



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA**

**EFFECTO DE LAS PARTÍCULAS DE BIOCOMBUSTIBLES SOBRE LA CAPACIDAD  
BACTERICIDA DE LOS MACRÓFAGOS PARA ELIMINAR A MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**ALDRIGHETTI BÁEZ STEPFANIE**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES.  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM**

**MÉXICO, D.F. MAYO 2015**



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de diciembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **ALDRIGHETTI BÁEZ STEPFANIE** con número de cuenta **512024765**, con la tesis titulada "**EFFECTO DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE HUMO DE BIOCOMBUSTIBLES SOBRE LA CAPACIDAD BACTERICIDA DE LOS MACRÓFAGOS PARA ELIMINAR A *Mycobacterium tuberculosis***", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL  
Vocal: DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE  
Secretario: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES  
Suplente: DRA. MARÍA ELENA CALDERÓN SEGURA  
Suplente: DR. EN C. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de marzo de 2015

*M. del Coro Arizmendi*

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir la realización de mis estudios de posgrado.**

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido mediante la beca de posgrado correspondiente a la convocatoria titulada “Convocatoria de Becas CONACYT Nacionales 2011-2012 Tercer periodo” que me otorgó y gracias a la cual fue posible mi dedicación de tiempo completo al programa de posgrado.**

**A los miembros del comité tutor y mi tutor principal por su apoyo y orientación en mis estudios de Posgrado.**

**Tutor principal: Dra. María Isabel Sada Ovalle**

**Comité Tutor: Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes.  
Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL.**

**Agradezco en primer término la asesoría y el apoyo de la Dra. Isabel Sada, por su tiempo y su ayuda, por el espacio, por la confianza que me brindo para desarrollar este proyecto y por mantener la mente abierta para permitirme moldear mi conocimiento. No de forma menos importante a la Dra. Leslie por su amabilidad y la forma tan autentica y desinteresada de compartir el conocimiento y ayudar a quienes no tenemos la experiencia pero si la motivación de aprender, por sus consejos, por mostrarme las virtudes de la disciplina, el orden y por compartir su sentido del humor conmigo.**

**También le agradezco a cada uno de mis compañeros de laboratorio que me regalaron un momento de diversión cuando era presa del estrés, a todos los que me ayudaron aun con las cosas más pequeñas porque sin ustedes el camino hubiese sido más complicado.**

**Especialmente le agradezco a mi compañero y amigo Ranferi por hacer las horas y horas de infección mucho más amenas, por ayudarme y aconsejarme, por resistir mi inigualable sentido del humor, por creer en mí y por mostrarme con el ejemplo que hacer que las cosas sucedan depende de sí mismo, agradezco tu apoyo y amistad sinceramente.**

## **DEDICATORIA**

**La presente está dedicada a mis padres y hermanos quienes siempre tienen palabras de aliento y admiración que me impulsan a seguir y sin quienes esto no hubiera sido posible.**

**De manera muy especial le dedico la realización de esta Tesis a Gustavo Quintos Rivero, por su apoyo de manera incondicional a cada paso y quien es un factor importante entre lo que soy y todo lo que deseo ser.**

**Efecto de las partículas de biocombustibles sobre la capacidad bactericida de los macrófagos para eliminar a *Mycobacterium tuberculosis***

**INDICE**

<b>1.LISTA DE FIGURAS</b>	.....	i
<b>2.ABREVIATURAS</b>	.....	iii
<b>3.RESUMEN</b>	.....	1
<b>4.ABSTRACT</b>	.....	3
<b>5.INTRODUCCION</b>	.....	5
5.1 Exposición a partículas generadas por la quema de biocombustibles a nivel mundial	.....	5
5.2 Características físico-químicas de las partículas de combustión dela biomasa	.....	7
5.3 Participación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en la Toxicidad de las PHBC	.....	8
5.4 Vías de señalización de los HAPs	.....	10
5.5 Efectos inmunológicos ante la exposición crónica a partículas de humo de leña	.....	11
5.6 Asociación entre Tuberculosis y Exposición acrónica a contaminantes	.....	13
<b>6.JUSTIFICACIÓN</b>	.....	16
<b>7.HIPÓTESIS</b>	.....	16
<b>8.OBJETIVOS</b>	.....	16
<b>9.MÉTODOS</b>	.....	17
<b>10.RESULTADOS</b>	.....	22
<b>11.DISCUCION Y CONCLUSIONES</b>	.....	33
<b>12.LITERATURA CITADA</b>	.....	41

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1.</b>	Usuarios de leña como combustible en México.....	6
<b>FIGURA 2.</b>	Vía de señalización de los HAPs a través del Receptor Aril Hidrocarburo.....	11
<b>FIGURA 3.</b>	Componentes orgánicos identificados en las partículas provenientes de humo de leña.....	22
<b>FIGURA 4.</b>	Distribución de partículas de combustión de la biomasa retenidas en filtros de nitrocelulosa.....	23
<b>FIGURA 5.</b>	Macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extracto orgánico .....	24
<b>FIGURA 6.</b>	Estrategia de análisis de receptores de superficie en macrófagos THP-1 estimulados con extractos orgánicos de PHBC.....	25
<b>FIGURA 7.</b>	Intensidad media de fluorescencia de la expresión de marcadores de activación y diferenciación en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos.....	26
<b>FIGURA 8.</b>	Porcentaje de expresión de marcadores de activación y diferenciación en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos.....	27
<b>FIGURA 9.</b>	Porcentaje de citotoxicidad en macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos.....	pg. 28



<b>FIGURA 10.</b> Control del crecimiento de M.tb en macrófagos expuestos a extractos orgánicos .....	29
<b>FIGURA 11.</b> Viabilidad en macrófagos expuestos a E.O. de PHBC.....	30
<b>FIGURA 12.</b> Evaluación de apoptosis y necrosis en macrófagos THP-1 expuestos a EO de PHBC .....	32
<b>FIGURA 13.</b> Modelo propuesto para la pérdida del balance apoptosis- necrosis en macrófagos expuestos a E.O e infectados por M.tb.....	39

## **ABREVIATURAS**

° C	Grados centígrados
nm	Nanómetros
nM	Nano-molar
mg	Microgramos
m <sup>3</sup>	Metros cúbicos
mL	Mililitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AhR	Receptor Aril hidrocarburo*
AHH	Hidrolasa Aril hidrocarburo*
AHRR	Represor del Receptor nuclear Aril Hidrocarburo*
AP-1	Proteína activadora 1*
ARA-9	Proteína de interacción a AhR
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNT	Translocador Nuclear del Receptor Aril hidrocarburo
BAX	Proteína tipo Bcl-2
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CCL	Quimiocina con Motivo Cisteína-Cisteína*
CD	Cumulo de diferenciación*
CMN	Células mono-nucleadas
CYP1-A1	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1*
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño celular*
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EO	Extracto orgánico
ERK1/2	Cinasa 1 y 2 reguladas por señalización extracelular.*
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
F-VAD	Benciloxicarbonil-Asp-Glu-Val-fluorometilcetona*
H <sub>2</sub> O	Oxido de hidrogeno
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HEPES	Acido-2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracini] Etanosulfónico*
HLA	Antígeno leucocitario humano*
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución*

IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IFN- $\gamma$ R1	Receptor 1 de Interferón gamma*
IFN- $\gamma$ R2	Receptor 2 de Interferón gamma*
IL	Interleucina
IL1-RI	Receptor 1 para interleucina 1*
IMF	Intensidad media de fluorescencia*
JNK	Cinasa N terminal c-Jun *
iNOS	Sintasa Inducible de Óxido Nítrico*
M.tb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MA	Macrófagos Alveolares
Man-LAM	Lipoarabinomanana manosilada.
MAPK's	Proteína-cinasas activadas por mitógenos*
MDM	Monocito Diferenciado a Macrófago
MMR	Receptor de Manosa*
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
NADPH	Nicotinamida- Adenina -Dinucleótido -Fosfato
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial De La Salud
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos*
PAS	Dominio sensor de señal Per-Arnt-Sim
PBS	Buffer de Fosfato-Salino*
PFA	para-Formaldehido
PHBC	Partículas de humo de biocombustibles
PM	Material particulado*
PM10	Material particulado $\geq 10 \mu\text{m}$ de diámetro*
PM 2.5	Material particulado de $\leq 2.5 \mu\text{m}$ de diámetro *
PMA	Forbol 12-miristato-13 acetato*
P53	proteína de 53KDa
RNI	Intermediarios Reactivos de Nitrógeno *
ROI	Intermediario Reactivo de Oxígeno*
ROS	Especies reactivas de oxígeno*
STA	Estaurosporina
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
THP-1	Línea celular monocítica de leucemia humana.

TB	Tuberculosis
TLR	Receptor Tipo Toll*
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa*
UFC	Unidades formadoras de colonias

\*Por sus siglas en ingles.

## **RESUMEN**

La exposición al humo de biocombustibles se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades del tracto respiratorio, tales como la tuberculosis pulmonar. Con la finalidad de evaluar si la capacidad de los macrófagos para eliminar a *M.tb* se modifica después de la exposición a partículas generadas durante la combustión de la biomasa, se obtuvieron extractos orgánicos presentes en las partículas del humo de leña. Este extracto se caracterizó mediante espectrometría de masas y HPLC identificándose más de 20 compuestos diferentes (hidrocarburos aromáticos policíclicos). Los más relevantes son: benzo-a-antraceno, fluorantreno y pirenos que se han reportado como agentes carcinogénicos y tóxicos. Los diámetros del 60 % de las partículas retenidas en filtros de nitrocelulosa durante el muestreo son menores a 2.5  $\mu\text{m}$  permitiendo su ingreso a la zona alveolar. Para la obtención de macrófagos se utilizó la línea celular de monocitos THP-1 la cual se diferenció con PMA. Adicionalmente se estudiaron macrófagos derivados de monocitos obtenidos a partir de donadores sanos mediante gradiente de centrifugación diferencial y selección positiva por inmuno-magneto con anticuerpos monoclonales anti-CD14. Los cambios en el cultivo de macrófagos expuestos a diferentes concentraciones de E.O se observaron mediante microscopia. La expresión de moléculas de superficie así como el cambio en el potencial de membrana mitocondrial se analizó mediante citometría de flujo. En la caracterización fenotípica de los macrófagos expuestos a concentraciones crecientes de extractos orgánicos durante 24 horas para identificar cambios en el perfil de expresión de receptores de superficie asociados con maduración (CD14, CD68) activación celular (CD80, CD86, HLA-DR, receptor tipo 1 para IL-1 y receptor tipo 1 y tipo 2 para el TNF- $\alpha$ .) y algunos otros que participan en la fagocitosis (DC-SING, MMR), solo se identificó un aumento estadísticamente significativo al evaluar la IMF del receptor tipo 1 para IL-1 a la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de EO ( $p < 0.05, n = 5$ ), así como una disminución en el porcentaje de expresión del marcador de maduración CD68 ( $p < 0.05, n = 5$ ). Los procesos de muerte celular se evaluaron inicialmente utilizando ensayos de citotoxicidad por tinción con cristal violeta con aumento significativo a las concentraciones de 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ) , 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0001$ ) y posteriormente por la técnica de ELISA para la detección de histonas como indicadores de muerte celular, se identificaron cambios estadísticamente significativos a la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  para histonas intracelulares y

extracelulares ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). El cambio en el potencial de membrana mitocondrial realizado por tinción con Mitotraker Red y Anexina V medido por citometría de flujo indicó cambios significativos en el porcentaje de células positivas a la tinción así como en su IMF. Analizamos el crecimiento bacteriano de *M.tb* en macrófagos expuestos a dosis crecientes de extractos orgánicos. Los resultados mostraron una disminución en la capacidad del macrófago para controlar el crecimiento del bacilo ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). Identificamos que los macrófagos expuestos a EO pierden el potencial de membrana mitocondrial de una manera concentración dependiente, además de incrementarse la susceptibilidad de morir por necrosis y apoptosis. Estos procesos parecen ser independientes de caspasas y dependientes de la concentración del extracto orgánico al que los macrófagos se exponen. Estos cambios en los mecanismos inmunológicos pueden favorecer el crecimiento descontrolado de *M.tb* en los macrófagos expuestos y ser una de las causas responsables del desarrollo de la tuberculosis pulmonar en individuos expuestos de manera crónica al humo de biomasa.

## **ABSTRACT**

Exposure to the smoke of biofuels has been related to the development of diseases of the respiratory tract, such as pulmonary tuberculosis.

With the purpose of assessing whether the ability of macrophages to eliminate *M. tb* is modified after exposure to particles generated during the combustion of biomass, extracts were obtained organic particles present in the wood smoke. This extract was characterized by mass spectrometry and HPLC identified more than 20 different compounds (polycyclic aromatic hydrocarbons). The most relevant are: benzo-a-anthracene, fluorantreno and pirenos that have been reported as toxic and carcinogenic agents. The diameters of the 60 per cent of the retained particles in nitrocellulose filters during the sampling are lower than 2.5  $\mu\text{m}$  allowing your income to the alveolar area. For the obtaining of macrophage cell line was used in THP-1 monocytes which are differentiated with PMA. In addition we studied macrophages derived from monocytes obtained from healthy donors by differential centrifugation gradient and positive selection by immuno-magneto with monoclonal antibody anti-CD14 .Changes in the cultivation of macrophages exposed to different concentrations of E. OR were observed by electron microscopy. The expression of surface molecules as well as the change in the mitochondrial membrane potential was analyzed by flow cytometry. In the phenotypic characterization of the macrophages exposed to increasing concentrations of organic extracts for 24 hours to identify changes in the expression profile of surface receptors associated with ripening (CD14, CD68) cellular activation (human CD80, CD86, HLA-DR, receptor type 1 for IL-1 and receptor type 1 and type 2 for the TNF- $\alpha$ .) and some others involved in the phagocytosis (DC-SING, MMR), only identified a statistically significant increase in assessing the MFI of the receiver type 1 for IL-1 to the concentration of 20  $\mu\text{g/ml}$  of EO ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ), as well as a decrease in the percentage of expression of maturation marker CD68 ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). The processes of cell death was initially assessed using tests of cytotoxicity by staining with crystal violet with a significant increase in the concentrations of 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.05$ ), 10 and 20  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0.0001$ ) and subsequently by ELISA for the detection of histones as indicators of cell death, statistically significant changes were identified to the concentration of 20  $\mu\text{g/ml}$  for histones intracellular and extracellular ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). The change in mitochondrial membrane potential made by staining with

Mitotraker Red and Annexin V measured by flow cytometry indicated significant changes in the percentage of cells staining positive as well as in their IMF. We analyze the bacterial growth of M.tb in macrophages exposed to increasing doses of organic extracts. The results showed a decrease in the ability of the macrophage to control the growth of the bacillus ( $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ). We identified that the macrophages exposed to EO lose the mitochondrial membrane potential of a concentration dependent manner, besides increased the susceptibility of die by necrosis and apoptosis. These processes seem to be independent of caspases and dependent on the concentration of the organic extract that the macrophages are exposed. These changes in immunological mechanisms can promote the uncontrolled growth of M.tb in macrophages exposed and be one of the causes responsible for the development of pulmonary tuberculosis in individuals chronically exposed to biomass smoke.



