.343	.000
LDL * Tipo_cel	13.286	8	1.661	2.272	.049
Error	21.927	30	.731		
Total	630.660	45			
Corrected Total	124.460	44			

Cuadro 13. ANOVA factorial para los ensayos de internalización de LDL-ox-PM, muestra que la internalización de LDL-ox-PM se debió al efecto de la concentración de LDL [LDL] ($p < 0.05$), al efecto del tipo celular ($p < 0.05$), así como al efecto de la interacción entre ambos factores (LDL*Tipo celular) ($p < 0.05$).

Dado que en el ANOVA factorial ($p < 0.05$) para α , β y $\alpha\beta$, se rechaza H_0 para cada uno de estos factores. Cuando se rechaza $H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = \alpha_5 = \alpha_6$, se concluye que existen diferencias en la internalización de LDL-ox-PM entre los niveles de A, es decir, entre las concentraciones de LDL-ox-PM. De manera análoga, cuando se rechaza $H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$, se concluye que existen diferencias en la internalización de LDL-ox-PM entre los niveles de B, es decir, entre las líneas celulares usadas. Cuando se rechaza $H_0: (\alpha\beta)_j \neq 0$, se concluye que los factores A y B interactúan, es decir, diferentes combinaciones de los niveles de los dos factores producen diferentes efectos.

Con estos resultados, decidimos realizar por un lado Pruebas de Comparación Múltiple, en específico se aplicaron Pruebas de Scheffe, con el fin de hallar las diferencias dentro de cada uno de los factores; por otro lado, se realizaron Contrastes Ortogonales con el fin de hallar las diferencias ocurridas entre algunas de las posibles interacciones.

Pruebas de comparación múltiple para la concentración de LDL: Prueba de Scheffe

Scheffe

(I) [LDL]	(J) [LDL]	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
2.5	5.0	-.8422	.40302	.378	-2.1641	.4797
	10.0	-1.8156*	.40302	.003	-3.1375	-.4937
	20.0	-2.7566*	.40302	.000	-4.0785	-1.4347
	40.0	-3.4855*	.40302	.000	-4.8074	-2.1635
5.0	2.5	.8422	.40302	.378	-.4797	2.1641
	10.0	-.9734	.40302	.239	-2.2953	.3485
	20.0	-1.9144*	.40302	.002	-3.2363	-.5925
	40.0	-2.6433*	.40302	.000	-3.9652	-1.3214
10.0	2.5	1.8156*	.40302	.003	.4937	3.1375
	5.0	.9734	.40302	.239	-.3485	2.2953
	20.0	-.9410	.40302	.270	-2.2629	.3809
	40.0	-1.6699*	.40302	.007	-2.9918	-.3479
20.0	2.5	2.7566*	.40302	.000	1.4347	4.0785
	5.0	1.9144*	.40302	.002	.5925	3.2363
	10.0	.9410	.40302	.270	-.3809	2.2629
	40.0	-.7288	.40302	.524	-2.0508	.5931
40.0	2.5	3.4855*	.40302	.000	2.1635	4.8074
	5.0	2.6433*	.40302	.000	1.3214	3.9652
	10.0	1.6699*	.40302	.007	.3479	2.9918
	20.0	.7288	.40302	.524	-.5931	2.0508

Cuadro 14. Prueba de Scheffe, aplicada para determinar donde se hallaban las diferencias entre las diferentes dosis usadas de LDL-ox. Esta prueba nos muestra que hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión de LDL-ox a partir de la concentración de 10 µg/µl de LDL-ox (*p<0.05). Sin embargo, esta prueba no nos muestra a partir de que concentración existen diferencias en los niveles de unión entre las diferentes líneas celulares; por lo que para detectar estas diferencias se hicieron Contrastes Ortogonales.

Pruebas de comparación múltiple para el tipo celular: Prueba de Scheffe

Scheffe

(I) Tipo_cel	(J) Tipo_cel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CHO-RS	CHO	1.3915*	.31218	.000	.5876	2.1954
	RAW	.1024	.31218	.948	-.7016	.9063
CHO	CHO-RS	-1.3915*	.31218	.000	-2.1954	-.5876
	RAW	-1.2891*	.31218	.001	-2.0931	-.4852
RAW	CHO-RS	-.1024	.31218	.948	-.9063	.7016
	CHO	1.2891*	.31218	.001	.4852	2.0931

Cuadro 15. Prueba de Scheffe, aplicada para determinar donde se hallaban las diferencias en los niveles de internalización de LDL-ox entre las diferentes líneas celulares usadas. Los niveles de internalización de LDL-ox por PM son estadísticamente diferentes entre células CHO-RS y CHO (*p=0.000<0.05) y entre las células CHO y RAW (*p=0.001<0.05), pero no hay diferencias estadísticamente significativas en los niveles de internalización de LDL-ox entre las células CHO-RS y RAW (p=0.948).

