



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Extractos orgánicos (PAHs) provenientes de humo
de leña y su impacto en el balance apoptosis/necrosis
en macrófagos THP-1”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

LUIS ALBERTO VAZQUEZ BOLAÑOS



MEXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: José Sullivan López González

VOCAL: Laura Carmona Salazar

SECRETARIO: María Isabel Sada Ovalle

1er SUPLENTE: Julio César Martínez Álvarez

2º. SUPLENTE: Mario Adán Moreno Eutimio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

ASESOR DEL TEMA: María Isabel Sada Ovalle

SUSTENTANTE: Luis Alberto Vázquez Bolaños

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
Índice de figuras.....	III
Lista de Abreviaturas.....	V
Introducción	1
Marco Teórico	3
Uso de biocombustibles a nivel mundial.....	3
Estadísticas en México.....	5
Generalidades de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs).....	6
Epidemiología asociada con la exposición a las partículas de humo de leña.....	9
Efectos inmunosupresores de las partículas de humo de leña.....	10
Respuesta de macrófagos alveolares a partículas contaminantes.....	11
Mitocondrias.....	13
Potencial de membrana mitocondrial.....	14
Muerte celular.....	16
Apoptosis.....	16
Necrosis.....	19
Respuesta inflamatoria ante la exposición a partículas contaminantes....	22
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos particulares	24
Materiales y métodos	25
a) Material biológico y reactivos.....	25
b) Cultivo celular.....	25
c) Diferenciación de monocitos a macrófagos.....	25
d) Exposición de macrófagos a extractos orgánicos.....	26
e) Medición del potencial de membrana mitocondrial.....	26

f) Estandarización de las condiciones experimentales para la medición de [ATP] extracelular.....	27
g) Cuantificación de [ATP] intra- y extracelular	28
h) Evaluación del tipo de muerte celular.....	28
i) Análisis de la muerte celular mediante la tinción con Anexina V y PI.....	29
j) Medición de la concentración de citocinas pro- inflamatorias.....	30
k) Análisis estadístico.....	31
Resultados	31
Discusión	45
Conclusiones	49
Perspectivas	50
Anexo I.....	51
ANEXO II.....	54
ANEXO III.....	56
REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

TÍTULO	PÁGINA
FIGURA 1. Exposición al humo de leña	3
FIGURA 2. Uso de biocombustibles sólidos en el mundo	4
FIGURA 3. Uso de biocombustibles sólidos en México	6
FIGURA 4. Estructuras químicas de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	7
FIGURA 5. Contenido de PAHs en la combustión de biomasa	8
FIGURA 6. Esquema de una mitocondria y sus compartimentos estructurales	14
FIGURA 7. Potencial de Membrana Mitocondrial	15
FIGURA 8. Vías de señalización de muerte celular activadas durante la apoptosis	18
FIGURA 9. Mecanismos que regulan la muerte celular por necrosis	21
FIGURA 10. Análisis del $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo	34
FIGURA 11. Pérdida del $\Delta\Psi_m$ en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos provenientes de humo de leña	35
FIGURA 12. Medición de la concentración de ATP en el medio extracelular de macrófagos THP-1 estimulados con concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS	37
FIGURA 13a. Liberación de ATP por los macrófagos THP-1 estimulados con extractos orgánicos	38
FIGURA 13b. Producción de ATP intracelular por los macrófagos THP-1 estimulados con los extractos orgánicos	38
FIGURA 14a. Muerte celular por apoptosis independiente de caspasas de los macrófagos THP-1	40
FIGURA 14b. Muerte celular por necrosis de los macrófagos THP-1	40

FIGURA 15a. Análisis por citometría de flujo de la tinción con Anexina V y Ioduro de Propidio de macrófagos THP-1	41
FIGURA 15b. Pérdida de la integridad de las membranas celular y nuclear de macrófagos THP-1	42
FIGURA 16a. Incremento en la producción de TNF- α en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos	44
FIGURA 16b. Ausencia de IFN- γ en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos	44
FIGURA 16c. Disminución en la producción de IL-1b en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos	44

ABREVIATURAS

AhR	Receptor aril- hidrocarburo*
AIF	Factor inductor de apoptosis*
ANOVA	Análisis de varianza
ASK1	Cinasa reguladora de la señal de apoptosis- 1*
ATP	Adenosin Tri- fosfato
BaP	Benzo[a]pireno
CD	Grupo de diferenciación*
CYP1A1	Polipéptido 1 de la subfamilia A de la familia 1 del citocromo P450*
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño*
dATP	desoxiadenosin Tri- fosfato
DEP	Partículas de Diesel*
dH ₂ O	Agua desionizada
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte*
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucleico*
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino- tetra- acético*
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas*
EndoG	Endonucleasa G
E.O.	Extracto orgánico proveniente de humo de leña
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas*
FADH ₂	Dinucleótido flavin- adenina reducido*

GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas*
HCl	Acido clorhídrico
HEPES	Acido hidroxil- etil- piperazin- etanol- sulfónico*
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible*
JNK	Cinasa c-Jun N- terminal*
LPS	Lipopolisacárido
MA	Macrófagos alveolares
mM	miliMolar
MT	MitoTracker CMX Ros
M Φ 's	Macrófagos
μ g/ mL	Microgramos por cada miliLitro
μ L	microLitro
μ M	microMolar
NADH	Dinucleótido nicotin- adenina reducido*
NLRs	Receptores tipo NOD*
nM	nanoMolar
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos*
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos*
PARP1	Polimerasa 1 asociada a reparación de daño a DNA*
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos*
PI	Ioduro de propidio*

PM _{2.5}	Material particulado o suspendido con un diámetro de 2.5 μm
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones*
RIPK	Protein- cinasa que interactúa con receptores
ROS	Especies reactivas de oxígeno*
SD	Desviación estándar*
SFB	Suero fetal bovino
STA	Estaurosporina*
S/e	Sin estímulo
TGF-β	Factor de crecimiento tisula beta*
TLRs	Receptores tipo Toll*
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa*
TNFR1/2	Receptor del factor de necrosis tumoral alfa 1 y 2*
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF-α*
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos*
ΔΨ _m	Potencial de membrana mitocondrial

* por sus siglas en Inglés

I. INTRODUCCIÓN

El uso de biocombustibles, como la leña, se ha empleado como fuente de energía y de combustión, principalmente en comunidades rurales de países en desarrollo. Sin embargo, se ha identificado asociación entre la exposición al humo de leña y daño al tracto respiratorio, ya que predispone a enfermedades tales como asma, cáncer pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y tuberculosis pulmonar [1]. Se estima que cada año hay cerca de 1.5 a 2 millones de muertes a nivel mundial que están asociadas con la exposición a diversos biocombustibles [2], y, la contaminación intramuros secundaria a este tipo de contaminantes es uno de los 10 factores de riesgo más importante para presentar daños a la salud, especialmente en los países en desarrollo [3]. En estos países, el uso intradomiciliario de biocombustibles, principalmente leña y carbón, es la principal fuente de contaminación medioambiental tanto en áreas rurales como urbanas [4]. La exposición por inhalación a éste tipo de partículas puede causar problemas graves de salud, ya que los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), presentes en las partículas de humo de leña, pueden difundir a través del tracto respiratorio y alojarse en las vías respiratorias inferiores, en donde se encuentran los macrófagos alveolares (MA), células fagocíticas del sistema inmunológico que ayudan a erradicar infecciones a este nivel.

Los MA son blanco de diversos patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, así como de sustancias tóxicas que se acumulan en pulmón. De tal forma que si los PAHs dañan a los MA, se puede incrementar la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades causadas por patógenos intracelulares, como es el caso de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* [5]. Así mismo, los MA funcionan como un puente entre la inmunidad innata y adaptativa debido a sus características como célula fagocítica y célula presentadora de antígenos (APC) a los linfocitos T.

Adicionalmente, los MA cuentan con mecanismos de defensa relevantes tales como el estallido respiratorio que requiere de la adecuada integridad de las mitocondrias, pues éstas son la principal fuente de energía metabólica en forma de ATP obtenido a través del ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, también son los principales organelos productores de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, además de que tienen importante participación en el proceso de muerte celular por apoptosis. Se ha documentado que, cuando los PAHs interfieren con los componentes de la cadena respiratoria y se acumulan en la mitocondria, disminuye el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y de manera secundaria disminuye la producción de ATP. Esta desregulación en el metabolismo del ATP puede favorecer que la célula muera por necrosis y no por apoptosis, ya que las células que mueren por apoptosis retienen sus niveles de ATP intracelular. En cambio, en las células que mueren por necrosis ocurre un colapso de esta fuente de energía [6].

Ya que se desconocen los mecanismos inmunopatogénicos que inducen muerte celular en macrófagos expuestos a compuestos orgánicos presentes en el humo de la leña y que los reportes epidemiológicos muestran una asociación entre la exposición a las partículas de humo de leña y el desarrollo de enfermedades del tracto respiratorio, en particular, tuberculosis pulmonar, nos propusimos estudiar algunos de estos mecanismos involucrados en el balance apoptosis/necrosis en un modelo experimental *in vitro* utilizando macrófagos derivados de monocitos de la línea celular THP-1 expuestos a extractos orgánicos provenientes de humo de leña (EO).

II. MARCO TEÓRICO

➤ Uso de biocombustibles a nivel mundial

Se ha estimado que cerca de la mitad de la población mundial (aproximadamente, 3 billones de personas) utiliza biomasa para cubrir las demandas energéticas y domésticas como la cocción de alimentos y la calefacción, entre otras, principalmente en los países menos desarrollados. Los principales materiales utilizados en México incluyen: leña, hojas secas, heces de animales y ocasionalmente carbón. Estos materiales, conocidos como biomasa o biocombustibles sólidos son ampliamente utilizados en zonas rurales de África, América Central, América del Sur y Asia. En estas regiones, la mayoría de las personas (mujeres y niños menores de 5 años, principalmente) están expuestas de manera crónica a las emisiones derivadas de la combustión [7].



Figura 1. Exposición al humo de leña. En las zonas rurales de los países menos desarrollados más de 3 billones de personas a nivel mundial todavía cocinan con biocombustibles sólidos, su principal fuente de combustión y calefacción, como esta madre mexicana que junto con su hijo están expuestos a las partículas potencialmente tóxicas incrementando el riesgo a desarrollar enfermedades de tipo respiratorio.

Se ha reportado que alrededor del 97% de las zonas rurales tienen acceso únicamente a los biocombustibles sólidos, comparado con un 73% de las zonas urbanas (Figura 2); sin embargo, la diferencia es aún más marcada en África subsahariana, donde los usuarios de estos materiales no se limitan a un solo tipo de biocombustible, sino que los combinan dependiendo de su disponibilidad. La madera es la más usada en la mayoría de los países, aunque el carbón se utiliza con mayor frecuencia en China, mientras que otro tipo de biocombustibles, como la gasolina, son utilizados en el resto de los países asiáticos [7].

En países desarrollados, por ejemplo Suiza, en las pequeñas comunidades del norte la concentración intramuros de partículas de humo de leña se incrementa hasta compararse con los niveles producidos en las grandes ciudades, la razón son las temporadas en las que las temperaturas son extremadamente bajas [2].

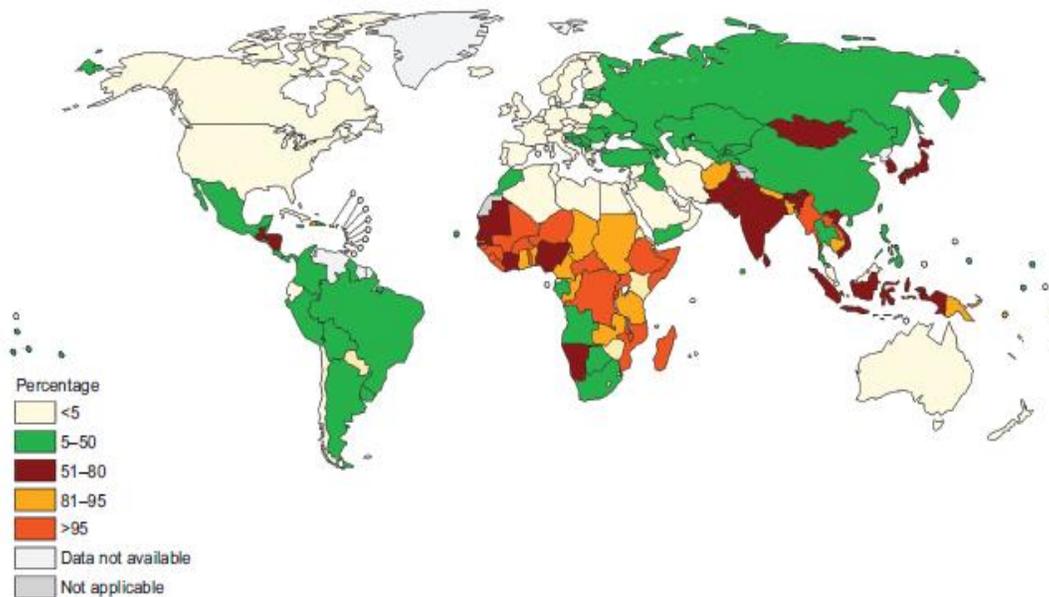


Figura 2. Uso de biocombustibles sólidos en el mundo. Basado en el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas, existen 140 países en los que el uso de biocombustibles sólidos se lleva a cabo como fuentes de energía. 31 de los países pertenecen a los menos desarrollados del continente africano, en los que el 97% de las comunidades rurales tienen acceso únicamente a este tipo de combustibles, comparado con el 73% de las zonas urbanas. La madera o leña es el biocombustible más usado en la mayoría de los países (Kurmi O, 2012).

De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US-EPA), los niveles intramuros de partículas suspendidas por la quema de biocombustibles sólidos permitidos son $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Sin embargo, estos niveles son rebasados, alcanzando entre 300 y $3000 \mu\text{g}/\text{m}^3$, y aún hasta $10\,000 \mu\text{g}/\text{m}^3/24$ horas durante la cocción de alimentos, incrementando el riesgo de contraer enfermedades respiratorias **[8]**.

Sin embargo, se ha publicado que, aunque el uso de biomasa como fuente de energía en los países menos desarrollados se incrementa de 2.68 billones de personas en 2009 a 2.77 billones en 2015, y que este nivel se mantenga hasta 2030 debido al incremento en el precio del queroseno y el gas embotellado. En los países subdesarrollados esta proporción disminuirá de un 54% en 2009 a un 44% en 2030. Por su parte en países desarrollados como China, la tendencia al uso de los biocombustibles disminuirá hasta un 19% en ese mismo año **[7]**.

➤ *Estadísticas en México*

La contaminación intramuros por partículas como los PAHs también es considerado como un problema grave de salud pública en México, pues se han reportado altos niveles de 1-hidroxipireno, ácido hipúrico y mucónico (metabolitos de los PAHs) en mujeres que se exponen al humo de leña para cocinar, lo cual ocurre en la mayor parte del territorio mexicano **[9]**.

Los efectos adversos a la salud asociados a este tipo de contaminación también han sido diversos en México, éstos incluyen: infecciones respiratorias agudas (IRAs), principalmente en niños, y EPOC, asma y tuberculosis pulmonar, principalmente en mujeres **[10]**. Adicionalmente, se ha descrito que el humo de leña es un factor de riesgo para desarrollar distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer nasofaríngeo, laríngeo, oral y pulmonar, entre otros; debido principalmente a que pasan más del 60% del tiempo en sus hogares expuestas a

las partículas producidas al cocinar. Las comunidades rurales de San Luis Potosí, el norte de Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tabasco y Yucatán, son las regiones de mayor demanda del uso de biocombustibles sólidos [9].

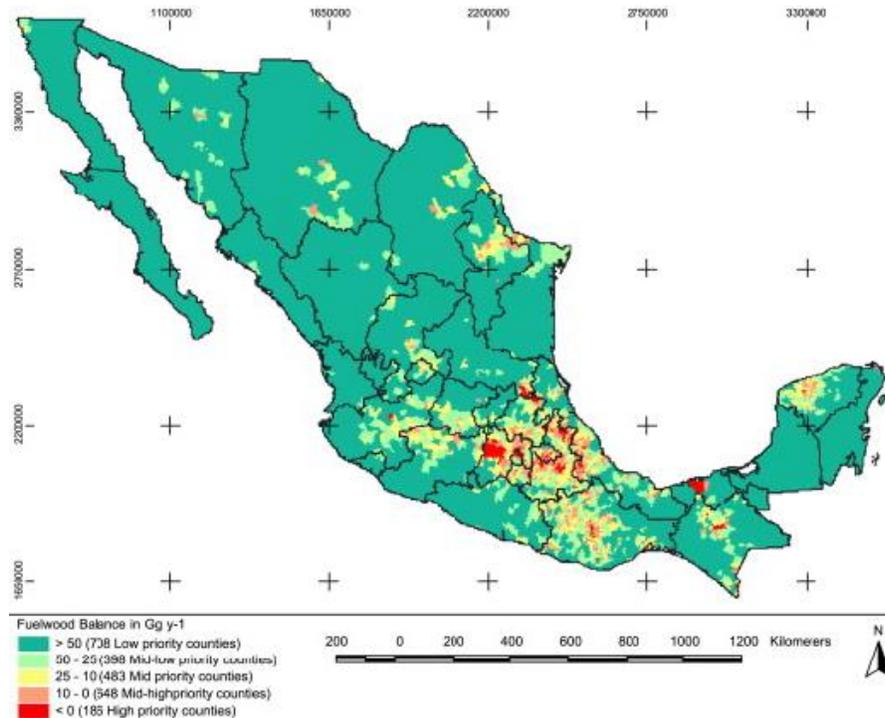


Figura 3. Uso de biocombustibles sólidos en México. La distribución del uso de leña en México comprende los grupos étnicos de las regiones del centro y sur del país, los cuales son los principales usuarios de leña como fuente de combustión y calefacción (Ghilard A, 2007).

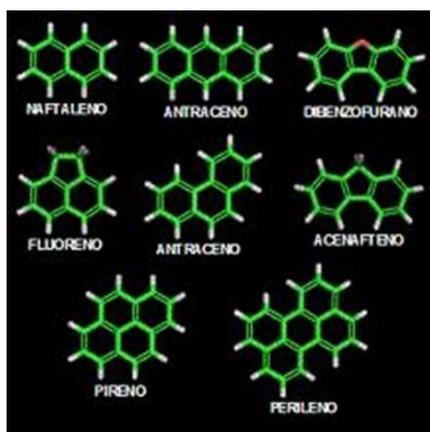
➤ Generalidades de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)

Uno de los principales componentes del humo de biomasa es el carbón, aunque también contiene más de 250 compuestos orgánicos potencialmente tóxicos. Las condiciones climáticas, el tipo de madera y la eficiencia en el proceso de la combustión modifican la composición de este material orgánico y, tanto la quema de biocombustibles como la oxidación parcial de material orgánico genera grandes cantidades de monóxido de carbono, cianuro de hidrógeno, amonio, óxido de nitrógeno, aldehídos y radicales libres. Adicionalmente, se han

identificado otros agentes tóxicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), que por su tamaño tan pequeño ($<2.5 \mu\text{m}$), pueden ser fácilmente inhalados y llegar a los pulmones, causando efectos dañinos a la salud [11].

Los PAHs son compuestos orgánicos derivados del benceno que se componen de 2 a 5 anillos aromáticos (Figura 4) y se forman por la combustión incompleta de materiales orgánicos, tales como la gasolina, el humo de escape de automóviles, residuos industriales, carbón, humo de leña, humo de tabaco, alimentos cocinados con carbón, etc [12-14]. Los PAHs constituyen una de las principales fuentes de contaminación ambiental, pues miles de toneladas son liberadas a la atmósfera cada año en Estados Unidos, contaminando el aire, agua y suelo, y causan efectos mutagénicos implicados en el desarrollo de cáncer en diferentes órganos, enfermedades cardiovasculares, infertilidad e inmunosupresión [15].

a)



Hidrocarburos aromáticos policíclicos estudiados

b)

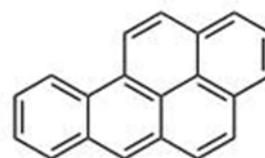


Figura 4. Estructuras químicas de PAHs. a) Estructuras químicas de diversos PAHs que varían entre 2 y 5 anillos aromáticos derivados del benceno, b) estructura química del benzo[a]pireno (BaP) del cual se tienen la mayor cantidad de reportes asociados al desarrollo de cáncer.

Aunque los PAHs no son los principales componentes de la fracción orgánica de las partículas de humo de leña, se han identificado más de 100 compuestos que se encuentran formando mezclas complejas en forma volátil o adsorbida al material particulado. Los PHAs conforman aproximadamente 9,745 ng/mg de la composición total de la leña. La caracterización fisicoquímica de los extractos

orgánicos provenientes de humo de leña identificó alrededor de 20 PAHs, de los cuales el benzo[a]antraceno, fluorantreno y pireno representan la fracción mayoritaria (Figura 5) [16].

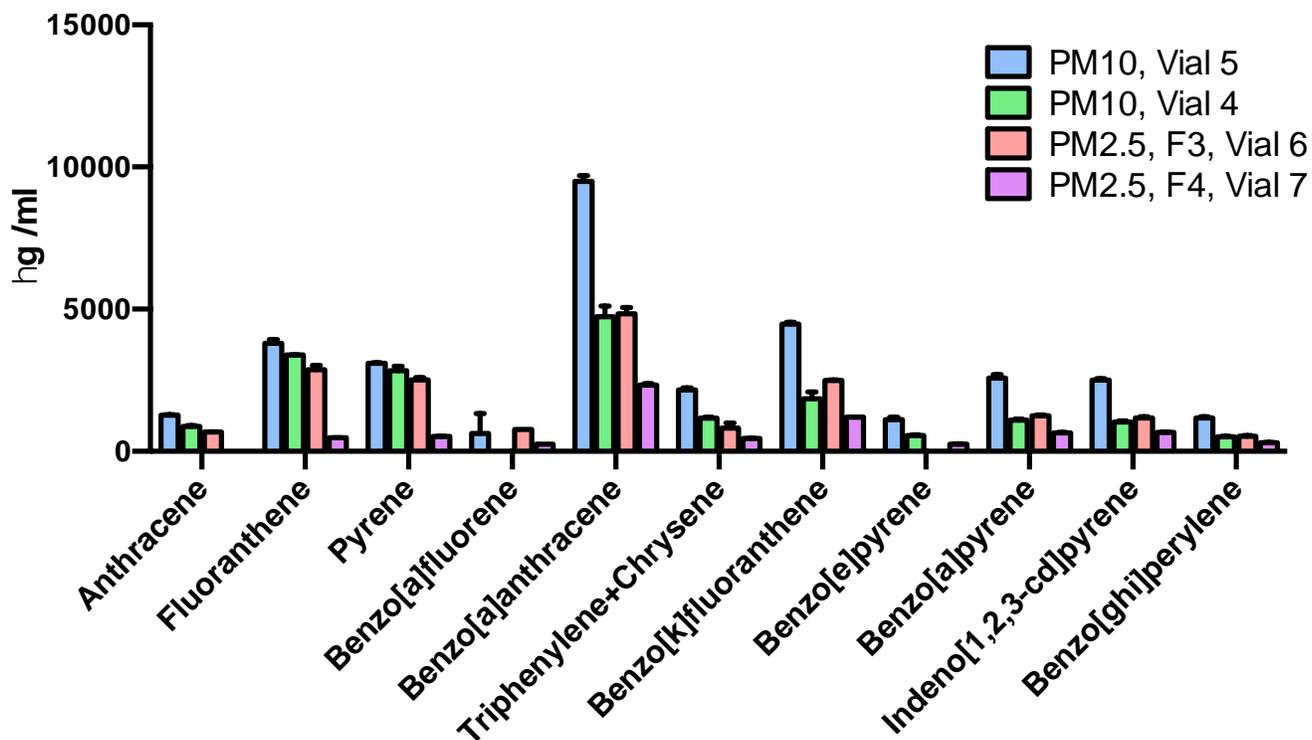


Figura 5. Contenido de PAHs en la combustión de biomasa. Mediante un análisis gravimétrico y fisicoquímico se encontró la presencia de 20 PAHs, siendo benzo[a]antraceno el PAH más abundante, seguido del fluoranteno, pireno y benzo[k]fluoranteno. La recolección de las partículas se realiza con un muestreador de bajo volumen denominado Mini Vol el cual muestrea 5 L/ min. La muestra (fracción orgánica) se recolecta en filtros de teflón al eliminarse todas las impurezas mediante una extracción con diclorometano.