## **INTRODUCCIÓN**

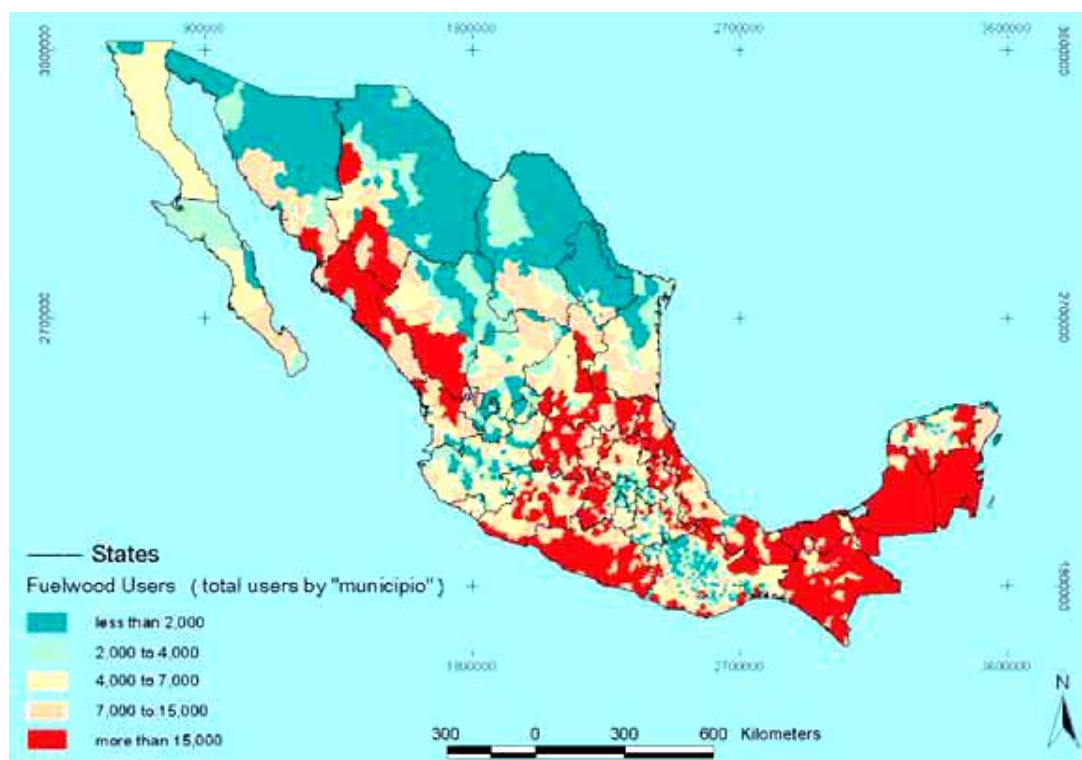
### **Exposición a las partículas generadas por la quema de biocombustibles a nivel mundial.**

La exposición a partículas de humo de biocombustibles (PHBC) y contaminantes ambientales es causa directa de problemas en la salud, ya que predispone a infecciones agudas del tracto respiratorio, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, cáncer y tuberculosis pulmonar, entre otras [1-5]. Publicaciones recientes muestran que cada año se presentan aproximadamente 1.5 a 2 millones de muertes a nivel mundial que están relacionadas con la exposición a diversos biocombustibles [6]. Actualmente se considera que la contaminación intramuros por humo de biocombustibles es uno de los 10 factores de riesgo más importante para daños a la salud, especialmente en los países en vías de desarrollo [7]. En estos países, el uso intradomiciliario de biocombustibles es considerado como la principal fuente de contaminación ambiental en áreas rurales y participa a su vez en la contaminación de áreas urbanas [8].

Se estima que aproximadamente 50% de la población mundial utiliza algún tipo de biocombustible para diversas actividades del hogar, y cerca del 90 % de los usuarios pertenecen a países en desarrollo, lo anterior es debido principalmente a su accesibilidad y bajo costo en comparación con los combustibles “limpios” que producen un número menor de partículas suspendidas que resultan contaminantes [9]. En países como India, China Turquía y la región de África sub Sahara la combustión de la biomasa (madera, carbón, estiércol y residuos agrícolas) en zonas rurales representa más de un 80% de la energía doméstica utilizada [5, 10-12].

La quema intramuros de combustibles sólidos produce altos niveles de material particulado con un diámetro aéreo de 10 $\mu$ m (PM10) y un rango de concentración de 300 a 3000  $\mu$ g/m<sup>3</sup> y material particulado de 2.5  $\mu$ m de diámetro (PM2.5) a una concentración de 256 $\mu$ g/m<sup>3</sup>/24 horas. Se estima que las mujeres que utilizan combustibles sólidos en ambientes cerrados inhalan aproximadamente 25 millones de litros de aire contaminado durante su vida, en la actualidad el desarrollo de estufas ecológicas para disminuir esta exposición no ha encontrado el impulso suficiente para impactar a las comunidades afectadas

[13]. Se ha documentado que la exposición crónica al humo de la biomasa duplica el riesgo de contraer alguna infección en las vías respiratorias bajas [14]. En México, según lo reportado por Masera y colaboradores en 2003, el suroeste y centro del País tienen un uso prioritario de la leña como combustible, existiendo aproximadamente 262 puntos “calientes” o municipios donde el uso de la leña puede generar un problema de salud [15]. Según las investigaciones realizadas por Masera y colaboradores se muestra que la distribución de usuarios en México se concentra en la región suroeste del país, específicamente en Guerrero, Oaxaca, Tabasco, Quintana Roo y Michoacán [Figura 1], en donde también se concentran las poblaciones con índices de pobreza más altos y en los cuales la disposición del biocombustible es asequible [16].



**Figura 1. Usuarios de leña como combustible en México.** Los puntos rojos representan los municipios con más de 15,000 usuarios de leña. [16].

De acuerdo con datos provenientes del INEGI para el censo de población y vivienda de 2010 se registró una disminución en el uso de biocombustibles de 21.2% a 14.5% en los últimos 20 años, de este 14.5% el 90% de los usuarios de biocombustibles se concentra en zonas con un menor índice de desarrollo humano (IDH) donde nueve de cada 10 viviendas sigue utilizando carbón o leña como combustible principal [17].

## **Características fisicoquímicas de las partículas de combustión de biomasa.**

Las partículas suspendidas en el ambiente pueden variar en composición, tamaño y características de superficie dependiendo de su origen [18, 19], aquellas partículas liberadas durante la combustión de la leña pueden variar en sus características dependiendo del tipo de combustión al que sea expuesta la madera así como de sus propiedades intrínsecas, como son el grado de humedad ambiental o el tipo de leña [19].

Una de las características físicas más importantes de las partículas que componen el humo de leña, es su tamaño ya que pueden depositarse en distintos niveles del tracto respiratorio, aun y cuando el sistema respiratorio humano esté dotado de mecanismos de defensa innatos como los cilios y la producción de moco [20, 21]. Estas barreras solo retienen a las partículas con diámetros superiores a los 10 $\mu$ m, mientras que aquellas partículas con un diámetro menor son capaces de alcanzar el árbol traqueo-bronquial y aquellas con un diámetro inferior a 2.5 $\mu$ m y las ultrafinas, pueden ingresar hasta la zona bronquiolo-alveolar [10, 22].

Las partículas contenidas en el humo de leña están formadas por carbón primario y tienen la capacidad de adsorber diversos compuestos orgánicos a los que se le atribuye la mayor parte de la actividad toxica en la partícula [23]. Las partículas del carbón primario tienen una microestructura que consiste de diferentes capas planas bidimensionales que rodean un solo núcleo, en contraste con las partículas provenientes de la quema del diesel las cuales tienen más de un núcleo con diámetros menores. Se ha reportado que esta característica física en la partícula de humo de leña podría ser importante ya que permite adsorber un mayor número de compuestos orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos [24].

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos presentes en las PHBC dependen de muchos factores, incluyendo el tipo de biocombustible utilizado, las condiciones de la combustión ya sea a bajas temperaturas (combustión incompleta) o altas temperaturas (combustión completa), la altitud e incluso el tipo de estufa o fogón [4]. La combustión ineficiente de los biocombustibles, que

ocurre en altas temperaturas y condiciones de deficiencia de oxígeno (pirolisis) produce una enorme variedad de contaminantes químicos, entre los que destacan el monóxido de carbono (CO) y el material particulado suspendido (PM), así como óxidos de nitrógeno, benceno, butadieno, formaldehído, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y otros subproductos caracterizados por su toxicidad y/o carcinogenicidad [1, 25].

En el humo de leña se han identificado más de 200 compuestos químicos de los cuales el 90% se encuentra en un rango inhalable  $<10\mu\text{m}$  [26], de estos existen algunos componentes presentes en todos los tipos de combustión de leña como son; CO, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, aldehídos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, componentes orgánicos volátiles y radicales libres [27, 28].

Cada uno de los componentes presentes en el humo de la combustión de la madera presentan características tóxicas; dos de los compuestos más importantes presentes en el humo de la leña son el monóxido de carbono (CO) que representa entre 80 y 370 gramos por cada kilogramo de leña en combustión y es responsable del 21.7% de la mortalidad a causa de exposición accidental sufrida por la combustión de leña intramuros [24, 29], y los HAPs, aun cuando estos representan solo el 1% en la composición química del humo de leña [24] se les confiere la mayoría de las características tóxicas de la partícula. La mayoría de estos HAPs están relacionados con procesos mutagénicos y de daño al ADN además de mostrar una alta habilidad para generar estrés oxidante [30]. Adicionalmente se pueden identificar compuestos como dioxinas, alquilbencenos y especies monoaromáticas oxigenadas que en conjunto representan menos del 10% de la composición total la partícula; se ha descrito que pueden actuar como contaminantes irritantes [29].

### **Participación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en la toxicidad de las PHBC.**

Desde 1775 se conoce el efecto carcinogénico y tóxico de los derivados del carbón y petróleo, Sir Percivall Pott describió una mayor incidencia de cáncer de piel de escroto en los deshollinadores, quienes estaban expuestos durante periodos largos a los compuestos derivados de la leña y el alquitrán, este hecho fue considerado la primera descripción de un agente cancerígeno ambiental y la primera referencia de una enfermedad profesional [31]. Sin embargo, fue hasta

el año de 1921 cuando se aisló el primer HAP en estado químicamente puro a partir del alquitrán; estudios posteriores con estos compuestos demostraron que los HAPs eran responsables del desarrollo de cáncer en modelos experimentales *in vivo* [32] iniciando de esta manera el estudio de los HAPs.

Los HAPs son los compuestos orgánicos con mayor grado de toxicidad generados durante la combustión de la biomasa en el proceso de pirolisis o combustión incompleta de la materia orgánica. Este proceso es denominado incompleto porque durante la combustión hay una deficiencia de oxígeno impidiendo la adecuada formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O lo cual favorece que el combustible no reaccione completamente con el oxígeno provocando la formación de monóxido de carbono (CO) e HAPs [33-35]. Existen más de 100 HAPs identificados, formados por anillos de carbono que pueden ser saturados o insaturados, sus características de saturación así como su configuración espacial determinan sus características químicas y biológicas [36], son compuestos altamente lipofílicos y se encuentran como sustancias complejas volátiles o adsorbidas a las partículas de carbón [34, 37].

Las fuentes de HAPs pueden ser naturales tales como los incendios forestales y erupciones volcánicas o antropogénicas como la combustión de biomasa, uso de tabaco, cocción de alimentos, actividades industriales, y emisiones vehiculares [34]. Uno de los HAPs más estudiado por sus efectos cancerígenos e inflamatorios es el Benzo-a-pireno el cual es generado también a una concentración elevada en diversos procesos industriales.[38, 39].

La principal vía de ingreso de los HAPs al organismo es la inhalación, seguida de la ingestión de alimentos cocidos a fuego directo y por último la absorción a través de la piel [37]. Una vez que estos hidrocarburos son absorbidos por el organismo son distribuidos en zonas con altas concentraciones lipídicas como riñones, hígado, cerebro, glándulas suprarrenales, tejido adiposo, bazo y ovarios [38]. Aunque la mayoría de los HAPs son eliminados del organismo existe un proceso de bioconcentración en los tejidos con alto contenido de lípidos [34].

Los HAPs han sido relacionados con diversas enfermedades como el cáncer, enfermedad pulmonar intersticial, asma y algunos estudios sugieren su asociación en tuberculosis pulmonar por ser componente importante durante la combustión de la biomasa [40-43]. La eliminación de los HAPs a nivel celular está regulada por el citocromo P450, específicamente por el gen *CYP1A1* [44]. *CYP1A1* es un gen polimórfico en el humano, sin embargo conserva las

características de ser inducido por el receptor aril hidrocarburo (AhR) al unirse a dioxinas o HAPs, una vez activado CYP1A1 codifica para la hidrolasa de aril hidrocarburo (AHH) encargada de la eliminación de los HAPs en un proceso involucrado en la generación de intermediarios reactivos de epóxido, relacionados con el desarrollo de cáncer [45-47]. El estudio del AhR ha arrojado importantes resultados, se ha demostrado que su activación en el ovario de feto humano inducida por humo de biomateriales como el tabaco, disminuye el tiempo de vida fértil del sujeto al reducir la capacidad proliferativa de las células germinales [48], otro de los efectos de la interacción del AhR con su ligando es la reducción en la expresión de RNAm y de la proteína CCL5 la cual participa como un importante quimioatrayente de eosinófilos y monocitos circulantes durante el proceso inflamatorio [49]. Por otro lado la activación del gen *CYP1A1* se ha relacionado ampliamente con un efecto protector ante la exposición a HAPs como se demostró en un experimento con ratones deficientes de *CYP1A1*, los cuales fueron altamente susceptibles a la toxicidad del Benzo- $\alpha$ -pireno administrado vía oral [50] por lo que una deficiencia o desregulación en este gen podría incrementar la citotoxicidad celular.

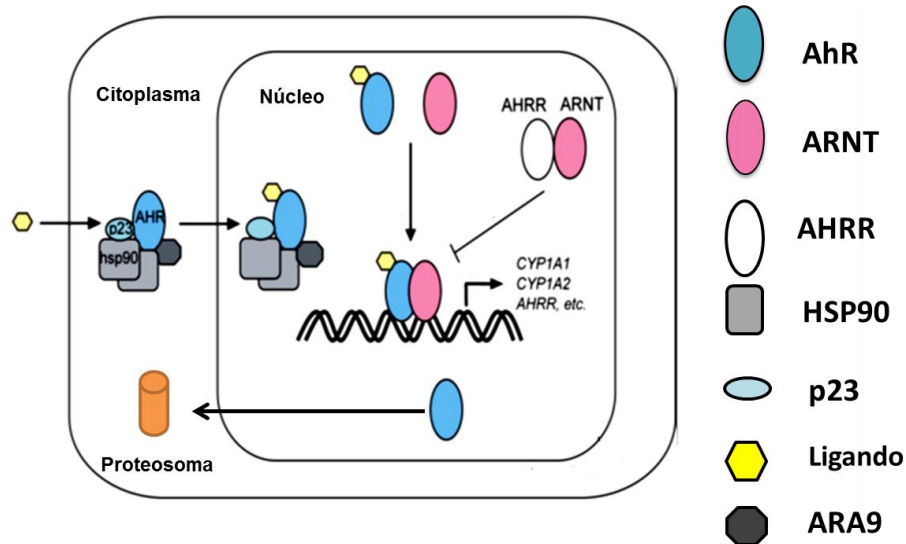
Entre los efectos inmunológicos de los HAPs se ha demostrado que el 7, 12-dimetilbenzo ( $\alpha$ ) antraceno (DMBA) administrado de forma oral en un modelo murino produce periodos de inmunosupresión persistente aun después de la eliminación del HAP del cuerpo [51]. Este efecto se ha observado en diferentes compartimientos linfoides como el bazo, los nódulos linfáticos y placas de Peyer[52].

### **Vía de señalización de los HAPs.**

Los estudios bioquímicos sobre el receptor de los HAPs han demostrado que el AhR en ausencia de un agonista se encuentra en el área citoplasmática unido a un dímero de chaperonas Hsp90 y a dos moléculas co-chaperonas ARA9 y p23 las cuales mantienen al receptor aril hidrocarburo en su forma inactiva [53]. Estructuralmente el AhR es una proteína de unión al ADN que cuenta con dominio hélice-bucle-hélice además de un dominio PAS el cual ante la activación del receptor por los HAP inicia un cambio conformacional en el AhR permitiendo la liberación de una señal de localización nuclear [54].