Contrastes Ortogonales

Estas pruebas se hicieron para determinar si hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de internalización de LDL-ox-PM según la concentración de LDL usadas y de acuerdo al tipo celular, es decir de acuerdo a la interacción entre ambos factores (LDL*tipo celular). El cuadro 16 muestra cada uno de los contrastes realizados.

En el contraste 1, se evaluó si hay diferencias entre las células RAW y las células CHO-RS en todas las concentraciones de LDL-ox usadas, con este contraste se confirma que no hay diferencias en los niveles de unión de LDL-ox entre estas dos líneas celulares (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05), por lo que en los demás contrastes se compararon a las células CHO-RS y RAW contra las células CHO.

En el contraste 2 se evaluó las diferencias entre las células CHO y las células CHO-RS en todas las concentraciones de LDL-ox usadas, con este contraste se confirma hay diferencias en los niveles de unión de LDL-ox entre estas dos líneas celulares (la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

En los contrastes 3, 4 y 5 se evaluaron las concentraciones de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox respectivamente, de la línea celular CHO-RS y RAW con respecto a las células CHO, y no se hallaron diferencias significativas (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05). Sin embargo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión para las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox entre las células CHO-RS y RAW con respecto a las células CHO. (Contrastes 6-7, en donde la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

En los contrastes 8, 9 y 10 se evaluaron las concentraciones de 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox respectivamente, solamente de la línea celular CHO-RS con respecto a las células CHO, y no se hallaron diferencias significativas (la F calculada es $<$ a la F 1,30 gl, 0.05). Sin embargo, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de unión para las concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox entre las células CHO-RS con respecto a las células CHO. (Contrastes 11 y 12, en donde la F calculada es $>$ a la F 1,30 gl, 0.05).

Nombre de tratamientos y totales																					
#	CHO ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					RAW ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					CHO-RS ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LDL-ox-PM)					Q= $\sum c_i y_i$	$r \sum c_i^2$	SC(Q)= $Q^2/r \sum c_i^2$	CM error	Fcal= SC Q/SC error	F 1, 30 gl (0.05)
	Contraste	2.5	5	10	20	40	2.5	5	10	20	40	2.5	5	10	20						
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1.52	30	0.077	0.731	0.105	4.14
2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	-1	-1	-1	-1	-1	-20.87	30	14.519		19.861	
3	2	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-0.63	18	0.022		0.030	
4	0	2	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	0	-4.36	18	1.056		1.445	
5	0	0	2	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	0	-5.56	18	1.717		2.349	
6	0	0	0	2	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	0	-9.76	18	5.292		7.240 ★	
7	0	0	0	0	2	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	-1	-19.91	18	22.023		30.127 ★	
8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0	0.28	6	0.013		0.018	
9	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	-2.42	6	0.976		1.335	
10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	-3.21	6	1.717		2.349	
11	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	-4.51	6	3.390		4.638 ★	
12	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-11.01	6	20.203		27.638 ★	
Σ	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	-4	-4	-4	-4	-4						

Cuadro 16. Contrastes ortogonales realizados para determinar las diferencias en los niveles de internalización entre las diferentes concentraciones de LDL-ox-PM en las diferentes líneas celulares (CHO, RAW y CHO-RS). (* $p < 0.05$) Diferencias estadísticamente significativas.

APÉNDICE V

Pruebas estadísticas aplicadas para los ensayos de competencia entre LDL-ox-PM y PM por el RS que presentan las células RAW y las células CHO-RS y para los ensayos que determinaron si las PM afectaban a otros receptores celulares, en los que se incubaron a las células con LDL-nat y PM.

En estos ensayos se midió la fluorescencia de las LDL-Dil para determinar los niveles de LDL que habían sido unidas e internalizadas por las células. Los datos se expresaron en unidades relativas de fluorescencia, en donde a los valores de fluorescencia sin PM se les dio el valor arbitrario de 1, y de ahí se sacó la relación de los niveles de fluorescencia cuando los cultivos celulares fueron incubados con PM, de tal forma que fuera perceptible las veces que disminuyó la fluorescencia en presencia de PM.

Para estos ensayos se aplicaron pruebas de t de student, de 1 cola.

Paso I. Planteamiento de la hipótesis nula y de la hipótesis alternativa.

