



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**PARTICIPACIÓN DE TGF- $\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN  
EPITELIO MESÉNQUIMA EN CÉLULAS DE PULMÓN EXPUESTAS A AEROPARTÍCULAS  
CONTAMINANTES (PM<sub>10</sub>) DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**GARCÍA GARCÍA CARLOS ABRAHAM**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**

**FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**DR. FELIPE VACA PANIAGUA**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018**



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GARCÍA GARCÍA CARLOS ABRAHAM** con número de cuenta **406082668**, con la tesis titulada "**PARTICIPACIÓN DE TGF- $\beta$  EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN CÉLULAS EXPUESTAS A AEROPARTÍCULAS CONTAMINANTES (PM 10) DE LA CIUDAD DE MÉXICO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ**:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ  
Secretario: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ  
Suplente: DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA  
Suplente: DR. FELIPE VACA PANIAGUA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 15 de enero de 2018

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca con número de registro 705524. Así como el financiamiento bajo el proyecto SEP-CONACyT 2015-255150.

Agradezco especialmente a mi tutora la Dra. Yesennia Sánchez Pérez por la oportunidad de realizar el posgrado bajo su tutela y por la ayuda brindada así como a los miembros de mi comité la Dra. Yolanda Chirino y el Dr. Felipe Vaca.

## **Agradecimientos personales**

Al Instituto Nacional de Cancerología específicamente a la Dirección de Investigación Básica por darme la oportunidad de realizar mi maestría y por el apoyo que da a los estudiantes.

Al Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer (C-MIC) por el apoyo para estancias y congresos.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el apoyo para asistir a congresos internacionales.

A los miembros del Jurado Dra. Maria Eugenia Gonsebatt, Dra. Elizabeth Ortiz y Dra. Patricia Segura por aceptar formar parte de mi jurado.

A mis compañeras Yanueh y Marel gracias a su amistad y su ayuda la vida es más fácil, las quiero.

A mis compañeros del laboratorio Dra. Claudia, Dr. Miguel, Dra. Mariel, Ana, MSc Raúl, Biol. Rocio, Dra. Imelda, Dra. Natalia, Abner y Pablo.

A mis padres por el apoyo que me dan día con día.

A mis amigos Ernesto, Anwart, Guadalupe y Karlita, los quiero.

## Índice

Índice de figuras .....	i
Lista de abreviaturas .....	ii
Resumen .....	1
Abstract.....	3
Introducción .....	5
Contaminación atmosférica .....	5
El material particulado (PM).....	7
La Transición Epitelio Mesénquima (TEM) .....	12
El Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ .....	14
La vía de señalización de TGF- $\beta 1$ en la TEM.....	15
Antecedentes.....	16
Contaminantes del aire en la inducción de TEM.....	16
Justificación .....	18
Hipótesis.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares .....	19
Metodología .....	20
Muestreo de PM <sub>10</sub> .....	20
Cultivo celular .....	20
Co-cultivos .....	20
Exposición a PM <sub>10</sub> .....	22
Transfecciones con siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta 1$ .....	22
Extracción de RNA .....	23
Síntesis de cDNA.....	24
q-PCR del mRNA de TGF- $\beta 1$ .....	24
Niveles de proteínas asociadas a TEM .....	25
Activación de fibroblastos a través de $\alpha$ -SMA (inmunofluorescencias).....	26
Captura de imágenes de inmunofluorescencias de $\alpha$ -SMA en fibroblastos.....	27
Evaluación de la forma activa de TGF- $\beta 1$ (ELISA) .....	27
Activación de MMP-2 y 9 (zimograma) .....	28
Análisis estadístico .....	28
Resultados.....	29
La PM <sub>10</sub> inducen el mRNA de TGF- $\beta 1$ en fibroblastos expuestos a PM <sub>10</sub> .....	29

Las PM <sub>10</sub> inducen la forma activa de TGF-β1 .....	29
Las PM <sub>10</sub> inducen la activación de fibroblastos a través de α-SMA .....	30
Las PM <sub>10</sub> inducen la fosforilación deSmad2/3 .....	32
Las PM <sub>10</sub> inducen marcadores de TEM .....	33
Activación de la MMP-2 y MMP-9 .....	35
Discusión de resultados.....	37
Conclusiones .....	39
Perspectivas .....	40
Literatura citada .....	41
Anexos.....	44
Anexo 1. Los tipos de transición epitelio mesénquima .....	44
Anexo 2. Clasificación de carcinogénicos por la IARC .....	47
Anexo 3. Gel de integridad de RNA extraído de fibroblastos expuestos a PM <sub>10</sub>	47

## Índice de figuras

Figura 1. Clasificación del material particulado

Figura 2. Marcadores de TEM

Figura 3. Vía de TGF- $\beta$ 1

Figura 4. Transwell y co-cultivo

Figura 5. Expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>

Figura 6. Inducción de TGF- $\beta$ 1 activo en co-cultivos expuestos a PM<sub>10</sub> por 48 horas

Figura 7. Niveles de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>

Figura 8. Niveles de fosforilación de Smad2/3 en células epiteliales

Figura 9. Niveles de E-caderina en células epiteliales

Figura 10. Niveles de Vimentina en células epiteliales

Figura 11. Niveles de  $\alpha$ -SMA en células epiteliales

Figura 12. Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de la MMP-2

Figura 13. Imagen representativa de gel de integridad de RNA



## Lista de abreviaturas

Al	Aluminio
Ca	Calcio
Cl	Cloro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
Cu	Cobre
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
Fe	Hierro
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency research Cancer)
K	Potasio
MMP-2	Metaloproteinasa de Matriz 2
MMP-9	Metaloproteinasa de Matriz 9
MMPs	Metaloproteinasa de Matriz (Matrix metalloproteinases)
Mn	Manganeso
mRNA	RNA mensajero
Ni	Níquel
NO <sub>2</sub>	Bióxidos de nitrógeno
O <sub>3</sub>	Ozono
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fosforo
Pb	Plomo
PM	Material Particulado (Particulate matter)
PM <sub>10</sub>	Material particulado con diámetro ≤ 10 µm
PM <sub>2.5</sub>	Material particulado con diámetro ≤ 2.5 µm
p-Smad2/3	Smad2/3 fosforilada
PST	Partículas Suspendidas Totales
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleotic acid)
ROCK	Rho cinasa (Rho Kinase)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
S	Azufre
Si	Silicio
SIMAT	Sistema de Monitoreo Atmosférico
siRNA	Pequeño RNA de interferencia (Small Interference Ribonucleotic acid)
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
TEM	Transición epitelio mesénquima
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Ti	Titanio
UF	Partículas ultra finas (Ultra fine)
Zn	Zinc
α-SMA	Actina de músculo liso alfa (Smooth Muscle Actin Alpha)
µg/cm <sup>2</sup>	Microgramo por centímetro cuadrado
µm	Micrómetros