Mientras que algunos PAHs son relativamente inocuos, otros como el benzo[a]pireno, dibenzantracenos, ciertos dibenzopirenos y nitropirenos son conocidos como agentes carcinógenos y mutagénicos, debido a que se les ha asociado con el desarrollo de cáncer en tráquea, bronquios y pulmón, incrementando la morbilidad y mortalidad cardiopulmonar, además de causar otras enfermedades tales como bronquitis, asma, exacerbación de EPOC [4]. Por otra parte, se ha reportado que los PAHs inducen muerte celular por apoptosis *in*

vitro en células Hepa1c1c7, en células ectocervicales humanas y en linfocitos B A20.1 de ratón, así como en macrófagos murinos RAW 264.7 [14].

➤ *Epidemiología asociada con la exposición a las partículas de humo de leña*

Se ha estimado que 1.9 millones de personas mueren de forma prematura debido a la exposición crónica al humo de biocombustibles sólidos como la madera (leña). De acuerdo con datos publicados por la Organización Mundial de la Salud, la contaminación intradomiciliaria y atmosférica por combustión de biomasa ocupan el décimo y décimo cuarto, de los 19 factores de riesgo de mortalidad, en países en desarrollo [17]. Las partículas producidas por la quema de biomasa están estrechamente relacionadas con el desarrollo de enfermedades del tracto respiratorio y enfermedades cardiovasculares; sin embargo, existen pocos estudios sobre los mecanismos de daño ocasionados en estos sistemas [7].

Por otro lado, aunque el asma ha sido menos estudiada en países en desarrollo que en los países desarrollados, y entendiendo que hay diferentes factores de riesgo en esos países debido al limitado estilo de vida, se tiene evidencia de que la exposición a biomasa, principalmente en comunidades rurales, puede no estar asociada al desarrollo de asma *per se*, pero sí puede estar asociado con exacerbaciones de asma existente o con síntomas respiratorios que pueden llevar a un diagnóstico equivocado de asma, pues hay evidencia que la exposición aguda al humo de leña causa irritación bronquial, inflamación, e incrementa la reactividad bronquial, que es posiblemente, la responsable de la exacerbación del asma [18].

Recientemente se demostró que la exposición crónica al humo de leña incrementa en un 55% la susceptibilidad a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Aunque el mecanismo inmunológico subyacente se desconoce, se ha propuesto que las partículas inhiben las propiedades bactericidas y bacteriostáticas de los macrófagos alveolares [7].

La mayoría de los estudios enfocados al uso de biomasa y el desarrollo de tuberculosis pulmonar sugieren que la prevalencia de esta patología es mayor en comunidades en condiciones pobres de salud y bajo estatus socioeconómico, debido a que este tipo de materiales es la única fuente de combustión a la que tienen acceso para uso doméstico [7].

➤ *Efectos inmunosupresores de las partículas de humo de leña (PAHs)*

Los PAHs inducen mecanismos inmunosupresores, tales como la inhibición de la producción de células inmunocompetentes y la inhibición de la diferenciación de monocitos humanos en células dendríticas y en macrófagos [12]. También se ha demostrado que la exposición a PAHs provoca atrofia de los órganos linfoides, induciendo la muerte celular por apoptosis en timocitos y en linfocitos B de médula ósea, e inhibición en el desarrollo de estas células. Esos efectos tóxicos hacia los precursores de células del sistema inmunológico han sido asociadas con la activación del receptor aril hidrocarburo (AhR) citosólico, un factor de transcripción básico dependiente de ligando, al cual se unen los PAHs, provocando su translocación al núcleo y su consecuente interacción con los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE). Esta vía implica una regulación incrementada de enzimas metabólicas como el citocromo (CYP450), particularmente el CYP1A1, el cual metaboliza PAHs en intermediarios altamente reactivos, provocando daño oxidativo al DNA, lo cual favorece que haya mutaciones y así el desarrollo de cáncer; sin embargo, también se ha reportado muerte celular por apoptosis [13].

Las células diferenciadas y maduras, también constituyen un blanco perfecto de los PAHs, pues estas partículas disminuyen la proliferación de linfocitos, la producción de citocinas por linfocitos T y de anticuerpos por células plasmáticas. Así mismo, inhiben algunas funciones de los macrófagos tales como, la adhesión

celular y producción de citocinas, además de que evitan su activación mediante IFN- γ [13].

En células monocíticas expuestas a benzo[a]pireno (BaP), disminuye la expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD80 y CD86, las cuales participan en la presentación de antígenos a los linfocitos T; de igual forma, existe una expresión disminuida de los receptores Fc γ CD16 y CD64, las cuales participan en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Así mismo, el BaP provoca disminución en los niveles de integrinas como CD11a, CD11c, CD29, CD49e y CD49f, responsables de la adhesión y migración celular [13].

Se ha demostrado que los extractos de humo de leña incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), inhiben a las enzimas glutatión intracelular y super óxido dismutasa, las cuales participan en la catálisis de O₂⁻ a H₂O₂ y la detoxificación por este último, respectivamente [19].

Existen estudios en los que han reportado que, además del tamaño y concentración de las partículas, la composición de éstas también contribuye con los efectos citotóxicos, por ejemplo, el contenido de metales, los compuestos orgánicos adsorbidos u otros componentes biológicos, como el lipopolisacárido (LPS) por ejemplo, están implicados en la patogénesis de la inflamación pulmonar inducida por partículas. Sin embargo, las partículas que carecen de sus componentes orgánicos no inducen muerte celular por apoptosis ni generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos murinos y humanos *in vitro* [20].

➤ *Respuesta de macrófagos alveolares a partículas contaminantes*

Los macrófagos alveolares (MA) llevan a cabo diversas funciones en inmunidad innata pulmonar y reparación tisular, además que son células que eliminan

células muertas y partículas del medio ambiente que alcanzan el parénquima pulmonar **[20]**.

La inhalación de partículas contaminantes induce una respuesta local tanto a nivel bronquial como alveolar. Esta respuesta es iniciada por los MA y células epiteliales (neumocitos tipo I y II). Los MA son las principales células que contribuyen al inicio de la respuesta inflamatoria local en el pulmón **[21]**, y posteriormente en la respuesta inflamatoria sistémica al producir citocinas pro-inflamatorias como GM-CSF, IL-1 α , IL-8, TNF- α e IFN- γ , así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) **[22]**.

La principal función de los MA es mantener a las vías aéreas libres de partículas contaminantes mediante la fagocitosis vía receptores scavenger, pues la mayoría de estas partículas contienen componentes microbianos en pequeñas cantidades como lipopolisacárido (LPS) y β -glucano, los cuales, al ser reconocidos por los receptores de tipo Toll (TLRs), favorecerían el procesamiento de las partículas contaminantes. Diversos estudios han demostrado que la exposición de MA a partículas contaminantes también induce apoptosis, la cual se considera que se lleva a cabo a través de receptores scavenger **[23, 24]**.

La fagocitosis de células apoptóticas (eferocitosis) por los MA está involucrada en la regulación de la respuesta inflamatoria y mantenimiento de la homeostasis pulmonar, removiendo células apoptóticas antes de que se induzca necrosis secundaria. Los MA son los principales responsables de remover y procesar células muertas en las vías aéreas, reduciendo su potencial inflamatorio **[25]**.

Por lo tanto, los efectos adversos a la salud, causados por la exposición a las partículas contaminantes, están fuertemente asociados con su fagocitosis, resaltando la función crucial de los MA en la respuesta inflamatoria que inducen las partículas.

➤ Mitocondrias

Las mitocondrias son organelos citoplasmáticos presentes en las células eucariotas, están implicados en procesos fisiológicos importantes, como el metabolismo, apoptosis, diferenciación y ciclo celular, están encargadas de suministrar la energía necesaria para la actividad celular, sintetizan ATP a expensas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos a través de la fosforilación oxidativa [26]. También son las principales productoras de especies reactivas de oxígeno (ROS) debido a las reacciones de óxido-reducción que se llevan a cabo durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria y, de acuerdo a la edad del organismo, el daño oxidativo se va acumulando, debido a la producción de ROS durante el transporte de electrones para la síntesis de ATP, lo cual provoca que haya disfunción mitocondrial, ya que se van degradando importantes moléculas como lo son las proteínas, los lípidos y el DNA. Se ha propuesto que los PAHs interfieren con los componentes de la cadena respiratoria, causando inhibición de la actividad enzimática, lo cual resultaría en un incremento en la producción de ROS, debido a la exacerbación del estrés oxidativo en la mitocondria, que a su vez llevarían al desarrollo de cáncer [6].

Al igual que las membranas plasmáticas, las membranas mitocondriales poseen una simetría en la distribución de fosfolípidos, no sólo entre las membranas interna y externa, sino también entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica; de modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias en la función y supervivencia de las mitocondrias y aún de la misma célula en el proceso de muerte celular por apoptosis [27].

En las mitocondrias se llevan a cabo distintas reacciones bioquímicas catabólicas que liberan importantes cantidades de energía, la cual se almacena en forma de ATP y es utilizado para mantener la actividad celular. En los organismos aeróbicos

más del 90% del ATP proviene de las mitocondrias, el resto se forma en la glucólisis anaeróbica [28].

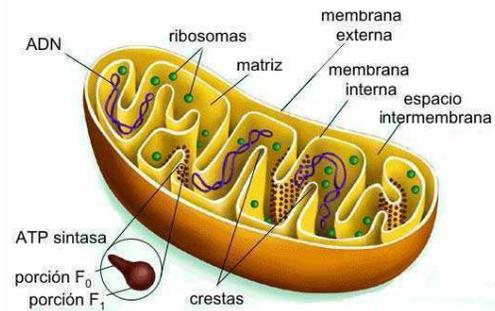


FIGURA 6. Esquema de una mitocondria y sus compartimentos estructurales.

La producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, se lleva a cabo en la membrana interna mitocondrial, en la cual, los electrones son transferidos a través de los componentes de la cadena respiratoria. Ésta última consiste de cinco complejos enzimáticos ensamblados en una orientación específica en la membrana interna. El paso de los electrones a través de los complejos I, III y IV libera la energía almacenada en forma de gradiente de protones y luego es utilizada por la ATP sintasa (último complejo enzimático) para producir ATP a partir de adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) [28].

➤ Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

La energía que se obtiene a través de la transferencia de electrones a lo largo de la cadena respiratoria es usada para bombear protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal, creando un gradiente electroquímico de protones (H⁺) a través de la membrana mitocondrial interna, el cual se conoce como potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Este gradiente electroquímico le permite a la ATP sintasa utilizar el flujo de H⁺ generados y transportados a lo largo de toda la cadena respiratoria, para producir ATP. De esta manera, la membrana mitocondrial interna separa dos compartimentos de diferente concentración de H⁺, lo que produce diferencias en la concentración química y en la distribución de la carga a través de la membrana (Figura 7) [28].

Otra característica importante del $\Delta\Psi_m$ es que provee el gradiente de carga necesario para la adquisición de Ca^{2+} mitocondrial, además de que, en condiciones de estrés la disipación del $\Delta\Psi_m$ favorece la producción de ROS, induciendo así la muerte celular. Por otra parte, ante un estímulo que genere estrés a la mitocondria, el $\Delta\Psi_m$ puede alterarse, disminuyendo el flujo de protones y de ésta manera, la disminución en la producción de ATP [29].

Las mitocondrias también están involucradas en la muerte celular, y la función que llevan a cabo es importante, ya que cualquier perturbación en el potencial de membrana, implicará de manera directa en la funcionalidad de la mitocondria por la disminución o inhibición en la producción de ATP [30]. Este ATP intracelular es uno de los indicadores determinantes del proceso de muerte celular que se pueda llevar a cabo, ya sea apoptosis o necrosis, pues las células que mueren por apoptosis retienen sus niveles de ATP intracelular, mientras que las que mueren por necrosis sufren una rápida disminución en la producción de ATP [31].

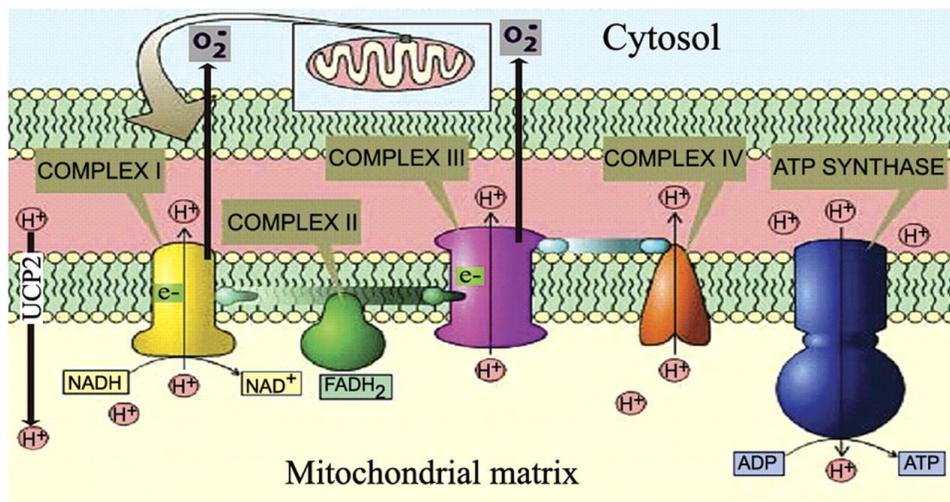


FIGURA 7. Potencial de membrana mitocondrial. La cadena transportadora de electrones utiliza al NADH y FADH_2 producidos por el ciclo de Krebs para generar ATP. Los electrones de NADH y FADH_2 son transferidos hacia los complejos enzimáticos en la membrana interna mitocondrial. Estos complejos actúan como acarreadores de electrones y bombean protones del espacio intermembranal hacia la membrana interna mitocondrial y, en presencia de oxígeno, al acarrear los electrones, se recolecta gradualmente la energía necesaria para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Sheikh- Hammad, D., 2010).

➤ Muerte celular

La muerte celular es un proceso evolutivo y conservado que juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis tisular y la respuesta inmune ante infecciones microbianas, proporcionando las señales inflamatorias necesarias para una respuesta eficiente. Distintas vías de muerte celular son inducidas de acuerdo al contexto celular [32]. Sin embargo, de manera general, dos formas de muerte se pueden distinguir en células eucariotas: apoptosis y necrosis, la primera es un proceso controlado, mientras que la necrosis no, en la que los componentes intracelulares liberados al medio extracelular causan respuestas inflamatorias que, al no ser controladas por células del sistema inmune, resulta en daño tisular [33].

- Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que ocurre en diversos eventos fisiológicos y patológicos, la cual se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos incluyendo, contracción celular, fragmentación y blebbing de la membrana plasmática, condensación de la cromatina, translocación de la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana celular a la cara externa, actuando como señal de peligro en este proceso, entre otros [34].

La actividad de enzimas proteolíticas (caspasas) es fundamental para que se lleve a cabo este proceso, éstas son sintetizadas como formas inactivas (zimógenos) y, al activarse fragmentan a sus sustratos sobre residuos de aspartato, llevando a cabo la cascada de activación de diversas endonucleasas que fragmentan y degradan al DNA, mostrando de esta manera las características morfológicas de una célula apoptótica [35].

La muerte celular por apoptosis se puede llevar a cabo a través de dos vías: por la vía del receptor o vía extrínseca y por la vía mitocondrial o vía intrínseca **[36]**.

En la vía extrínseca, se lleva a cabo la estimulación de receptores de muerte, como Fas/Apo1 (CD95), el receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa (TNFR1) y el receptor 1 del ligando inductor de apoptosis asociado a TNF (TRAILR1), cuyos ligandos correspondientes son FasL (CD95L), TNF- α y TRAIL. Estos receptores comparten dominios extracelulares similares ricos en cisteína y contienen dominios de muerte intracelulares que participan en la transmisión de señales de muerte desde la superficie hacia el interior de la célula **[37]** que resulta en la activación de la caspasa iniciadora, caspasa 8, cuya función es propagar la señal de apoptosis al activar a la caspasa efectora, la caspasa 3. La vía intrínseca ocurre cuando la célula se encuentra en un estado de estrés, debido a la exposición a compuestos tóxicos, lo que provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa como consecuencia de la pérdida del $\Delta\Psi_m$, favoreciendo que se liberen al citoplasma factores apoptogénicos, tales como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis (AIF), el segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/inhibidor directo de la proteína de unión a la proteína inhibidora de apoptosis (Smac/DIABLO) o la endonucleasa G del espacio intermembranal de la mitocondria. El citocromo c liberado hacia el citoplasma se une con Apaf-1 y caspasa 9, que con dATP forman un complejo llamado apoptosoma, el cual lleva a cabo la activación de la caspasa 3, para que ésta a su vez, active endonucleasas que fragmenten al DNA; mientras que Smac/DIABLO promueve la activación de las caspasas a través de la inhibición de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) **[38]**.

Además, la vía intrínseca o mitocondrial se puede llevar a cabo mediante dos vías: la vía dependiente de caspasas, en la que el citocromo c en el citosol provoca la activación de las caspasas y la subsecuente fragmentación del DNA, y la vía independiente de caspasas, en la que AIF y EndoG translocan del espacio

intermembranal de la mitocondria hacia el núcleo resultando en la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA [39].

El estrés oxidativo, producido por diversos estímulos como lo es el humo de cigarro por ejemplo, acelera el proceso de muerte celular por apoptosis en las células del pulmón.

Por otra parte, la muerte celular provocada por los extractos de humo de leña en este tipo de células sugiere apoptosis independiente de caspasas, pues, además de la identificación de residuos de fosfatidilserina, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, incremento en los niveles de Bak y Bax, así como de la fragmentación del DNA, se encontró translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) y endonucleasa G (EndoG) de la mitocondria al núcleo, sin activación de la cascada de las caspasas [19].

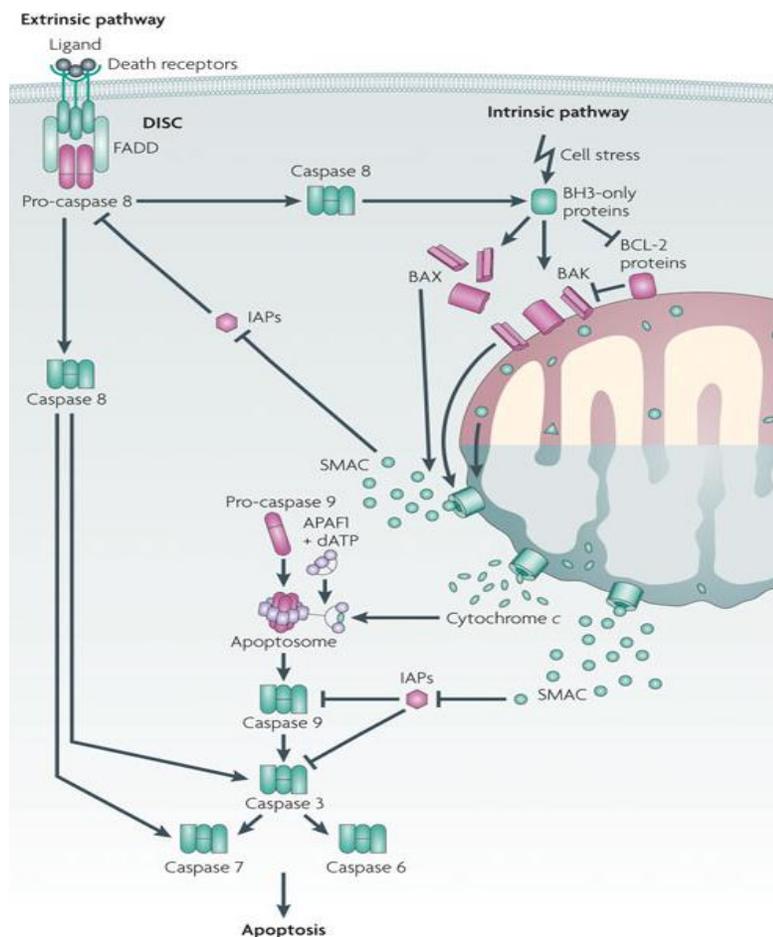


FIGURA 8. Vías de señalización de muerte celular activadas durante la apoptosis. La apoptosis es activada por la oligomerización de receptores de muerte (vía extrínseca) y por señales de estrés (vía intrínseca). En la vía extrínseca, la activación de receptores de muerte mediada por sus ligandos resulta en el reclutamiento del dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y procaspasa 8, formando un complejo de señalización intracelular inductor de muerte (DISC). En este complejo la procaspasa 8 es convertida en su forma activa, la caspasa 8 por autoproteólisis, la cual a su vez, puede activar a otras caspasas efectoras como la caspasa 3, 6 y 7. En la vía intrínseca o mitocondrial, las proteínas de linfoma de células B (Bcl-2), como Bak por ejemplo, son activadas al recibir señales de estrés intracelular, las cuales llevan a la inhibición de las proteínas anti- apoptóticas Bcl-2 y al reclutamiento de BAX a la mitocondria, cuya función es formar poros en la membrana externa mitocondrial, lo que permite la liberación de proteínas presentes en el espacio intermembranal, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF), la endonucleasa G, y el citocromo c, al citosol. La unión del citocromo c con el factor activador de proteasas adaptadoras 1 (Apaf-1), favorece la formación del complejo multiprotéico, apoptosoma, para llevar a cabo la activación de la caspasa 9 dependiente de ATP, la cual, también activa a la caspasa 3. En algunos tipos celulares, las dos vías intrínseca y extrínseca, convergen a nivel de BID, la cual puede ser activada proteolíticamente por la caspasa 8 (**Rudel T, 2010**).