Ho: No existe una diferencia significativa entre los niveles de unión/internalización de LDLox y/o LDLnat cuando las células son incubadas sin PM y cuando las células son incubadas con PM.

H1: Existe una diferencia significativa entre los niveles de unión/internalización de LDLox y/o LDLnat cuando las células son incubadas sin PM y cuando las células son incubadas con PM.

O bien,

Ho: \bar{x} de unión/internalización con PM = \bar{x} de unión/internalización sin PM

Hi: \bar{x} de unión/internalización con PM \leq \bar{x} de unión/internalización sin PM

Paso II. Selección de un nivel de significancia

$\alpha=0.05$, prueba de 1 cola.

Paso III. Estadístico de prueba

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

Donde:

x: media de la muestra

μ_0 : constante o valor de referencia

s: desviación estándar de la muestra

n: tamaño de la muestra

Paso IV. Se formula la regla de decisión

Se hallan los valores críticos de t ($t^{\alpha=0.05,2}$)

La prueba de t es de una cola, con 2 grados de libertad y una significancia de $\alpha=0.05$.

Según estos datos, el valor crítico de "t" es: $t=2.920$.

Como se trata de una prueba de una cola y la región de rechazo está en la cola izquierda, el valor crítico es negativo. Así que, la regla de decisión es rechazar H_0 si el valor de t es menor que -2.920. Esto se muestra de manera esquemática en el siguiente diagrama.



Paso V. Se calcula "t" y se llega a una decisión.

Ensayos de competencia a 4°C de LDL ox y PM en células RAW

$$t = \frac{0.7607 - 1}{0.1765/\sqrt{3}} = -2.3484$$

, No se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 4°C de LDL nat y PM en células RAW

$$t = \frac{0.5468 - 1}{0.1882/\sqrt{3}} = -4.1693$$

, Se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 37°C de LDL ox y PM en células RAW

$$t = \frac{0.6675 - 1}{0.0752/\sqrt{3}} = -7.6612$$

, Se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 37°C de LDL nat y PM en células RAW

$$t = \frac{0.4592 - 1}{0.0752/\sqrt{3}} = -12.4608$$

, Se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 4°C de LDL ox y PM en células CHO-RS

$$t = \frac{0.4718 - 1}{0.0778/\sqrt{3}} = -11.7639$$

, Se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 4°C de LDL nat y PM en células CHO-RS

$$t = \frac{0.2404 - 1}{0.0471/\sqrt{3}} = -27.9265$$

, Se rechaza Ho

Ensayos de competencia a 37°C de LDL ox y PM en células CHO-RS

$$t = \frac{0.3099 - 1}{0.0945/\sqrt{3}} = -12.6415$$

, Se rechaza Ho

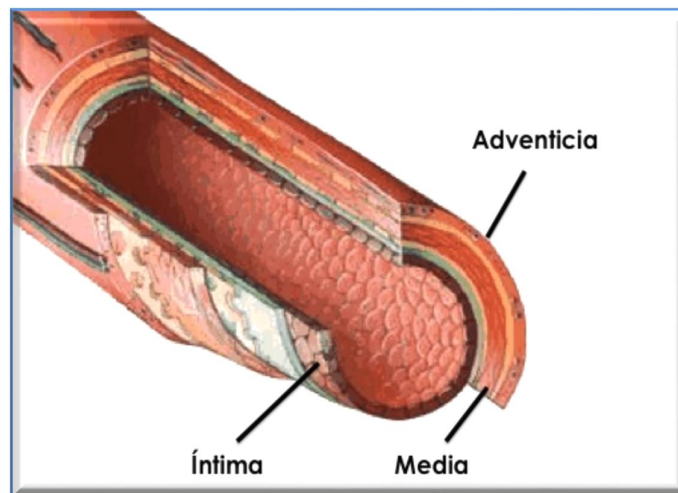
Ensayos de competencia a 37°C de LDL nat y PM en células CHO-RS

$$t = \frac{0.1654 - 1}{0.0477/\sqrt{3}} = -30.2391$$

, Se rechaza Ho

11. GLOSARIO

Arteria. Cada uno de los vasos que llevan la sangre desde el corazón a las demás partes del cuerpo. Las paredes de las arterias normales consisten de tres capas concéntricas bien definidas, que rodean el lumen de la arteria. Cada capa tiene una composición celular distintiva. La **íntima** es la capa adyacente inmediata al lumen, está conformada principalmente por una sola capa de células endoteliales que conforman una barrera entre el flujo sanguíneo y el estroma de la pared arterial. Estas células se encuentran sobre una membrana basal conformada de matriz extracelular y proteoglicanos. La capa intermedia, es conocida como **media** y consiste principalmente de células de músculo liso arregladas en capas. La **adventicia** es la capa más externa y está formada de una matriz laxa de elastina, células de músculo liso, fibroblastos y colágena. Cada una de estas capas está demarcada por capas concéntricas de elastina.