## Resumen

**Introducción:** Las PM<sub>10</sub> (partículas contaminantes del aire con un diámetro aerodinámico de  $\leq 10$  micrómetros) son una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos y material biológico, y son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón, además han sido clasificadas como carcinógeno para los humanos por la OMS (Organización Mundial de la Salud). En estudios previos, demostramos que las PM<sub>10</sub> inducen la formación de fibras de estrés de actina por la vía de la proteína cinasa asociada a Rho (ROCK), además las partículas favorecen la activación de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9, y éstos eventos están asociados a migración e invasión celular, por otro lado estos procesos pueden llevar a transformación celular asociada a cáncer a través de un programa celular conocido como transición epitelio mesénquima (TEM). La TEM asociada a cáncer surge como resultado de alteraciones en las células epiteliales que incluye cambios en los niveles de proteínas asociadas a células epiteliales y un incremento en proteínas asociadas a células mesenquimales como son la disminución en los niveles de E-caderina e incremento en los niveles de Vimentina y actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA), y estos cambios son regulados por la fosforilación de Smad2/3 (p-Smad2/3) como una respuesta a la inducción de TGF- $\beta$ 1. Los fibroblastos son secretores importantes de TGF- $\beta$  por lo que el **objetivo** de este trabajo fue determinar marcadores de transición de epitelio mesénquima como la pérdida de E-caderina y el incremento en los niveles de p-Smad2/3 Vimentina y actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) a través de TGF- $\beta$ 1 en células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>. **Métodos:** Los fibroblastos no inmortalizados y no transformados de pulmón humano (LL47) y células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) fueron co-cultivados en un sistema de transwell, donde los fibroblastos fueron expuestos a PM<sub>10</sub> (10 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) por 24h y 48h y los marcadores de TEM fueron evaluados en las células A549. El mRNA de TGF- $\beta$ 1 se determinó por q-PCR y la forma activa de TGF- $\beta$ 1 se midió por ELISA, se evaluó la activación de fibroblastos a través de  $\alpha$ -SMA por inmunofluorescencia. Los marcadores de TEM tales como E-caderina, p-Smad2/3, Vimentina y  $\alpha$ -SMA se midieron mediante Western blot. La actividad de

MMP-2 y MMP-9 se evaluó mediante un zimograma. Para observar si las PM<sub>10</sub> inducen la expresión marcadores de TEM a través de TGF-β1, se inhibió la expresión del mRNA de TGF-β1 mediante un siRNA. **Resultados:** se observó un incremento significativo ( $p < 0.005$  vs NT) con respecto a células sin exponer (NT) en la expresión del mRNA de TGF-β1 en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub> por 24h y 48h, así como la actividad de su proteína ( $p < 0.05$  vs NT). La activación de los fibroblastos se determinó mediante el incremento de los niveles de α-SMA, los cuales fueron significativos a las 48 h ( $p < 0.05$  vs NT). En las células epiteliales se observó que hay un incremento en los niveles de fosforilación de Smad2/3 a las 24 horas ( $p < 0.05$  vs NT), mientras que los niveles de E-caderina disminuyeron a 24 y 48h ( $p < 0.05$  vs NT). Por otro lado, los niveles de marcadores de TEM (Vimentina y α-SMA) aumentaron a las 48h ( $p < 0.05$  vs NT). Además, se observó actividad de MMP-2 a las 24 y 48h ( $p < 0.05$  vs NT). Cuando se silenció el mRNA de TGF-β1, se previnieron los efectos observados con PM menos metaloproteinasas MMP-2. **Conclusiones:** Las PM<sub>10</sub> inducen expresión de marcadores de TEM a través de la vía de TGF-β1.

## Abstract

**Background:** PM<sub>10</sub> (atmospheric particulate pollutants with an aerodynamic diameter of  $\leq 10$  micrometers) is a complex mixture which includes organic and inorganic materials, as well as biological components, and has been recently listed as a carcinogen for humans by World Health Organization. In previous studies we have demonstrated how PM<sub>10</sub> induces changes on the actin cytoskeleton (involving the ROCK pathway) as well as the activation of MMP-2 and MMP-9, two associated proteins promoting cell migration and invasion in cancer. These events can lead the epithelial mesenchymal transition (EMT). EMT arises as a result of alterations in epithelial cells, causing loss of cell adhesion and polarity. These alterations include a decrease of E-cadherin levels and an increase of Vimentin and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) levels, usually as a response of TGF- $\beta$ 1 induction and phosphorylation of Smad2/3 (p-Smad2/3). TGF- $\beta$ 1 pathway is associated with cell migration and invasion in different tumors through EMT. **The aim** of this study was to determine the status of EMT markers, such as loss of E-cadherin, as well as increase of p-Smad2/3, vimentin and  $\alpha$ -SMA through TGF- $\beta$ 1 in epithelial cells, using a co-culture model with fibroblasts exposed to PM<sub>10</sub>. **Materials and methods:** Normal lung fibroblasts (LL47) and lung epithelial cells (A549) were co-cultured in trans-well and only fibroblasts were exposed to PM<sub>10</sub> (10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) for 24 h and 48 h. TGF- $\beta$ 1 mRNA was measured by q-PCR and activation of TGF- $\beta$ 1 was measured by ELISA. We also evaluated fibroblast activation measuring levels of  $\alpha$ -SMA by immunofluorescence. EMT markers such as E-cadherin, p-Smad2/3, Vimentin and  $\alpha$ -SMA were measured by Western blot. Activity of MMP-2 and MMP-9 was evaluated by zymograms. In order to evaluate if PM<sub>10</sub> induces expression of EMT markers through TGF- $\beta$ 1, a siRNA was used against the TGF- $\beta$ 1 mRNA. **Results:** TGF- $\beta$ 1 mRNA expression was observed in fibroblasts exposed to PM<sub>10</sub> for 24 h and 48 h, as well as an increase in  $\alpha$ -SMA levels suggesting the activation of fibroblasts. We also observed activation of TGF- $\beta$ 1 at 48 h. On the other hand, E-cadherin decreased at 24 h and 48 h in epithelial cells in co-culture. Also, levels of EMT markers such as p-Smad2/3 increased at 24h meanwhile vimentin and  $\alpha$ -SMA increased at 48 hrs. Finally, activity of MMP-2 was observed at 24 h and 48 h. When

TGF- $\beta$ 1 mRNA was silenced, the effects observed with PMs were prevented.