Se ha descrito que el cambio conformacional en el AhR permite que interactúe con su translocador nuclear (ARNT), promoviendo la unión específica a secuencias de anclaje en el ADN como CYP1. [55]

Los datos obtenidos sugieren que el receptor es sujeto de regulación negativa por exporte nuclear, o por acción del represor del receptor nuclear aril hidrocarburo (AHRR) se ha descrito que su degradación puede darse vía proteosoma una vez que es traslocado del núcleo. [53]



**Figura 2. Vía de señalización de los HAPs a través del Receptor Aril Hidrocarburo.** Una vez que el receptor aril hidrocarburo (AhR) es activado por su ligando (HAP) este se transloca al núcleo mediante su interacción con el ARTN permitiendo la activación de genes como CYP1. Posteriormente el receptor aril hidrocarburo puede sufrir de exportación nuclear y ser degradado por el proteosoma. Imagen modificada de: [53]

### Efectos inmunológicos ante la exposición crónica a partículas de humo de leña.

El efecto inmunológico que ejercen las partículas de humo de biocombustibles aún no se ha caracterizado por completo, ya que su potencial citotóxico e inflamatorio depende de las características físicas y químicas de las partículas, las cuales varían considerablemente dependiendo del tipo de combustión; se ha documentado que durante la combustión a temperaturas medias se produce un mayor efecto citotóxico de las partículas en comparación con aquellas resultado de la pirolisis, incrementando así la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en macrófagos. Adicionalmente se ha documentado que los bomberos forestales pueden cursar con un mayor

reclutamiento de granulocitos a nivel pulmonar posterior a la exposición al humo de leña mayor a tres horas [56, 57].

Existe evidencia de que los HAPs presentes en el extracto orgánico de la partícula de humo de biomasa son responsables de la mayor parte de los efectos citotóxicos en células como macrófagos alveolares y neumocitos [58]. Aunque no son los únicos componentes de la partícula que tienen efectos tóxicos, [56] al exponer monocitos a la fracción orgánica de humo de leña se ha reportado disminución en la capacidad de estos para activar a los linfocitos y eliminar al patógeno en un co-cultivo infectado con *streptococcus pneumoniae*. La actividad fagocítica permanece sin cambio en la mayoría de los reportes y se presenta a los HAPs como los componentes responsables que impiden a los macrófagos montar una respuesta eficiente ante las infecciones [59, 60]. En queratinocitos el AhR al ser activado por su ligando disminuye la expresión de la proteína CCL5, un factor quimiotáctico importante de neutrófilos y monocitos circulantes. [49] Adicionalmente se ha demostrado que en partículas con altas cantidades de HAPs hay un aumento en la expresión de otros mediadores inflamatorios como IL-6, IL-8 y una mayor activación de las MAPKs [61].

Hasta el momento se han implicado diferentes efectos de las partículas de humo de leña sobre la respuesta inmune. Se ha demostrado que el material particulado puede ser reconocido por los receptores tipo TLR2 y TLR4 mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) en las partículas, estos receptores una vez activados producen citocinas pro-inflamatorias por células del epitelio bronquial y macrófagos alveolares [62]. Este fenómeno se observó en macrófagos peritoneales knock-out para el gen de *TLR2/4* los cuales presentaron una disminución significativa en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 al exponerlos a PM [63]. Uno de los factores de transcripción más ampliamente implicado en la secreción de estas citocinas es el NF $\kappa$ B el cual interactúa vía MyD88 con el TLR4 activado por PM [64]. Otro factor de transcripción relacionado es el factor AP1, el cual es activado río arriba por JNK, ERK1/2 y p38 o mediante un incremento en la concentración de calcio intracelular favoreciendo la fosforilación y activación de las MAPKs permitiendo también el aumento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias [65]. Otro de los mecanismos toxicológicos importantes es la generación de especies reactivas de oxígeno a través de la activación del TLR, y la vía de MyD88-p38 para la activación de la molécula phox 40 y NADPH [66], la generación de ROS



puede ser causada por las propiedades fisicoquímicas de las partículas, por el efecto de los componentes solubles en ella como los metales de transición, el efecto de las partículas y sus extractos en la mitocondria o la activación de células pro-inflamatorias capaces de generar ROS y RNS. [67]

Se ha confirmado que un aumento en el calcio intracelular mediado por las endotoxinas presentes en las partículas puede activar al factor de transcripción AP1 de manera independiente a ROS [68] y promover también la secreción de citocinas pro inflamatorias. El efecto pro-inflamatorio que se observa en el aparato respiratorio se convierte en un fenómeno sistémico, lo cual se traduce en muchos de los casos en enfermedades cardiovasculares [69]. Experimentos realizados en macrófagos estimulados con HAP (B- $\alpha$ -pireno) o partículas de diesel y LPS mostraron que la concentración de los estímulos así como el orden en el que interaccionan con la célula puede tener efectos opuestos en la regulación y expresión de citocinas anti-inflamatorias o pro-inflamatorias como la IL-10 o IL-1 $\beta$  respectivamente. Estos datos sugieren que la producción de citocinas anti-inflamatorias es inducida al exponer a las células a partículas de diesel o B- $\alpha$ -pireno previo al estímulo con LPS y decrece al invertir el orden de estos estímulos [70].

Se ha demostrado que los HAPs pueden inducir señales tanto apoptóticas como anti-apoptóticas en células de hepatoma murino donde se demostró que las células expuestas a B- $\alpha$ -pireno activaban y translocan al núcleo en mayor proporción a la molécula p53, la cual induce la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax, del mismo modo los niveles de la proteína anti-apoptótica fosfo-Bid se vieron incrementados [71].

Por otro lado la exposición a HAPs como el Benzo-a-pireno ha sido relacionada con una reducción del 60~70% de células monocíticas adherentes obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica, probablemente por la inducción de apoptosis, y la inhibición de la maduración de los monocitos [72].

### **Asociación entre Tuberculosis y exposición crónica a contaminantes.**

En México, en el año 2010, la tasa de notificación de tuberculosis fue de 17 casos por 100 mil habitantes. La identificación de factores de riesgo para desarrollar tuberculosis y de esa forma minimizar la incidencia, podría disminuir la carga económica que representa la tuberculosis, especialmente en países en

desarrollo. La inhalación crónica de humo de tabaco es uno de los factores de riesgo conocidos para desarrollo de tuberculosis. El tabaco, al igual que la leña y otros productos procedentes de plantas son biocombustibles, por lo que algunos componentes derivados de su combustión son comunes. Existe evidencia que asocia la exposición crónica al humo de biocombustibles con el desarrollo de tuberculosis pulmonar. En Turquía, el 26% de los casos de tuberculosis pulmonar es asociada a la exposición crónica de humo de leña intradomiciliaria. Otras enfermedades asociadas a la exposición crónica de humo de leña son bronquitis, asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica [5, 42, 73-75].

*Mycobacterium tuberculosis* tiene como principal célula hospedera al macrófago alveolar (MA) que es la célula fagocítica predominante en el pulmón y es componente fundamental de los sistemas inmunológicos innato y adaptativo, así como la célula huésped de un gran número de patógenos y contaminantes medioambientales [76]. Actualmente contamos con pocos estudios que documenten los efectos tóxicos inducidos por las PHBC en el macrófago o células epiteliales pulmonares y su potencial efecto a nivel de la inmunidad frente a patógenos.

Durante el desarrollo de la respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb) intervienen un grupo de citocinas como el TNF- $\alpha$ , la interleucina 10 (IL-10) y proteínas de la familia Bcl-2 que participan en la modulación de la muerte celular o apoptosis de los macrófagos infectados [77-79]. Se han estudiado diversos factores que pueden conducir al macrófago infectado a otros tipos de muerte como la piroptosis mediada por la activación del inflamosoma [80]. PAMPs, patrones moleculares asociados a daño celular (DAMP), ácido úrico, beta-amiloide, asbesto y sílica cristalina son algunos de los estímulos que pueden inducir la secreción de estas citocinas y mediar la activación del inflamosoma-NLAP3 [81, 82]. La activación de este complejo proteico lleva a la activación auto catalítica de la caspasa-1 la cual media el procesamiento y secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 así como la muerte celular por piroptosis [80]. La piroptosis se presenta en células mieloides que están infectadas por bacterias como M.tb y que utilizan esta vía para escapar de los mecanismos citotóxicos presentes en los macrófagos activados [82-84]. Existe un gran número de investigaciones realizadas en células epiteliales expuestas a PM generado por la combustión de diesel que proponen una disfunción en el proceso de fagocitosis

el cual impide la eliminación bacteriana así como procesos de opsonización, migración y función también se encuentran alterados en células polimorfonucleares expuestas a PM, además de la activación de AP1 y el NF $\kappa$ B asociados con la producción de citocinas pro-inflamatorias, incremento en el estrés oxidante y apoptosis [85-88].

Los mecanismos antes descritos comparten vías de señalización intracelular que ayudan a mantener el equilibrio entre apoptosis y necrosis. Patógenos como M.tb han desarrollado mecanismos de evasión de la respuesta inmune, uno de los más importantes es la evasión de la muerte celular por apoptosis [84]. Hasta la fecha no existe evidencia científica contundente que describa los mecanismos inmunológicos que pueden ser modificados como consecuencia de la exposición de los macrófagos a PHBC o a los componentes orgánicos adsorbidos en la partícula, así como su implicación en el desarrollo de tuberculosis pulmonar. Es posible que cuando los macrófagos alveolares se exponen a los componentes orgánicos presentes en el PHBC se pierda el equilibrio entre los mecanismos que regulan los procesos de apoptosis vs. necrosis. La pérdida de dicho balance podría favorecer que exista un mayor crecimiento intracelular de M.tb y ser éste uno de los potenciales mecanismos inmunológicos que expliquen la asociación entre exposición a PHBC y desarrollo de tuberculosis pulmonar.

## **JUSTIFICACIÓN**

Se ha documentado la asociación epidemiológica entre la exposición al humo de biocombustibles y el desarrollo de tuberculosis pulmonar. Los mecanismos inmunopatogénicos que subyacen a dicha asociación no han sido completamente estudiados. La posibilidad de explorar, en modelos *in vitro* de infección con M.tb, el efecto de los compuestos orgánicos de partículas presentes en el humo de los biocombustibles, permitirá conocer si existe participación de la respuesta inmunológica que contribuya a la asociación entre exposición a partículas de humo de biocombustibles y desarrollo de tuberculosis.

## **HIPÓTESIS**

La exposición a componentes orgánicos de PHBC afecta la capacidad de los macrófagos para eliminar a M.tb de una manera dosis dependiente.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los cambios en la capacidad bactericida de macrófagos expuestos a los componentes orgánicos adsorbidos en las partículas provenientes del humo de la combustión de biocombustibles en un modelo *in vitro* de infección con M.tb.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Identificar si existe alteración dependiente de la dosis en la expresión de receptores de activación y fagocitosis de M.tb (CD14, CD68, CD80, CD86, TLR2, TLR4, IL1-RI, MMR, DC-SIGN, HLA-DR extracelular) en macrófagos expuestos a compuestos orgánicos provenientes de PHBC
2. Evaluar el crecimiento intracelular de M.tb en macrófagos THP-1 (línea células de macrófagos humanos) expuestos a compuestos orgánicos provenientes de PHBC en los días 1 y 4 post-infección.
3. Evaluar el cambio en la tasa de muerte celular por necrosis y/o apoptosis en macrófagos expuestos a compuestos orgánicos provenientes de PHBC.

## **MÉTODOS**

### **Obtención de PHBC**

La obtención de las PHBC se realizó con un muestreador de bajo volumen denominado MiniVol el cual muestreó 5 L/min y colectó las muestras en filtros de teflón. Los períodos de muestreo fueron de 4 horas por día a lo largo de 3-5 visitas programadas a la comunidad de Zacatlán de las Manzanas, Puebla. La caracterización fisicoquímica de las muestras de PHBC fue enfocada a la composición orgánica, la cual fue realizada con la colaboración de la Dra. Irma Rosas Pérez y el Dr. Omar Amador Muñoz en los laboratorios de Aerobiología y Mutagenesis Ambiental del Centro de Ciencias de la Atmósfera, UNAM.

### **Extracción y caracterización fisicoquímica de la fracción orgánica de PHBC**

Para la obtención de la fracción orgánica contenida en las PHBC se realizó una limpieza exhaustiva con acetona y Diclorometano (DCM) del equipo de extracción. Se colocó el filtro con PHBC y se agregó 4 ml de DCM en una cámara de extracción, la cual se mantuvo en reflujo durante 5 minutos en un baño de agua a 60 ° C con sonicación. Posterior a los 5 minutos se retiró del baño de agua y se esperó a que la cámara llegara a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con DCM al equipo de reflujo y se colectó en la cámara interna junto con la muestra para su extracción. La muestra se colocó en la cámara de vacío y se colectó en un contenedor con tapón doble horadado para la reducción de la muestra mediante nitrógeno grado cromatográfico. Por último la muestra se analizó por cromatografía líquida (HPLC) y espectrometría de masas.

### **Cultivo de línea Celular THP-1**

La línea celular de monocitos humanos (THP-1) (ATCC TIB-202) se mantuvo en cultivo a 37 ° C en una atmósfera de humedad al 5% CO<sub>2</sub> y en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con aminoácidos no esenciales 1%, L-glutamina 2mM, HEPES, piruvato de sodio, estreptomina, β-mercaptoetanol y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Previo a cada experimento, la suspensión de células THP-1 se ajustó a una concentración de 5X10<sup>5</sup> células por mL de medio suplementado. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos para permitir su adherencia y diferenciación a macrófagos en presencia de 100 nM/mL de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) durante 3 horas a 37 ° C en 5% CO<sub>2</sub>,

posteriormente se retiró el sobrenadante y permanecieron en RPMI 1640 a 37 ° C 5% CO<sub>2</sub>.

### **Cultivo de macrófagos diferenciados de monocitos**

A partir de un concentrado leucocitario se obtuvieron las CMN por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (1.077 de densidad) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente fueron resuspendidas en medio de cultivo suplementado (RPMI 1640, HEPES 10mM, L-glutamina 200 mM). Los monocitos fueron purificados mediante perlas inmunomagnéticas acopladas a un anticuerpo anti-CD14. Posteriormente se sembraron un total de  $1 \times 10^6$  monocitos en placas de cultivo de 24 pozos en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado. Para inducir su diferenciación en macrófagos, los monocitos purificados fueron cultivados en medio libre de suero (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10ng/mL de GM-CSF (Leucomax, Sandoz-Wander Pharma). El medio fue reemplazado cada 2 días y después de 6-7 días se obtuvieron macrófagos maduros caracterizándolos en base a su morfología y expresión de superficie de los marcadores CD14, CD33 por citometría de flujo FACS Aria II.

### **Estimulación in vitro de macrófagos THP-1 con PHBC**

Los cultivos celulares fueron expuestos a concentraciones crecientes de extracto orgánico de PHBC (1, 5, 10 y 20 µg/mL) y DMSO (vehículo para los extractos orgánicos) durante 24 horas. Al término del tiempo de estimulación el medio de cultivo fue removido y se agregó medio de cultivo sin antibióticos para infectar las células con la cepa virulenta M.tb-H37Rv en el laboratorio de Bioseguridad nivel 3 del Departamento de Microbiología.