- Necrosis

El término necrosis se origina de la palabra griega "*nekros*", que significa "cuerpo muerto". La necrosis es un tipo de muerte celular caracterizado por un aumento en el volumen celular (oncosis), hinchazón de los organelos, ausencia de la fragmentación internucleosomal del DNA y ruptura de la membrana plasmática, y, como consecuencia de la permeabilización de la membrana plasmática y lisis celular, el contenido intracelular liberado al exterior puede provocar un estado inflamatorio descontrolado [40].

Por años, a la necrosis se le ha considerado como una forma accidental de muerte celular, pues como un proceso independiente de la actividad de caspasas se observaba como un tipo de muerte no controlada. Sin embargo, evidencia acumulada ha mostrado algunas formas de muerte que involucran vías de

señalización que contribuyen a la necrosis como un proceso controlado, similar a lo observado en la apoptosis **[41]**.

Actualmente, los marcadores que se utilizan para detectar muerte celular por necrosis y al mismo tiempo diferenciarla claramente de la apoptosis, cuentan con ciertas limitaciones. La liberación de proteínas intracelulares tales como la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1) y ciclofilina A (CypA) han sido propuestas como biomarcadores de necrosis; sin embargo, ambas, son liberadas pasivamente de células que mueren por necrosis secundaria a la apoptosis, o secretadas por células activadas o muertas por piroptosis.

Por lo tanto, debido a las limitadas metodologías con las que contamos para detectar necrosis, se han utilizado métodos combinados, tales como la tinción positiva para TUNEL (por sus siglas en inglés *Terminal desoxy nucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling*), pero negativa para la actividad de caspasas ó inmunohistoquímica y microscopía electrónica **[40]**.

La muerte celular por necrosis también se puede llevar a cabo mediante la activación del receptor de linfotoxina beta (LT β R) en ausencia de inhibidores de caspasas y requiere la actividad de cinasas como la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis, ASK1. En contraste, cuando TNF- α , liberado por la célula muerta, es reconocido por el receptor 2 de TNF (TNFR2), en presencia de inhibidores de caspasas sí se lleva a cabo este proceso de muerte.

La muerte celular por necrosis se ha observado en macrófagos de origen humano y de ratón infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, pues Wong y Jacobs demostraron que la necrosis de macrófagos THP-1 infectados con este patógeno indujo la activación del inflammasoma NLRP3, pero no la de la caspasa 1, diferenciando así entre un proceso de necrosis y no de piroptosis **[42]**. Por otra parte, se ha demostrado que cuando las células reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), los cuales son liberados por células muertas, favorece

la muerte por necrosis mediada principalmente por TLR3, -4 y -9. Así mismo, el reconocimiento de PAMPs por otros PRRs y agentes fisicoquímicos que causan estrés oxidativo, tales como radiación UV, exceso de calcio y daño al DNA provocan este tipo de muerte celular (Figura 9).

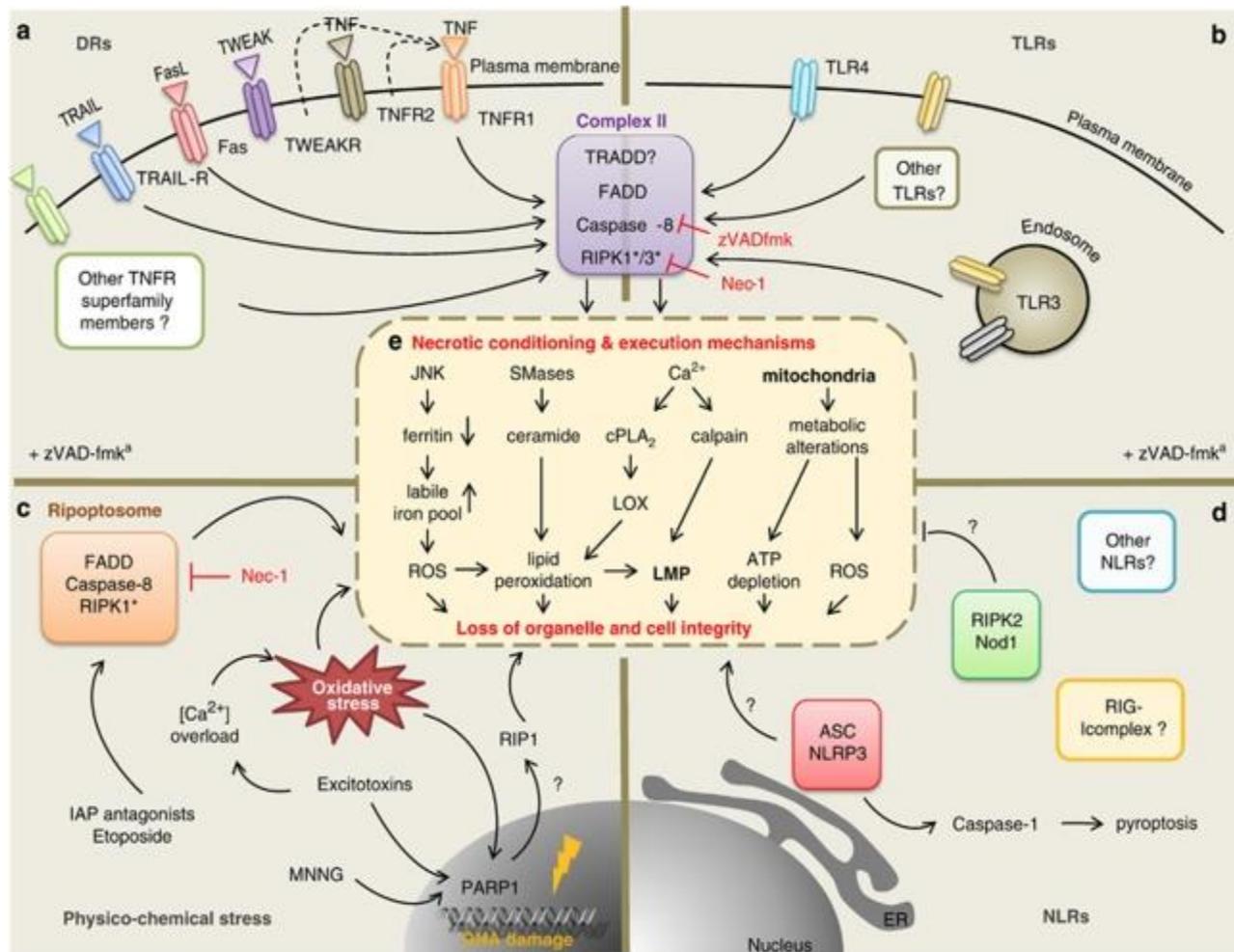


Figura 9. Mecanismos que regulan la muerte celular por necrosis. La necrosis puede ser provocada por un amplio rango de estímulos. **a)** Necroptosis, inducida por la estimulación de receptores de muerte (TNFR1, TRAILR, Fas) dependiente de la actividad de cinasas RIPK1 y RIPK3. **b)** TLR3 y TLR4 inducen necrosis a través de la señalización de RIPK1 y RIPK3. El reconocimiento de RNA por TLR3 y de lipopolisacárido por TLR4 provoca el reclutamiento del adaptador de interferon β que contiene un dominio del receptor de interleucina IL-1, el cual interactúa con RIPK1 y RIPK3. **c)** El estrés físico- químico induce la muerte celular por necrosis mediante la activación de PARP1, la eliminación o tratamiento antagonista de IAPs induce la formación de un complejo inductor de muerte independiente de receptores de muerte llamado ripoptosoma. **d)** La estimulación de los receptores tipo NOD (NLR's) como el NLRP3 induce

necrosis dependiendo del contexto celular, es decir, si se trata de células mieloides o no mieloides. **e)** Al llevarse a cabo la muerte por necrosis, varios factores se ven involucrados, por ejemplo la fosfolipasa A₂, lipoxigenasa y esfingomielinasa, así como la activación de la cinasa terminal JUN (JNK), las cuales provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminución en la producción de ATP (**Vanlangenakker N, 2012**).

➤ *Respuesta inflamatoria ante la exposición a partículas contaminantes*

En los alveólos pulmonares de sujetos sanos, los macrófagos residentes y las células epiteliales son las principales células blanco de las partículas depositadas. Se ha sugerido que también los monocitos, precursores de los macrófagos, se acumulan en el pulmón durante la inflamación, y asisten a la eliminación de partículas inhaladas. La inflamación se refiere a la acumulación local de líquido, proteínas plasmáticas y leucocitos que inicia por una lesión física, un proceso infeccioso o una respuesta inmune local e involucra la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Por ejemplo, TNF- α e IL-1 β , citocinas de respuesta aguda, promueven el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos mediante el incremento en la expresión de la quimiocina IL-8 **[43]**.

Los mecanismos propuestos para explicar los efectos adversos a la salud secundarios a la exposición a partículas de biocombustibles, incluyen estrés oxidativo (producción de ROS), inflamación y genotoxicidad, pues estudios *in vitro* han demostrado que las partículas de humo de leña incrementan la expresión y producción de citocinas pro- inflamatorias **[18, 44]**.

Existe evidencia epidemiológica que demuestra que la exposición a partículas contaminantes del aire con un diámetro menor a 10 μm provoca enfermedades cardiopulmonares y, aunque los mecanismos fisiopatológicos no son claros, estas partículas estimulan la producción de citocinas pro- inflamatorias por los macrófagos alveolares y células epiteliales pulmonares, por ejemplo: IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF y TNF- α . Éstas inducen, tanto la respuesta inflamatoria local en el pulmón como la respuesta inflamatoria sistémica, estimulando las células

residentes en el pulmón, ya sean células epiteliales o macrófagos de una manera parácrina y/o autócrina para producir quimiocinas necesarias para el reclutamiento de leucocitos como los polimorfonucleares (neutrófilos) que asistan al procesamiento y eliminación de agentes dañinos y patógenos [20].

III. JUSTIFICACIÓN

La exposición a partículas de humo de biocombustibles, especialmente a humo de leña y contaminantes ambientales está asociada a problemas graves de salud, ya que predispone a infecciones agudas y crónicas del tracto respiratorio, cuya consecuencia fisiopatológica es la alteración de mecanismos y/o eliminación de células funcionales (macrófagos alveolares) que median la respuesta inmune contra patógenos; sin embargo, los mecanismos inmunopatogénicos no se conocen completamente. La posibilidad de estudiar el efecto de los extractos orgánicos de humo de leña nos permitirá saber si existe un sustento inmunológico que contribuya a dicha asociación.

IV. HIPÓTESIS

La exposición de macrófagos THP-1 a extractos orgánicos provenientes del humo de leña favorece la muerte celular por necrosis de una manera concentración dependiente.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la muerte celular por apoptosis y/o necrosis en macrófagos de la línea THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos provenientes de humo de leña.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Medir cambios en el potencial de membrana mitocondrial de los macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos.
- b) Determinar la concentración de ATP intra- y extracelular producido por los macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos.
- c) Evaluar el proceso de muerte celular en los macrófagos THP-1 después de haber sido expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos.
- d) Analizar la muerte celular de los macrófagos THP-1 después de su exposición a concentraciones crecientes de extractos orgánicos mediante el ensayo de Anexina V y Ioduro de Propidio.
- e) Determinar la concentración de citocinas pro- inflamatorias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN-}\gamma$) en sobrenadantes de cultivo de macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

a) Material biológico y reactivos

La línea celular de monocitos THP-1 (ATCC TIB-202) se obtuvo de ATCC (*American Type Culture Collection*). El medio de cultivo RPMI se enriqueció con los suplementos (Tabla 1, Anexo I) obtenidos de *Gibco*. El acetato de forbol-miristato (PMA), el lipopolisacárido (LPS) y la estaurosporina fueron comprados en Sigma, San Luis, MO, EUA. Los extractos orgánicos provenientes de humo de leña fueron donados por la Dra. Irma Rosas del Instituto de Ciencias de la atmósfera, UNAM. El MitoTracker Red CMXRos (MT) se compró en Invitrogen, Eugenia, Oregón, EUA. El interferón gamma recombinante humano (rIFN- γ) se adquirió en R&D Systems. Los kits ELISA^{PLUS} para TNF- α , IFN- γ e IL-1 β fueron obtenidos de BioLegend, San Diego, CA, EUA. La Anexina V y el Ioduro de Propidio se compraron en BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA.

b) Cultivo celular

Monocitos de la línea celular THP-1 se cultivaron en un frasco de 25 cm² a una confluencia de 1×10^6 células/ mL de medio de cultivo RPMI suplementado, y se incubaron a 37° C con una atmósfera de 5% CO₂ durante 2-3 días, después de este tiempo, se les cambió el medio de cultivo para mantener a los monocitos (viabilidad mayor a 95%).

c) Diferenciación de monocitos a macrófagos

Los monocitos se transfirieron a un tubo de 15 mL y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min., después se decantó el sobrenadante y se agregó 1 mL más de medio de cultivo RPMI suplementado, para resuspender el pellet (paquete celular) y, a partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:10 en azul tripano para

contar la viabilidad de monocitos en una cámara de Neubauer. Posteriormente se cultivaron 1×10^6 monocitos/mL en cada pozo de placas de 24 pozos y se diferenciaron a macrófagos agregando 62 μL de PMA a una concentración final de 100 nM durante 3 h, a 37°C y 5% CO_2 . Transcurrido el tiempo de diferenciación, se retiró el sobrenadante y los macrófagos (adheridos a la placa y con morfología característica) se lavaron con 300 μL de medio de cultivo RPMI suplementado, y, finalmente se les agregó 1 mL más de medio para dejar incubando hasta el siguiente día a 37°C y 5% CO_2 .

d) Exposición de macrófagos a extractos orgánicos

Los extractos orgánicos provenientes de humo de leña (EO) utilizados en este trabajo fueron obtenidos y caracterizados por la Dra. Irma Rosas (Ciencias de la Atmósfera, UNAM). En la comunidad de Zacatlán de las Manzanas en el estado de Puebla, se utilizó un muestreador de tipo High Vol para recolectar las partículas contaminantes provenientes de la quema de leña. A partir de estos filtros se realizó una extracción con diclorometano para obtener la fracción orgánica. Los principales compuestos obtenidos (análisis fisicoquímico por cromatografía de líquidos de alta densidad, HPLC) al término del enriquecimiento de materia orgánica fueron benzo[a]antraceno, fluorantreno, pireno y benzo[k]fluoranteno. A partir de una solución stock (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se tomaron los volúmenes necesarios para estimular a los macrófagos con concentraciones crecientes de extractos orgánicos provenientes de humo de leña (EO: 1, 5, 10, 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de cultivo RPMI suplementado), y se incubaron durante 24 h, a 37°C y 5% CO_2 .

e) Medición del potencial de membrana mitocondrial

Se preparó una solución stock del colorante MitoTracker Red CMXRos (MT) en medio de cultivo RPMI suplementado sin SFB, evitando su exposición a la luz. Por otra parte, los macrófagos THP-1 ($\text{M}\Phi$'s) expuestos durante 24 h a concentraciones crecientes de EO se recuperaron en tubos eppendorff

previamente rotulados con cada una de las condiciones de exposición. Después se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se decantó. El pellet se resuspendió en 900 μ L de medio de cultivo RPMI suplementado sin SFB y se tomaron tres veces, 300 μ L de éste, colocándolos en tubos para citometría de flujo. Posteriormente, los M Φ 's se tiñeron con MT 100 nM y 150 nM a un volumen final de 1 mL (este compuesto difunde de manera pasiva a través de la membrana celular y ya en el citoplasma se une con las proteínas de la membrana externa de las mitocondrias íntegras mediante un enlace de tipo tiol y, al oxidarse emite fluorescencia a 576nm, la cual es detectada por citometría de flujo). Los M Φ 's se incubaron durante 20-25 min en oscuridad a 37° C y 5% CO₂ y posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 200 μ L de buffer de tinción (*CellStaining Buffer*, BioLegend) para adquirirlas en un citómetro de flujo *FACS Aria*. Finalmente, los datos se analizaron empleando el software Flow Jo 3 star 10.0.4.

f) Estandarización de las condiciones experimentales para la medición de [ATP] extracelular

Los M Φ 's fueron expuestos a concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS, por separado y en combinación, durante 4 h a 37° C y 5% CO₂. Posteriormente, se tomaron 20 μ L de sobrenadante y se resuspendieron en 180 μ L de solución estándar de reacción, para medir la producción de ATP extracelular utilizando el sistema luciferina/ luciferasa, cuyo fundamento se basa en el requerimiento de ATP por parte de la luciferasa para oxidar a la luciferina y así producir luz. La luminiscencia producida se midió en un luminómetro *BioTek* a 560 nm. Se preparó una solución stock de ATP 1 μ M en agua desionizada (dH₂O) a partir de la solución contenida en el kit *ATP determination, Invitrogen*, la cual se utilizó para realizar una curva estándar de [ATP], a partir de la cual se extrapolaron los datos obtenidos con las células expuestas a IFN- γ y LPS, con la finalidad de conocer la concentración de ATP extracelular producida por los M Φ 's. La luminiscencia

producida en la reacción es directamente proporcional a la concentración de ATP producida.

g) Cuantificación de [ATP] intra- y extracelular

Se preparó una solución stock de ATP con la que se realizó la curva estándar para cada determinación, y una solución estándar de reacción que contiene a la enzima luciferasa y su sustrato luciferina, la cual también se utilizó tanto para la curva estándar como para las muestras. Después que los MΦ's fueron expuestos a concentraciones crecientes de EO durante 4 h, se realizó la medición de la producción de ATP extracelular en un luminómetro *BioTek*. Para ello, se tomaron 20 μ L (por duplicado) de sobrenadante por cada condición de exposición a EO y se resuspendieron en 180 μ L de la solución estándar de reacción en una placa de 96 pozos, se agitó la placa y se leyeron, tanto la curva estándar como las muestras al tiempo señalado. Para cuantificar la producción de ATP intracelular, después de haber sido estimulados con los EO, los MΦ's se recuperaron en tubos eppendorff previamente rotulados y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se lisaron con 300 μ L de buffer (Tritón 0.2%) durante 10 min. Posteriormente se tomaron 20 μ L de cada tubo por duplicado de cada condición y se añadieron a una placa de 96 pozos con 180 μ L de solución estándar de reacción.

h) Evaluación del tipo de muerte celular

Mediante el uso del kit *Cell death determination* ELISA^{plus}, basado en un inmunoensayo de ELISA, cuyo fundamento es una reacción antígeno-anticuerpo, se evaluó la muerte celular por apoptosis y por necrosis. Después de su exposición a los EO, la placa en la que se cultivaron los MΦ's se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min y se recuperaron 200 μ L del sobrenadante de cada condición, se tomaron 20 μ L por duplicado y se colocaron en una placa de 96 pozos sensibilizada con estreptavidina conjugada a anticuerpos anti-histonas para

evaluar la presencia de histonas extracelulares como un marcador de muerte celular por necrosis. Posteriormente, los *pellets* se resuspendieron en buffer de lisis y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (T.A.), después la placa se centrifugó nuevamente, y se colocaron 20 μ L (por duplicado) del sobrenadante en otra placa de 96 pozos sensibilizada con estreptavidina conjugada a anticuerpos anti-histonas, evaluándose así, muerte celular por apoptosis. A cada una de las placas se le añadieron las muestras y, a una se añadió estaurosporina 3 μ M como control positivo de necrosis y, a la otra, estaurosporina 1 μ M como control de apoptosis. Las placas se incubaron durante 2 h a T.A. en presencia de Ac's anti-DNA. Posteriormente, se añadieron 80 μ L de control de reactivo contenido en el kit, se protegió de la luz y se incubó durante 2 h a T.A. en agitación constante. Después se retiró el sobrenadante y los pozos de las placas se lavaron con 300 μ L de buffer. Se añadieron 100 μ L de solución de sustrato y se incubó a T.A. durante 20 minutos hasta el desarrollo de color. Por último, se agregaron 100 μ L de solución para detener la reacción y la absorbancia en cada una de las muestras se midió en un lector de ELISAs iMark (BioRad) a 405 nm.

i) Análisis de la muerte celular mediante la tinción con Anexina V y PI

Después de haber sido expuestos a EO, los M Φ 's cultivados se recuperaron en tubos de 15 mL y se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación a 1500 rpm. Posteriormente se resuspendieron en 1 mL de buffer de Anexina V 1X y se tomaron 250 μ L, colocándolos en tubos para citometría de flujo rotulados para teñirlos con Anexina V y con Ioduro de Propidio (PI) en cada una de las condiciones experimentales. Se incubaron durante 15 min en oscuridad y a T.A. Después se agregaron 400 μ L más de buffer de Anexina V y las células se adquirieron en un citómetro de flujo *Facs Aria* y se analizaron. La fosfatidilserina, una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, es translocada de la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática de células en

apoptosis. La Anexina V tienen alta afinidad por la fosfatidilserina expuesta, la cual, al ser reconocida puede ser detectada mediante citometría de flujo.

j) Medición de la concentración de citocinas pro-inflamatorias

La concentración de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ se midió en sobrenadantes de M Φ 's estimulados durante 24 h con EO a concentraciones crecientes, mediante el uso de kits de ELISA^{PLUS} (BioLegend, EUA). Los inmunoensayos se realizaron sensibilizando las placas con anticuerpos de captura anti- IL-1 β , -IFN- γ y -TNF- α (1:200), según correspondía, incubándolas toda la noche a 4^o C. Al día siguiente se añadieron 100 μ L de buffer de bloqueo durante 1 h a T.A. con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se realizó una solución stock de IL-1 β , IFN- γ y TNF- α recombinantes, a partir de la cual se realizaron diluciones seriales para construir las curvas estándar de cada citocina, y se agregaron 100 μ L de cada estándar; y para las muestras se agregaron 100 μ L de sobrenadante de cultivo de M Φ 's estimulados con EO a diferentes concentraciones, incubándose a T.A. durante 2 h. Posteriormente se agregaron 100 μ L de anticuerpo de detección biotinilado y las placas se incubaron a T.A. durante 1 h. Después se agregaron 100 μ L de enzima peroxidasa conjugada a avidina (1000X), incubando durante 30 minutos, para después añadir buffer de sustrato e incubar durante 20 min en oscuridad. Finalmente la reacción fue detenida con H₂SO₄ 2N. Entre cada uno de los pasos, es decir, después de los tiempos de incubación y antes de agregar cada uno de los reactivos se realizaron 4 lavados con 300 μ L de buffer de lavado (PBS + Tween 20 0.05%). A partir de las curvas estándar de cada citocina se extrapolaron los datos obtenidos con las muestras; los límites de detección estuvieron en el rango de 2 a 7 pg/mL. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro lector de ELISAs iMark (BioRad) a 450 nm.

k) Análisis estadístico

Todos los datos se reportaron como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico de cada uno de los resultados se realizó utilizando el software GraphPadPrism versión 6.0a. El análisis de varianza de una vía (ANOVA) se utilizó para analizar diferencias entre grupos. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VIII. RESULTADOS

a) La exposición de los MΦ's a los EO favorece la disminución gradual del $\Delta\Psi_m$ de una manera concentración dependiente.