**Conclusion:** PM<sub>10</sub> induces the expression of EMT markers via TGF- $\beta$ 1.

## **Introducción**

### **Contaminación atmosférica**

El aire es una mezcla heterogénea de diferentes gases de los cuales el 78.08% es nitrógeno (N<sub>2</sub>), 20.98% oxígeno (O<sub>2</sub>), 0.035% dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y 0.93% gases insertes. La contaminación del aire, se da mediante la introducción de gases o partículas contaminantes en proporciones tales que se altera su composición natural. El origen de los contaminantes es consecuencia de emisiones derivadas de fenómenos naturales como las erupciones volcánicas, erosión del suelo e incendios forestales. Otra de las fuentes de emisión es la derivada de actividades antropogénicas, las cuales son emitidas por las industrias, el transporte y la quema de combustibles fósiles. La contaminación generada por estas actividades se produce de dos formas: como contaminantes primarios emitidos directamente al ambiente, por ejemplo, los escapes de vehículos automotores y por chimeneas de fábricas; así como por contaminantes secundarios los cuales son formados a partir de los contaminantes primarios en la atmósfera en co-presencia de la luz solar, humedad o ambas (Trasande & Thurston 2005).

Para evaluar la calidad del aire se han identificado seis contaminantes, que reciben este nombre debido a que se ha demostrado que dichos contaminantes tienen efectos adversos en la salud de las personas. Además, dichos contaminantes también se han establecido como parámetro para evaluar la calidad del aire. Los contaminantes criterio son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), dióxidos de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), ozono (O<sub>3</sub>), plomo (Pb) y el material particulado (PM<sub>10</sub> y PM<sub>2.5</sub>), y sus efectos en la salud del ser humano se resume en la tabla 1.

Si bien, no hay un umbral en el cual la contaminación del aire no afecte la salud de las personas, si se han establecido lineamientos con el fin de regular las concentraciones permisibles de estos contaminantes en el aire. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido recomendaciones en cuanto a las concentraciones de dichos contaminantes, estos lineamientos varían de acuerdo a las leyes de cada país y en la tabla 2 se muestra las concentraciones recomendadas

por OMS y las que se rigen para México según las normas oficiales mexicanas (NOM).

Tabla 1. Efectos de los contaminantes criterio sobre la salud.

Contaminante	Efectos en la salud
Monóxido de carbono (CO)	En altas concentraciones el monóxido de carbono puede ser fatal. La intoxicación por este contaminante es uno de los tipos más comunes de envenenamiento, puede inhabilitar el transporte de oxígeno hacia las células y provocar mareos, dolor de cabeza, náuseas, estados de inconsciencia e inclusive la muerte.
Dióxidos de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	De todos los óxidos de nitrógeno que se encuentran en la atmósfera, solo el dióxido de nitrógeno (NO <sub>2</sub> ) tiene un efecto negativo en la salud. La exposición a altas concentraciones puede ocasionar daño en la membrana celular del tejido pulmonar y a bajas concentraciones puede ocasionar irritación en las vías respiratorias o agravar los síntomas de enfermedades respiratorias como bronquitis y pulmonía.
Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	El dióxido de azufre es un gas irritante y tóxico; los efectos en la salud van desde irritación en las vías respiratorias hasta la agudización de síntomas de enfermedades respiratorias o cardiovasculares existentes.
Ozono (O <sub>3</sub> )	Irrita las vías respiratorias. En altas concentraciones reduce la función pulmonar, agrava el asma, inflama las células que recubren los pulmones, además de agravar las enfermedades pulmonares crónicas.
Plomo (Pb)	El plomo es una potente neurotoxina que se acumula gradualmente en algunos tejidos del cuerpo humano, su exposición puede generar diversos daños en riñones, sistema hepático, sistema gastrointestinal y sistema óseo. Los niños son particularmente vulnerables al plomo, ya que puede dañar su desarrollo neurológico. El daño dependerá de la dosis, tiempo de exposición y estado de salud en que encuentra la persona expuesta.
Partículas suspendidas (PM <sub>10</sub> y PM <sub>2.5</sub> )	Las partículas suspendidas representan el principal problema de salud pública, ya que sus efectos dependen de la concentración, composición química y tamaño. El riesgo es mayor a medida que se reduce el tamaño de la partícula, y el incremento en la concentración está relacionado con enfermedades respiratorias, cardiovasculares y un incremento en el riesgo de mortalidad.

Datos obtenidos del SIMAT, 2017.

En México se siguen las NOM para establecer los límites permisibles de los contaminantes criterio del aire, sin embargo, las concentraciones de estos contaminantes según las NOM aún están por arriba de los recomendados por la

OMS (Tabla 2). En la ciudad de México, según datos del Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) las normas para ozono (0.070 ppm) y material particulado PM<sub>10</sub> (40 µg/m<sup>3</sup>) y PM<sub>2.5</sub> (12 µg/m<sup>3</sup>) no cumplen con ésta norma, ya que anualmente se rebasan los niveles permisibles.

Tabla 2. Concentraciones de contaminantes criterio según la OMS y la CDMX.