Apoplejía. Daño cerebral provocado por la interrupción del suministro de sangre al cerebro.

Citocinas. Son una clase de mensajero químico que regulan la homeostasis y la proliferación celular. Las citocinas actúan por medio de receptores de citocina específicos sobre las células en las cuales influyen.

Diámetro aerodinámico. Se define como el diámetro de una partícula esférica con un densidad de 1g/cm^3 , que posee la misma velocidad de sedimentación que la partícula de interés, es decir que tiene a misma velocidad final debida a la fuerza gravitatoria en el aire en calma, que la que tiene la partícula de interés, bajo las condiciones existentes de temperatura, presión y humedad relativas.

Estría grasa. Lesión aterosclerótica temprana que contiene principalmente macrófagos cargados con lípidos (células espumosas), y que posteriormente puede desarrollarse hacia lesiones más graves conocidas como placa aterosclerótica.

Endotoxina. Elemento de la pared celular de las bacterias Gram negativas, es un potente inductor de citocinas y por tanto de inflamación. Se ha reportado que media algunos de los efectos proinflamatorios de las PM.

Etiología. Estudia la causa que determina la aparición de una enfermedad.

Estrés oxidante. Desbalance entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los agentes oxidantes, que potencialmente llevan a daño.

Fisiopatología. Estudio de los mecanismos patogénicos que determinan la aparición de la enfermedad.

Interleucina (IL). Es un término genérico que se usa para referirse a citocinas producidas por los linfocitos

Isquemia. Disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo de una parte del cuerpo, producida por una alteración normal o patológica de la arteria o arterias aferentes a ella.

Morbilidad. Frecuencia con que se produce una enfermedad o anomalía en una determina población.

Mortalidad. Número de muertes por unidad de población en cualquier región, grupo de edad o enfermedad específica, generalmente se expresa como muertes por 1000, por 10 000 o por 100 000 habitantes. Tasa de muertes producidas en una población durante un tiempo dado, en general o por una causa determinada.

Quelación. Remoción de iones inorgánicos mediante un agente químico, el cual capta iones metálicos como Mg, Ca, Na, K, Li, etc., del complejo donde están adheridos.

Quimiocina. Pequeñas proteínas quimiotrayentes que estimulan la migración y activación de las células, en especial de las células fagocíticas y de los linfocitos. Tienen una participación fundamental en las respuestas inflamatorias.

Radicales libres. Especies químicas capaces de existir de forma independiente, contienen uno o más electrones desapareados. Ejemplos de radicales libres en sistemas biológicos: O_2^- , OH, NO.

Receptor. Macromolécula alostérica, usualmente asociada con un tipo celular particular, que une una sustancia química específica (usualmente secretada por otra célula); durante este proceso sufre un cambio conformacional definido que desencadena una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos dentro de la célula blanco.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Gaytán R, Mas-Oliva J. (2002). El receptor "pepenador" y su importancia en procesos amiloidóticos. *Gaceta Médica Mexicana*. 138(5): 445-459.
- Aguilar-Gaytán R, Mas-Oliva J. (2003). Oxidative stress impairs endocytosis of the scavenger receptor class A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 305(3): 510-517.
- Aguilar-Gaytán R. (2004). Análisis de la función endocítica y de la expresión del receptor pepenador o "scavenger" bajo condiciones de estrés oxidativo. Tesis de Doctorado. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I, Ponce de León-Rosales S, Osornio-Vargas AR. (2002). Biologic Effects in Vitro by PM10 from Three Different Zones of Mexico City. *Environmental Health Perspectives*. 110(7): 715-720.
- Alfaro-Moreno E, Nawrot TS, Nemmar A, Nemery B. (2007). Particulate matter in the environment: pulmonary and cardiovascular effects. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 13(2): 98-106.
- Alfaro-Moreno E, Torres V, Miranda J, Martínez L, García-Cuellar C, Nawrot TS, Vanaudenaerde B, Hoet P, Ramírez-López P, Rosas I, Nemery B, Osornio-Vargas AR. (2009). Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environmental Research*. 109(5): 528-535.
- Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Wei Gong K, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lulis AJ, Nel AE. (2008). Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. *Circulation Research*. 102(5): 589-596.
- Aviram M, Fuhrman B. (1998). LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: Role of prooxidants vs. antioxidants. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 188(1-2): 149-159.
- Baccarelli A, Zanobetti A, Martinelli I, Grilo P, Hou L, Giacomini S, Bonzine M, Lanzani M, Mannucci PM, Bertazzi PA, Schwartz J. (2007). Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostatics*. 5(2): 252-260.
- Beeson WL, Abbey DE, Knutsen SF. (1998). Long term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults. Results from the AHSMOG study. *Environmental Health Perspectives*. 106(12): 813-823.