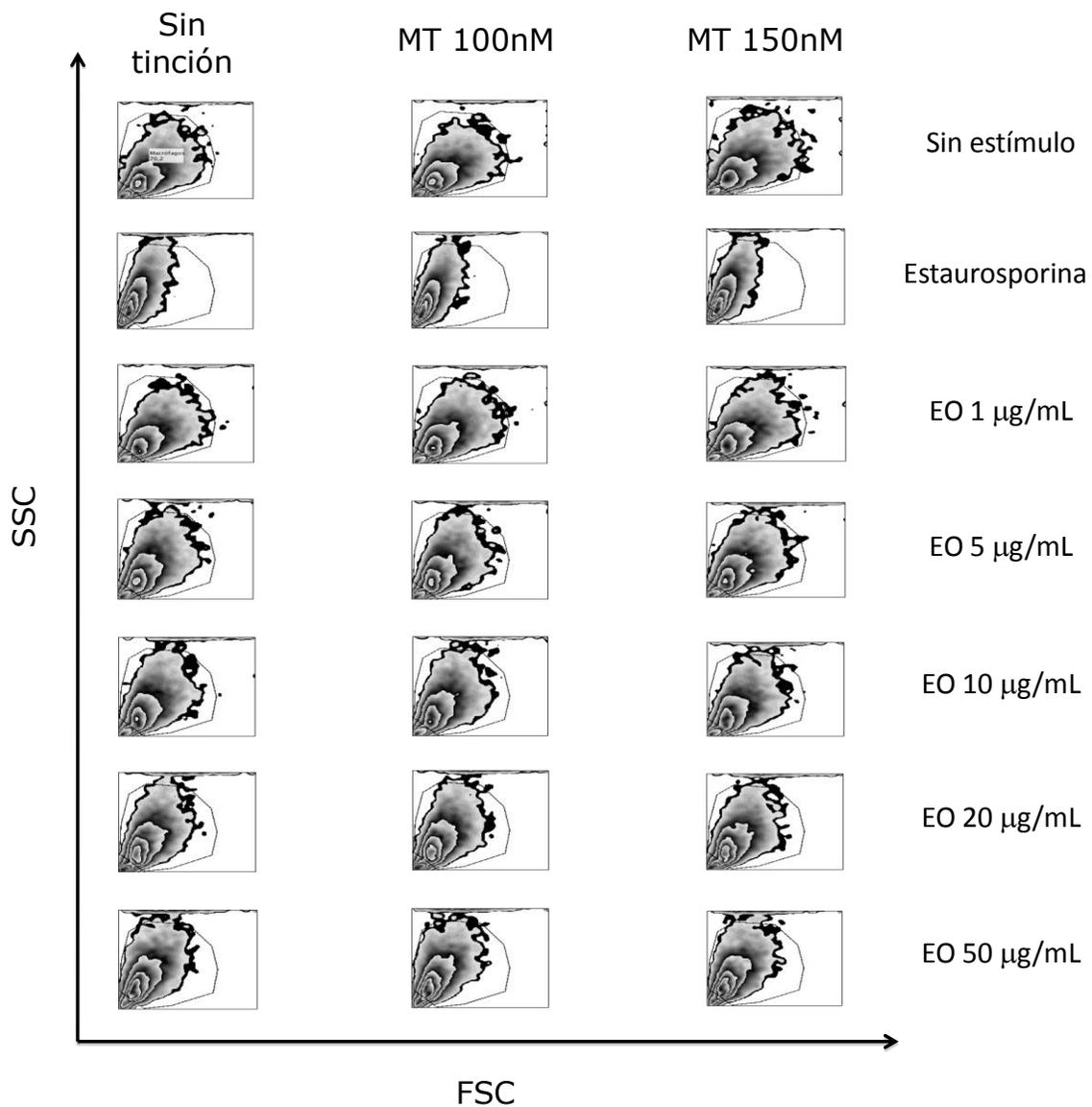
Para estudiar los potenciales efectos tóxicos de los EO sobre la funcionalidad/viabilidad de los MΦ's, uno de los parámetros que nos propusimos evaluar es el potencial de membrana mitocondrial, cuya importancia radica en la síntesis de ATP para que las células lleven a cabo sus funciones metabólicas de manera eficiente. Para ello se utilizó el reactivo MitoTracker Red CMXRos (MT) a distintas concentraciones, 100 y 150 nM.

El análisis de la pérdida del $\Delta\Psi_m$ por citometría de flujo, no mostró cambios en el tamaño y granularidad de las poblaciones celulares, respecto a la condición sin estímulo (Figura 10a); sin embargo, en las ventanas en las que se muestra el % de células positivas para la tinción con el MT (MT+; Figura 10b) y en los histogramas (Figura 10c), se aprecia un desplazamiento de las poblaciones sobre el eje "x", conforme incrementó la concentración de los EO (ver también Figura S1).

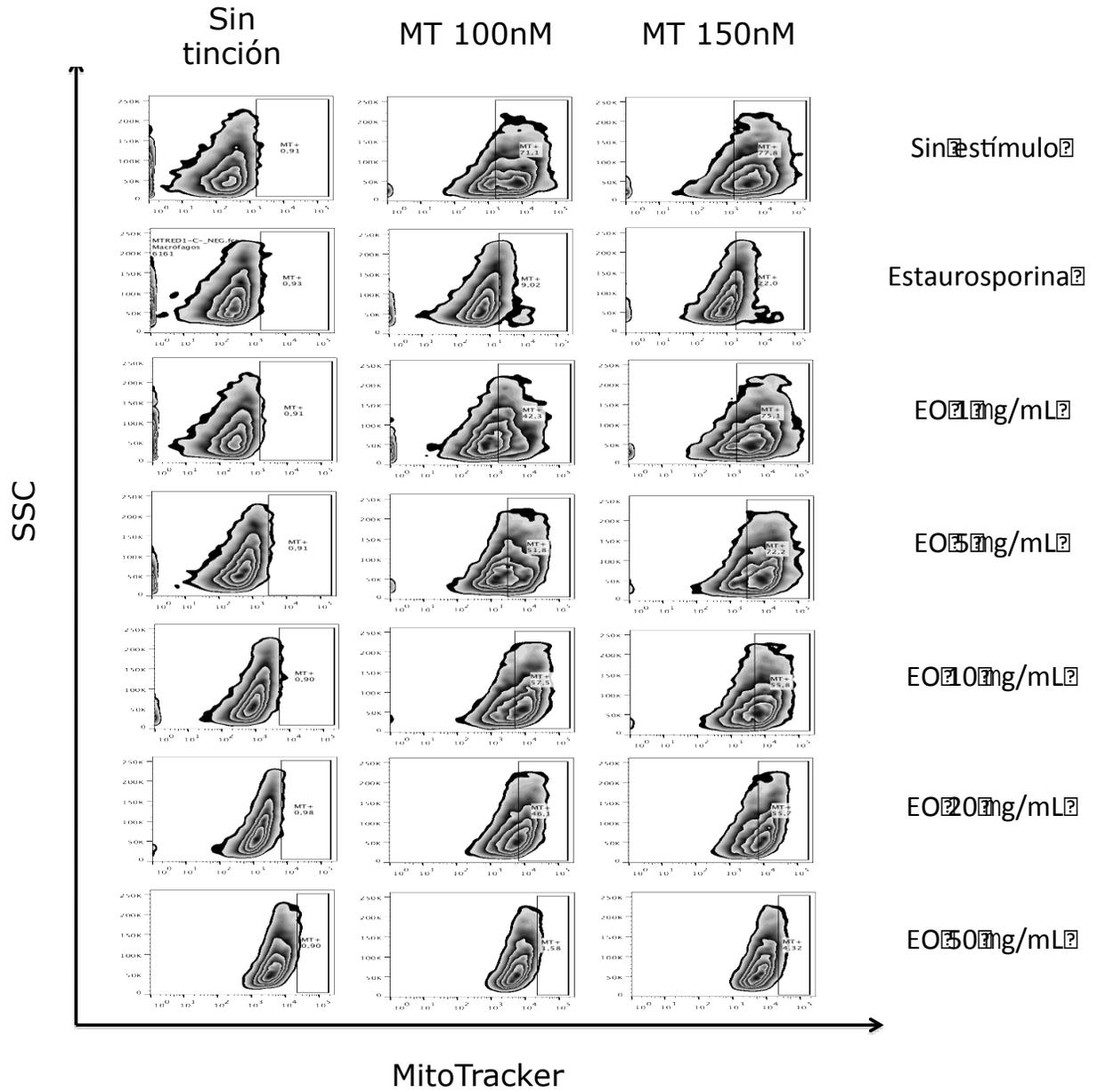
En las Figuras 11a y 11b se observa una disminución en la tinción con el MT en las células que fueron estimuladas con los EO. Este fenómeno mostró una

tendencia concentración dependiente. Se identificó una diferencia estadísticamente significativa (** $p < 0.02$, *** $p < 0.0016$, **** $p < 0.0002$) con la concentración de 10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Al analizar la intensidad media de fluorescencia (IMF) sólo pudimos identificar diferencias estadísticas con la concentración más alta de los EO. Estos resultados sugieren que la exposición de los $\text{M}\Phi$'s a los EO reduce el número de mitocondrias funcionales en las células.

10a)



10b)



10c)

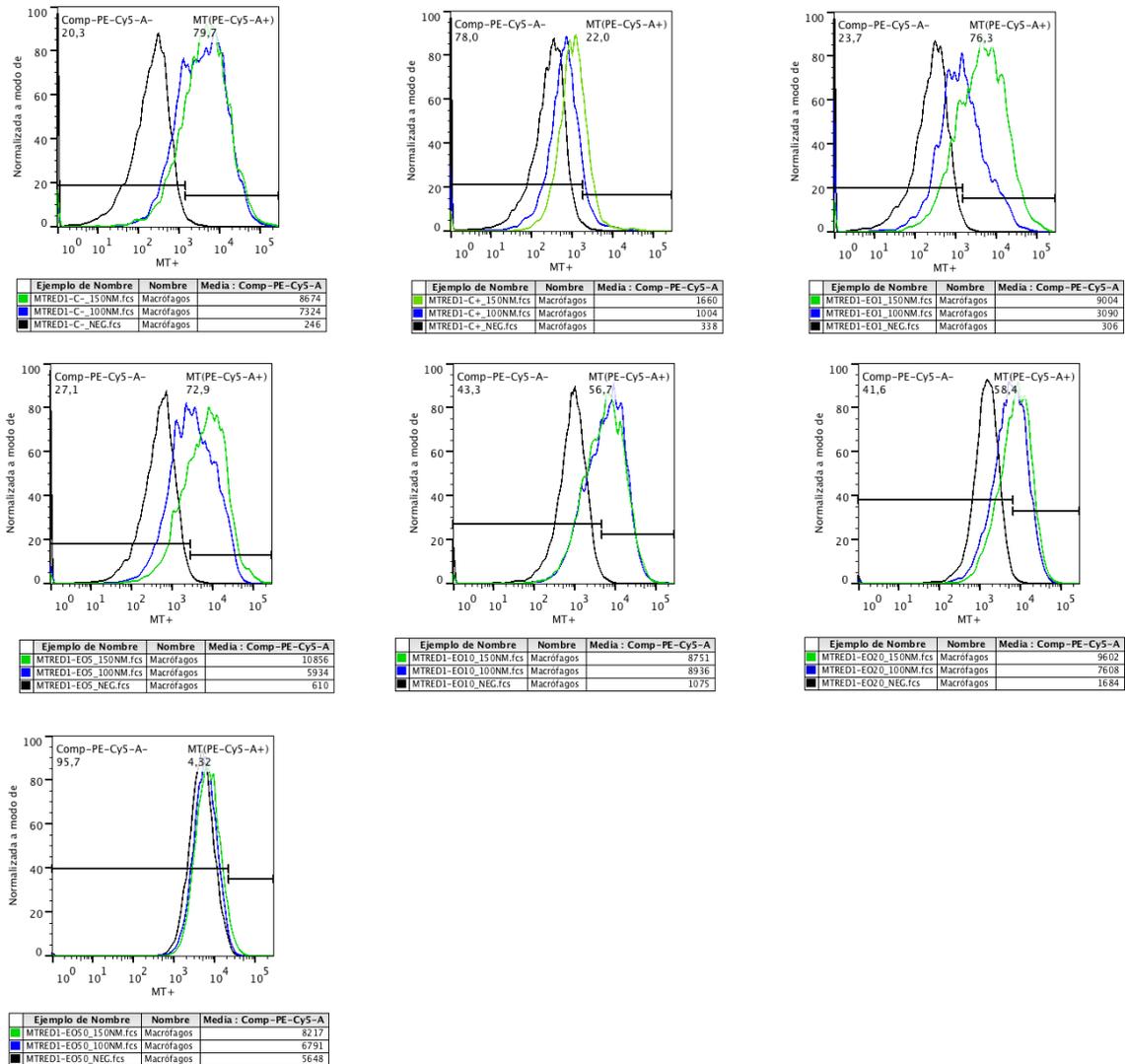
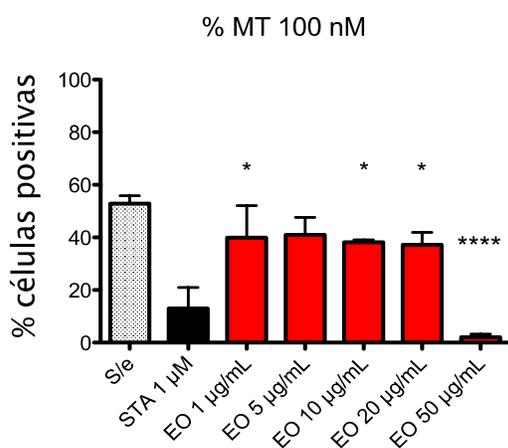


Figura 10. Análisis del $\Delta\Psi_m$ mediante citometría de flujo. a) Representación gráfica (zebraplots) del tamaño y granularidad de cada una de las poblaciones celulares con cada una de las condiciones experimentales para la evaluación del $\Delta\Psi_m$ a las 24 h. b) Representación gráfica (zebraplots) del análisis de las poblaciones celulares que fueron positivas para la tinción con MT. c) Representación gráfica de los histogramas para las poblaciones MT+. Las imágenes representan el análisis realizado en uno de cuatro experimentos realizados (ver análisis completo en FIGURA S1).

a)



b)

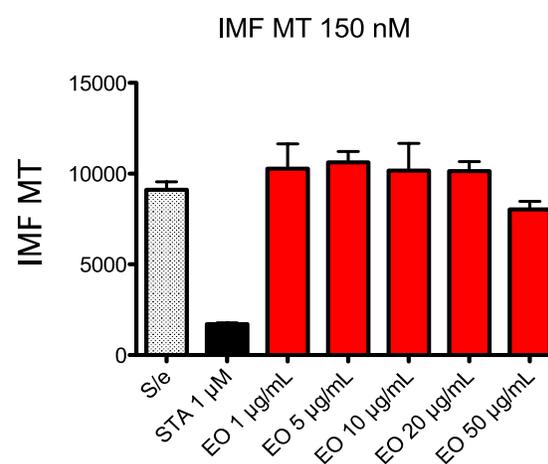
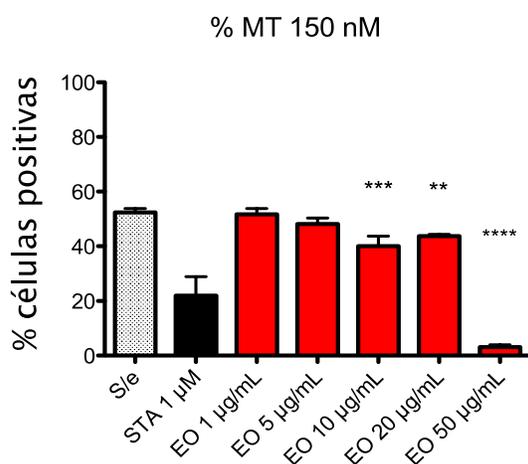
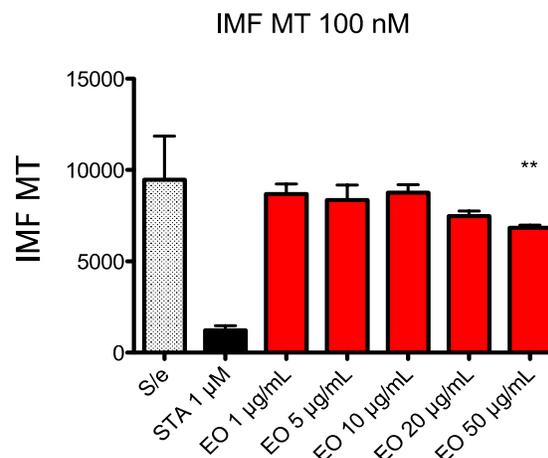


FIGURA 11. Pérdida del $\Delta\Psi_m$ en M Φ 's expuestos a extractos orgánicos provenientes de humo de leña. Los M Φ 's fueron estimulados con concentraciones crecientes de EO (1,5,10,20 y 50 μ g/mL) durante 24 h, posteriormente se tiñeron con MT (100 y 150 nM; previa estandarización) durante 20-25 min en oscuridad y se analizó la pérdida de la tinción mediante citometría de flujo: % células teñidas **a)** e Intensidad media de fluorescencia (IMF) **b)**. Estaurosporina [STA (1 μ M)]: control (+). Las barras representan la media \pm SD, n=4 experimentos independientes por duplicado (**p<0.0014,***p<0.0002,****p<0.0001).

b) Lipopolisacárido (LPS) como control positivo para la liberación de ATP al medio extracelular

Se sabe que la activación celular favorece la síntesis de ATP que le permite a la célula llevar a cabo las funciones metabólicas. La estimulación con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como el LPS es uno de los estímulos externos que induce la activación de los MΦ's y la liberación de ATP [45]. Para evaluar si la exposición a los EO era capaz de inducir la secreción de ATP necesitamos establecer inicialmente un control positivo que nos permitiera comparar los niveles de ATP obtenidos en los ensayos subsecuentes. Con este objetivo es que estimulamos a los MΦ's con concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS.

Después de 4 h de estímulo con IFN- γ y LPS en combinación y por separado, se identificó que LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) es el estímulo adecuado para utilizarlo como control positivo de producción y liberación de ATP al medio extracelular. En cuanto a la medición de la concentración intracelular de ATP utilizamos como control positivo a la estaurosporina 1 μM durante 4 h.

En la Figura 12 se puede observar que cuando los MΦ's son estimulados con concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS incrementan la liberación de ATP. El único estímulo que favoreció la liberación de ATP por sí sólo fue LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a una y cuatro horas de estímulo, por lo tanto ésta fue la condición que decidimos utilizar como control positivo en la medición de ATP extracelular con las muestras de los EO.

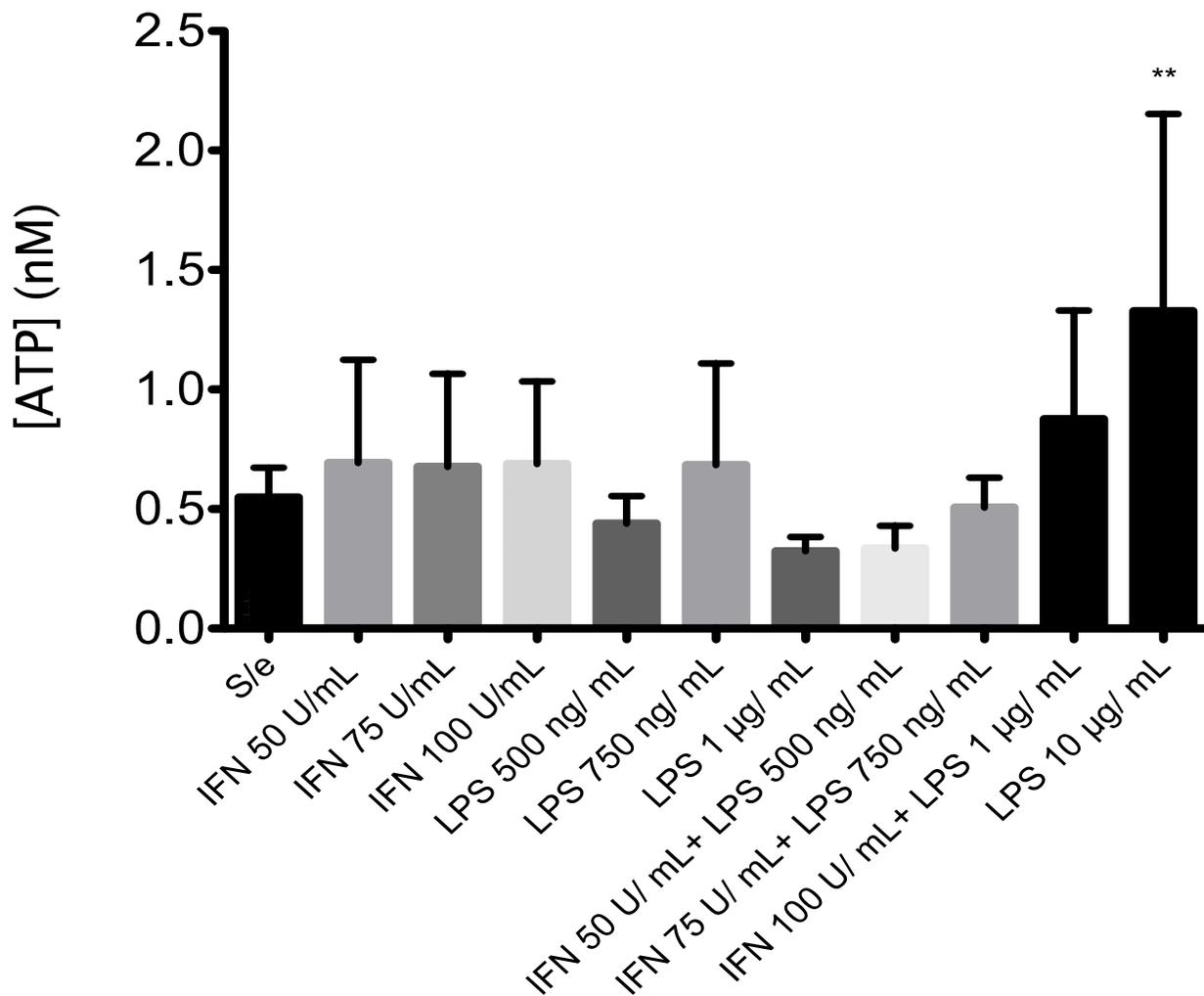


FIGURA 12. Medición de la concentración de ATP en el medio extracelular de MΦ's estimulados con concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS. Los MΦ's fueron estimulados con concentraciones crecientes de IFN- γ y LPS en combinación y por separado durante 4 h en medio de cultivo RPMI a 37° C y 5% CO₂, posteriormente, se realizaron las mediciones de concentraciones de ATP en el sobrenadante, utilizando el sistema luciferina/ luciferasa a 560 nm. Las barras representan la media \pm SD de 6 experimentos independientes por duplicado (**p<0.0019).

c) Concentración de ATP intra y extracelular en MΦ's expuestos a los EO.