<b>Contaminante</b>	<b>OMS</b>	<b>CDMX</b>
Monóxido de carbono (CO)	No disponible	11.0 ppm, máximo anual como promedio móvil de 8 horas
Dióxidos de nitrógeno (NO <sub>2</sub> )	40 µg/m <sup>3</sup> de media anual 200 µg/m <sup>3</sup> de media en 1h	0.210 ppm, promedio horario
Dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> )	20 µg/m <sup>3</sup> media en 24h 500 µg/m <sup>3</sup> de media en 10 min.	0.110 ppm, máximo promedio de 24h 0.200 ppm, segundo máximo anual como promedio móvil de 8 horas 0.025 ppm, promedio anual
Ozono (O <sub>3</sub> )	100 µg/m <sup>3</sup> de media en 8h	0.095 ppm, promedio horario 0.070 ppm, máximo anual del promedio móvil de 8 horas
Plomo (Pb)	No disponible	1.5 µg/m <sup>3</sup> , en un periodo de tres meses como promedio aritmético
Partículas suspendidas (PM <sub>10</sub> )	20 µg/m <sup>3</sup> de media anual 50 µg/m <sup>3</sup> de media en 24h	75 µg/m <sup>3</sup> , promedio 24 horas 40 µg/m <sup>3</sup> , promedio anual
Partículas suspendidas (PM <sub>2.5</sub> )	10 µg/m <sup>3</sup> de media anual 25 µg/m <sup>3</sup> de media en 24h	45 µg/m <sup>3</sup> , promedio 24 horas 12 µg/m <sup>3</sup> , promedio anual

Datos obtenidos de la OMS y del SIMAT.

### **El material particulado (PM)**

Debido a los efectos en la salud del ser humano, y como factor de riesgo en el desarrollo de diferentes enfermedades, incluyendo cáncer de pulmón, es de nuestro



interés el material particulado y conocer los mecanismos mediante los cuales las PM inducen estos efectos. Las aeropartículas contaminantes del aire (PMs) son una mezcla compleja de diferentes contaminantes ambientales que tienen variaciones en su composición según la localidad, época y estación del año por ende la composición de las partículas varía dependiendo del lugar de su fuente, por ejemplo, derivado de actividades antropogénicas como la combustión producida por el tránsito vehicular o geográficas como la erosión del suelo (Englert 2004, Pope & Dockery 2006).

Las partículas se han clasificado por tamaño de partícula con base a su diámetro aerodinámico (Englert 2004). Las partículas suspendidas totales (PST) es el término más comprensivo que incluye a las partículas de cualquier tamaño suspendidas en el aire. (Englert 2004). Las  $PM_{10}$  y las  $PM_{2.5}$  tienen un diámetro igual o menor a 10 micrómetros y 2.5 micrómetros respectivamente. Las partículas ultra finas (UF) son aquellas con un diámetro menor a  $0.1 \mu m$ . Las  $PM_{2.5}$  también reciben el nombre de partículas finas y la fracción que va desde los 2.5 hasta los  $10 \mu m$  se le llama “partículas gruesas”. Las fracciones de partículas más grandes comprenden a las de menor tamaño, así por ejemplo, las UF forman parte de la fracción  $PM_{2.5}$  y estas a su vez forman parte de la fracción  $PM_{10}$  y estas a su vez forman parte de las PST (Fig. 1). Sin embargo, las partículas más grandes de  $30-70 \mu m$  solo permanecen suspendidas por un corto período de tiempo antes de su deposición (Englert 2004).

A la fracción del material particulado  $\leq PM_{10}$  se le conoce también como fracción inhalable debido a que pueden penetrar a diferentes regiones de las vías respiratorias profundas y ejercer algún efecto en la salud (Li et al 2003).

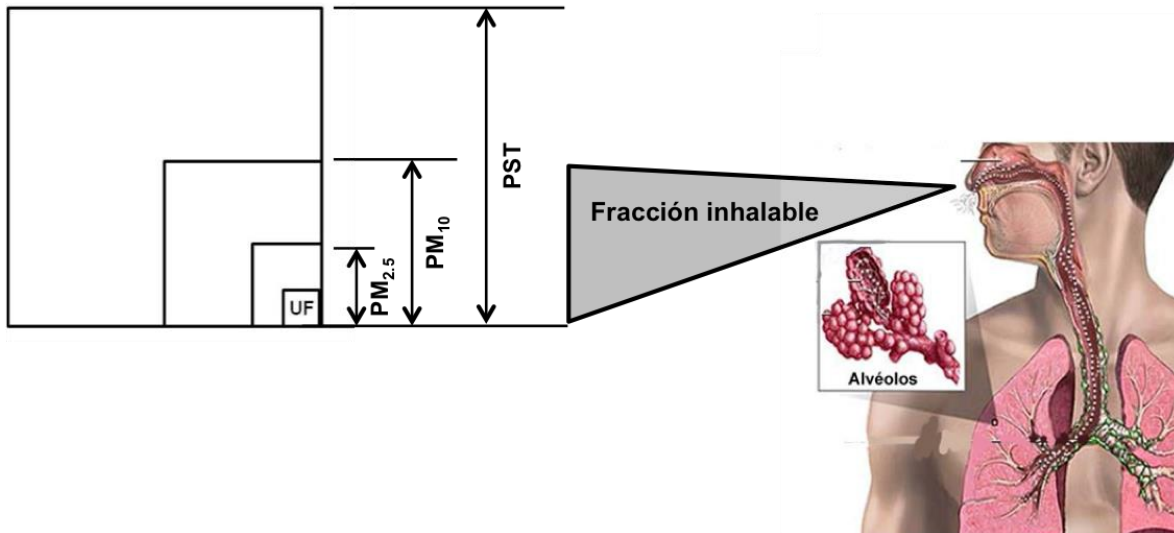


Figura 1. Clasificación del material particulado. El material particulado se clasifica por su diámetro aerodinámico en PST,  $PM_{10}$ ,  $PM_{2.5}$  y UF. Del 100% de las PST, aproximadamente el 40 % son  $PM_{10}$ , el 16% son  $PM_{2.5}$ . La fracción  $PM_{10}$  puede contener a las fracciones más pequeñas así, las partículas UF forman parte de fracción  $PM_{2.5}$  y estas a su vez forman parte de la fracción  $PM_{10}$ . A la fracción  $PM_{10}$  se le llama fracción inhalable debido a que son capaces de llegar a las vías respiratorias profundas. Datos obtenidos del SIMAT 2007.