### **Ensayo de citotoxicidad con Cristal violeta.**

Los macrófagos THP-1 se sembraron y diferenciaron con PMA en placas de 96 pozos, posteriormente fueron expuestos durante 24 horas a concentraciones crecientes de Extracto Orgánico (E.O), posterior a la exposición se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS, se retiró el PBS y se agregó 50µl de para-Formaldehído (PFA) 4% por 1 hora, se descartó el PFA y se realizó un lavado con 200µl de PBS, se agregó a cada pozo 100µl de cristal violeta durante 30 minutos en agitación, posteriormente se descartó y se realizó el lavado de la placa sumergiéndola en un contenedor de agua corriente por 5-10 minutos, se

retiró el excedente y la placa se secó a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente se agregó a cada pozo 150µl de tritón 0.2% por 30 minutos en agitación, por último se transfirió 100µl de cada pozo a una placa nueva y se leyó en un Lector de placas de ELISA (BioRad, Modelo iMARK) a 600nm.

### **Análisis de la expresión de receptores de superficie en macrófagos.**

Una vez que los macrófagos THP-1 se incubaron durante 24 horas a las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 µg de los extractos orgánicos se analizaron mediante citometría de flujo. Las células se recuperaron y centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células/tubo. Para la citometría de flujo las células se tiñeron durante 30 minutos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra las siguientes marcas: CD14, CD68, CD80, CD86, DC-SING, MMR, TLR-2, TLR-4, HLA-DR, receptor tipo 1 para IL-1 y receptor tipo 1 y 2 para el TNF- $\alpha$ . Para cada una de las tinciones se incluyó FMO (fluorescence minus one). Posteriormente las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) y fueron analizadas con el software FlowJo 10.0.4 (Tree Star).

### **Modelo de infección in vitro con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis***

La cepa virulenta de M.tb-H37Rv fue cultivada hasta la fase logarítmica de crecimiento en medio líquido Middlebrook 7H9 (100-200ml) complementado con 0.05% Tween 80 y medio de enriquecimiento ADC a 37°C. Para cada experimento se descongeló una alícuota de la bacteria y se realizó la siguiente metodología; el vial de M.tb-H37RV (almacenado a -80°C) se centrifugo a 8000 rpm durante 8min. Posteriormente, para favorecer la fagocitosis M.tb se incubo en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2% suero humano (Gemini Bio-Products), 10% suero fetal bovino y 0.05% Tween 80 durante 5 minutos. La bacteria se centrifugó a 1000 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se ajustó la concentración bacteriana a  $1 \times 10^6$  bacterias/ $1 \times 10^6$  células, para mantener una relación de infección de 1:1. La duración de la infección in vitro fue de 2 horas para todos los experimentos. Una vez transcurrido este tiempo se realiza un lavado a todos los pozos con RPMI para eliminar las bacterias que no fueron fagocitadas por los macrófagos y se

mantuvieron por 3 días en cultivo. Todas las condiciones experimentales se realizaron por triplicado. En los días 1 y 4 post-infección se recuperó el sobrenadante, y se almacenó para su análisis posterior. Las células se lisaron con Triton-X-100 al 1% durante 5 min, se realizan tres diluciones seriadas 1:1000 por cada pozo y se sembró una alícuota de cada dilución en cajas de agar Middlebrook-7H10 para cuantificar las unidades formadoras de colonias posteriores a 21 días de incubación.

### **Pérdida de potencial de membrana mitocondrial por Mitotracker-Anexina V**

Los macrófagos THP-1 se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pozo. Posteriormente las células fueron expuestas durante 24 horas a concentraciones crecientes del EO (1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) incluyendo estaurosporina (control positivo de muerte celular). Al término del tiempo de incubación las células se recuperaron y se incubaron durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con 4  $\mu\text{l}$  de una dilución  $10\mu\text{M}$  de Mitotracker Red el cual tiñe la mitocondria de células vivas y su acumulación es dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Al término de la incubación se realizó un lavado a cada tubo con PBS y se resuspendieron en  $100\mu\text{l}$  de buffer de unión a Anexina-V, se adicionó 5 $\mu\text{l}$  de Anexina V-Alexa flúor. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron y se fijaron con PFA al 4%. Finalmente se realizó un lavado con PBS y se resuspendieron en  $250\mu\text{l}$  de PBS para leer en el citómetro FACS Aria.

### **Análisis de muerte celular en macrófagos por tinción de Anexina-V-Ioduro de propidio.**

Posterior a la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos las células fueron estimuladas con EO a concentraciones crecientes durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , la estaurosporina se agregó como control de muerte celular a una concentración de  $1\mu\text{M}$ , las células se recuperaron por separado y resuspendieron en  $200\mu\text{l}$  de buffer Anexina 1X para cada condición, se agregaron 5 $\mu\text{l}$  de Anexina-V o/y Ioduro de propidio según el diseño experimental. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACS Aria (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

### **Detección de muerte celular en macrófagos por ELISA.**



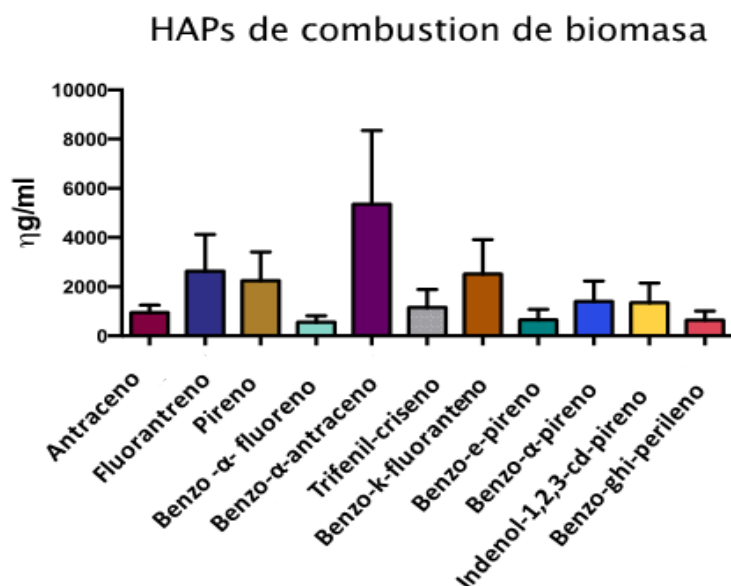
Las células fueron diferenciadas a macrófagos y se mantuvieron en medio RPMI, en cada pozo se colocaron los inhibidores Z-VAD y Z-AF (10 $\mu$ M) durante 30 minutos, posteriormente se agregaron las diferentes concentraciones de extracto orgánico (1, 5, 10 y 20  $\mu$ g/ml) durante 24 horas, se utilizó 1 y 3  $\mu$ g/ml de estaurosporina durante 4 y 12 horas como control positivo para apoptosis y necrosis respectivamente, las células se mantuvieron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de los diferentes estímulos se centrifugo la placa durante 10 minutos a 200xg, se retiraron 200  $\mu$ L de cada pozo y fueron reservados en una placa nueva entre 2-8 °C para evaluar muerte por necrosis, las células fueron resuspendidas con 200 $\mu$ l de buffer de lisis y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue transferido a una placa nueva para evaluar apoptosis. De las placas de 96 pozos para apoptosis y necrosis se tomaron 20  $\mu$ l de cada pozo (x4) y se transfirieron a una placa de 96 pozos previamente fijada con estreptavidina- Ac's anti-Histonas- Biotina, por duplicado, para evaluar apoptosis y necrosis. Por último se analizó en un Lector de placas de ELISA (iMARK) a 405nm cada una de las muestras.

## **RESULTADOS**

Este protocolo fue aprobado por los Comités de Ciencia y Bioética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (B03-12). En colaboración con la Dra. Irma Rosas del Centro de Ciencias Atmosféricas de la UNAM, se obtuvieron las muestras de humo de leña en la comunidad de Zacatlán de las Manzanas, Puebla. Este sitio de muestreo es considerado como “libre” de contaminación antropogénica, por lo que permite el muestreo exclusivo de las emisiones de biomasa.

### **Caracterización de los principales compuestos orgánicos (HAP's) presentes en PHBC**

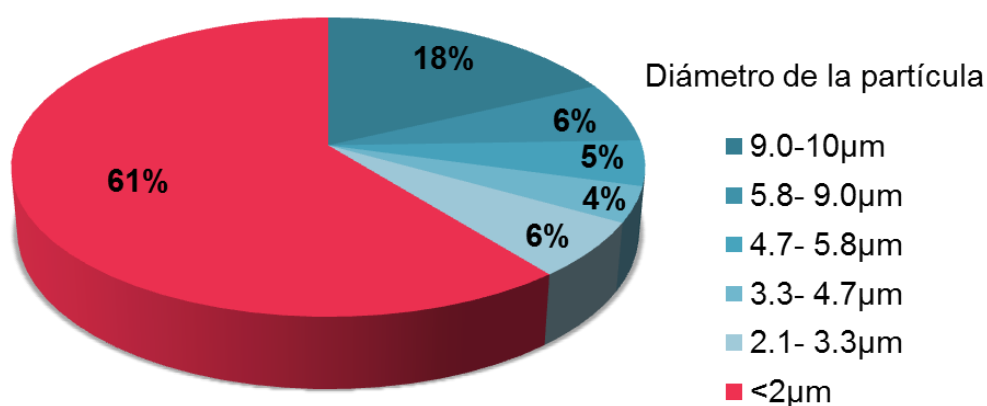
La caracterización fisicoquímica de los componentes orgánicos presentes en el humo de leña realizada por HPLC fueron identificados 11 hidrocarburos aromáticos policíclicos. Dentro de los principales HAPs encontrados están el Benzo ( $\alpha$ ) antraceno el más abundante, seguido por el benzo [k] fluorantreno y el pireno (**Figura 3**).



**Figura 3. Componentes orgánicos identificados en el PHBC.** Los EO obtenidos de las partículas de humo de biocombustibles son analizadas y caracterizadas por HPLC. La imagen es representativa de 4 filtros independientes, se muestra la media  $\pm$  DS.

Durante el proceso de muestreo, las partículas se retienen en filtros de nitrocelulosa con diámetros de poro menor a  $10\mu\text{m}$ , en estos filtros se retuvieron aproximadamente  $6,750\ \mu\text{g}$  de partículas provenientes de la combustión de la leña.

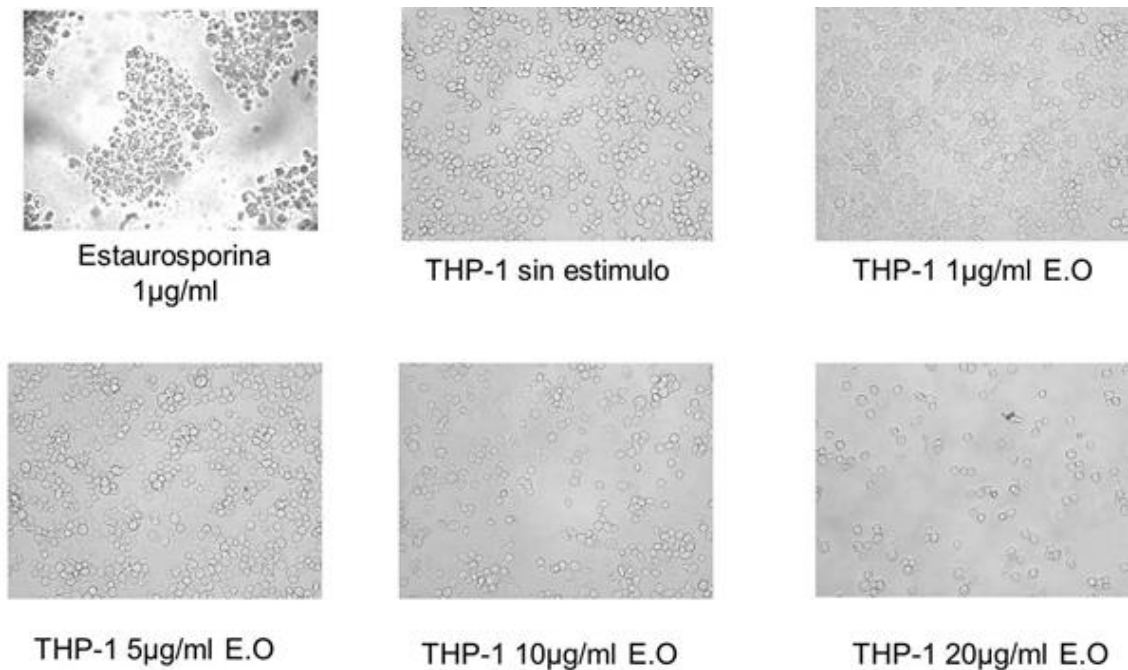
En la **Figura 4** se muestran los diámetros de las partículas retenidas en los filtros de nitrocelulosa durante la caracterización físico-química de las PHBC. El diámetro de las partículas retenidas varía en un rango de  $10\mu\text{m}$  hasta  $0.43\mu\text{m}$ , de las cuales más del 60 % puede internalizarse hasta el área bronquioalveolar debido a su diámetro menor a  $2.5\mu\text{m}$ .



**Figura 4. Distribución de partículas de combustión de biomasa retenidas en filtros de nitrocelulosa.** Imagen representativa de cuatro experimentos independientes.

#### **Cambios en etapas tempranas de exposición a E.O en macrófagos THP-1.**

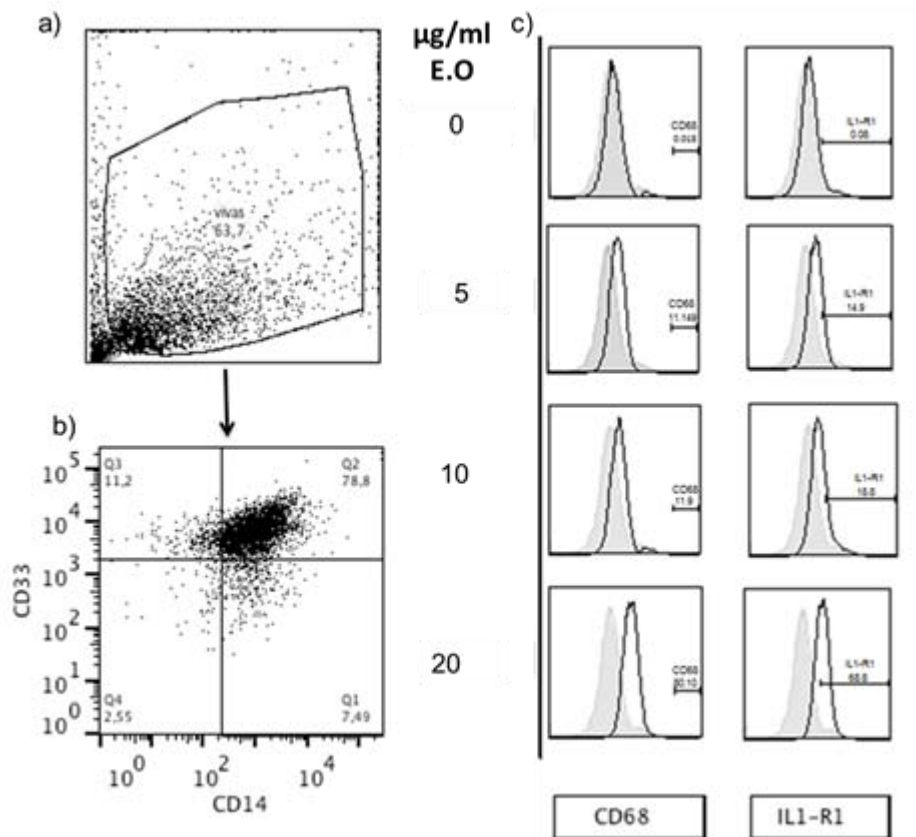
Para estudiar el efecto del EO en los macrófagos en cultivo se observaron los cambios por microscopía de luz 24 horas después de ser expuestos a concentraciones crecientes del EO. En la **Figura 5** se muestran las imágenes representativas de 5 experimentos en donde se aprecia una disminución en el número de células adherentes en las placas de cultivo de forma concentración dependiente, indicando que las características funcionales de los macrófagos se pierden con la exposición a los EO.