Una vez que identificamos la concentración de LPS adecuada para utilizarlo como control positivo de liberación de ATP al medio extracelular, se midió la concentración de ATP en el sobrenadante del cultivo de los MΦ's estimulados con los EO a concentraciones crecientes durante 4 h. Solo identificamos diferencia estadísticamente significativa en la concentración extracelular de ATP con el estímulo de 10 µg/mL de EO, respecto a la condición basal (Figura 13a). Al analizar la concentración de ATP intracelular, no se observaron cambios en las concentraciones de ATP respecto a la condición basal (S/e) (Figura 13b). Estos resultados son consistentes con la ausencia de ATP en el medio extracelular.

a) b)

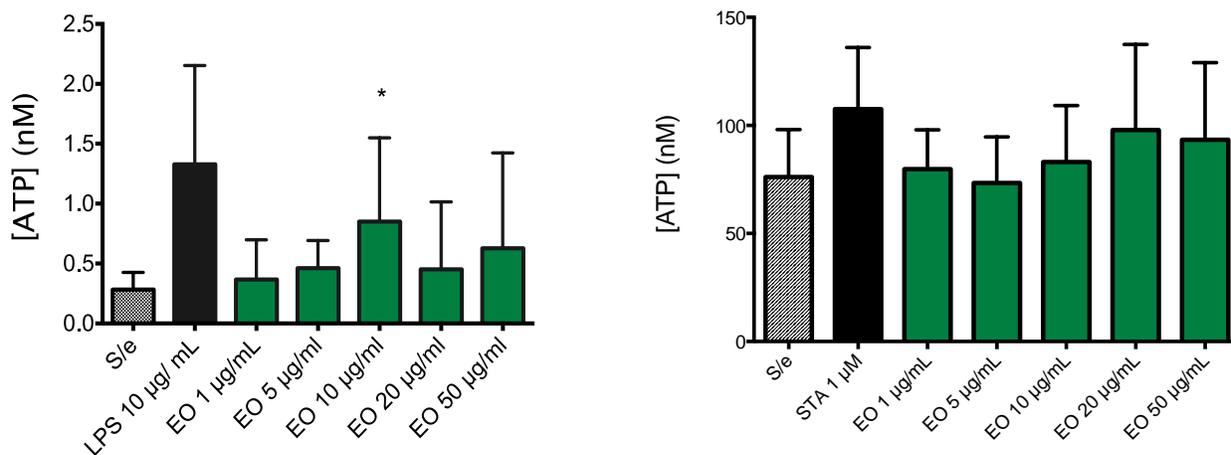


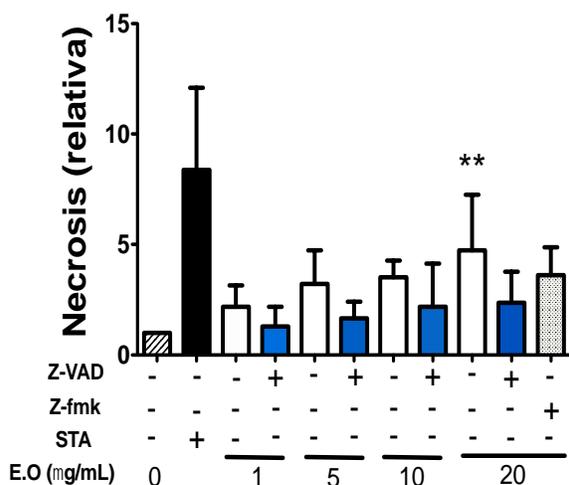
FIGURA 13. Liberación de ATP por MΦ's estimulados con extractos orgánicos provenientes de humo de leña. Los MΦ's fueron estimulados con concentraciones crecientes de EO y se incubaron a 37° C y 5% CO₂ durante 4 h. Posteriormente se midió la concentración de ATP en el sobrenadante de cultivo (a) Control positivo: LPS 10 µg/mL; y la concentración de ATP intracelular (b); Control positivo: estaurosporina (STA) 1 µM. Las barras representan la media ± SD de 4 experimentos independientes por duplicado (p<0.01).

d) La exposición de los MΦ's a los EO favoreció la muerte celular por necrosis

Posteriormente evaluamos si los MΦ's expuestos a los EO eran más susceptibles a desarrollar muerte celular, y, con la finalidad de identificar si este fenómeno era dependiente de la activación de la vía de las caspasas utilizamos el inhibidor de estas proteasas, Z-VAD. Como controles positivos las células fueron expuestas a estaurosporina 3 μM durante 24 h, y a estaurosporina 1 μM durante 4 h, para muerte por necrosis y apoptosis, respectivamente [46].

Los resultados de la Figura 14 muestran que los EO provocan muerte celular por apoptosis y por necrosis manera concentración dependiente, encontrándose que hubo mayor muerte por necrosis. Además, pudimos observar diferencias estadísticamente significativas, únicamente con la concentración de 20 μg/ mL. También identificamos que al incluir el inhibidor de caspasas, la apoptosis no se inhibió **(a)**, al igual que el proceso de necrosis, que, aunque sí disminuyó, no hubo diferencia estadísticamente significativa **(b)**. Estos resultados demuestran que el estímulo con los EO promueven muerte celular por apoptosis independiente de caspasas, sugiriendo que no ocurre liberación de citocromo c, ni formación del apoptosoma, pero sí la liberación de AIF y EndoG; así también favorecen la muerte celular por necrosis, sugiriendo exacerbación de estados inflamatorios crónicos e incremento en la susceptibilidad a infección por *Mycobacterium tuberculosis*, por ejemplo.

a)



b)

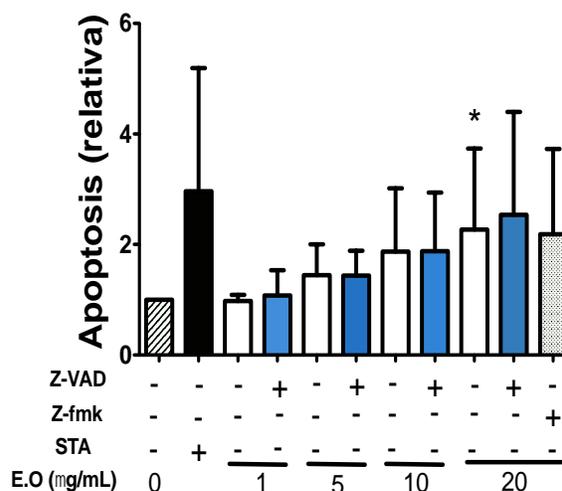


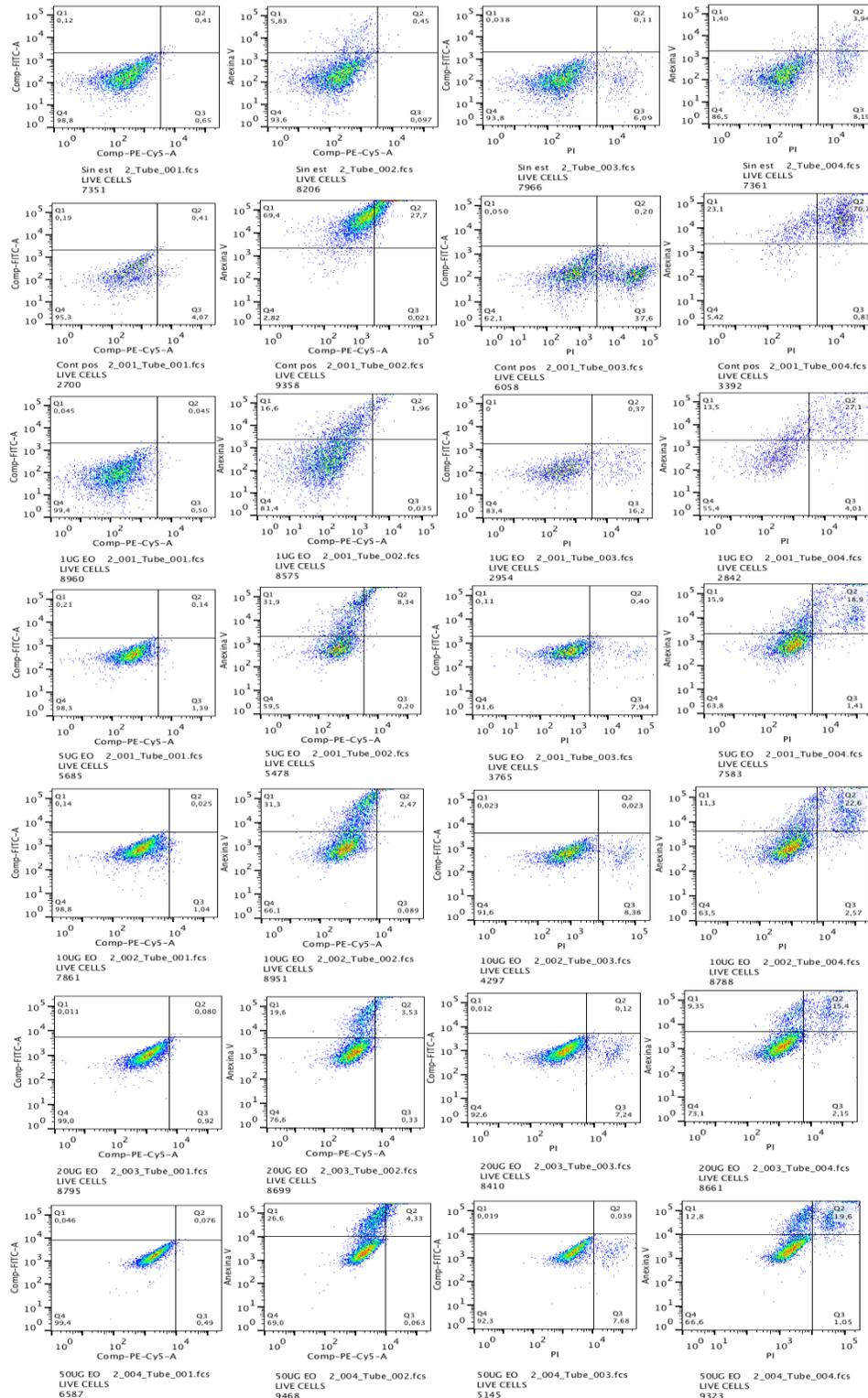
FIGURA 14. Evaluación de apoptosis y necrosis en MΦ's estimulados con extractos orgánicos provenientes de humo de leña. MΦ's fueron estimulados con concentraciones crecientes de EO (1, 5, 10 y 20 µg/mL) durante 24 h, y en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas Z-VAD (50 µM) durante 30 min, previa incubación. Z-fmk (50 µM) se utilizó como control del inhibidor. El proceso de muerte celular por necrosis **a)** y por apoptosis **b)** se evaluó mediante la detección de histonas extra- e intracelulares, respectivamente, por el método de ELISA. Control positivo de apoptosis: estaurosporina (STA) 1µM durante 4 h; Control positivo de necrosis: estaurosporina (STA) 3 µM durante 24 h. Las barras representan la media ± SD, n=8 experimentos independientes por duplicado (**p<0.01 y *p<0.05, respectivamente).

e) La exposición de los MΦ's a EO indujo pérdida de la integridad de la membrana celular y nuclear

La muerte celular también fue evaluada mediante la tinción con Anexina V y Ioduro de Propidio (PI) para evaluar la integridad de las membranas celular y nuclear de los MΦ's. La pérdida de la asimetría de la membrana plasmática y la condensación del citoplasma y núcleo son características de muerte celular. En la Figura 15 se observa que, conforme incrementó la concentración de EO, las células fueron positivas para la tinción con Anexina V y para la tinción con ambos, Anexina V y PI, de manera concentración dependiente. Dichos resultados demuestran que los MΦ's murieron por apoptosis, ya que mostraron

características morfológicas como la externalización de residuos de fosfatidilserina, aunque no se tiñeron con PI, pero sí hubo un incremento en las células muertas (ANN-PI), lo cual indica que también hubo muerte por necrosis en los M Φ 's expuestos a EO (ver análisis completo Figura S2).

15a)



15b)

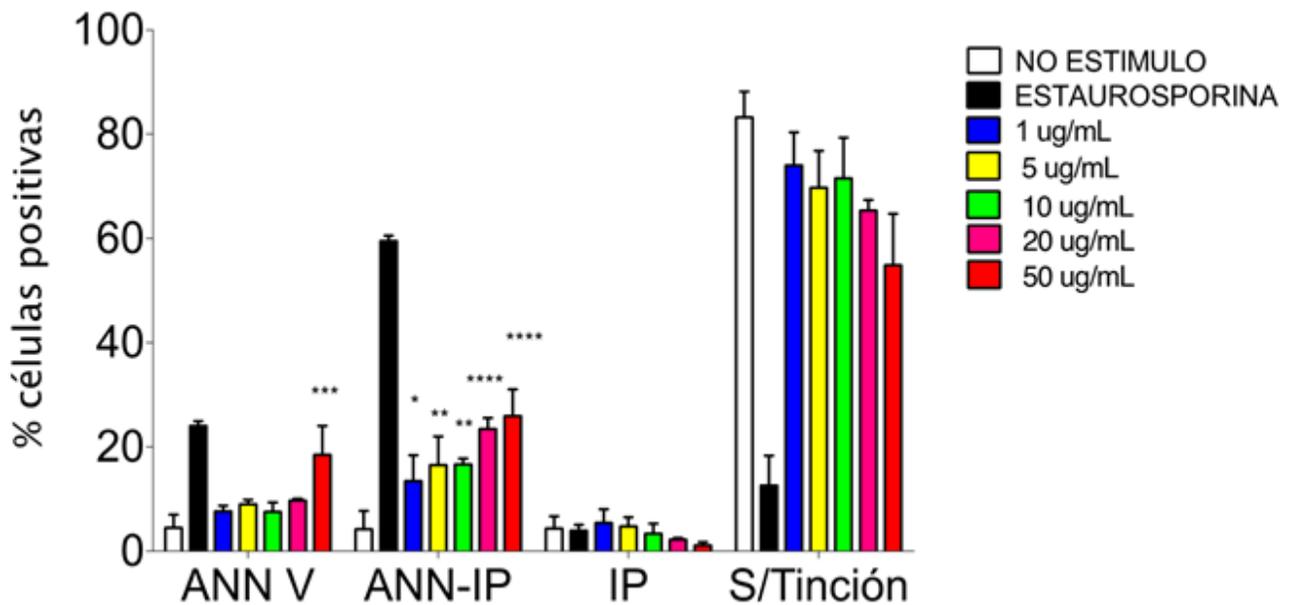


FIGURA 15. La exposición a extractos orgánicos provocó pérdida de la integridad de las membranas celular y nuclear en MΦ's. Los MΦ's fueron expuestos a concentraciones crecientes de EO durante 24 h. Posteriormente se tiñeron con Anexina V y PI durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente y se analizaron mediante citometría de flujo. a) Dot plots del análisis por citometría de flujo y b) Histogramas de los valores de % de células teñidas. Como control positivo se utilizó estaurosporina 1 μM. ANN V; células teñidas con Anexina V, ANN-PI; células teñidas con Anexina V y PI, PI; células teñidas con PI, S/Tinción; células que no se tiñeron. Las barras representan la media ± SD, n=4 experimentos independientes (****p<0.0001).

f) Producción de citocinas pro-inflamatorias por MΦ's expuestos a los EO.

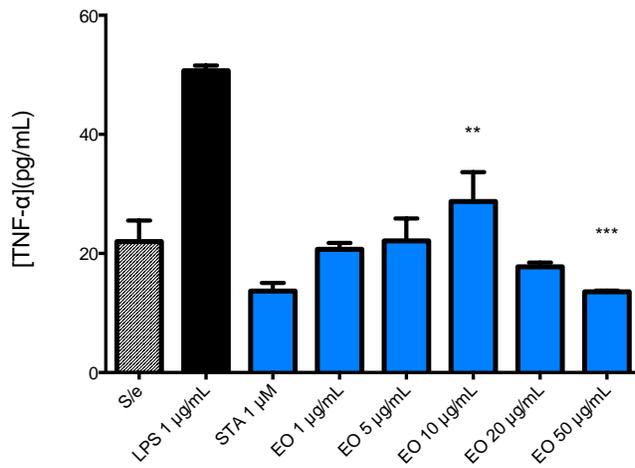
Para evaluar si la exposición de los MΦ's a los EO induce la respuesta inflamatoria, se cuantificaron las citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-1β en el sobrenadante del cultivo. En la Figura 16a se observa que la producción de TNF-α incrementó de manera concentración dependiente siendo estadísticamente significativa la diferencia con la concentración de 10 μg/mL; sin embargo, con 20 y 50 μg/mL se observa que hubo una disminución significativa en la producción de esta citocina con respecto al control. En contraste, aunque se sabe que los macrófagos no son los principales productores de IFN-γ, sí lo producen al activarse en respuesta a un estímulo que favorezca estrés celular, como lo es el

LPS, sin embargo, la producción de IFN- γ fue nula con cada una de las condiciones de estímulo, al compararlas con el control positivo, LPS 1 μ g/mL (Figura 14b).

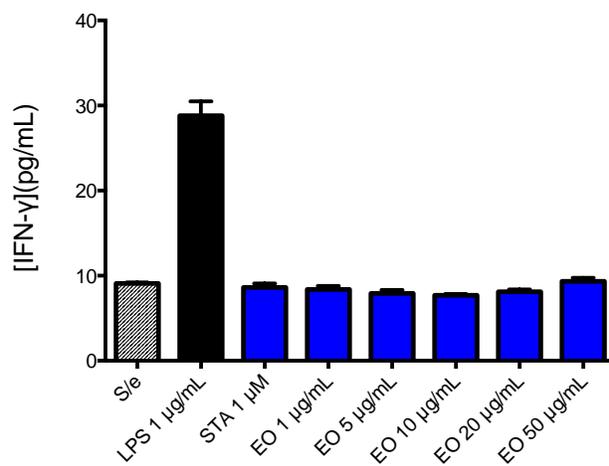
Respecto a IL-1 β , observamos que conforme incrementó la concentración de los EO, la producción de esta citocina disminuyó de manera gradual, existiendo una diferencia estadísticamente significativa con cada una de las condiciones de estímulo respecto al control (Figura 14c).

El hecho de que no se lleve a cabo la producción de citocinas pro- inflamatorias, más que la de TNF- α , nos habla de un posible intento por parte de los M Φ 's de responder a estas partículas mediante la muerte celular por apoptosis, pues este mecanismo demostró llevarse a cabo ante este estímulo (Figura 13b).

a)



b)



c)

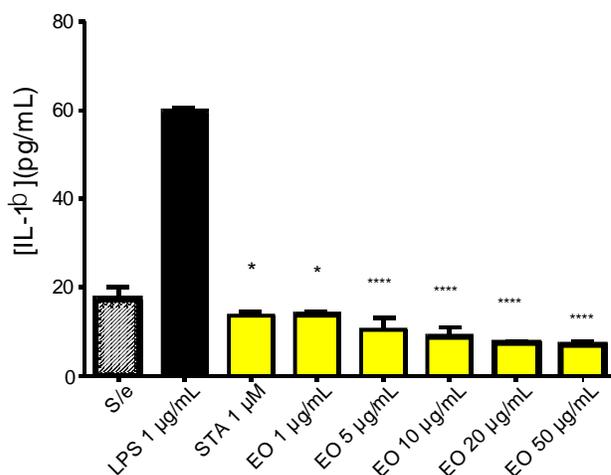


FIGURA 16. Producción de citocinas pro- inflamatorias por los MΦ's estimulados con concentraciones crecientes de extractos orgánicos. Los MΦ's fueron expuestos a las concentraciones crecientes de extractos orgánicos indicadas durante 24 h a 37° C y 5% CO₂, las concentraciones de **a)** TNF-α, **b)** IFN-γ, **c)** IL-1β, en el sobrenadante del cultivo se determinaron mediante ELISA. Los histogramas representan la media ± SD (n=4 experimentos independientes por duplicado, *p<0.01, **p<0.04, ***p<0.0002, ****p<0.0001). Control positivo: LPS 1 µg/mL

IX. DISCUSIÓN

Los principales resultados de este trabajo son: **1)** la exposición de los macrófagos THP-1 a los extractos orgánicos favoreció la disminución gradual del $\Delta\Psi_m$ de una manera concentración dependiente, **2)** la exposición de los macrófagos THP-1 a los extractos orgánicos modifica la concentración de ATP extracelular, **3)** la exposición de los macrófagos THP-1 a los extractos orgánicos favoreció la muerte celular por necrosis, **4)** la exposición de los macrófagos THP-1 a los extractos orgánicos provocó pérdida de la integridad de las membranas celular y nuclear y **5)** la exposición de los macrófagos THP-1 a los extractos orgánicos modifica la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , INF- γ e IL-1 β).

La exposición *in vitro* de los M Φ 's a los EO disminuyó el $\Delta\Psi_m$ de manera concentración dependiente demostrando daño mitocondrial. El análisis del porcentaje de células positivas para la tinción con MT disminuyó de manera concentración dependiente mientras que la intensidad media de fluorescencia no mostró cambios. Estos resultados sugieren que a concentraciones altas de EO disminuye el número de mitocondrias funcionales en los M Φ 's, posiblemente como consecuencia de la activación de procesos de muerte celular. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en un estudio en el que evaluaron la pérdida del $\Delta\Psi_m$ en células endoteliales pulmonares de humano expuestas a EO a diferentes tiempos de exposición **[19]**. Desconocemos hasta la fecha si la exposición crónica de las células a los EO y los cambios en la fisiología celular evaluados por la pérdida gradual del número de mitocondrias viables puedan estar asociados con cambios en la eficiencia de la respuesta inmune que tengan impacto en el hospedero.

La conservación del $\Delta\Psi_m$ es un evento fisiológicamente crítico para la producción de ATP, por lo que, evaluamos si la exposición de los MΦ's a estos compuestos modificaba la concentración intra y extracelular de ATP. Los resultados mostraron que la concentración intracelular de ATP no presentó cambios con respecto a la condición basal (S/e) sugiriendo que a pesar del estímulo la producción de ATP se mantiene. Sin embargo, al analizar la concentración de ATP en el sobrenadante del cultivo pudimos observar que con 10 $\mu\text{g/mL}$ la concentración de ATP incrementó con respecto a la condición basal. Estos resultados sugieren que conforme se incrementa la concentración de EO las células expuestas incrementan su tasa de muerte celular por necrosis, lo cual explicaría la mayor concentración de ATP en el sobrenadante. Sin embargo, es necesario evaluar si la producción de ATP intracelular se debe a que a pesar de la pérdida de la integridad de las mitocondrias, se llevó a cabo de manera eficiente, o éste ATP es producto de otras rutas metabólicas como la glucólisis o el ciclo de Krebs, por ejemplo, que no se hayan visto alteradas.