- Björkerund B, Björkerund S. (1998). Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 16(3): 416-424.
- Brauer M, Avila-Casado C, Fortoul TI, Vedal S, Stevens B, Churg A. (2001). Air pollution and retained particles in the lung. *Environmental Health Perspectives* 109(10): 1039–1043.
- Brown MS, Goldstein JL. (1986). A Receptor-Mediated Pathways for cholesterol Homeostasis. *Science*. 232(4746): 34-47.
- Castillejos M, Borja-Aburto VH, Dockery DW, Gold DR, Loomis D. (2000). Coarse particles and mortality in Mexico City. *Inhalation Toxicology*. 12 (Suppl. 1): 61–72.
- Chen L, Nadziejko C. (2005). Effects of Subchronic Exposures to Concentrated Ambient Particles (CAPs) in Mice: CAPs Exacerbate Aortic Plaque Development in Hyperlipidemic Mice. *Inhalation Toxicology*. 17(4-5): 217-224.
- Chen B, Kan H. (2008). Air pollution and population health: a global challenge. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 13(2): 94 - 101.
- Chirino YI, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz MC, Segura-García Y, Rosas I, Pedraza-Chaverri J, García-Cuellar C. (2010). PM₁₀ impairs the antioxidant defense system and exacerbates oxidative stress driven cell death. *Toxicology Letters* 193(3): 209-216.
- Churg A, Brauer M, Avila-Casado MC, Fortoul TI, Wright JL. (2003). Chronic Exposure to High Levels of Particulate Air Pollution and Small Airway Remodeling. *Environmental Health Perspectives*. 111(5): 714-718.
- Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW, Jiang Z. (2009). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Sciences*. 5(5): 474-488.
- De Vizcaya-Ruiz A, Gutiérrez-Castillo ME, Uribe-Ramírez M, Cebrián ME, Mugica-Alvarez V, Sepúlveda J, Rosas I, Salinas E, García-Cuellar C, Martínez F, Alfaro-Moreno E, Torres-Flores V, Osornio-Vargas A, Sioutas C, Fine PM, Singh M, Geller MD, Kuhn T, Miguel AH, Eiguren-Fernandez A, Schiestl RH, Reliene R, Froines J. (2006). Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. *Atmospheric Environment*. 40: S538-S592.

- Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. (2005). Potential Role of Ultrafine Particles in Associations between Airborne Particles Mass and Cardiovascular Health. *Environmental Health Perspectives*. 113(8): 934-946.
- Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. (1999). Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 286(1-2): 191-205.
- Diociaiuti M, Balduzzi M, De Berardis B, Cattani G, Stacchini G, Ziemacki G, Marconi A, Paoletti L. (2001). The two PM_{2.5} (fine) and PM_{2.5-10} (coarse) fractions: evidence of different biological activity. *Environmental Research* 86(3):254-262.
- Dockery DW. (2001). Epidemiologic evidence of cardiovascular effects of particulate air pollution. *Environmental Health Perspectives*. 109 (Suppl 4): 483-486.
- Donaldson K, Brown DM, Mitchell C, Dineva M, Beswick PH, Gilmour P, MacNee W. (1997). Free radical activity of PM₁₀: iron-mediated generation of hydroxyl radicals. *Environmental Health Perspectives*. 105(Suppl 5): S1285-S1289.
- Donaldson K, MacNee W. (2001). Potential mechanisms of adverse pulmonary end cardiovascular effects of particulate air pollution (PM₁₀). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 203(5-6): 411-415.
- Donaldson K, Stone V, Seaton A, MacNee W. (2001). Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. *Environmental Health Perspectives*. 109 (Suppl. 4): 523-527
- Donaldson K, Stone V, Borm PJA, Jimenez L, Gilmour PS, Schins RPF, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W. (2003). Oxidative Stress and Calcium Signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radical Biology & Medicine*. 34(11): 1369-1382.
- EPA, 2009. <http://www.epa.gov>
- Englert N. (2004). Fine particles and human health- a review of epidemiological studies. *Toxicology Letters*. 149(1-3): 235-242.
- Furuyama A, Kanno S, Kobayashi T, Hirano S. (2009). Extrapulmonary translocation of intratracheally instilled fine and ultrafine particles via direct and alveolar macrophage-associated routes. *Archives of Toxicology*. 83(5): 429-437.
- Gallus S, Negri E, Boffetta P, McLaughlin JK, Bosetti C, La Vecchia C. (2008). European studies on long-term exposure to ambient particulate matter and lung cancer. *European Journal of Cancer Prevention*. 17(3): 191-194.