Las  $PM_{10}$  son una mezcla compleja de componentes orgánicos, inorgánicos y de material biológico. La fracción orgánica comprende a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); la fracción inorgánica son iones metálicos; y el material biológico principalmente son endotoxinas derivadas de bacterias (Chirino et al 2015). En la tabla 2 se enlistan los componentes de las  $PM_{10}$ .

Uno de los estudios hechos en la Ciudad de México ha demostrado que el material particulado  $PM_{2.5}$  aumentan la tasa de mortalidad a consecuencia de enfermedades cardiovasculares y pulmonares y el efecto se observó después de cortos periodos de exposición debido a que cuando aumentan los niveles de PMs en un corto periodo de tiempo, aumentan los ingresos hospitalarios 3 a 5 días después de los altos niveles de concentración de  $PM_{2.5}$ , a consecuencia de estos episodios, se produce exacerbación de enfermedades cardiorrespiratorias, principalmente en sectores vulnerables de la población como adultos mayores (<65 años) que pueden llegar hasta muerte (Borja-Aburto et al 1998)

Tabla 2. Composición de las PM<sub>10</sub> de la ciudad de México

Fracción orgánica	Fracción inorgánica	Componentes biológicos
Naftaleno	Al	Polen Bacterias Endotoxinas derivadas de bacterias
Acenaftileno	Si	
Acenafteno	P	
Fluoreno	S	
Fenantreno	Cl	
Antraceno	K	
Fluoranteno	Ca	
Pireno	Ti	
Benzo(a)antraceno	Cr	
Criseno	Mn	
Benzo(b)fluoranteno	Fe	
Benzo(k)fluoranteno	Ni	
Benzo(a)pireno	Cu	
Dibenzo(a,h)antraceno	Zn	
Benzo(g,h,i)pireleno	Pb	
Indeno		

Composición de la PM<sub>10</sub> de la ciudad de México (Salcido-Neyoy et al 2015).

Por otro lado, estudios hechos por Pope y colaboradores en el 2002, realizados, en una cohorte seguida durante 16 años, demostraron que un incremento de 10 µg/m<sup>3</sup> de PM<sub>2.5</sub> aumenta en un 8% el riesgo de morir por cáncer de pulmón (Pope et al 2002). Recientemente (Chen et al 2016), demostró que las PM<sub>10</sub> también son capaces de aumentar el riesgo de mortalidad por cáncer de pulmón entre 4-6% cuando los niveles de PM<sub>10</sub> aumentan 10 µg/m<sup>3</sup>. En este sentido, en el 2013, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) declaró a la contaminación extramuros incluyendo a las PM<sub>10</sub> como carcinogénico para los humanos (grupo 1) tabla 3 (Anexo) y como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón y vejiga (Loomis et al 2013).

Para entender, los mecanismos moleculares mediante los cuales las PM<sub>10</sub> inducen daños en la salud de las personas y su papel como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer, se han realizado diversos estudios toxicológicos y de forma general se ha podido determinar que las  $\leq$  PM<sub>10</sub> inducen efectos citotóxicos, genotóxicos y pro-inflamatorios sobre las células. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo y de otros grupos han determinado que la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> en cultivo celular es suficiente para inducir los efectos toxicológicos, sin embargo, a esta dosis las PM<sub>10</sub> no inducen muerte celular (Alfaro-Moreno et al 2002).

Las PM inducen la liberación de citocinas como TNF-alfa, PGE<sub>2</sub> y la IL-6 (Alfaro-Moreno et al 2002, Alfaro-Moreno et al 2009). Otros estudios realizados con PM<sub>10</sub> han demostrado que las partículas inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Guan et al 2016). Por otro lado, se ha observado que los HAPs presentes en las PM<sub>10</sub> pueden inducir daño al DNA mediante la formación de aductos de HAPs (Calderón-Segura et al 2004, Salcido-Neyoy et al 2015, Sevastyanova et al 2007). Además de los aductos en el DNA, las PM<sub>10</sub> también inducen daño al DNA mediante la ruptura de la doble cadena (Sánchez-Pérez et al 2009), formación de micronúcleos (Roubicek et al 2007). Todos estos efectos inducidos por las partículas se han asociado con procesos que pueden conducir a transformación celular y carcinogénesis.

Por otro lado, nuestro grupo ha reportado que las PM<sub>10</sub> inducen un estado de tipo senescencia, la cual por una parte se asocia a cambios en el citoesqueleto y por otra parte a la generación de microambientes que pueden favorecer el crecimiento tumoral (Sánchez-Pérez et al 2009). Los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por las PM<sub>10</sub> se llevan a cabo a través de la vía de ROCK, la cual favorece la formación de fibras de estrés de actina, estas fibras se asocian a migración celular, un evento importante en cáncer (Chirino et al 2017). La formación de fibras de estrés de actina en células epiteliales están íntimamente relacionados con la activación de programas celulares como la transición epitelio mesénquima (TEM) (Thiery & Sleeman 2006).

## **La Transición Epitelio Mesénquima (TEM)**

Un programa celular que permite la pérdida de la polaridad de las células epiteliales con el fin de participar en diferentes procesos como invasión, migración, diferenciación y reparación de tejidos es la transición epitelio mesénquima (TEM). Estos cambios incluyen cambios en el citoesqueleto y genéticos que les confiere una mayor capacidad de migración, adquieren resistencia a la apoptosis y un elevado incremento en la producción de componentes de matriz extracelular (MEC) (Jolly et al 2017, Lamouille et al 2014, Larue & Bellacosa 2005). La finalización de la transición epitelio mesénquima es señalizada por degradación de la membrana basal y la formación de una célula tipo mesenquimal que puede migrar fuera de la capa epitelial en la que fue originada (Thiery & Sleeman 2006).

En la TEM se da una serie de eventos moleculares los cuales sirven como marcas del proceso de TEM en los cuales las células epiteliales pierden sus características y adquieren propiedades típicas de células mesenquimales que requiere cambios complejos en la arquitectura y el comportamiento celular. Los marcadores de TEM abarcan un espectro de cambios inter e intracelulares y no todos ellos siempre se ven durante el proceso de TEM, por lo cual la TEM no representa necesariamente un cambio en el linaje celular (Lamouille et al 2014, Thiery & Sleeman 2006).