LPS es un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), del cual se sabe que induce la liberación de ATP en diversos tipos celulares, incluyendo células que mueren por necrosis, por lo que se utilizó como control positivo para la liberación de esta molécula ante el estímulo de los extractos orgánicos y, como se pudo observar, estas partículas por sí solas no indujeron la liberación de ATP, caso contrario al LPS. Éste último se encuentra de manera libre en el medio ambiente, pudiéndose encontrar adsorbido o adherido a las partículas de aire contaminado o a las generadas por la quema de biocombustibles, lo cual facilitaría su fagocitosis y la estimulación de la respuesta inflamatoria requerida para eliminar cualquier sustancia o compuesto tóxico dañino para el organismo que pueda provocar el desarrollo o exacerbación de enfermedades de tipo respiratorio, incluso cáncer pulmonar.

El ATP además de ser la principal fuente de energía para las células, es una molécula esencial en el proceso de muerte celular por apoptosis, ya que ésta es dependiente de la retención de los niveles intracelulares de ATP, pues la activación de las caspasas y endonucleasas, así como la formación del complejo apoptosoma son dependientes de energía en forma de ATP [47]; sin embargo, ante el estímulo de EO no se observó la activación de esta vía.

La activación de ambos procesos de muerte celular, apoptosis independiente de caspasas y necrosis, evaluados por presencia de histonas nucleares, translocación de fosfatidilserina (células teñidas con Anexina V; apoptosis) y fragmentación nuclear (células teñidas con ambos, Anexina V y PI; necrosis), todas con un incremento de manera concentración dependiente, indican que la muerte por necrosis de los MΦ's favorecería la exacerbación de procesos inflamatorios que no pudieran ser controlados por las células residentes en pulmón de personas expuestas de manera crónica al humo de leña. Además, estos resultados son consistentes con los obtenidos por Liu, Po Len y Solhaug, en cuyos estudios reportaron tinción positiva con Anexina y PI, así como la detección de apoptosis y necrosis por microscopía de fluorescencia, además de la traslocación de los factores apoptogénicos, AIF y EndoG, de la mitocondria al núcleo, demostrando muerte por apoptosis independiente de caspasas, en células epiteliales Hepa1c1c7 y células endoteliales, ambas de humano [13, 19].

Finalmente, al evaluar la secreción de citocinas pro-inflamatorias en el sobrenadante de cultivo proveniente de los MΦ's expuestos a los E.O., se identificó que TNF- α incrementó de manera gradual con las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, con la concentración de 20 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los niveles de esta citocina disminuyeron por debajo del control (S/e). Es posible que esta cinética de secreción se deba a un estado de activación ineficiente en los MΦ's. En relación a la IL-1 β observamos que tiene una relación inversa con la concentración del E.O. TNF- α e IL-1 β son citocinas que promueven la inflamación

y la síntesis de moléculas de adhesión, además de que actúan de manera sinérgica para incrementar la expresión de IL-8, así como el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos **[48]**. Por lo que los cambios en el perfil de producción y secreción de estas citocinas puede limitar la funcionalidad de los mecanismos de defensa por parte de los macrófagos alveolares contra el daño ocasionado por las partículas e incluso por alguna infección oportunista.

Estudios previos han demostrado que los efectos supresores de partículas de diesel (DEP) en los macrófagos reside en la presencia de los PAHs y las fracciones de resinas contenidas en estas partículas, disminuyendo la producción de IFN- γ , lo cual lleva a la disminución y/o inhibición de la síntesis de la iNOS, resultando en una respuesta pobre e ineficiente hacia microorganismos patógenos intracelulares **[49]**. Los resultados que hemos obtenido respecto a IFN- γ también implican una respuesta ineficiente por parte de los macrófagos hacia las partículas del humo de leña.

El impacto inmunológico que tiene la exposición de las células en el sistema inmune se ve manifiesta en estudios previos que demuestran los efectos directos de DEP en la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*. Los autores demostraron que estas partículas incrementan la carga bacteriana en los pulmones con una disminución en la producción de citocinas pro- inflamatorias **[17]**, similar a nuestros resultados (Figura 14); consistente con otro estudio en el que demostraron que la exposición a estas partículas disminuyó la fagocitosis y actividad bactericida en macrófagos alveolares infectados con *Listeria monocytogenes* **[50]**.

Adicionalmente, Ferecatu y colaboradores demostraron previamente que partículas de 2.5 μm de diámetro provocan un efecto anti- apoptótico a nivel mitocondrial ligado a la presencia de los PAHs adsorbidos y a su ligando, el AhR, favoreciendo la regulación negativa de los genes involucrados en la apoptosis

[22]; sin embargo, nosotros demostramos que los extractos orgánicos (PM_{2.5}) sí inducen este tipo de muerte celular.

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial así como en la producción de citocinas pro- inflamatorias pueden hacer que estas células sean más propensas a morir por necrosis. Estos cambios funcionales tienen implicaciones inmunológicas relevantes ya que los macrófagos son las células que por excelencia median protección a nivel del sistema respiratorio. La necrosis es un mecanismo que favorece la respuesta inflamatoria local y sistémica, de modo que es posible que participe en el desarrollo de un estado inflamatorio crónico persistente en aquellas personas expuestas al humo de leña. Es posible que la disfunción de los macrófagos participe en el desarrollo de infecciones del aparato respiratorio en mujeres que cocinan con humo de leña y en los niños que aún no asisten a la escuela ya que son las poblaciones mayormente afectadas.

X. CONCLUSIONES

La exposición *in vitro* a los extractos orgánicos provenientes del humo de leña favorece la muerte celular por necrosis de los macrófagos THP-1, aunque también inducen apoptosis independiente de caspasas, ambos procesos de manera concentración dependiente.

Es necesario realizar más estudios experimentales que nos permitan identificar si los cambios en estos mecanismos inmunológicos pueden ser parcialmente responsables de la mayor susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas, así como al desarrollo de cáncer pulmonar.

XI. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos nos hemos propuesto investigar la vía de señalización de muerte celular específica que inducen los extractos orgánicos provenientes de humo de leña, mediante la identificación de diversas moléculas involucradas, tales como las caspasas 8, 9 y 3, para diferenciar entre la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis, así como Bak, Bax, citocromo c, AIF y EndoG. Así mismo, la caspasa 1 para descartar o evidenciar un proceso de piroptosis, y PARP1 para evaluar necrosis.

Adicionalmente, evaluaríamos la muerte celular de los macrófagos mediante citometría de flujo, identificando las células que mueren por apoptosis, diferenciándolas de las que lo hacen por necrosis, así como la identificación de células que mueren por necrosis secundaria a la apoptosis, a través de la tinción con el homodímero III de etidio **[51]**.

Por otra parte, la evaluación de la respuesta inflamatoria mediante la expresión intracelular de citocinas pro- y anti- inflamatorias, tales como IL-12, IL-8, IL-10 y TGF- β es otra de las mediciones con las que se podrían evaluar los efectos de los extractos orgánicos provenientes del humo de leña, así como su perfil fenotípico mediante la expresión de receptores de superficie.

ANEXO I

Preparación de reactivos

- Medio de cultivo RPMI suplementado para THP-1

RPMI suplementado para monocitos de la línea celular THP-1	
RPMI 1640 no suplementado	430mL
Suero Fetal Bovino (SFB)	50 mL
Aminoácidos no esenciales	5 mL
HEPES	5 mL
Piruvato de sodio	5 mL
Antibiótico	5 mL
β - mercaptoetanol	500 μ L

TABLA 1. Composición para 500 mL de medio de cultivo RPMI en el que se cultivan y se siembran las células. Preparar por separado 1 mL de una solución de β - mercaptoetanol diluyendo 3.5 μ L en 996.5 μ L de RPMI

- Acetato de Forbol- miristato (PMA)

De una solución stock 1 mg/mL realizar una dilución 1:1000, resuspendiendo en medio de cultivo RPMI suplementado [1 μ g/mL] y, a partir de ésta tomar 62 μ L completando a 1 mL para una concentración final de PMA 100 nM.

- Solución stock MitoTracker Red CMXRos

Resuspender el contenido de un vial de MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) en 94 μ L de RPMI suplementado sin SFB, posteriormente tomar 19 μ L y resuspender en un volumen final de 10 mL en medio de cultivo sin SFB y, a partir de ésta tomar los volúmenes necesarios para la determinación del $\Delta\Psi_m$.

-
- Buffer de lisis Tritón X-100 0.2%

Preparar 50 mL de buffer añadiendo Tritón X-100 0.2%, EDTA 4mM y Tris- HCl 0.1 mM con pH 8.5, al final aforar con PBS.

- Solución stock ATP

De la solución de ATP contenida en el kit (*ATP determination*, molecular probes) tomar 15 μ L y resuspender en dH₂O a un volumen final de 1 mL, posteriormente, de ésta solución tomar 267 μ L y completar hasta 1 mL para tener una solución stock de ATP 50 μ M, a partir de ésta tomar los volúmenes necesarios para la cuantificación de [ATP] extracelular.

- Solución estándar de reacción (luciferina/ luciferasa)

Para 20 mL:

- 17.8 mL dH₂O
- 1 mL buffer de reacción 20X
- 0.2 mL DTT 0.1 M (Preparar una solución stock de DTT 100 mM añadiendo 1.62 mL de dH₂O)
- 1 mL de D- luciferina 10 mM (Preparar 1 mL de una solución stock de D- luciferina 10 mM añadiendo 1mL del buffer de reacción 1X a un vial de D- luciferina componente A)
- 5 μ L de luciferasa 5 mg/mL

NOTA: homogenizar por inversión, NO VORTEX (ya que la luciferasa puede ser fácilmente desnaturalizada)

- Solución stock inhibidor de caspasas Z-VAD

Resuspender el contenido del vial en 214 μL para tener una concentración de 10 mM.

De ésta solución tomar 4.3 μL y resuspender en 15.7 μL de DMSO [200 μM], y, a partir de ésta tomar el 5 μL para tener una concentración final de 50 μM en el cultivo celular.

- Solución stock control negativo del inhibidor (Z-fmk)

Resuspender el contenido del vial en 263 μL para tener una concentración de 10 mM.

De ésta solución tomar 2.7 μL y resuspender en 7.3 μL de DMSO [100 μM], y, a partir de ésta solución tomar 5 μL para tener una concentración final de 50 μM en el cultivo celular.

- Curva estándar de ATP

[ATP] (nM)	Vol. Soln. Std. ATP	Vol. Soln. Std. Rx
20	20 μL	180 μL
15	15 μL	185 μL
10	10 μL	190 μL
5	5 μL	195 μL
1	1 μL	199 μL
0	0	200 μL

TABLA 3. Relación de volúmenes añadidos a los pozos de la placa de 96 pozos en la que se realizó la curva estándar de ATP

ANEXO II

Memoria de cálculo

❖ Solución Stock de MitoTracker Red CMXRos

$$m = 50 \mu\text{g} = 0.05 \text{ mg cada vial} \quad \frac{0.05 \text{ mg}}{531.52 \text{ mg/mmol}} = 9.4 \cdot 10^{-5} \text{ mmol}$$

$$\text{PM} = 531.52 \text{ mg/mmol}$$

$$m_{\text{LDMSO}} = \frac{9.4 \cdot 10^{-5} \text{ mmol}}{1 \text{ mM}} = 0.094 \text{ mL} = 94 \mu\text{L} \quad 1 \text{ mM} \cdot \frac{1 \cdot 10^6 \text{ nM}}{1 \text{ mM}} = 1 \cdot 10^6 \text{ nM}$$

$$\begin{array}{r} 94 \mu\text{L} \text{ ————— } 1 \times 10^6 \text{ nM} \\ \times \quad \text{————— } 2 \times 10^5 \text{ nM} \end{array}$$

$$x = 18.8 \mu\text{L} = 19 \mu\text{L de sol. Stock en } 9981 \mu\text{L de RPMI sin SFB para completar a } 10 \text{ mL}$$

Ejemplo:

Para agregar 10 nM

$$\begin{array}{r} 10\,000 \mu\text{L} \text{ ————— } 200\,000 \text{ nM} \\ \times \quad \text{————— } 10 \text{ nM} \end{array}$$

$$x = 0.5 \mu\text{L (TABLA 2)}$$

❖ Solución stock de ATP

$$\begin{array}{r} 400 \mu\text{L} \text{ ————— } 5 \text{ mM} \\ 1 \mu\text{L} \text{ ————— } \times \end{array}$$

$$x = 12.5 \mu\text{M (en } 1 \mu\text{L + } 999 \mu\text{L dH}_2\text{O)}$$

$$\begin{array}{r} 1000 \mu\text{L} \text{ ————— } 12.5 \mu\text{M} \\ \times \quad \text{————— } 1 \mu\text{M} \end{array}$$

$$x = 80 \mu\text{L (80 } \mu\text{L + } 920 \mu\text{L dH}_2\text{O)}$$

Ejemplo:

Para agregar 20 nM

$$\begin{array}{r} 1000 \mu\text{L} \text{ ————— } 1000 \text{ nM} \\ \times \quad \text{————— } 20 \text{ nM} \end{array}$$

$$x = 20 \mu\text{L}$$

❖ Buffer de lisis

EDTA 4mM

$$\left(\frac{0.004\text{mol}}{1\text{L}}\right)\left(\frac{380.2\text{g}}{1\text{mol}}\right)\left(\frac{100\text{g}}{99.5\text{g}}\right)(0.05\text{L}) = 0.076\text{g} = 76\text{mg}$$

Tris-HCl

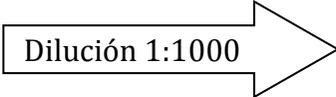
$$\left(\frac{0.1\text{mmol}}{1\text{L}}\right)\left(\frac{121.4\text{mg}}{1\text{mmol}}\right)\left(\frac{100\text{mg}}{99.8\text{mg}}\right)(0.05\text{L}) = 0.61\text{mg}$$

Tritón X-100

$$\begin{array}{l} 50\text{ mL} \text{ ————— } 100\% \\ X \text{ ————— } 0.2\% \end{array}$$

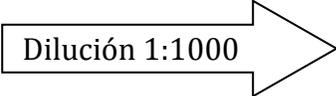
$$X = 0.1\text{ mL} = 100\ \mu\text{L}$$

❖ Lipopolisacárido (LPS)

Solución stock 1 mg/mL  Dilución 1:1000  1 µg/mL: $\begin{array}{l} 1\ \mu\text{g} \text{ ————— } 1000\ \text{mL} \\ 0.5\ \mu\text{g} \text{ ————— } X \\ X = 500\ \mu\text{L} \end{array}$

❖ Interferon gamma (IFN-γ)

$$1\ \text{UI IFN-}\gamma = 50\ \text{pg} \longrightarrow 100\ \text{UI} = 5000\ \text{pg} = 5\ \text{ng IFN-}\gamma$$

Solución stock 100 µg/mL  Dilución 1:1000  100 ng/mL

$$\begin{array}{l} 100\ \text{ng} \text{ ————— } 1000\ \mu\text{L} \\ 5\ \text{ng} \text{ ————— } X \end{array} \quad X = 50\ \mu\text{L}$$

ANEXO III

Figura Suplementaria 1a) Experimento 2

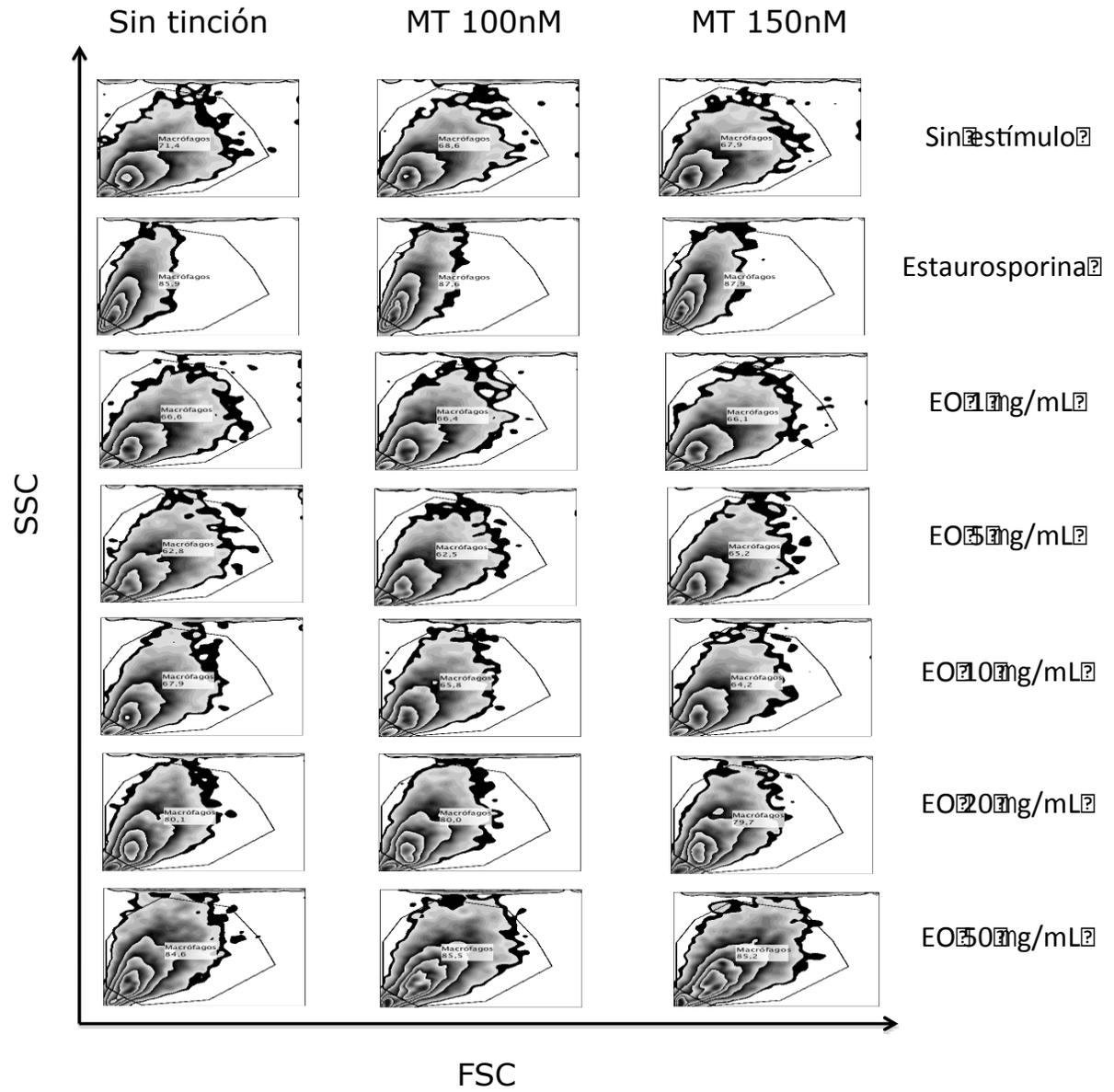


Figura Suplementaria 1b) Experimento 2

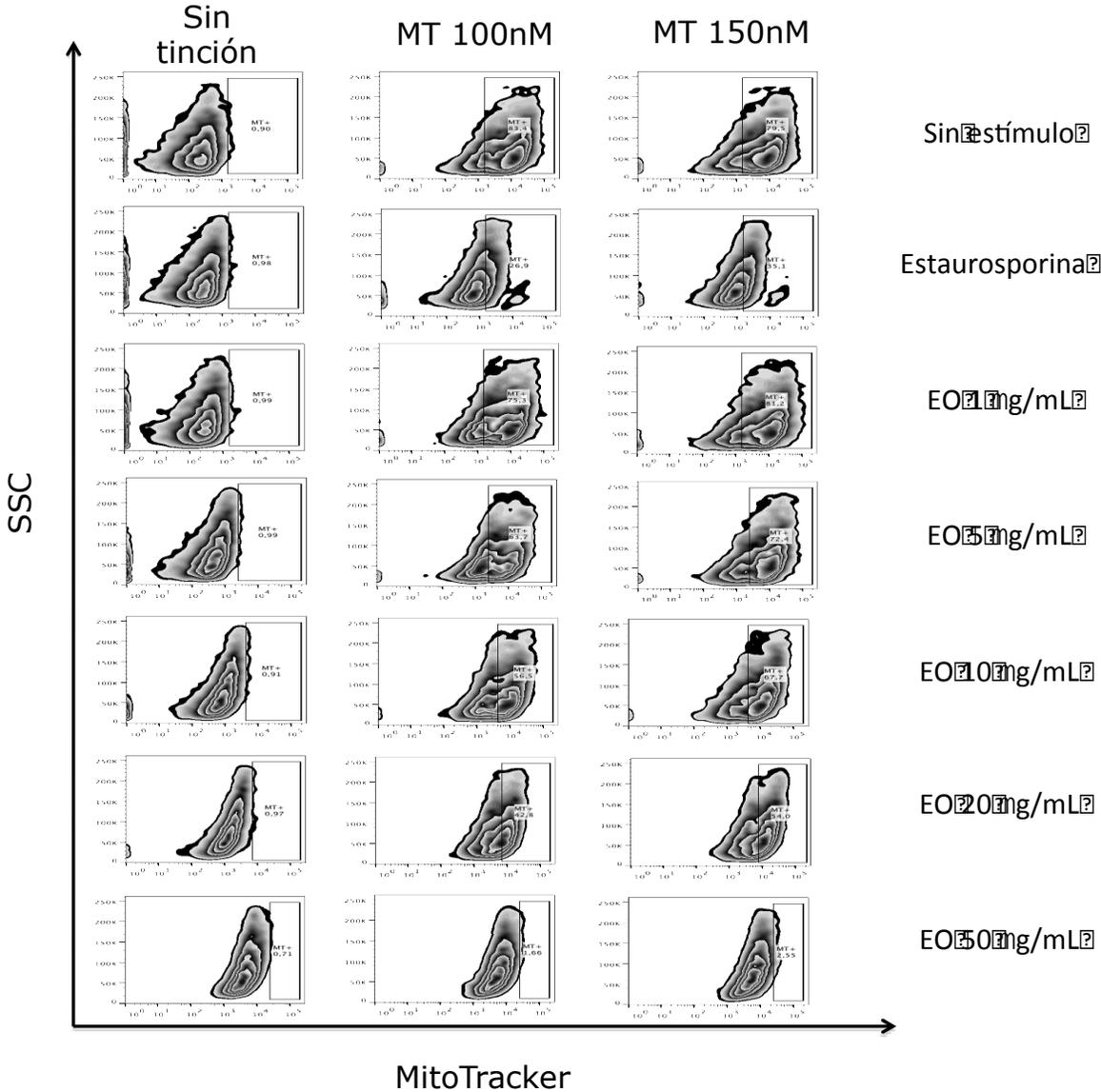
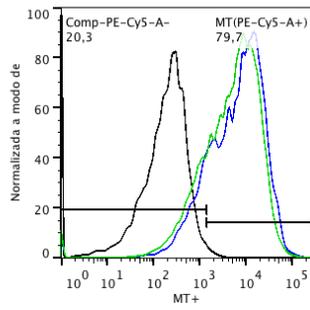
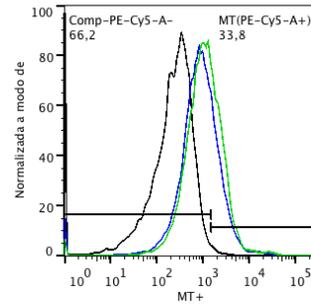