**Figura 5. Macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extracto orgánico (1, 5, 10, y 20 µg/ml).** Macrófagos THP-1 fueron expuestos durante 24 horas a concentraciones crecientes de EO. Como control positivo se utilizó estaurosporina (1µg/ml). n=5 Objetivo 20X

#### **Expresión de receptores de superficie en células estimuladas con PHBC.**

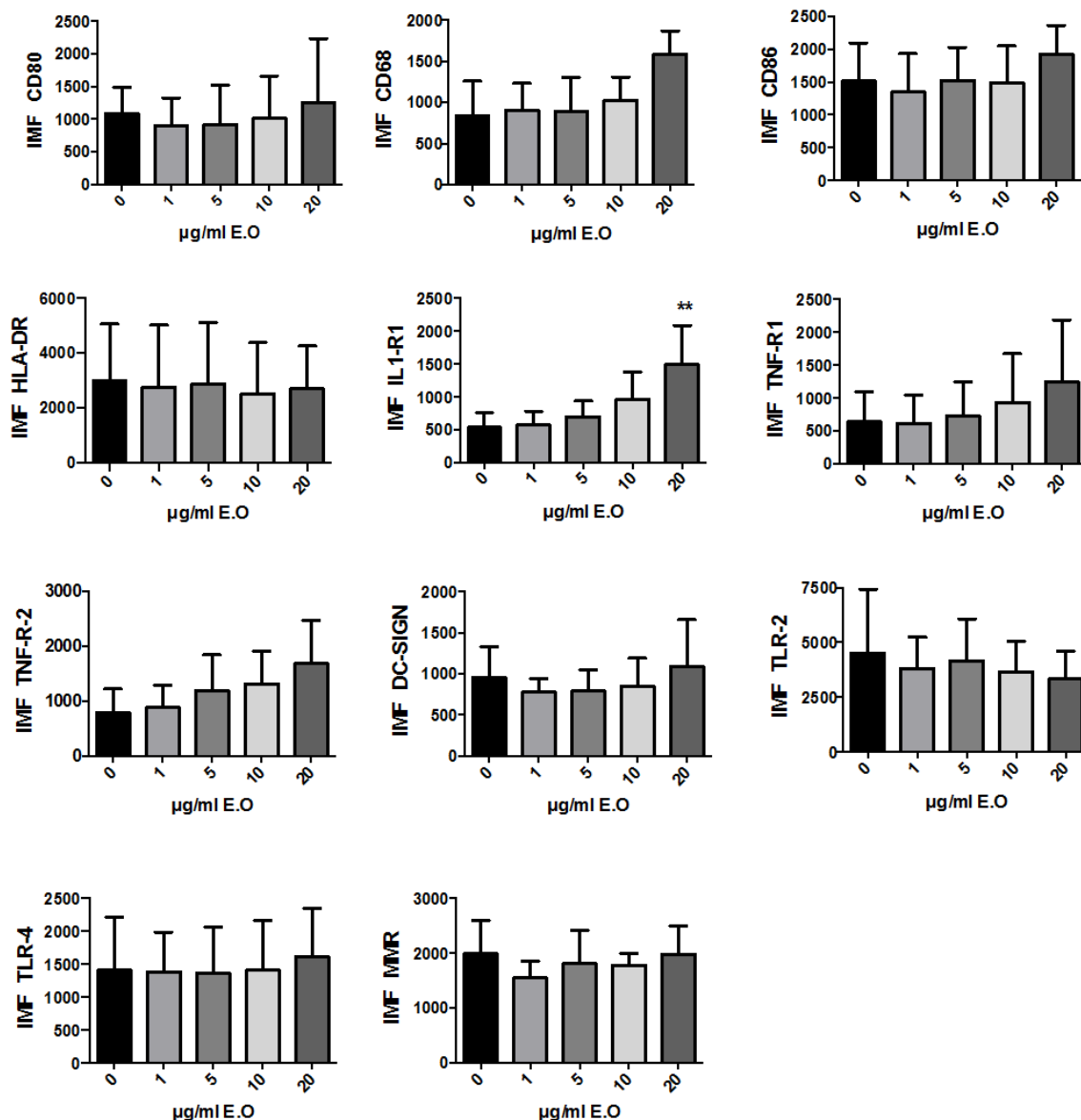
El análisis de la expresión de los marcadores de superficie se evaluó en los macrófagos THP-1 expuestos durante 24 horas a distintas concentraciones de los EO (1, 5, 10 y 20 µg/ml). En la **Figura 6** se muestran un ejemplo del tipo de análisis de citometría de flujo que se realizó para los distintos marcadores.



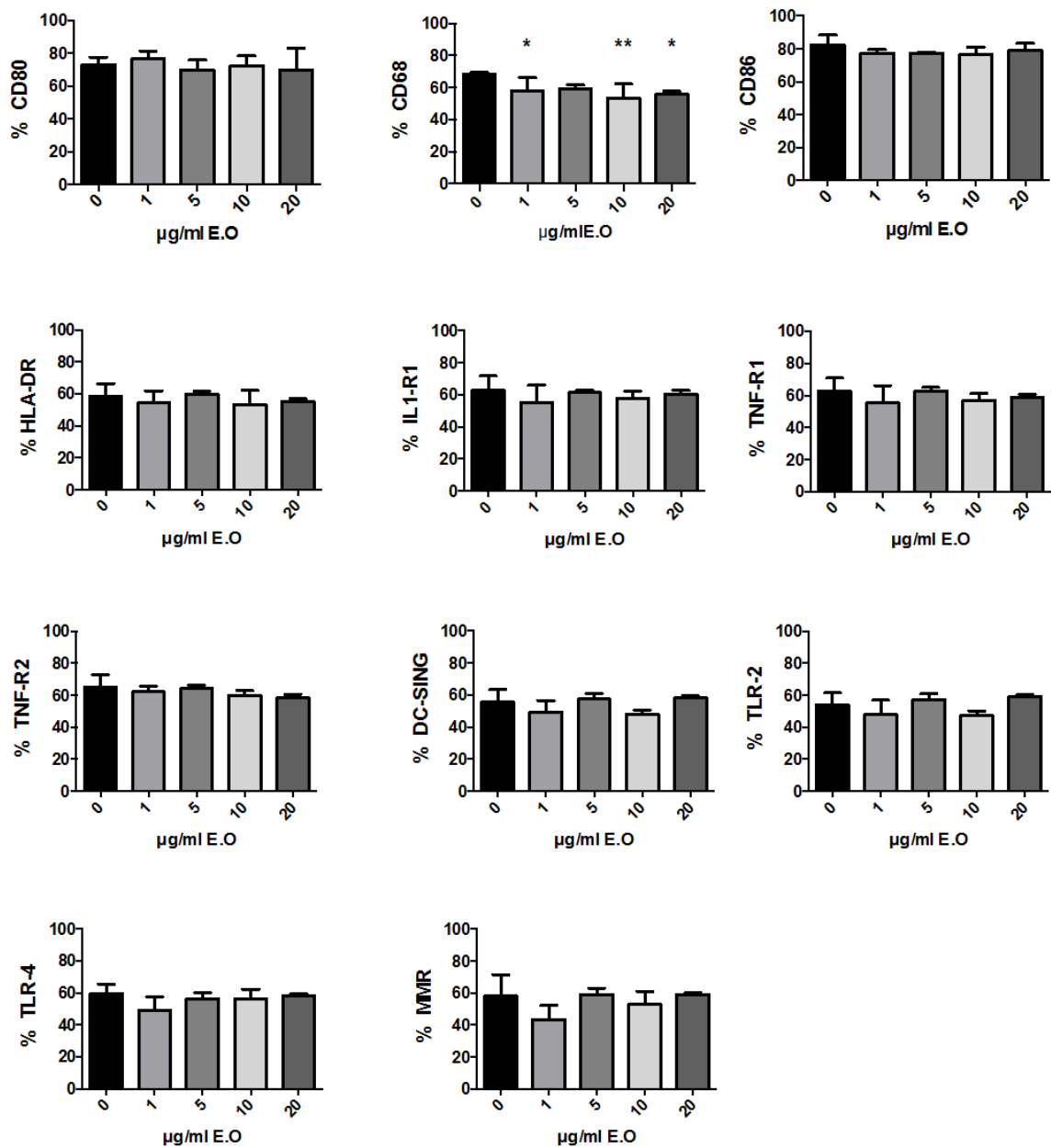
**Figura 6. Análisis de receptores de superficie en macrófagos THP-1 estimulados con EO de PHBC.** En la imagen se muestra la estrategia de análisis para los macrófagos estimulados 24 horas con concentraciones crecientes de EO; **a)** gráfico de puntos, ventana de células vivas **b)** gráfico de puntos de puntos células dobles positivas a los marcadores de diferenciación mieloide CD33 CD14 **c)** histogramas correspondientes a los marcadores CD80 y el receptor 1 para IL-1.

Como parte del análisis evaluamos la intensidad media de fluorescencia (**Figura 7**) y porcentaje de células positivas (**Figura 8**) para los diferentes marcadores de activación y diferenciación en el macrófago, solo uno de los marcadores evaluados mostró diferencias significativas (IL1-RI) en cuanto a la IMF con respecto al control (RPMI), sin embargo se puede observar que la exposición a concentraciones crecientes del extracto orgánico produce modificaciones en la expresión de marcadores importantes para el efectivo control de la micobacteria en los macrófagos. El porcentaje de CD86 también cambió significativamente con respecto al control en el número de células que son positivas para el marcador. Con una n=5 experimentos se pueden apreciar tendencias en los macrófagos positivos al receptor tipo 1 de TNF, DC-SIGN los cuales incrementaron en cantidad de una manera dependiente de la concentración,

mientras que la IMF de macrófagos positivos para el receptor TLR-2 disminuyó (Figura 7). Sugiriendo que los extractos orgánicos pueden regular por algún mecanismo la síntesis y la expresión membranar de marcadores de activación y diferenciación del macrófago que participan de manera activa en la inmunidad contra patógenos.



**Figura 7. Intensidad media de fluorescencia de marcadores de activación y diferenciación en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos.** Macrófagos THP-1 fueron expuestos a PHBC (1, 5, 10 y 20µg/ml) o RPMI como control. Se muestra la intensidad media de fluorescencia para cada uno de los marcadores de superficie. Las barras representan la media ± DS. n= 5 \*\*p<0.05

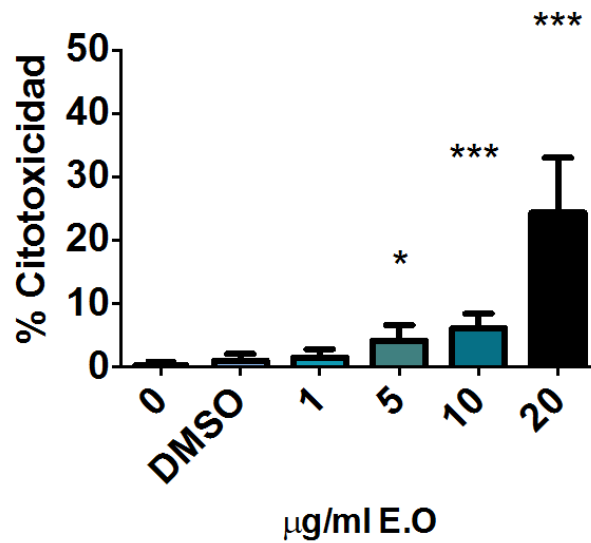


**Figura 8. Porcentaje de expresión de marcadores de activación y diferenciación en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos.** Macrófagos THP-1 fueron expuestos durante 24 horas a concentraciones crecientes de extractos orgánicos proveniente de las PHBC (1, 5, 10 y 20µg/ml) o RPMI como control. Se muestra el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores de superficie. Las barras representan la media  $\pm$  DS. n = 5 \*p<0.05 \*\*p<0.005

### Citotoxicidad celular en macrófagos expuestos a E.O

Como un paso previo a la infección de los macrófagos expuestos a E.O de PHBC, se evaluó el potencial efecto citotóxico de los E.O (**Figura 9**), al analizar los resultados de 6 experimentos independientes se obtuvieron diferencias

significativas con las concentraciones de 5ug/ml ( $p < 0.05$ ), 10 y 20 $\mu$ g/ml ( $p < 0.0001$ ).

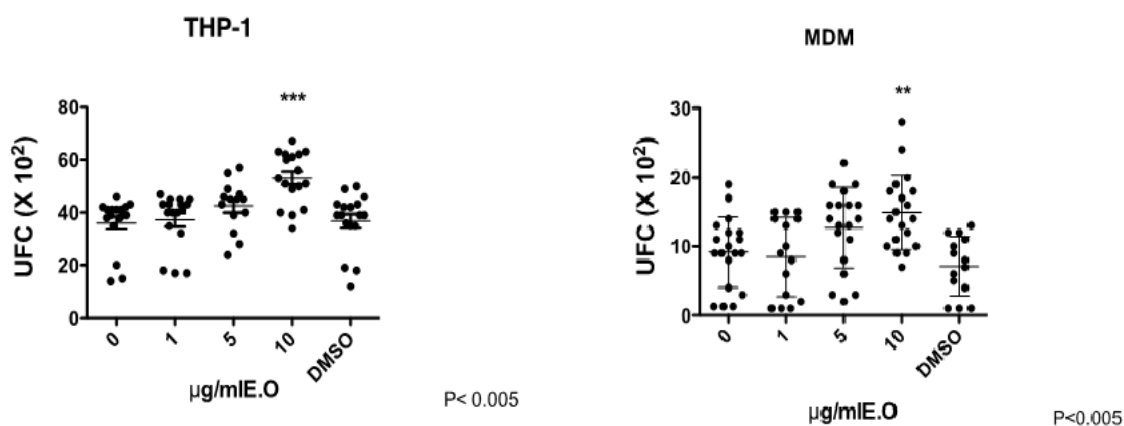


**Figura 9. Porcentaje de citotoxicidad en macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de E.O de PHBC.** Se muestra la mediana y el rango intercuartilar de 6 experimentos independientes, por duplicado. ANOVA comparado con el control sin estímulo, \* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.0001$ . Las barras indican DS.

**Evaluación del crecimiento micobacteriano en macrófagos expuestos a extractos orgánicos de PHBC.** Macrófagos THP-1 fueron expuestos durante 24 horas a concentraciones crecientes de extractos orgánicos proveniente de las PHBC (1, 5 y 10 $\mu$ g/mL), posteriormente fueron infectados durante 2 horas con Mtb-H37Rv en una relación 1:1 bacteria: célula. En el día 4 post-infección las células fueron lisadas y 3 diluciones seriales fueron sembradas en placas de agar Middlebrook 7H10. Tres semanas después se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (**Figura 10**). Únicamente en este experimento se eliminó la concentración de 20 $\mu$ g/ml pues la tasa de células muertas (26%) modificaría la relación 1:1(bacteria: célula) durante la infección impidiendo analizar y comparar la respuesta de los macrófagos ante la infección por M.tb. Los resultados obtenidos demostraron que existe una relación directa entre la concentración de los EO y el crecimiento bacteriano. Dada la relevancia de este fenómeno decidimos repetir este experimento en monocitos diferenciados a macrófagos (MDM) provenientes de sangre periférica de donadores sanos con el objetivo de descartar que el resultado pudiera estar presente solo en la línea celular y no ser un fenómeno fisiopatológico de mayor relevancia.



Los monocitos fueron cultivados durante siete días para permitir su diferenciación a macrófagos maduros y posteriormente fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales. Nuevamente identificamos que a mayor concentración de los extractos orgánicos se presenta mayor crecimiento bacteriano. Estos resultados en conjunto demuestran que los extractos orgánicos deterioran algunos de los mecanismos inmunológicos que utilizan los macrófagos para controlar el crecimiento intracelular de M.tb.