La TEM es un proceso biológico, que para su estudio se ha dividido en tres tipos. El tipo 1 es el que se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario. Este evento, la TEM participa en la formación de las diferentes capas embrionarias. En el tipo 2, la función de la TEM es en la reparación de tejidos (cicatrización). El tipo 3 está asociado a procesos carcinogénicos. Si bien en el tipo 3, la TEM potencializa la migración celular e invasión de células ya transformadas, también se sabe que la adquisición de marcadores de TEM, es un evento temprano en la transformación de células que puede conducir a cáncer, ya que estas células son capaces de inducir un microambiente que puede favorecer la carcinogénesis (Jolly et al 2017, Kalluri & Weinberg 2009, Shiga et al 2015). Por lo que el enfoque de este trabajo está dirigido hacia la búsqueda de marcadores de TEM que se puedan asociar con el tipo 3 de TEM.

En muchos carcinomas las señales que inducen la TEM se da a través de tumores asociados al estroma y notablemente los factores de crecimiento que la inducen son EGF, PDGF, FGF y TGF- $\beta$  y lo hacen a través de la activación de efectores moleculares intracelulares como los miembros de la familia de Ras, Rho y Rac, ya que esos miembros orquestan el desensamble de los complejos de unión así como de cambios en la organización del citoesqueleto que ocurren durante la TEM (Thiery & Sleeman 2006). Esos cambios también derivan en la activación de factores de transcripción como Snail (Snail1) y Slug (Snail2) que regulan cambios en patrones de expresión de genes que intervienen en la TEM, por lo que el principal papel de Snail1 y Snail2 es la represión de los marcadores epiteliales como es la expresión de E-caderina (Brzozowa et al 2015).

Además de ser un marcador epitelial, E-caderina es una de las proteínas que se encargada de mantener las uniones celulares por medio de las uniones adherentes, por lo que la pérdida de E-caderina es considerada un marcador de TEM (Thiery & Sleeman 2006). Aunado a las pérdida de marcadores epiteliales como E-caderina, las células que se encuentran en el proceso de TEM comienzan adquirir la ganancia marcadores de TEM, que son proteínas de citoesqueleto como Vimentina y Actina de Músculo Liso alfa ( $\alpha$ -SMA) que son marcadores que se asocian a migración principalmente en el tipo 3 de TEM (Shirkoohi 2013). Después de haber perdido marcadores epiteliales y adquirido marcadores asociados a células tipo mesenquimales, se inician otros programas como la liberación de familias de enzimas remodeladoras de matriz extracelular (MMP) metaloproteinasas de matriz, las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 (gelatinasa A y B respectivamente) pueden degradar específicamente colágeno tipo IV que es el principal componente de la membrana basal, por lo cual la activación de la MMP-2 y MMP-9 aumenta la migración celular y este evento se asocia a cáncer (Shirkoohi 2013). Los pasos en la TEM se pueden resumir en la figura 2.

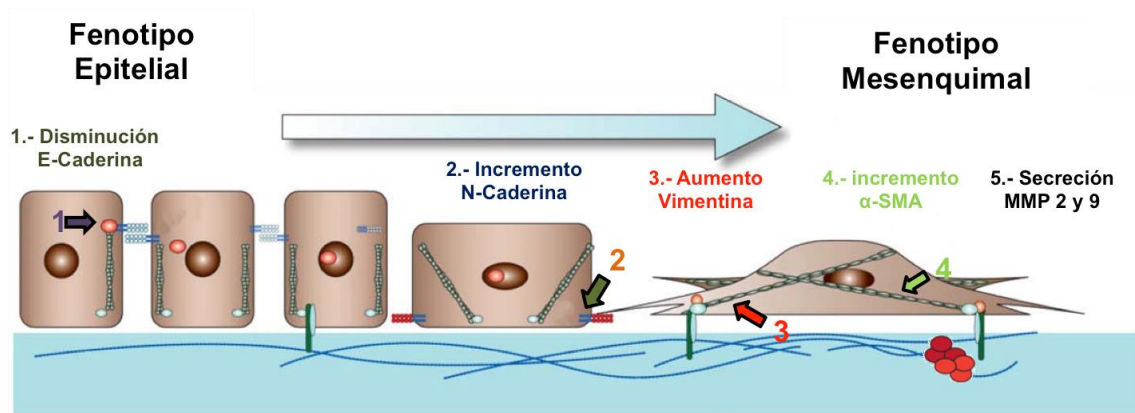


Figura 2. Marcadores de TEM. En la TEM la pérdida de marcadores epiteliales (E-caderina) es un evento importante, así como la ganancia de marcadores mesenquimales (N-caderina, Vimentina y  $\alpha$ -SMA) además de la secreción y activación de metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9).

### El Factor de Crecimiento Transformante $\beta$ 1

Se sabe que TGF- $\beta$  es un importante supresor de crecimiento de células epiteliales y por lo tanto de tumores primarios. Sin embargo, ahora se conoce que cuando se desregula es uno de los principales inductores de TEM. La súper familia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , es un grupo de factores polipeptídicos multifuncionales que controlan numerosos procesos celulares relacionados con estados tempranos del desarrollo hasta una gran variedad de funciones celulares normales y anormales (Wrana & Attisano 2000). El TGF- $\beta$ 1 es generalmente liberado en una forma latente (inactiva) unido a la proteína de unión a TGF- $\beta$  latente (LT $\beta$ P), la forma latente es almacenada en la matriz extracelular a través de la unión con el factor de latencia de TGF- $\beta$  (LTF).

La forma activa de TGF- $\beta$ 1 se da al separarse del complejo que lo mantiene en latencia. Después de la separación de LTF, TGF- $\beta$ 1 es convertido a su forma activa. Los efectos biológicos de los miembros de esta familia son inducidos a través de una familia de receptores transmembranales treonina/serina cinasa. Estos se han clasificado como receptor tipo I o receptor tipo II. La unión de TGF- $\beta$ 1 al receptor transmembranal de TGF- $\beta$  de tipo II y I, lleva al ensamble del complejo proteico con actividad Serina/Treonina cinasa. Cuando el ligando de TGF- $\beta$ 1 se une a su receptor en la membrana celular, induce la dimerización de su receptor, lo cual ocasiona una serie de fosforilaciones.