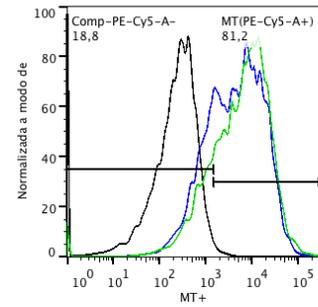
Figura Suplementaria 1c) Experimento 2



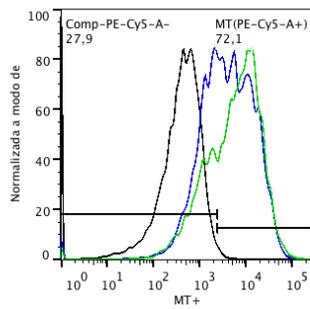
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-C-.001_150NM.fcs	Macrófagos	8995
MTRED1-C-.001_100NM.fcs	Macrófagos	11208
MTRED1-C-.001_NEG.fcs	Macrófagos	223



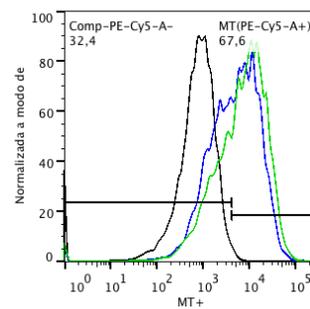
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-C+.001_150NM.fcs	Macrófagos	1657
MTRED1-C+.001_100NM.fcs	Macrófagos	1375
MTRED1-C+.001_NEG.fcs	Macrófagos	272



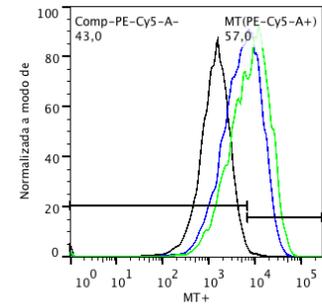
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E01_001_150NM.fcs	Macrófagos	11143
MTRED1-E01_001_100NM.fcs	Macrófagos	8717
MTRED1-E01_001_NEG.fcs	Macrófagos	257



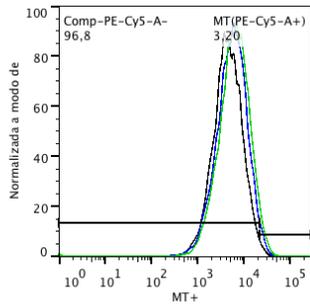
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E05_001_150NM.fcs	Macrófagos	9790
MTRED1-E05_001_100NM.fcs	Macrófagos	7610
MTRED1-E05_001_NEG.fcs	Macrófagos	522



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E010_001_150NM.fcs	Macrófagos	11020
MTRED1-E010_001_100NM.fcs	Macrófagos	8134
MTRED1-E010_001_NEG.fcs	Macrófagos	957



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E020_001_150NM.fcs	Macrófagos	10377
MTRED1-E020_001_100NM.fcs	Macrófagos	7144
MTRED1-E020_001_NEG.fcs	Macrófagos	1675



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E050_001_150NM.fcs	Macrófagos	7527
MTRED1-E050_001_100NM.fcs	Macrófagos	6663
MTRED1-E050_001_NEG.fcs	Macrófagos	5436

Figura Suplementaria 1a) Experimento 3

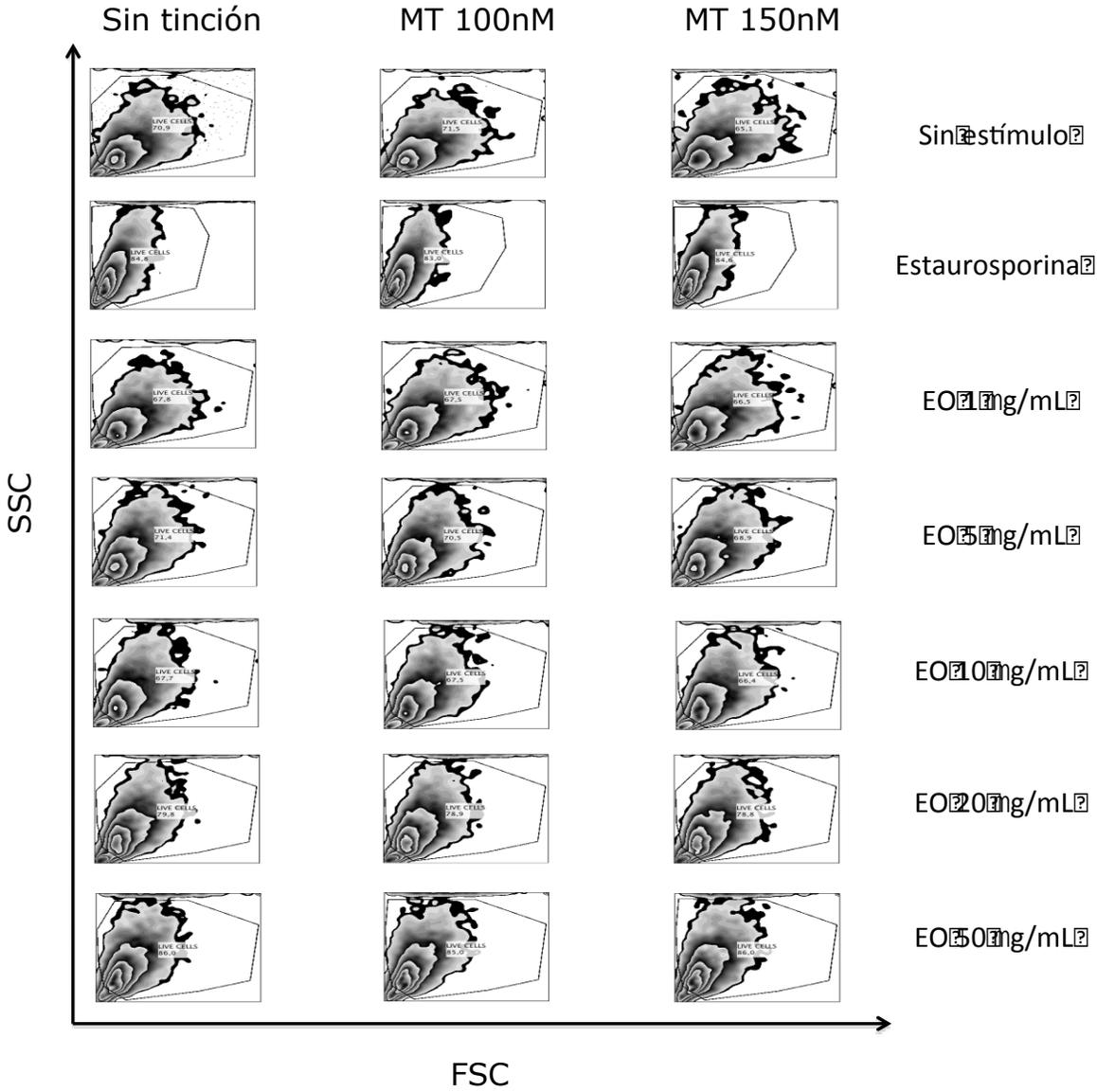


Figura Suplementaria 1b) Experimento 3

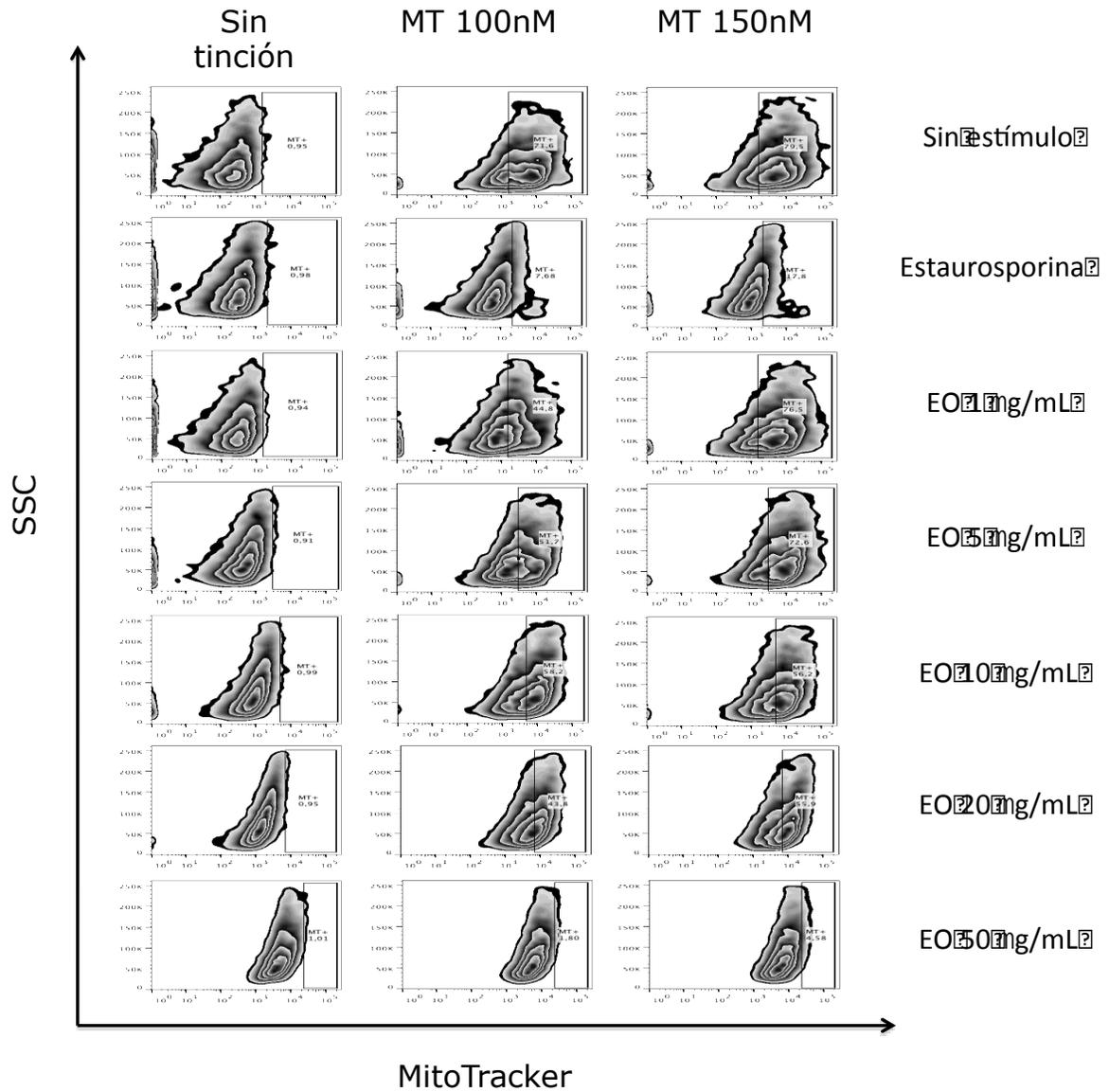
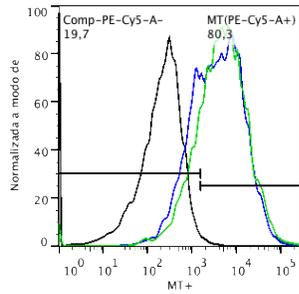
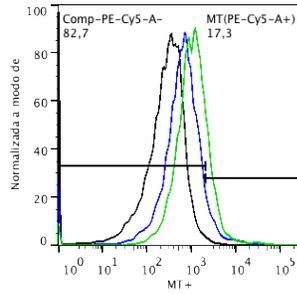


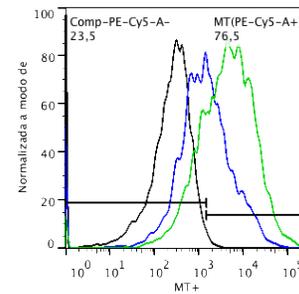
Figura Suplementaria 1c) Experimento 3



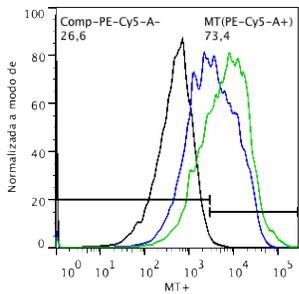
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-C+_150NM.fcs	LIVE CELLS	9053
MTRED1-C+_100NM.fcs	LIVE CELLS	7473
MTRED1-C+_NEG.fcs	LIVE CELLS	253



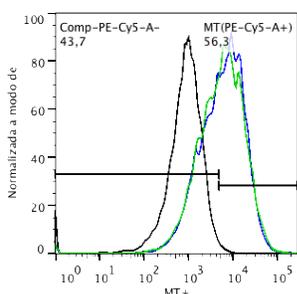
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-C+_150NM.fcs	LIVE CELLS	1701
MTRED1-C+_100NM.fcs	LIVE CELLS	1042
MTRED1-C+_NEG.fcs	LIVE CELLS	360



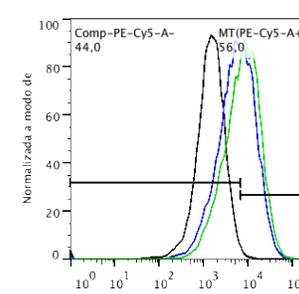
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E01_150NM.fcs	LIVE CELLS	9195
MTRED1-E01_100NM.fcs	LIVE CELLS	3186
MTRED1-E01_NEG.fcs	LIVE CELLS	311



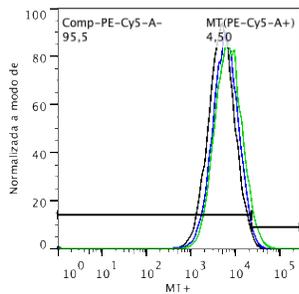
Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E05_150NM.fcs	LIVE CELLS	11141
MTRED1-E05_100NM.fcs	LIVE CELLS	6050
MTRED1-E05_NEG.fcs	LIVE CELLS	626



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E010_150NM.fcs	LIVE CELLS	9050
MTRED1-E010_100NM.fcs	LIVE CELLS	9172
MTRED1-E010_NEG.fcs	LIVE CELLS	1105



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E020_150NM.fcs	LIVE CELLS	9822
MTRED1-E020_100NM.fcs	LIVE CELLS	7793
MTRED1-E020_NEG.fcs	LIVE CELLS	1733



Ejemplo de Nombre	Nombre	Media : Comp-PE-Cy5-A
MTRED1-E050_150NM.fcs	LIVE CELLS	8537
MTRED1-E050_100NM.fcs	LIVE CELLS	6946
MTRED1-E050_NEG.fcs	LIVE CELLS	5782