- García-Cuellar C, Alfaro-Moreno E, Martínez-Romero F, Ponce de León-Rosales S, Rosas I, Pérez Cárdenas E, Osornio-Vargas AR. (2002). DNA Damage Induced by PM10 from Different Zones of Mexico City. *Annals Occupational Hygiene* 46(1): 425-428.
- Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. (2003). Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *American Journal of Physiology Lung, Cell and Molecular Physiology* 284(3): L533–L540.
- Glass CK, Witztum JL. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 104(4): 503-516.
- Goldsmith CA, Imrich A, Danaee H, Ning YY, Kobzik L. (1998). Analysis of air pollution particulate-mediated oxidant stress in alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 54 (7): 529–545.
- Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. (1979). Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*. 279(5715): 679-684.
- Greaves DR, Gordon S. (2005). Recent insight into the biology of macrophage scavenger receptors. *Journal of Lipid Research*. 46(1): 11-20.
- Greaves DR, Gordon S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *Journal of Lipid Research*. 50: S282-S286.
- Halliwell B, Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57 (Suppl 5): 715S-725S.
- Hetland RB, Refsnes M, Myran T, Johansen BV, Uthus N, Schwarze PE. (2000). Mineral and/or metal content as critical determinants of particle-induced release of IL-6 and IL-8 from A549 cells. *Journal of Toxicology Environmental Health. Part A*. 60(1): 47–65.
- Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, Ohya T, Matsuura F, Tsukamoto K, Okamoto Y, Matsuyama A, Matsumoto K, Miyagawa J, Matsuzawa Y. (1999). Expression of Human Scavenger Receptor Class B Type I in Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages and Atherosclerotic Lesions. *Circulation Research*. 85(1):108-116.
- Hsiao WLW, Mo ZY, Fang M, Shi X, Wang F. (2000). Cytotoxicity of PM2.5 and PM2.5–10 ambient air pollutants assessed by the MTT and the comet assay. *Mutation Research* 471(1-2):45–55.

- Imrich A, Ning YY, Koziel H, Coull B, Kobzik L. (1999). Lipopolysaccharide priming amplifies lung macrophage tumor necrosis factor production in response to air particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 159(2): 117–124.
- INE, 2009. <http://www.ine.gob.mx>
- Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. (1986). Lipoprotein-receptor interactions. *Methods in Enzymology*. 129: 542-565.
- Jacobs L, Emmerechts J, Hoylaerts MF, Mathieu C, Hoet PH, Nemery B, Nawrot TS. (2011). Traffic Air Pollution and Oxidized LDL.
- Jimenez LA, Thompson J, Brown DA, Rahman I, Antonicelli F, Duffin R, Drost EM, Hay RT, Donaldson K, MacNee W. (2000). Activation of NF- κ B by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of I κ B degradation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 166(2): 101–110.
- Kampa M, Castanas E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution*. 151(2): 362-367.
- Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM. (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and risk of coronary heart disease: The Framingham study. *Annals of Internal Medicine* 74 (1): 1-12.
- Kulkarni N, Pierse N, Rushton L, Grigg J. (2006). Carbon in airway macrophages and lung function in children. *The New England Journal of Medicine*. 355(1): 21-30.
- Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN. (2005). Ambient Air pollution and Atherosclerosis in Los Angeles. *Environmental Health Perspectives*. 113(2): 201-206.
- Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. (2010). Oxidized LDL: Diversity, Patterns of Recognition, and Pathophysiology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 13(1): 39-75.
- Lewtas J. (1993). Complex mixtures of air pollutants: characterizing the cancer risk of polycyclic organic matter. *Environmental Health Perspectives*. 100: 211–218.
- Libby P. (2002). Atherosclerosis: The New View. *Scientific American*. 286(5): 45-55.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002). Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 105(9): 1135-1143.
- Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. (1980). Deposition, retention, and

clearance of inhaled particles. *British Journal of Industrial Medicine*. 37(4): 337–362.