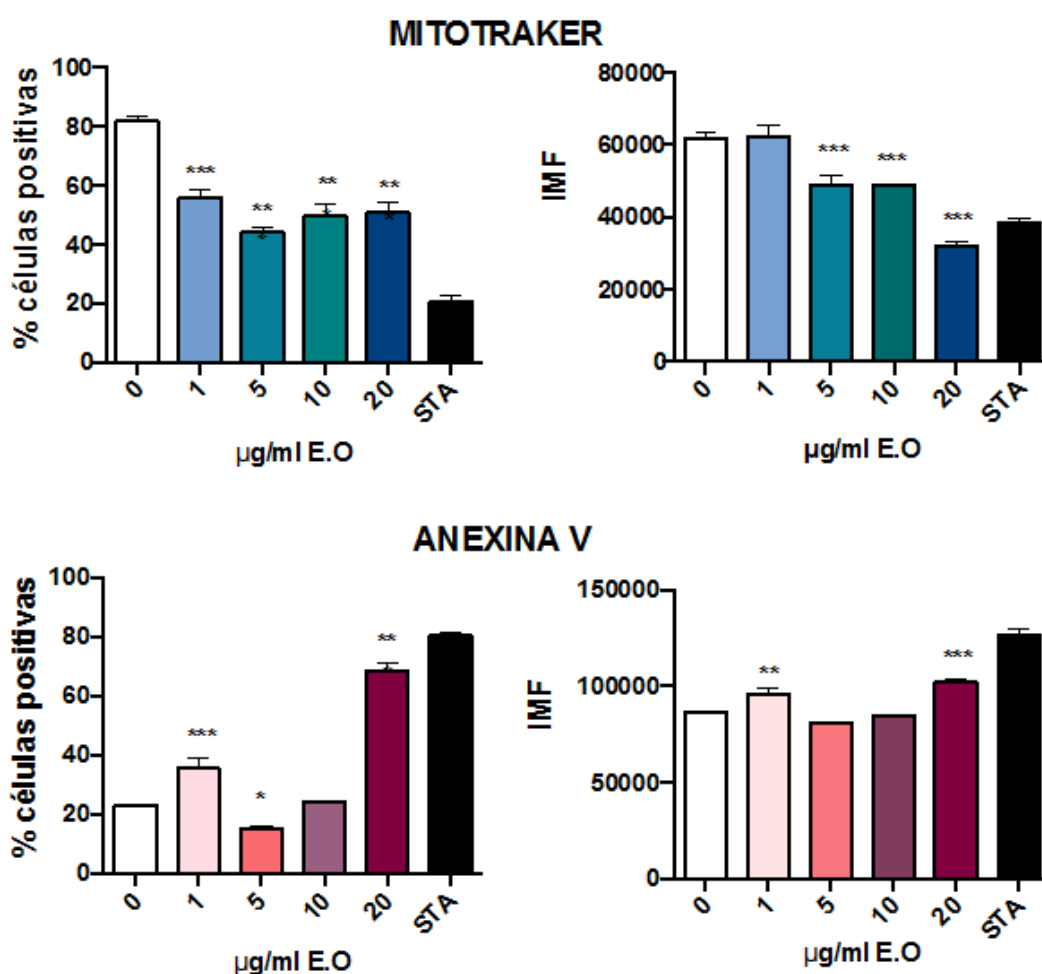


**Figura 10. Control del crecimiento de M.tb en macrófagos expuestos a EO.** Macrófagos THP-1 o MDM fueron expuestos durante 24 horas a concentraciones crecientes de EO proveniente de las PHBC (1, 5 y 10µg/ml). Se muestra la mediana y el rango intercuartil de 5 experimentos independientes. ANOVA comparado con macrófagos no expuestos

### **Pérdida del potencial de membrana mitocondrial en macrófagos THP-1 expuestos a EO**

Para evaluar si los cambios morfológicos y el incremento en el crecimiento bacteriano que se observaron en los macrófagos expuestos a los E.O. pudieran ser secundarios a daño sufrido a nivel mitocondrial y que estos pudieran llevar a muerte celular, decidimos medir cambios en el potencial de membrana mitocondrial después de exponer los macrófagos a concentraciones crecientes de los EO (**Figura 11**). Al analizar los resultados de 4 experimentos independientes observamos que los EO disminuyen el potencial de membrana mitocondrial aun en concentraciones bajas de EO.

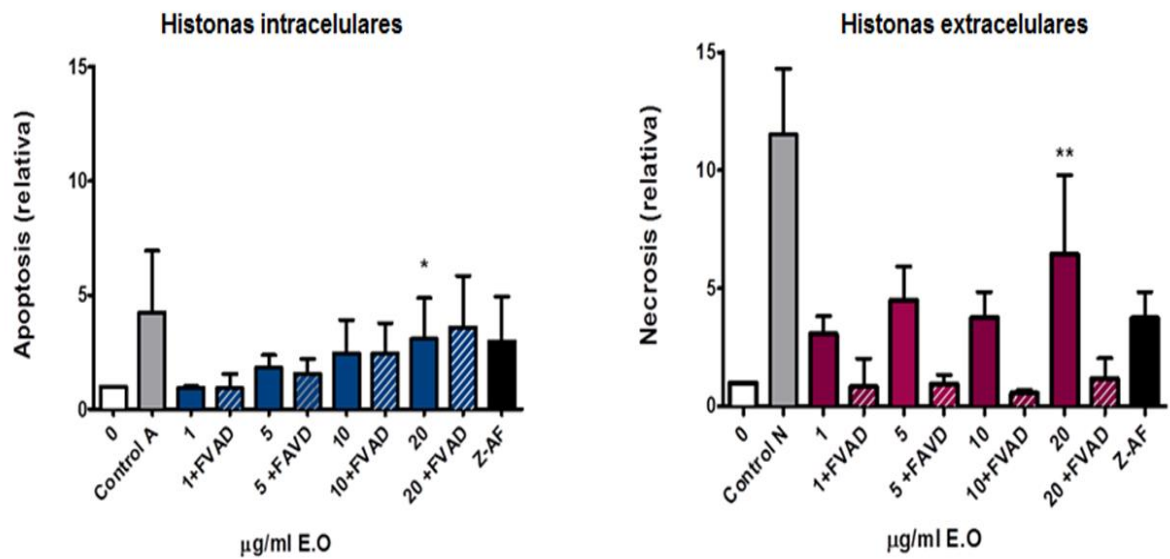
La pérdida de potencial de membrana mitocondrial a causa de la exposición a los EO. podían ejercer un efecto pro-apoptótico en los macrófagos por lo cual se realizó un análisis con Anexina V, un marcador temprano de muerte celular, en este análisis se observó un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para Anexina V a concentraciones de 1 y 20  $\mu\text{g/ml}$  de EO, con respecto al control, este resultado aunado a la disminución concentración dependiente en el porcentaje de células positivas para mitotraker podría indicar un daño a la membrana de la mitocondria que active vías de señalización intracelular que favorezcan los procesos de muerte celular y que una vez que los macrófagos son infectados por M.tb no sean capaces de activar los diversos mecanismos inmunológicos que limiten el crecimiento bacteriano.



**Figura 11. Viabilidad en macrófagos expuestos a EO de PHBC.** Panel superior IMF y porcentaje de células positivas para Mitotraker Red. Panel inferior IMF y porcentaje de células positivas a la tinción con Anexina V. Como control se usó Estaurosporina (STA) Se muestra la media  $\pm$ DS, \* $p < 0.05$  \*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0001$  de 5 experimentos.

## **Evaluación de apoptosis y necrosis en macrófagos THP-1 expuestos a extractos orgánicos**

De acuerdo con los resultados preliminares, concentraciones crecientes de EO producen daño a nivel de membrana mitocondrial y celular. La muerte celular por apoptosis y/o necrosis tiene impacto directo en la inmunidad contra M.tb por ello evaluamos si los macrófagos expuestos a concentraciones crecientes de E.O. eran más susceptibles a alguno de los dos tipos de muerte celular, mediante un ensayo de ELISA específico para la identificación de histonas, en el que las histonas presentes en el sobrenadante fueron representativas del proceso de muerte por necrosis, posterior a la lisis celular y de vesículas a las histonas encontradas en el sobrenadante representaron el proceso de apoptosis. En la **Figura 12** se muestra que los macrófagos expuestos a E.O incrementan tanto el proceso de apoptosis como el de necrosis dependiente de la concentración, en ambos procesos de muerte se muestra una diferencia significativa a concentraciones de 20µg /ml de EO, para observar si estos procesos de muerte eran dependientes de la vía de las caspasas se agregó un inhibidor pan-caspasas (FAVD) a cada una de las condiciones, observándose que la muerte celular por apoptosis se presenta de forma independiente a la vía de las caspasas mientras que la necrosis es un proceso en parte dependiente de caspasas, así mismo se puede apreciar que el proceso de necrosis ocurre de forma mayoritaria en las células THP-1 expuestas al EO en comparación con la apoptosis, lo cual favorece la diseminación de la bacteria al permitir la infección de nuevas células.



**Figura 12. Evaluación de apoptosis y necrosis en macrófagos THP-1 expuestos a E.O. de PHBC.** Macrófagos THP-1 expuestos a concentraciones crecientes de extracto orgánico durante 24 horas, se utilizó como control para ambos procesos de muerte estaurosporina 1µg/ml y los inhibidores Z-VAD y Z-AF (control del inhibidor). A) Muerte celular por apoptosis inducida por E.O B) Muerte celular por necrosis en células expuestas a E.O.\* $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.005$

## Discusión

Los principales resultados de este proyecto son:

1) los compuestos que se encuentran adsorbidos en las partículas del humo de la leña son principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos, 2) 60 % de las de las partículas liberadas durante la combustión de la leña son menores a 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro permitiendo su ingreso al área alveolar, 3) Los EO inducen la pérdida de la adherencia en los macrófagos 4) los extractos orgánicos inducen cambios fenotípicos en los macrófagos expuestos, 5) los extractos orgánicos inducen citotoxicidad en los macrófagos a concentraciones mayores a 10 $\mu\text{g}$ , 6) los E.O. limitan la capacidad bactericida de los macrófagos THP-1 y MDM de una manera concentración dependiente, 7) los EO favorecen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, 8) los EO inducen apoptosis y necrosis en los macrófagos expuestos de una manera concentración dependiente y 9) la muerte celular parece ser mediada por un mecanismo independiente de caspasas.

En la caracterización fisicoquímica de los extractos orgánicos se identificaron alrededor de 20 HAPs de los cuales el fluorantreno y pireno representan la fracción mayoritaria, este dato es consistente con lo demostrado previamente por Anett-Kocbach y colaboradores en el año 2006 [26], sin embargo los niveles de benzo- $\alpha$ -antraceno y benzo-k-fluorantreno son mayores a los valores informados en la literatura [26], una posible explicación al incremento en la concentración de estos componentes en nuestras muestras pueden ser las diferencias en las condiciones de combustión, humedad ambiental y el tipo de leña [34]. Muchos de los HAPs que fueron identificados como compuestos adsorbidos en las partículas de humo de leña han sido previamente descritos como altamente tóxicos [3]. La oxidación parcial de la materia orgánica genera altos niveles de monóxido de carbono y más de 200 compuestos orgánicos, todos ellos con la capacidad de incrementar la resistencia en la vía aérea, inducir inflamación crónica, metaplasia escamosa de la laringe y engrosamiento de la barrera alveolo-capilar [73]. Adicionalmente el análisis físico del humo de biocombustibles permitió la identificación del diámetro de las partículas que se encuentran en el ambiente durante la combustión de la leña, en los resultados es posible observar que más de un 60% de las partículas que se encuentran en un rango inhalable podrían llegar hasta el área alveolar debido a su tamaño inferior

a los 2.5 $\mu$ m, favoreciendo el proceso inflamatorio en estas zonas y dificultando la eliminación de *Mycobacterium tuberculosis* el cual puede ingresar hasta estas zonas.

Inicialmente se observó el efecto que tenían los EO en los macrófagos mediante microscopia de luz, en estas imágenes se puede apreciar una disminución en el número de células adherentes en las placas de cultivo de forma concentración dependiente, indicando que las características funcionales de los macrófagos se pierden con la exposición a los EO.

Los patrones moleculares asociados a patógeno son conservados en M.tb y son reconocidos a través de distintos receptores de superficie, entre ellos están TLR2 y TLR4 que juegan un papel importante en la respuesta innata contra M.tb [89]. TLR2 reconoce lipoarabidomanana, lipomanana y manósidos de fosfatil inositol presentes en la membrana de M.tb activando la secreción de citocinas pro-inflamatorias [90]. Una hipótesis que planteamos es que los compuestos presentes en el humo de la leña inducen cambios en los mecanismos que tiene el macrófago para controlar las infecciones. Cambios en la expresión receptores de superficie que inician la respuesta pro-inflamatoria o que favorecen la maduración/diferenciación y fagocitosis de los macrófagos fueron nuestro principal objetivo de análisis. Al analizar la expresión de TLR2 y 4 identificamos que la frecuencia y la IMF de TLR2 disminuyen de una manera concentración dependiente aunque no con cambios estadísticamente significativos. El impacto que puede tener la reducción en la expresión de este receptor incluye disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias. Adicionalmente se ha documentado que cambios en la expresión de TLR2 modifican la capacidad de los macrófagos para eliminar a los HAPs ya que se ha demostrado que TLR2 es un receptor clave en la regulación de la expresión de CYP1A1, que a su vez participa de forma activa en la eliminación de estos compuestos tóxicos [91]. Se ha demostrado que la expresión intestinal de CYP1A1 es silenciada en ratones deficientes en TLR2, incluso bajo exposición a un inductor como el benzopireno, provocando que los HAPs no puedan ser eliminados de la célula [92]. También se ha demostrado que la presencia de HAPs en los macrófagos favorece la peroxidación lipídica, daño al DNA y activación de NF $\kappa$ B [1]. Esta pérdida en la capacidad del macrófago para eliminar los HAPs predispone a un estado de

estrés celular, que afecta el potencial de membrana mitocondrial y posiblemente la producción de ATP impidiendo la eliminación eficaz de M.tb; sin embargo, aún se desconoce la vía de señalización que relacione al TLR2 con la expresión de CYP1A1. [92]

Los lipopéptidos presentes en la pared de M.tb son reconocidos por TLR4, la señalización de TLR4 induce la síntesis y secreción de citocinas pro-inflamatorias incluyendo a la IL-1 $\beta$  [90]. IL-1 $\beta$  es una citocina que puede promover la apoptosis al inducir la secreción de TNF- $\alpha$ , el reclutamiento de FAAD y la activación de las caspasas 8 y 3 [77]. Macrófagos deficientes de TLR4 han mostrado disminución, aunque no completa de TNF- $\alpha$  [93]. El aumento en la producción de IL-1 $\beta$  induce un incremento en la secreción de TNF- $\alpha$  y promueve a su vez los procesos de muerte en el macrófago por activación de las caspasas [77]. Nuestros resultados muestran incremento en la expresión de los receptores 1 y 2 de TNF-  $\alpha$  así como el receptor 1 de IL-1. Este resultado es importante para el desarrollo de la respuesta inflamatoria ya que la secreción de la IL-1B estimula y es estimulada por la secreción de TNF- $\alpha$ , del mismo modo un aumento en la secreción de IL-1  $\alpha$  o  $\beta$  genera un aumento en la expresión de su receptores (1, 2 y RA) para mediar el proceso inflamatorio [94], debido a este incremento en la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se genera un estado de estrés oxidativo que promueve el daño celular [95].