Figura Suplementaria 1a) Experimento 4

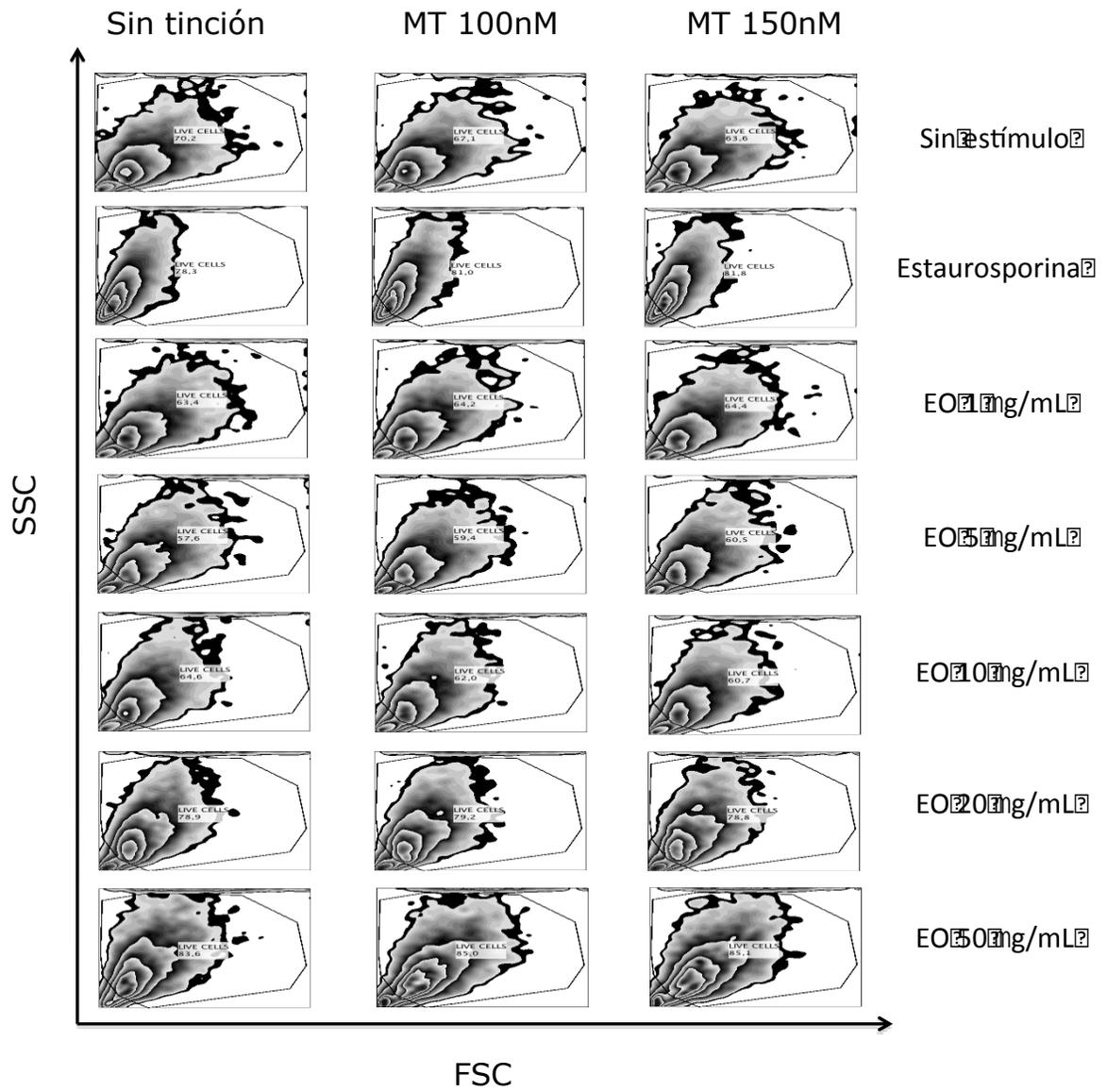


Figura Suplementaria 1b) Experimento 4

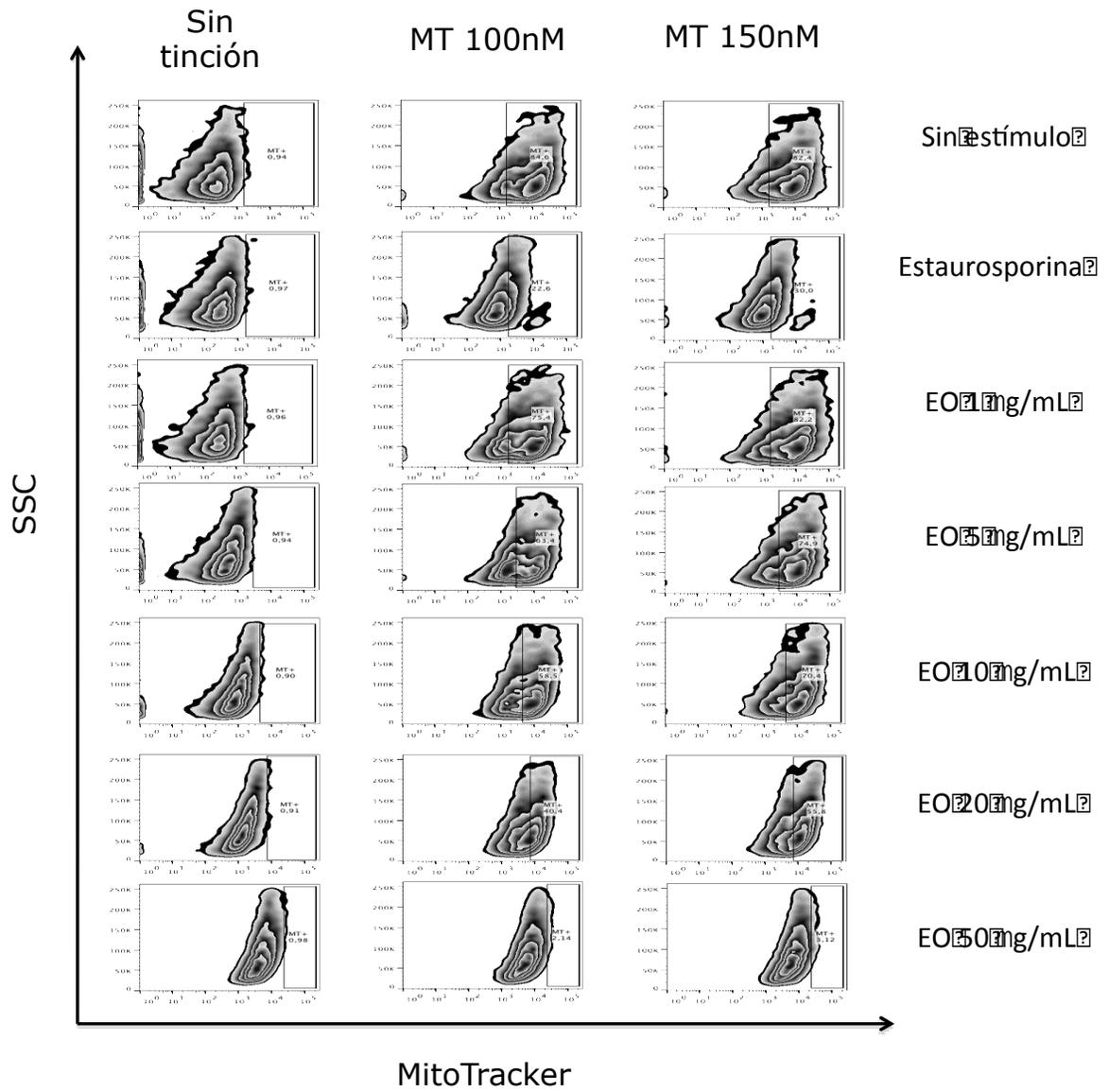


Figura Suplementaria 1c) Experimento 4

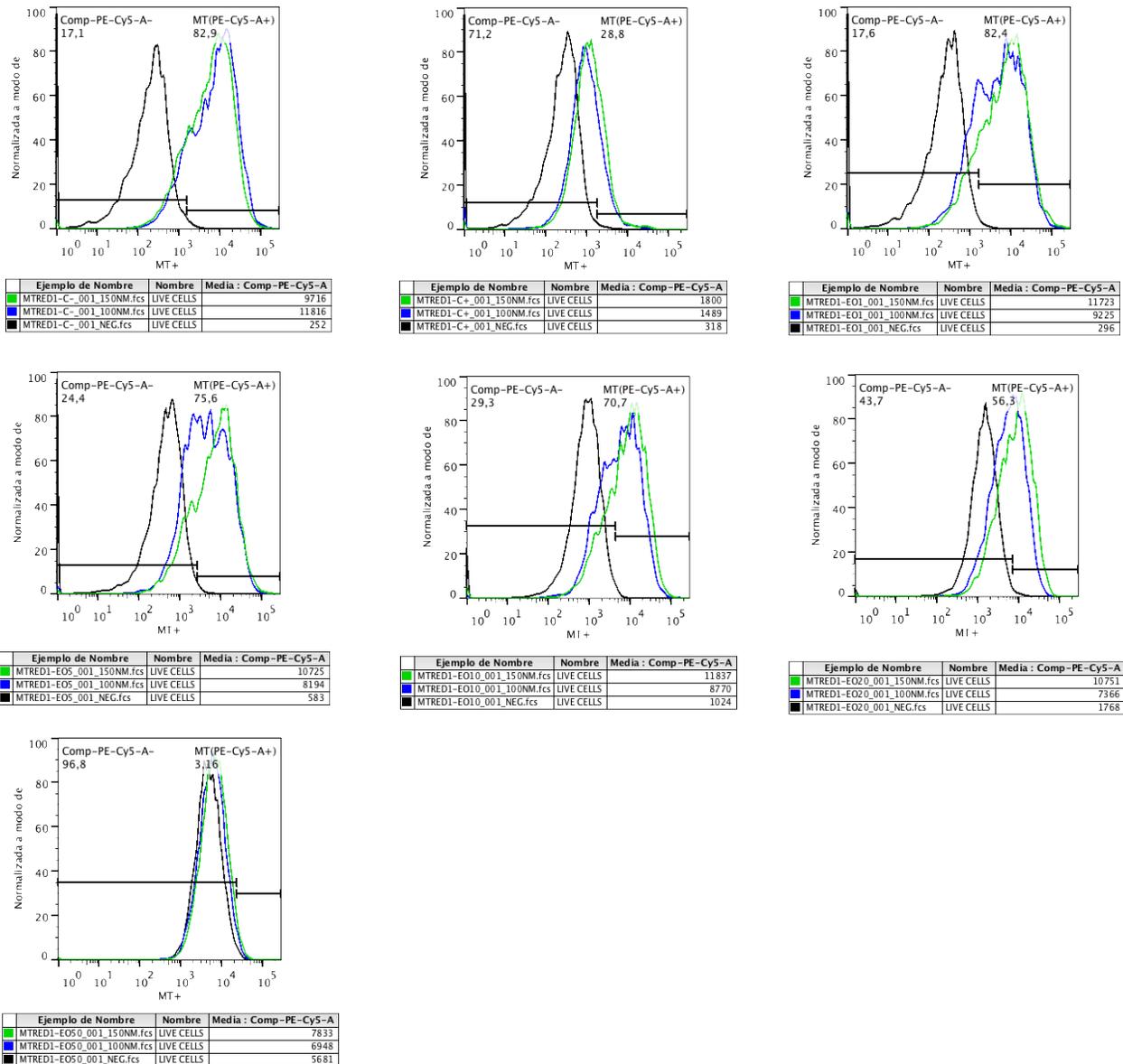


FIGURA S1. Pérdida del $\Delta\Psi_m$ en MΦ's. Análisis del por citometría de flujo. a) Representación gráfica (zebraplots) del tamaño y granularidad de cada una de las poblaciones celulares con cada una de las condiciones experimentales para la evaluación del $\Delta\Psi_m$ a las 24 h. b) Representación gráfica (zebraplots) del análisis de las poblaciones celulares que fueron positivas para la tinción con MT (MT+). c) Representación gráfica de los histogramas para las poblaciones MT+.

Figura S2a Tinción de MΦ's con Anexina V y PI Experimento 2

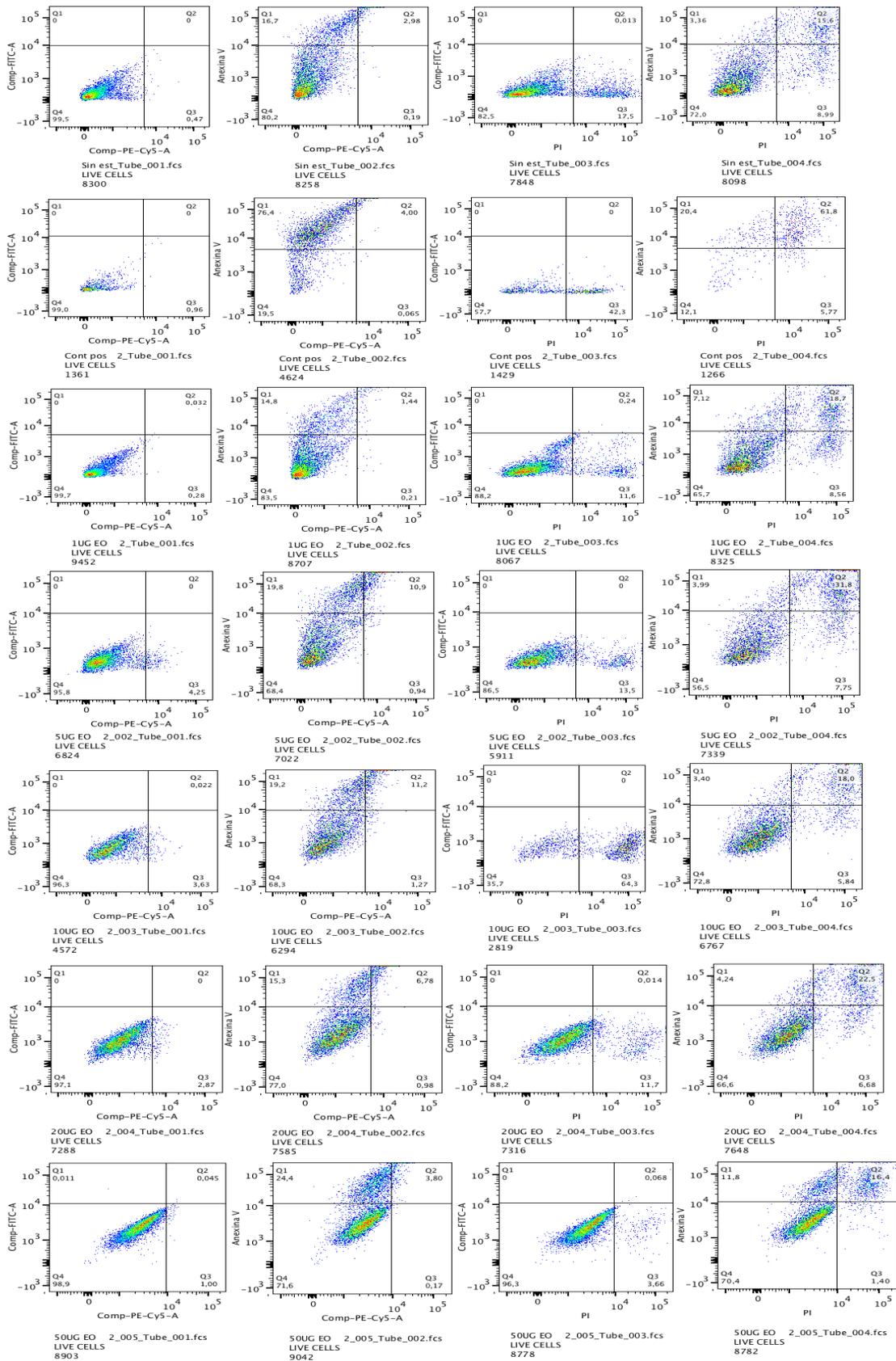


Figura S2b Tinción de MΦ's con Anexina V y PI Experimento 3

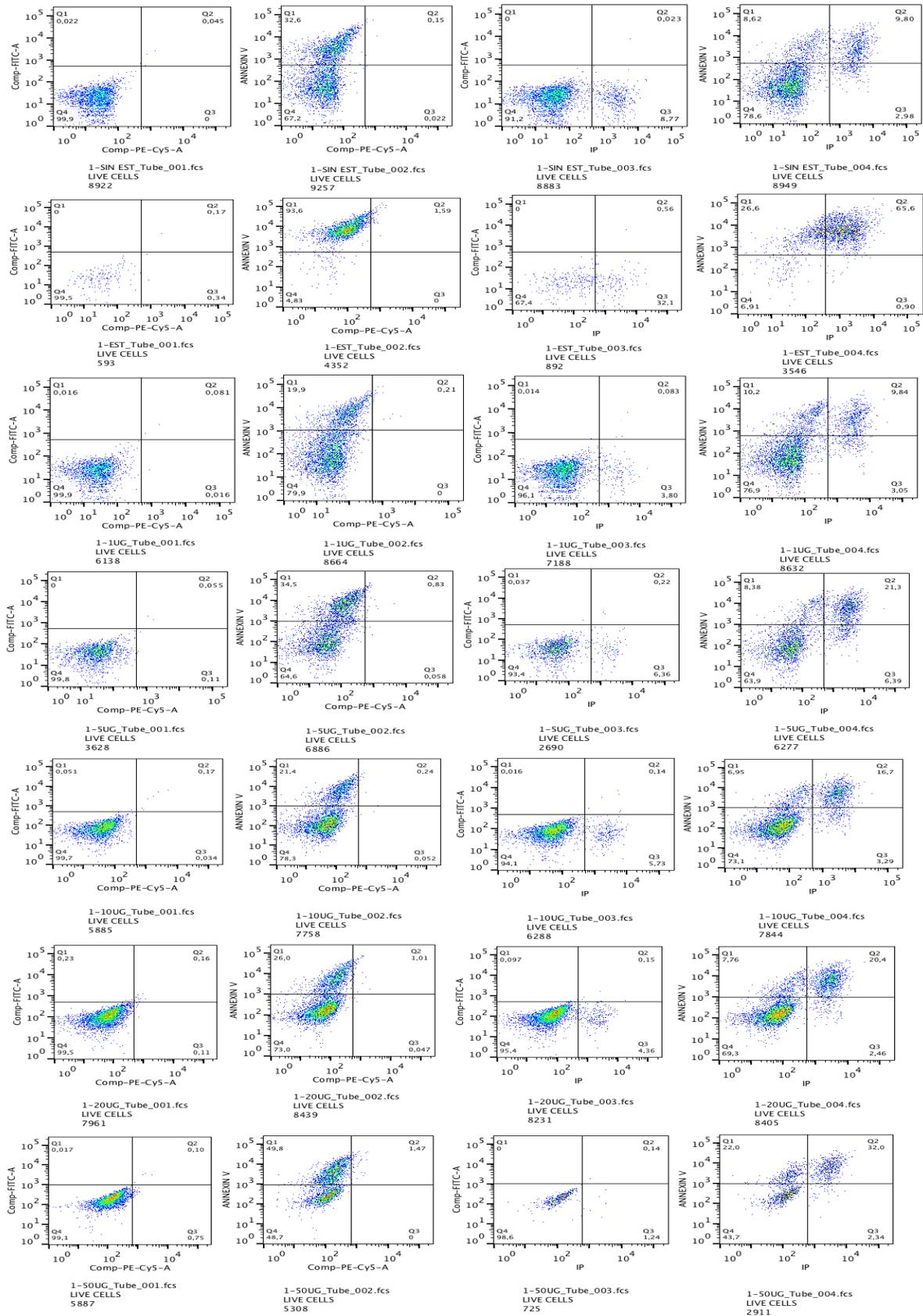
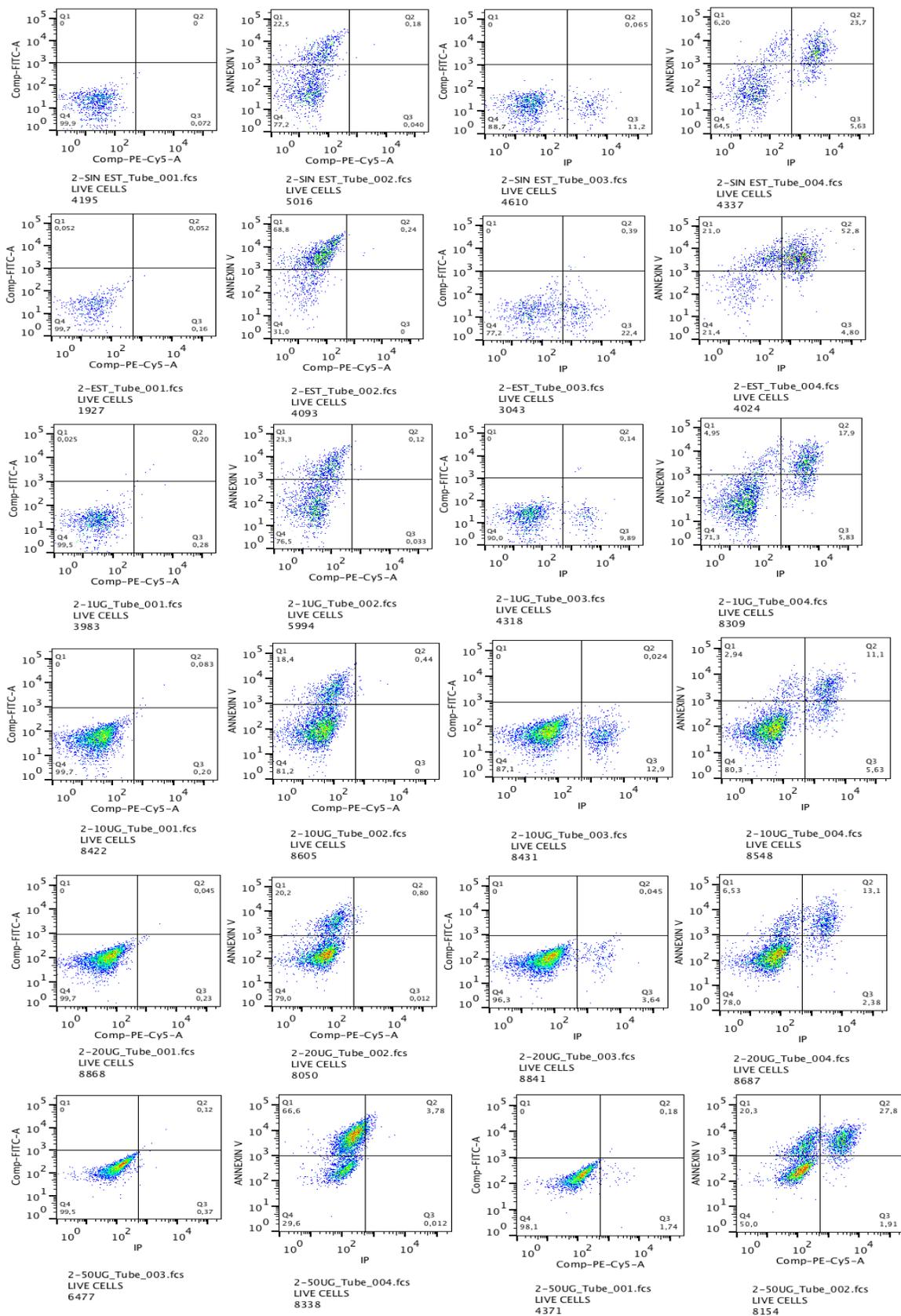


Figura S2c Tinción de MΦ's con Anexina V y PI Experimento 4



REFERENCIAS

1. Leonard, S.S., et al., *Wood smoke particles generate free radicals and cause lipid peroxidation, DNA damage, NFkappaB activation and TNF-alpha release in macrophages*. Toxicology, 2000. **150**(1-3): p. 147-57.
2. Hedberg, E., et al., *Is levoglucosan a suitable quantitative tracer for wood burning? Comparison with receptor modeling on trace elements in Lycksele, Sweden*. Journal of the Air & Waste Management Association, 2006. **56**(12): p. 1669-78.
3. Palma, P., et al., *Identification of levoglucosan and related stereoisomers in fog water as a biomass combustion tracer by ESI-MS/MS*. Annali di chimica, 2004. **94**(12): p. 911-9.
4. Rowland, F.S., et al., *Abstracts of the 6th FECS Conference 1998 Lectures*. Environmental science and pollution research international, 1998. **5**(3): p. 119-96.
5. Bauernfeind, F., et al., *Inflammasomes: current understanding and open questions*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(5): p. 765-83.
6. Miro, O., et al., *Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain function and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes*. Carcinogenesis, 1999. **20**(7): p. 1331-6.
7. Kurmi, O.P., K.B. Lam, and J.G. Ayres, *Indoor air pollution and the lung in low- and medium-income countries*. Eur Respir J, 2012. **40**(1): p. 239-54.
8. Rehfuess, E., C. Corvalan, and M. Neira, *Indoor air pollution: 4000 deaths a day must no longer be ignored*. Bull World Health Organ, 2006. **84**(7): p. 508.
9. Pruneda-Alvarez, L.G., et al., *Exposure to indoor air pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons, toluene, benzene) in Mexican indigenous women*. Indoor Air, 2012. **22**(2): p. 140-7.
10. Perez-Padilla, R., A. Schilman, and H. Riojas-Rodriguez, *Respiratory health effects of indoor air pollution*. Int J Tuberc Lung Dis, 2010. **14**(9): p. 1079-86.
11. Kodgule, R. and S. Salvi, *Exposure to biomass smoke as a cause for airway disease in women and children*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012. **12**(1): p. 82-90.
12. van Grevenynghe, J., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2374-81.
13. van Grevenynghe, J., et al., *Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **317**(3): p. 708-16.
14. Solhaug, A., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells*. Carcinogenesis, 2004. **25**(5): p. 809-19.
15. Palma, P., et al., *Identification of levoglucosan and related stereoisomers in fog water as a biomass combustion tracer by ESI-MS/MS*. Ann Chim, 2004. **94**(12): p. 911-9.
16. Kocbach, A., et al., *Physicochemical characterisation of combustion particles from vehicle exhaust and residential wood smoke*. Part Fibre Toxicol, 2006. **3**: p. 1.
17. Sarkar, S., et al., *Suppression of the NF-kappaB pathway by diesel exhaust particles impairs human antimycobacterial immunity*. J Immunol, 2012. **188**(6): p. 2778-93.
18. Torres-Duque, C., et al., *Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(5): p. 577-90.
19. Liu, P.L., et al., *Wood smoke extract induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in human lung endothelial cells: role of AIF and EndoG*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L739-49.

-
20. Hiraiwa, K. and S.F. van Eeden, *Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 619523.
 21. Hogg, J.C. and S. van Eeden, *Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution*. *Respirology*, 2009. **14**(3): p. 336-46.
 22. Ferecatu, I., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor*. *Part Fibre Toxicol*, 2010. **7**: p. 18.
 23. Hiura, T.S., et al., *Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages*. *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5582-91.
 24. Obot, C.J., et al., *Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002. **184**(2): p. 98-106.
 25. Henson, P.M., D.L. Bratton, and V.A. Fadok, *Apoptotic cell removal*. *Curr Biol*, 2001. **11**(19): p. R795-805.
 26. Boland, M.L., A.H. Chourasia, and K.F. Macleod, *Mitochondrial Dysfunction in Cancer*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 292.
 27. Grimm, S. and D. Brdiczka, *The permeability transition pore in cell death*. *Apoptosis*, 2007. **12**(5): p. 841-55.
 28. Midzak, A.S., et al., *ATP synthesis, mitochondrial function, and steroid biosynthesis in rodent primary and tumor Leydig cells*. *Biol Reprod*, 2011. **84**(5): p. 976-85.
 29. Perry, S.W., et al., *Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide*. *Biotechniques*, 2011. **50**(2): p. 98-115.
 30. Chassin, C., et al., *Pore-forming epsilon toxin causes membrane permeabilization and rapid ATP depletion-mediated cell death in renal collecting duct cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(3): p. F927-37.
 31. Fennessey, C.M., S.E. Ivie, and M.S. McClain, *Coenzyme depletion by members of the aerolysin family of pore-forming toxins leads to diminished ATP levels and cell death*. *Mol Biosyst*, 2012. **8**(8): p. 2097-105.
 32. Philip, N.H. and I.E. Brodsky, *Cell death programs in Yersinia immunity and pathogenesis*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012. **2**: p. 149.
 33. Schulze-Lohoff, E., et al., *Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F962-71.
 34. Fulda, S. and K.M. Debatin, *Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy*. *Oncogene*, 2006. **25**(34): p. 4798-811.
 35. Degterev, A., M. Boyce, and J. Yuan, *A decade of caspases*. *Oncogene*, 2003. **22**(53): p. 8543-67.
 36. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
 37. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 420-30.
 38. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
 39. Walczak, H. and P.H. Krammer, *The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems*. *Exp Cell Res*, 2000. **256**(1): p. 58-66.
 40. Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(1): p. 75-86.
 41. Vercammen, D., et al., *Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor*. *J Exp Med*, 1998. **187**(9): p. 1477-85.

-
42. Wong, K.W. and W.R. Jacobs, Jr., *Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol, 2011. **13**(9): p. 1371-84.
 43. Bolling, A.K., et al., *Wood smoke particles from different combustion phases induce similar pro-inflammatory effects in a co-culture of monocyte and pneumocyte cell lines*. Part Fibre Toxicol, 2012. **9**: p. 45.
 44. Danielsen, P.H., et al., *Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in rats after intratracheal instillation or oral exposure to ambient air and wood smoke particulate matter*. Toxicol Sci, 2010. **118**(2): p. 574-85.
 45. Sakaki, H., et al., *Autocrine regulation of macrophage activation via exocytosis of ATP and activation of P2Y11 receptor*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e59778.
 46. Jayaraman, P., et al., *IL-1beta promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4196-204.
 47. Ola, M.S., M. Nawaz, and H. Ahsan, *Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis*. Mol Cell Biochem, 2011. **351**(1-2): p. 41-58.
 48. Ishii, H., et al., *Contribution of IL-1 beta and TNF-alpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particulates (PM10)*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(1): p. L176-83.
 49. Saxena, Q.B., et al., *Identification of organic fractions of diesel exhaust particulate (DEP) which inhibit nitric oxide (NO) production from a murine macrophage cell line*. Toxicol Lett, 2003. **143**(3): p. 317-22.
 50. Yang, H.M., et al., *Diesel exhaust particles suppress macrophage function and slow the pulmonary clearance of Listeria monocytogenes in rats*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(5): p. 515-21.
 51. Apoptotic & Necrotic Cell Differentiation, PromoKine [revisado de Internet: <http://www.promokine.info/products/apoptosis/apoptotic-necrotic-cell-detection-kits/>]