El inicio de la señalización sucede al unirse el ligando al receptor de tipo II para inducir la formación del complejo heterodimérico compuesto del receptor II y el receptor I. Entonces el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I sobre residuos de Serina y Treonina en el dominio yuxtamembrana GS altamente conservado. Una vez fosforilado, el receptor tipo I es activado para propagar la señal. La proteína blanco del receptor tipo I activo son los miembros de la familia de mediadores intracelulares Smad (Wrana & Attisano 2000).

### **La vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 en la TEM**

El receptor de TGF- $\beta$ 1 activo necesita de mediadores intracelulares para inducir la expresión de marcadores de TEM, los mediadores que llevan a cabo esta función son la familia de proteínas de Smad. La familia de Smad incluye tres grupos los cuales se han clasificado con base en su función. Las R-Smads (Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5 y Smad 8), las Co-Smads (Smad 4) y las I-Smads (Smad 6 y Smad 7). Las “R” se abrevian del inglés Reactive o reactivas; “Co” co-activated o co-activadoras y las “I” inhibitorias. Las R-Smads son sustratos de receptores tirosina/cinasa, la Smad 2 y Smad 3 son fosforiladas por TGF- $\beta$ 1. Una vez fosforiladas las Smad2/3 forman un complejo heterodimérico con Smad 4 la cual sirve como co-activadora (Wrana & Attisano 2000). Una vez formado este complejo es capaz de translocar al núcleo donde sirve como co-represor para la expresión de E-caderina o factor de transcripción de los genes de Vimentina y  $\alpha$ -SMA asociados a TEM (Massagué et al 2000, Wendt et al 2012).

Por otro lado, se lleva a cabo la represión de proteínas inhibitorias de las MMPs como son los inhibidores tisulares endógenos de metaloproteínasa (TIMPs) esto favorece la activación de las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 (Wendt et al., 2012).



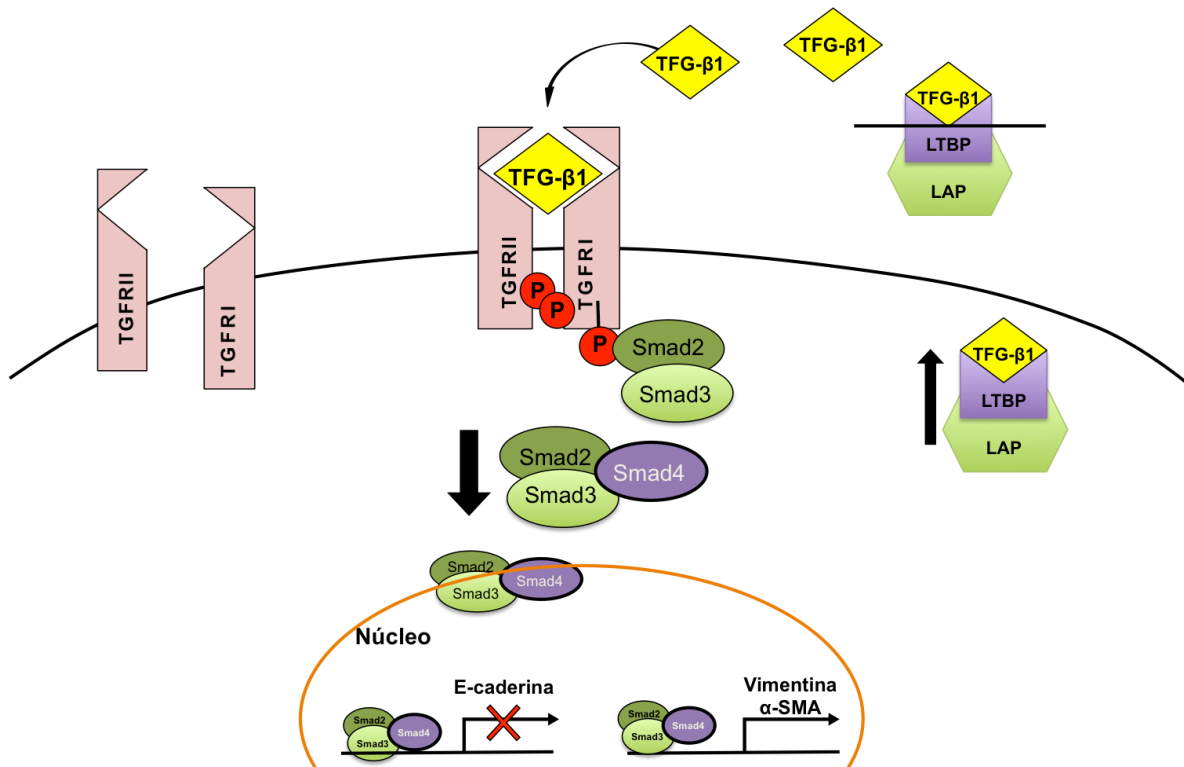


Figura 3. Vía de TGF-β1 en la TEM. El ligando de TGF-β1 es inactivado en el citoplasma mediante la unión a LTBP y LTF que inhiben su función biológica. Cuando TGF-β1 se libera de este complejo, entonces puede unirse a su receptor en la membrana celular para que mediante la fosforilación del complejo de Smad2/3 lo activan y migra hacia el núcleo de la célula donde cumple su función como co-represor o factor de transcripción para la expresión de marcadores de TEM.