Marcadores importantes en el proceso de fagocitosis y activación de la respuesta inmune ante M.tb como son el receptor de manosa (MMR), el marcador DC-SING y CD80 respectivamente, mostraron cambios en su perfil de expresión cuando los macrófagos fueron expuestos a las diferentes concentraciones de los EO. Como se ha documentado, el receptor de manosa es clave en el proceso de reconocimiento y fagocitosis no opsónica de M.tb [96]. Este receptor reconoce manosa presente en la lipoarabinomana de M.tb. [97, 98]; nosotros identificamos que este receptor disminuye su expresión al incrementar la concentración de EO con respecto al control aunque la diferencia no es significativa. El receptor de manosa es importante durante las fases iniciales de la infección ya que la fagocitosis no opsónica realizada por los macrófagos es crítica para la defensa del huésped debido a que en el líquido bronquioalveolar no inflamatorio no hay una cantidad suficiente de opsoninas que puedan promover la fagocitosis opsónica [96]. Al adicionar la concentración de 20  $\mu$ g /ml de EO la expresión del receptor de manosa se incrementa con

respecto a los valores basales. Se ha documentado que la entrada de M.tb a través de este receptor puede favorecer la supervivencia del patógeno ya que inhibe la fusión fagolisosomal de una forma dependiente a glucofosfolípidos [99], por lo que un aumento en este receptor podría facilitar la supervivencia de la micobacteria.

Los receptores DC-SING y la molécula coestimuladora CD80 incrementaron su expresión dependiendo de la concentración de extracto orgánico. DC-SING es un receptor que reconoce diferentes carbohidratos tales como los glico-conjugados unidos a manosa [100]. Se ha demostrado que ManLAM unido a al DC-SING puede incrementar la secreción de IL-10 una citocina supresora de la respuesta inflamatoria, además de interactuar con TLR2 y TLR4 ya que estos receptores estimulan la producción de la proteína p65 que posterior a ser acetilada por la vía de DC-SING puede estimular la activación de NF $\kappa$ B y la liberación de citocinas anti-inflamatorias [101, 102]. En MA se ha demostrado que DC-SING incrementa su expresión durante la infección con M.tb [103]. Es posible que el incremento en la expresión de este receptor secundario a la exposición a los extractos orgánicos favorezca la secreción de IL-10 y de esta manera límite el control del crecimiento de M.tb.

Una vez que identificamos los cambios en la expresión de receptores de superficie evaluamos si los extractos orgánicos ejercían un efecto citotóxico sobre los macrófagos, los resultados indican que la concentración de 20  $\mu$ g/ml aumenta el porcentaje de células muertas hasta un 26%, con la finalidad de mejorar la reproducibilidad de los datos al evaluar la capacidad de los macrófagos para controlar el crecimiento de M.tb y favorecer la relación 1:1 se eliminó únicamente en el modelo de infección la concentración de 20 $\mu$ g/ml.

Para evaluar si la exposición a los extractos orgánicos limita la capacidad bactericida de los macrófagos por un mecanismo asociado a muerte celular, se realizaron experimentos de infección in-vitro. Al evaluar las unidades formadoras de colonias se observa nuevamente un fenómeno dosis creciente en donde observamos el mayor crecimiento bacteriano en los MDM y THP-1 que fueron expuestos a la concentración más alta de los extractos orgánicos(10 $\mu$ g/ml). Con base a estos resultados podemos sugerir que los macrófagos pierden la capacidad de controlar el crecimiento intracelular bacteriano.

Varios mecanismos de defensa pueden ser modificados en el macrófago y tener como consecuencia un deterioro en la capacidad para controlar el crecimiento



bacteriano; la muerte celular es uno de los mecanismo ampliamente utilizados desde el punto de vista inmunológico para controlar diversos procesos infecciosos [104].

La pérdida del potencial de membrana mitocondrial es uno de los indicadores de muerte celular por lo cual se evaluaron los cambios en el potencial con la sonda de Mitotracker Red, además de evaluarse los procesos tempranos de muerte como el intercambio de fosfatidilserina a la capa exterior de la membrana celular, la cual se evalúa por la tinción con Anexina V en macrófagos expuestos a concentraciones crecientes de los extractos, en cuanto a la tinción con Mitotraker Red se observó que dicho potencial tiende a disminuir cuando se compara con los macrófagos no expuestos. El análisis estadístico realizado con ANOVA indica que existen diferencias significativas entre las condiciones y al realizar comparaciones independientes esto es; macrófago no expuesto vs. Macrófago + 1µg del extracto (así como 5, 10 y 20µg) se identificaron diferencias significativas  $p < 0.0001$   $n=5$ . Nuestra hipótesis es que los EO disminuyen el potencial de membrana de la mitocondria al grado de inducir muerte celular y afectar vías de señalización de muerte celular, lo cual se confirma con la tinción por Anexina V en la que se observa aumento significativo a concentraciones altas de EO en las que se presenta una diferencia significativa en las células positivas a la tinción con respecto al control. Estos resultados indican un proceso de daño en las células a nivel mitocondrial que podrían llevar una pérdida de ATP así como un posible proceso de apoptosis temprana inducido por el EO. [98]

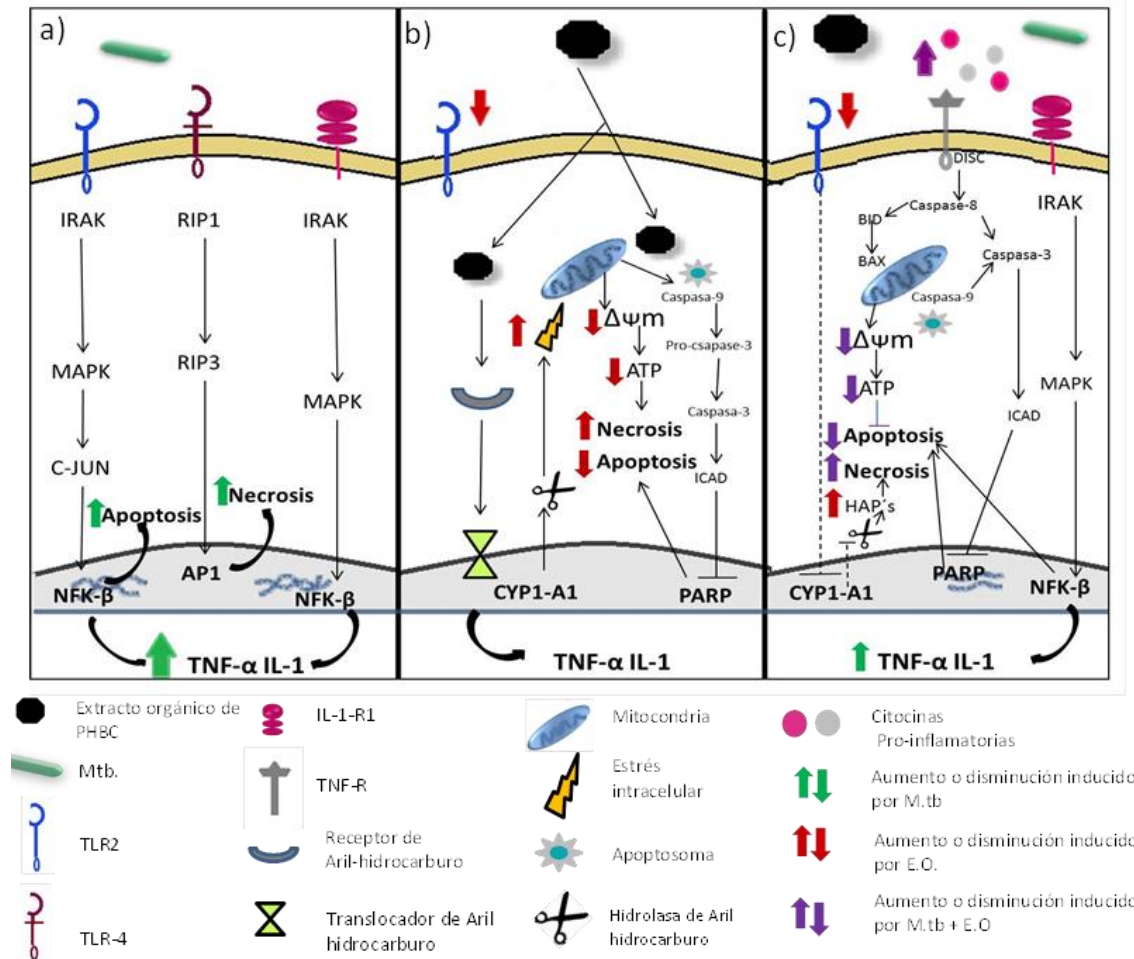
Considerando los resultados previos decidimos realizar un ensayo que nos permitiera evaluar los dos principales procesos de muerte; apoptosis y necrosis simultáneamente. Este ensayo cuantifica la presencia de histonas en el sobrenadante (indicador de necrosis) o en las células lisadas (indicador de apoptosis). Al evaluar 8 experimentos independientes identificamos que los extractos orgánicos activan ambas vías de muerte celular, la que induce apoptosis ( $p < 0.05$ ) y la que induce necrosis ( $p < 0.05$ ) específicamente a concentraciones de 20µg/ml, sin embargo se muestra una tendencia a incrementar de forma dosis dependiente para ambos procesos de muerte ante el estímulo con EO, al comparar entre ambos tipos de muerte celular podemos observar un incremento en la muerte por necrosis.

Se ha descrito que la cepa H37Rv de M.tb es un cepa virulenta que promueve la muerte celular por necrosis y pro-apoptótica en comparación con la cepa Beijing

[105], hemos observado que la muerte celular en los macrófagos estimulados únicamente con los extractos orgánicos genera muerte celular tanto necrótica como apoptótica, [33] además de daño a nivel mitocondrial, el efecto de los EO en las células pulmonares podría ser un factor que disminuya la capacidad de eliminación del bacilo.

Los resultados indican que la muerte por apoptosis se presenta de forma independiente a la vía de las caspasas, este resultado puede deberse a compuestos específicos como por ejemplo el B- $\alpha$ -Pireno, el cual se ha descrito altera de forma dramática las capacidades funcionales como adherencia y fagocitosis además de desencadenar la muerte por apoptosis a través de la vía de las caspasas así como por la vía mitocondrial pues se asocia con una pobre regulación de factores de supervivencia como FLIP-1, BCL-XL, además la regulación de factores pro-apoptóticos como p53[72].

Ya que en los macrófagos se presentan ambos tipos de muerte celular de forma dependiente e independiente de caspasas, nosotros proponemos un modelo de señalización (**Figura 13**) en que los extractos orgánicos activan la vía intrínseca de la apoptosis a través del aumento de estrés celular por acción de la hidrolasa de aril hidrocarburo así como por la concentración de los EO en la membrana de la mitocondria lo cual afecta el potencial de membrana y a su vez disminuye la disponibilidad de ATP necesario para llevar a cabo procesos de muerte controlados como la apoptosis, por otra parte se observó que los E.O afectan la expresión de receptores tipo Toll y aumentan significativamente al receptor 1 para la IL-1 la vía de activación de los TLRs lleva directamente a la secreción de citocinas pro inflamatorias importantes para controlar el proceso infeccioso, sin embargo al ser previamente expuestos a los extractor orgánicos los macrófagos se encuentran en un estado de desbalance en las vías de muerte celular que puede favorecer la diseminación de la micobacteria al promover la muerte por necrosis y la infección de nuevas células reclutadas por las citocinas pro-inflamatorias liberadas.



**Figura 13. Modelo propuesto para la pérdida del balance apoptosis-necrosis en macrófagos expuestos a E.O e infectados por M.tb.** a) En condiciones normales los macrófagos tienen la capacidad de reconocer y activar vías de muerte celular así como la producción de citocinas ante un proceso infeccioso. b) Los macrófagos expuestos a EO incrementan los niveles de epóxidos así como estrés intracelular por la activación de la Hidrolasa de Aril Hidrocarburo activada por CYP1A1, lo cual promueve daño a nivel mitocondrial, efecto que también puede producirse por la concentración de extracto orgánico de PHBC en la membrana mitocondrial [106] promoviendo la disminución del potencial de membrana, así como del ATP disponible para llevar a cabo la muerte por apoptosis activada por la vía intrínseca, bajo esas condiciones los macrófagos son más susceptibles a la muerte celular. c) Los macrófagos expuestos a EO e infectados por M.tb incrementan la secreción de citocinas pro-apoptóticas, aumentan el estrés celular a causa de la disminución del TLR-2, importante en la activación de la hidrolasa de aril hidrocarburo lo cual favorece la acumulación de los HAPs [92], en el macrófago se disminuye el potencial de membrana mitocondrial así como la disponibilidad de ATP predisponiendo al macrófago a la muerte por necrosis favoreciendo la diseminación del bacilo y progresión de la tuberculosis pulmonar.

## Conclusiones

Estos resultados sugieren que la asociación epidemiológica que se ha descrito entre exposición crónica a humo de leña y desarrollo de tuberculosis pulmonar tiene un fundamento inmunológico potencialmente asociado a un desbalance en los mecanismos que regulan la muerte celular de macrófagos.

## LITERATURA CITADA:

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. Leonard, S.S., et al., *Particle size-dependent radical generation from wildland fire smoke*. Toxicology, 2007. **236**(1-2): p. 103-13.
3. Danielsen, P.H., et al., *Oxidative damage to DNA and repair induced by Norwegian wood smoke particles in human A549 and THP-1 cell lines*. Mutation research, 2009. **674**(1-2): p. 116-22.
4. Kocbach, A., et al., *Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties*. Particle and fibre toxicology, 2009. **6**: p. 29.
5. Babalık A, B.N., Taylan M, Bostan L, Kızıltaş S, Başbuğ Y, Çalışır HC., *Biomass smoke exposure as a serious health hazard for women*. Tuberk Toraks., 2013: p. 6.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Institute, W.R., *World Resources: Guide to global environment*. . Oxford University press, 1998.
10. Song Y, T.X., Xie S, Zhang Y, Wei Y, Zhang M, Zeng L, Lu S, *Source apportionment of PM2.5 in Beijing in 2004*. . J Hazard Mat 2007. **146**: p. 7.
11. Smith KR, M.S., *The burden of disease from indoor air pollution in developing countries: comparison of estimates*. Int J Hyg Environ Health, 2003. **206**: p. 11.
12. Kurmi OP, S.S., Simkhada P, Smith WC, Ayres JG. , *COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: a systematic review and meta-analysis*. . Thorax., 2010. **65**: p. 8.
13. Zuk M, R.L., Blanco S, Serrano P, Cruz J, Angeles F, Tzintzun G, Armendariz C, Edwards RD, Johnson M, Riojas-Rodriguez H, Masera O., *The impact of improved wood-burning stoves on fine particulate matter concentrations in rural Mexican homes*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2007. : p. 8.
14. Mukesh Dherani, D.P., Maya Mascarenhas, Kirk R Smith, Martin Weber, Nigel Bruce, *Indoor air pollution from unprocessed solid fuel use and pneumonia risk in children aged under five years: a systematic review and meta-analysis*. Bull World Health Organ, 2008. **86**: p. 8.
15. Drigo, M.O.R.R., *WISDOM: una representación cartográfica de la oferta y la demanda de combustibles leñosos*. Unasyuva 2003. **53**: p. 5.
16. Omar R. Masera, G.G., Adrián Ghilardi, *Fuelwood "hot spots" in Mexico: A case study using WISDOM*. 2004.
17. INEGI. *Censo de población y vivienda*. 2010; Available from: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010).