- Lippmann M, Gordon T, Chen LC. (2005). Effects of Subchronic Exposures to Concentrated Ambient Particles (CAPs) in Mice. *Inhalation Toxicology*. 17(4-5): 177-187.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky L, Darnell J. (2009). *Biología Celular y Molecular*. 5ª ed., Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lusis AJ. (2000). Atherosclerosis. *Nature*. 407(6801): 233-241.
- Mahley RW, Inneraty TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research*. 25(12): 1277-1294.
- Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Fei Jiang N, Rochelle LG, Akley NJ, Dreher KL, Adler KB. (1997). The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Response of Airway Epithelium to Particulates. *Environmental Health perspectives*. 105(5): 1301-1307.
- Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Araújo-Zin W. (2010). Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter. *Cell Biology and Toxicology*. 26(5): 481-498.
- Mello AP, da Silva I, Abdalla DS, Damsceno NR. (2011). Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*. 215(2): 257-265.
- Molina LT, Kolb CE, de Foy B, Lamb BK, Brune WH, Jiménez JL, Ramos-Villegas R, Sarmiento J, Paramo-Figueroa VH, Cardenas B, Gutierrez-Avedoy V, and Molina MJ. (2007). Air quality in North American's most populous city-overview of the MCMA-2003 campaign. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 7: 2447-2473.
- Montiel-Dávalos A, Ibarra-Sánchez MJ, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, López-Marure R. (2010). Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. *Toxicology in Vitro*. 24(1): 135-141.
- Moon C, Becker S. (1999). Citotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicology and Appl Pharmacology*. 155(3): 245-252.

- Monn C, Fendt R, Koller T. (2002). Ambient PM10 extracts inhibit phagocytosis of defined inert model particles by alveolar macrophages. *Inhalation Toxicology*. 14(4): 369-385.
- Monn C, Naef R, Koller T. (2003). Reactions of macrophages exposed to particles <10 µm. *Environmental Research*. 91(1): 35-44.
- Moore KJ, Freeman MW. (2006). Scavenger Receptors in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 26(8): 1702-1711.
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S. (2005). Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*. 182(1): 1-15.
- Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. (1999). CD36, a Novel Receptor for Oxidized Low-Density Lipoproteins, Is Highly Expressed on Lipid-Laden Macrophages in Human Atherosclerotic Aorta. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 19(5): 1333-1339.
- Nelson D, Cox MM. (2001). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 3ª ed., Barcelona: Omega.
- Nemmar A, Vanbilloen H, Holyaerts MF, Hoet PH, Verbruggen A, Nemery B. (2001). Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 164(9): 1665-1668.
- Nemmar A, Hoet PHM, Vanbilloen H, Mortelmans, Nemery B. (2002). Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*. 105(): 411-414.
- Nemmar A, Holyaerts MF, Hoet PHM, Nemery B. (2004). Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicology Letters*. 149(1-3): 243-253.
- Nie J, Beyea J, Bonner MR, Han D, Vena JE, Rogerson P, Vito D, Muti P, Trevisan M, Edge SB, Freudenheim JL. (2007). Exposure to traffic emissions throughout life and risk of breast cancer: the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. *Cancer Causes Control*. 18(9): 947-955.
- Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, Millecchia L, Rao KM, Marvar PJ, Hubbs AJ, Castranova V, Boegehold MA. (2006). Systemic Microvascular Dysfunction and Inflammation after Pulmonary Particulate Matter Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 114(3): 412-419.
- Obot CJ, Morandi MT, Beebe TP, Hamilton RF, Holian A. (2002). Surface Components of Airborne Particulate Matter Induce Macrophage Apoptosis

through Scavenger Receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 184 (2): 98-106.

- Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Ponce de León- Rosales S, Miranda J, Rosas I. (2003). Pro-inflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico City Air Pollution Particulate Matter in Vitro Are Dependent on Particle Size and Composition. *Environmental Health Perspectives*. 111(10): 1289-1293.
- Peters A, Doring A, Wichmann H, Koenig W. (1997). Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality?. *Lancet* 349(9065): 1582-1587.
- Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. (2002). Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particle Air Pollution. *Journal of the American Medical Association*. 287(9): 1132-1141.
- Pope CA III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. (2004). Cardiovascular mortality and long term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 109(1): 71-77.
- Pope AC III (2007). Mortality effects on longer term exposures to fine particulate air pollution: review of recent epidemiological evidence. *Inhalation Toxicology*. 19 (Suppl. 1): 33-38.
- Pozzi R, De Berardis B, Paoletti L, Guastadisegni C. (2003). Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology* 183(1-3): 243-254.
- Rader DJ, Puré E. (2005). Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: Beyond the foam cell? *Cell Metabolism*. 1: 223-230.
- Ramsey SA, Gold ES, Aderem A. (2010). A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *European Molecular Biology Organization. Molecular Medicine*. 2(3): 79-89.
- Rosas-Pérez I, Serrano J, Alfaro-Moreno E, Baumgardner D, García-Cuellar C, Miranda Martín del Campo J, Raga GB, Castillejos M, Drucker Colín R, Osornio Vargas AR. (2007). Relations between PM₁₀ composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. *Chemosphere*. 67(6): 1218-1228.
- Samet JM, Dominici F, Coursac I, Zeger SL. (2000). Fine particulate air pollution and mortality in 20 US cities, 1987-1994. *The New England Journal of Medicine*. 343(24): 1742-1749.

- Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Morales-Bárcenas R, Gutiérrez-Ruiz C, Vázquez-López I, García-Cuellar C. (2009). DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM₁₀) of urban air pollutants. *Cancer Letters*. 278(2): 192-200.
- Schittmayer M, Birner-Gruenberger R. (2009). Functional proteomics in lipid research: Lipasas, lipid droplets and lipoproteins. *Journal of Proteomics*. 72(6): 1006-1018.
- Schwartz DA. (2001). Does inhalation of endotoxin cause asthma? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 163(2): 305–313
- Schwartz J, Norris G, Larson T, Sheppard L, Claiborne C, Koenig J. (1999). Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. *Environmental Health Perspectives*. 107(5): 339–342.
- Seaton A, Soutar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius R, Stout R. (1999). Particulate air pollution and the blood. *Thorax*. 54(): 1027-1032.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 150(1): 76-85.
- Sørensen M, Autrup H, Møller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S. (2003). Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutation Research*. 544(2-3): 255-271.
- Soukup JM, Ghio AJ, Becker S. (2000). Soluble components of Utah Valley particulate pollution alter alveolar macrophage function in vivo and in vitro. *Inhalation Toxicology*. 12(5): 401–414.
- Steinberg D. (1997). Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(34): 20963–20966,
- Stocker R, Keaney JF Jr. (2004). Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 84(4): 1381-1478.
- Suh HH, Bahadori T, Vallarino J, Spengler JD. (2000). Criteria Air Pollutants and Toxic Air Pollutants. *Environmental Health Perspectives*. 108(Suppl. 4): 625-633.
- Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. (2005). Long-term Air Pollution Exposure and Acceleration of Atherosclerosis and Vascular Inflammation in an Animal Model. *Journal of the American Medical Association*. 294(23): 3003-3010.

- Sun Q, Yue P, Kirk RI, Wang A, Moatti D, Jin X, Lu B, Schechter AD, Lippmann M, Gordon T, Chen LC, Rajagopalan S. (2008). Ambient Air Particulate Matter Exposure and Tissue Factor Expression in Atherosclerosis. *Inhalation Toxicology*. 20(2): 127-137.
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, et al. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*. 386(6622): 292-296.
- Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vicent R, van Eede SF. (2002). Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *Journal American Collage Cardiology*. 39(6): 935-942.
- Tao F, Gonzalez-Flecha B, Kobzik L. (2003). Reactive Oxygen Species in Pulmonary Inflammation by Ambient Particles. *Free Radical Biology & Medicine*. 35(4): 327-340.
- Terpstra V, Van Amersfoort ES, Van Velzen AG, Kuiper J, Van Berkel TJC. (2000). Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors. Function in Relation to Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(8): 1860-1872.
- Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. (2001). Cytokines Involved in the Systemic Inflammatory Response Induced by Exposure to Particulate Matter Air Pollutants (PM10). *American Journal Respiratory Critical and Care Medicine*. 164(): 826-830.
- Yatera K, Hsieh J, Hogg JC, Tranfield E, Susuki H, Shih CH, Behzad AR, Vicent R, van Eeden SF. (2008). Particulate matter air pollution exposure promotes recruitment of monocytes into atherosclerotic plaques. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294(2): H944-H953.
- Young IS, McEneny J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2(29): 358-362.
- Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. (2000). Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environmental Health Perspectives*. 108(11): 1071-1077.
- Zhang H, Yang Y, Stenbrecher UP. (1993). Structural Requirements for the Binding of Modified Proteins to the Scavenger Receptor of Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(8): 5535-5542.
- Zingg JM, Ricciarelli R, Azzi A. (2000). Scavenger Receptors and Modified Lipoproteins: Fatal Attractions? *IUBMB Life*. 49: 397-403.