18. Gauggel S, D.-G.C., Wimmer J, Wingfield M, van der Burg B, Dietrich DR. , *Characterization of biologically available wood combustion particles in cell culture medium ALTEX.*, 2012. **29**: p. 17.
19. Tapanainen M, J.P., Mäki-Paakkanen J, Hakulinen P, Lamberg H, Ruusunen J, Tissari J, Jokiniemi J, Hirvonen MR. , *Efficiency of log wood combustion affects the toxicological and chemical properties of emission particles.* . *Inhal Toxicol.* , 2012 **24**: p. 12.
20. Gray, H., *Anatomy of the Human Body.* . 3d ed 1918.
21. PiñaAntonio, A., *Como son las partículas atmosféricas antropogénicas y cuál es su relación con los diversos tipos de fuentes contaminantes?* , ed. C. Gold 2011. 161.
22. Boman BC, N.A., Boström D, Öhman M. , *Characterisation of inorganic particulate matter from residential combustion of pelletized biomass fuels.* *Energy & Fuels* 2004. **18**: p. 10.
23. Siegel PD, S.R., SaxenaQB, Ma JY, MaJK, Yin XJ, Castranova V, Al Humandi N, Lewis DM *Effect of diesel exhaust particulate (DEP) on immune responses: contributions of particulate versus organic soluble components.* . *J Toxicol Environ Health A*, 2004. **67**: p. 10.
24. Torres Duque Carlos , M.D., Perez Padilla R., *Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence.* *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2008. **5**: p. 13.
25. Dubick, M.A., et al., *Indices of antioxidant status in rats subjected to wood smoke inhalation and/or thermal injury.* *Toxicology*, 2002. **176**(1-2): p. 145-57.
26. Kocbach A, Y.L., Karl E Ytri, Flemming R Cassee, Per E Schwarze and Ellen Namork. , *Physicochemical characterization of particles from vehicle exhaust and residential wood smoke.* *Particle and fibre toxicology* 2006. **3**.
27. Agency., U.S.E.P., *A summary of emissions characterization and non-cancer respiratory effects of the Wood smoke*, E.P. agency, Editor 1993, EPA-435/R-93-036: Washington, DC.
28. Nolte CG, S.J., Cass GR, Simoniet BR. , *Highly polar organic compounds present in wood smoke and in the ambient atmosphere.* *Environ Sci Technol* 2000. **35**: p. 7.
29. Yari M, F.N., Ahmadi H, Najafi F., *Profile of acute carbon monoxide poisoning in west province of Iran.* *J Coll Physicians Surg Pak.*, 2012. **22**(6): p. 4.
30. Ryohei Miyata, S.F.v.E., *The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter.* *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011. **257**: p. 18.
31. J., D., *Percivall Pott.* . *Ann R Coll Surg Eng.*, 1972. **50**: p. 11.
32. Society, R. *Ernest Laurence.* 2012; Available from: <http://royalsociety.org/library/1949-1900/ErnestLaurence>
33. Solhaug A, R.M., Låg M, Schwarze PE, Husøy T, Holme JA., *Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells.* *Carcinogenesis.* , 2004. **5**: p. 10.
34. Antonio., A., *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Acercamiento a su problemática como riesgo laboral*, D.S.d.S.L.y.M. Ambiente, Editor 2010, MCA-UGT Federación de Industria.: México
35. van Zandvoort I, W.Y., Rasrendra CB, van Eck ER, Bruijninx PC, Heeres HJ, Weckhuysen BM., *Formation, Molecular Structure, and Morphology of Humins in Biomass Conversion: Influence of Feedstock and Processing Conditions.* *ChemSusChem.* , 2013.
36. Teixeira EC, M.C., Agudelo-Castañeda DM, de Oliveira Garcia K, Wiegand F., *Polycyclic aromatic hydrocarbons study in atmospheric fine and coarse*

- particles using diagnostic ratios and receptor model in urban/industrial region.* Environ Monit Assess, 2013 **Epub ahead of print.**
37. Binková B, C.M., Pastorková A, Jelínek R, Benes I, Novák J, Srám RJ., *Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000-2001.* Mutat Res., 2003. **525**: p. 16.
  38. Vives I, G.J., Guitart R. , *Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana.* Apuntes de Ciencia y Tecnología., ed. A.d.C.y. Tecnología. Vol. 3. 2001.
  39. de Oliveira Alves N, M.L.A., Dos Santos FC, Nascimento KH, Dallacort R, de Castro Vasconcellos P, de Souza Hacon S, Artaxo P, de Medeiros SR., *Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region.* Ecotoxicol Environ Saf., 2011. **74**(5): p. 6.
  40. Hernández-Garduño E, B.M., Pérez-Neria J, Vedal S., *Wood smoke exposure and lung adenocarcinoma in non-smoking Mexican women.* Int J Tuberc Lung Dis., 2004. **8**(3): p. 6.
  41. Ramanakumar AV, P.M., Siemiatycki J., *Risk of lung cancer from residential heating and cooking fuels in Montreal, Canada.* Am J Epidemiol., 2007. **165**(6): p. 8.
  42. Perez-Padilla, R., et al., *Cooking with biomass stoves and tuberculosis: a case control study.* The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2001. **5**(5): p. 441-7.
  43. Xu X, N.T., Christiani DC, Weiss ST, Chen C, Zhou Y, Fang Z, Jiang Z, Liang W, Zhang F., *Occupational and Environmental Risk Factors for Asthma in Rural Communities in China.* Int J Occup Environ Health, 1996. **2**(3): p. 5.
  44. Nebert DW, D.T., *The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis.* Nat Rev Cancer., 2006. **6**(12): p. 14.
  45. Crofts F, T.E., Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ, *Functional significance of different human CYP1A1 genotypes.* Carcinogenesis., 1994. **15**(12): p. 3.
  46. SH, S., *Review Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment.* Crit Rev Toxicol., 1994. **24**(2).
  47. Cosma G, C.F., Taioli E, Toniolo P, Garte S, *Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene.* J Toxicol Environ Health., 1993. **40**: p. 8.
  48. Anderson RA, M.L., Coutts S, Kinnell HL, Fowler PA, Childs AJ., *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by a component of cigarette smoke reduces germ cell proliferation in the human fetal ovary.* Mol Hum Reprod, 2013.
  49. Morino-Koga S, U.H., Tsuji G, Takahara M, Kajiwara J, Hirata T, Furue M., *Reduction of CC-chemokine ligand 5 by aryl hydrocarbon receptor ligands.* J Dermatol Sci., 2013. **72**(1): p. 7.
  50. Uno S, D.T., Derkenne S, Curran CP, Miller ML, Shertzer HG, Nebert DW, *Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation.* Mol Pharmacol., 2004. **65**(5): p. 13.
  51. Burchiel SW, T.T., Lauer FT, Oprea TI., *Activation of dioxin response element (DRE)-associated genes by benzo(a)pyrene 3,6-quinone and benzo(a)pyrene 1,6-quinone in MCF-10A human mammary epithelial cells.* Toxicol Appl Pharmacol., 2008: p. 2.

52. Gao J, L.F., Mitchell LA, Burchiel SW. , *Microsomal epoxide hydrolase is required for 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced immunotoxicity in mice.* Toxicol Sci., 2007: p. 8.
53. Nguyen LP, B.C., *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor.* Chem Res Toxicol., 2008: p. 15.
54. Petrulis JR, K.A., Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH, *The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity.* J Biol Chem., 2003: p. 9.
55. Ikuta T, T.T., Watanabe J, Yoshida M, Yoneda Y, Kawajiri K, *Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor.* J Biochem, 2000: p. 7.
56. Bølling AK, T.A., Sallsten G, Braun A, Westerholm R, Bergvall C, Boman J, Dahlman HJ, Sehlstedt M, Cassee F, Sandstrom T, Schwarze PE, Herseth JL, *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 Nov 2012. **9**(45).
57. Swiston JR, D.W., Attridge S, Li GT, Brauer M, van Eeden SF., *Wood smoke exposure induces a pulmonary and systemic inflammatory response in firefighters.* Eur Respir J., 2008: p. 9.
58. Tellabati A, F.V., Teichert F, Singh R, Rylance J, Gordon S, Andrew PW, Grigg J., *Acute exposure of mice to high-dose ultrafine carbon black decreases susceptibility to pneumococcal pneumonia.* Part Fibre Toxicol, 2010.
59. Migliaccio CT, K.E., King QO, Porter V, Jessop F, Ward T., *Adverse effects of wood smoke PM(2.5) exposure on macrophage functions.* Inhal Toxicol. , 2013: p. 9.
60. Renwick LC, B.D., Clouter A, Donaldson K., *Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types.* Occup Environ Med. , 2004: p. 5.
61. Totlandsdal AI, L.M., Lilleaas E, Cassee F, Schwarze P, *Differential proinflammatory responses induced by diesel exhaust particles with contrasting PAH and metal content.* Environ Toxicol. 2015 Jul 31. , 2013.
62. Shoenfelt J, M.R., Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, Squibb KA, Medvedev AE., *Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter.* J Leukoc Biol. , 2009: p. 9.
63. Kerkhof M, P.D., Brunekreef B, Reijmerink NE, Wijga AH, de Jongste JC, Gehring U, Koppelman GH., *Toll-like receptor 2 and 4 genes influence susceptibility to adverse effects of traffic-related air pollution on childhood asthma.* Thorax., 2010. **65**: p. 7.
64. Samet JM, R.A., Graff D, Cascio WE, Berntsen JH, Huang YC, Herbst M, Bassett M, Montilla T, Hazucha MJ, Bromberg PA, Devlin RB., *Concentrated ambient ultrafine particle exposure induces cardiac changes in young healthy volunteers.* Am J Respir Crit Care Med., 2009.
65. Miyata R, v.E.S., *The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter.* Toxicol Appl Pharmacol., 2011. **257**(2).
66. Fan J, L.Y., Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA., *Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling.* J Immunol., 2007: p. 6573.
67. Mazzoli-Rocha F, F.S., Einicker-Lamas M, Zin WA., *Roles of oxidative stress in signaling and inflammation induced by particulate matter.* Cell Biol Toxicol., 2010(5): p. 18.



68. Cuschieri J, G.D., Garcia I, Jelacic S, Maier RV., *Slow channel calcium inhibition blocks proinflammatory gene signaling and reduces macrophage responsiveness.* J Trauma. , 2002: p. 8.
69. Kido T, T.E., Bai N, Suda K, Yang HH, Li Y, Chiang G, Yatera K, Mukae H, Sin DD, Van Eeden SF., *Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation.* Am J Respir Cell Mol Biol., 2011: p. 8.
70. Pacheco KA, T.M., Sterritt C, Negri J, Rosenwasser LJ, Borish L, *The influence of diesel exhaust particles on mononuclear phagocytic cell-derived cytokines: IL-10, TGF-beta and IL-1 beta.* Clin Exp Immunol.Thorax., 2001. **126**(3): p. 9.
71. Anita Solhaug, M.R., Marit Lag, Per E.Schawarze, Trine Husoy and Jorn A.Holme, *Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cella.* Carcinogenesis, 2004. **25**: p. 11.
72. van Grevenynghe J, R.S., Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, Fardel O. , *Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages.* J Immunol., 2003: p. 8.
73. Perez-Padilla, R., A. Schilman, and H. Riojas-Rodriguez, *Respiratory health effects of indoor air pollution.* The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2010. **14**(9): p. 1079-86.
74. Bruce, N., R. Perez-Padilla, and R. Albalak, *Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge.* Bulletin of the World Health Organization, 2000. **78**(9): p. 1078-92.
75. Torres-Duque, C., et al., *Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence.* Proceedings of the American Thoracic Society, 2008. **5**(5): p. 577-90.
76. Bauernfeind, F., et al., *Inflammasomes: current understanding and open questions.* Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(5): p. 765-83.
77. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages.* Critical reviews in eukaryotic gene expression, 2010. **20**(2): p. 87-103.
78. Klingler K, T.-W.K., Brändli O, Aston C, Kim R, Chi C, Rom WN., *Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes.* Infect Immun. , 1997. **65**(12): p. 7.
79. Sly LM, H.-W.S., Reiner NE, McMaster WR., *Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1.* J Immunol., 2003. **170**(1): p. 8.
80. Vande Walle, L. and M. Lamkanfi, *Inflammasomes: caspase-1-activating platforms with critical roles in host defense.* Frontiers in microbiology, 2011. **2**: p. 3.
81. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals.* Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
82. Franchi, L., et al., *Inflammasomes as microbial sensors.* European journal of immunology, 2010. **40**(3): p. 611-5.
83. Lee, J., et al., *Mycobacterium tuberculosis induces an atypical cell death mode to escape from infected macrophages.* PloS one, 2011. **6**(3): p. e18367.
84. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells.* Infection and immunity, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
85. Burg, N.P., MH. , *The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity.* Clin immunol., 2001. **99**.

86. Berenson CS, G.M., Grove LJ, Maloney J, Sethi S., *Impaired phagocytosis of nontypeable Haemophilus influenzae by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease.* J Infect Dis., 2006. **194**(10).
87. Taylor AE, F.-H.T., Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, Barnes PJ, Donnelly LE., *Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD.* Eur Respir J., 2010. **35**(5): p. 8.
88. Dagher Z, G.G., Billet S, Verdin A, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Shirali P., *Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture.* J Appl Toxicol., 2007. **27**(3).
89. Bafica A, S.C., Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. and Source, *TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis.* J Exp Med., 2005. **202**(12).
90. Chow JC, Y.D., Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction.* J Biol Chem., 1999. **274**(16): p. 4.
91. Liguori MJ, L.C., Liu H, Ciurlionis R, Ditewig AC, Doktor S, Andracki ME, Gagne GD, Waring JF, Marsh KC, Gopalakrishnan M, Blomme EA, Yang Y. , *AhR activation underlies the CYP1A autoinduction by A-998679 in rats.* Front Genet., 2012. **3**(213).
92. Khoa Nguyen Do, L.N.F., Thomas Elbenhardt Jensen, Laurent Gautier, Alexandr Parlesak., *TLR2 controls intestinal carcinogen detoxication by CYP1A1.* PLoS One, 2012. **7**(3).
93. Drennan MB, N.D., Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Frémond C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B., *Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection.* Am J Pathol. , 2004. **164**(1): p. 9.
94. CA., D., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family.* Annu Rev Immunol., 2009. **27**.
95. Lee J, R.H., Jeong MH, Kornfeld H., *Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of Mycobacterium tuberculosis is mediated by a novel caspase-independent pathway.* J Immunol., 2006. **176**(7): p. 8.
96. Linehan SA, M.-P.L., Gordon S, *Macrophage lectins in host defence.* Microbes Infect. , 2000. **2**(3): p. 10.
97. Schlesinger LS, K.T., Iyer S, Hull SR, Marchiando LK., *Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis by human macrophages.* J Immunol., 1996. **157**(10): p. 8.
98. Schlesinger LS, H.S., Kaufman TM., *Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages.* J Immunol.1994. **152**(8): p. 10.
99. Sthal PD, E.R., *The mannose receptor is a patternrecognition receptor involved in host defense.* 1998;10:50-55. Curr Opin.Immunol 1998. **10**: p. 5.
100. Mitchell DA, F.A., Drickamer K., *A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands.* J Biol Chem. , 2001. **276**(31): p. 6.
101. Geijtenbeek TB, V.V.S., Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y., *Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function.* J Exp Med., 2003. **197**(1): p. 10.
102. Liu Z, Y.X., Peng Z, Zhang H, Gao S, Zeng Y, Yu M, Zhu C., *[Mycoplasma pneumoniae capsular polysaccharides bind to DC-SIGN and promote the secretion of IL-10].* Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2013. **29**(1): p. 3.

103. Tailleux L, P.-T.N., Bergeron-Lafaurie A, Herrmann JL, Charles P, Schwartz O, Scheinmann P, Lagrange PH, de Blic J, Tazi A, Gicquel B, Neyrolles O., *DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis*. PLoS Med. , 2005. **2**(12).
104. Tan TY, C.J., *Denge virus infected human monocytes trigger late activation of caspase 1, which mediates proinflammatory IL-1B secretion and pyroptosis*. J Gen Virol, 2013: p. 5.
105. Butter RL, B.P., Jang J, Jang MS, Robertson BD., *The balance of apoptotic and necrotic cell death in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages is not dependent on bacterial virulence*. PLoS One, 2012.
106. Miro O, Josep R.A, Diana J, Jordi C, Álvaro U.M, Francesc C., *Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain function and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes*. Carcinogénesis., 1999.20p 1331-6