## Antecedentes

### Contaminantes del aire en la inducción de TEM

Hay poca información acerca de si las PM<sub>10</sub> pueden inducir marcadores de TEM asociados a cáncer. El enfoque que han tenido los estudios realizados con partículas o los componentes de las partículas han sido en la participación de TGF-β1 en la inducción de fibrosis a través de la TEM (Thevenot et al., 2013; Iwanaga et al 2012). Se han usado modelos *In vitro* con células epiteliales de pulmón o *In vivo* tejido pulmonar de ratón y evaluaron si los componentes de las partículas inducen exacerbación del asma y fibrosis idiopática pulmonar (Thevenot et al., 2013; Iwanaga et al 2012). En estos estudios se han usado las fracciones PM<sub>2.5</sub> y/o extractos orgánicos de las partículas y se evaluó la inducción de marcadores de TEM asociados a fibrosis como Fibronectina y Vimentina. En un reporte realizado

con PM<sub>10</sub>, donde usan concentraciones desde 10, 50, 100, 250 y 500 µg/mL se observó que las PMs inducen un aumento en los niveles de la proteína de TGF-β1 y Fibronectina en células epiteliales con una concentración de 50 y 100 µg/mL (Kyung et al., 2012). En un trabajo realizado con humo de tabaco, observaron que la expresión de marcadores de TEM no necesariamente es inducida por la vía de TGF-β1, si no que es a través del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1-α) (Eurling, Reynaert et al 2014).

En resultados previos observamos que al exponer células epiteliales A549 a 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub>, las partículas no inducen cambios en la expresión del mRNA de TGF-β1, ni en la secreción y activación de la proteína de TGF-β1. Cuando evaluamos si las PM<sub>10</sub> inducen marcadores de TEM, no observamos cambios en los niveles de Vimentina y α-SMA. En otro resultado previo del laboratorio se evaluó si las PM<sub>10</sub> inducen HIF1-α y no se observaron cambios en los niveles de esta proteína.

Se sabe que en estroma pulmonar existen fibroblastos residentes los cuales tienen como función el mantenimiento del tejido. Cuando hay una lesión en el tejido, se induce la activación de los fibroblastos residentes (los fibroblastos activos expresan marcadores que se asocian a la activación como es la proteína α-SMA), sin embargo, los fibroblastos activos pueden favorecer el desarrollo de ciertas patologías (fibrosis pulmonar idiopática, EPOC) mediante la inducción de TEM, además se puede favorecer el crecimiento de células tumorales (Shiga et al 2015). Los fibroblastos en el estroma pulmonar es una fuente importante de TGF-β1, se ha descrito que el principal inductor de TEM es TGF-β1. Si bien, la TEM es un evento que participa en procesos normales en el mantenimiento de los tejidos, en cáncer es importante su participación en la progresión de la enfermedad.

## **Justificación**

Las PM<sub>10</sub> son consideradas un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón, sin embargo, los mecanismo mediante los cuales favorecen el cáncer no son claros, por otro lado, la expresión de marcadores de TEM es un evento temprano en la transformación de células que puede conducir a cáncer y estas células son capaces de inducir un microambiente que puede favorecer la carcinogénesis a través de TGF-β1. Los fibroblastos en el estroma pulmonar son secretores de TGF-β1, y este factor de crecimiento participa en el proceso de TEM en células epiteliales. Debido a que TGF-β1 es el principal inductor de la TEM, es importante evaluar si las PM<sub>10</sub> inducen la expresión de marcadores de TEM a través de TGF-β1 en células epiteliales en un modelo de co-cultivo entre fibroblastos y células epiteliales como un proceso celular asociado al desarrollo de cáncer.

## **Hipótesis**

Las PM<sub>10</sub> inducirán en fibroblastos la secreción de TGF-β1 y este favorecerá la expresión de marcadores de TEM en células epiteliales como aumento en los niveles de p-Smad2/3, Vimentina y actina de musculo liso α (α-SMA), además de inducir la disminución de los niveles de la proteína E-caderina (marcador epitelial).

## **Objetivo general**

Determinar marcadores de transición de epitelio mesénquima como la perdida de E-caderina y el incremento en los niveles de fosforilación de Smad2/3, Vimentina y actina de músculo liso (α-SMA) a través de TGF-β1 en células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>.

## Objetivos particulares

En un modelo de co-cultivo de células epiteliales de pulmón humano (A549) y fibroblastos de pulmón humano (LL47) expuestos a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 24 y 48 horas, se determinó si las  $\text{PM}_{10}$ :

- **En fibroblastos:**
  - Inducen la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1.
  - Se determinó si se induce la secreción de la forma activa de TGF- $\beta$ 1.
  - Si se induce la activación de fibroblastos a través de un aumento en los niveles de  $\alpha$ -SMA.
- **En células epiteliales:**
  - Si se induce la expresión de marcadores de TEM mediante la disminución de E-caderina como marcador epitelial y un aumento en los niveles de fosforilación de Smad2/3, aumento en los niveles de Vimentina y  $\alpha$ -SMA como marcadores asociados a TEM.
  - Se determinó si las  $\text{PM}_{10}$  inducen expresión de marcadores de TEM a través de TGF- $\beta$ 1.
- **En sobrenadantes de los co-cultivos:**
  - Si se induce la activación de las MMP-2 y la MMP-9.

## **Metodología**

### **Muestreo de PM<sub>10</sub>**

Las PM<sub>10</sub> fueron colectadas en una zona residencial al sur de la Ciudad de México, en esta zona la fuente más importante es el tránsito vehicular. Para la colecta de las PM<sub>10</sub> se usó un muestreador de grandes volúmenes con un flujo de 1.13 m<sup>3</sup>/min (GMW modelo 1200 VFC HVPM10; Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA). Las PM<sub>10</sub> fueron depositadas sobre un filtro de nitrocelulosa con poros de 3.0 µm (Sartorius AG, Goettingen, Germany), 3 días por semana durante el 2007. Los filtros se almacenaron en obscuridad, a 4°C en un desecador antes de remover las partículas. Las partículas fueron colectadas de los filtros raspando cuidadosamente la membrana con una hoja quirúrgica libre de endotoxinas y se depositaron en viales de vidrio libre de endotoxinas. Las partículas colectadas se mantuvieron en obscuridad y secas a 4 °C hasta su uso (Alfaro-Moreno et al. 2009).

### **Cultivo celular**

Para este trabajo se utilizaron células epiteliales A549 (ATCC CCL-185) derivadas de adenocarcinoma de pulmón humano, esta línea celular fue establecida desde 1972, y han mantenido muchas de las características morfológicas y metabólicas de células de epitelio de tipo II (Foster, Oster et al. 1998). Por otro lado, se emplearon fibroblastos de pulmón humano no transformados y no inmortalizados LL47 (ATCC CCL-135). Ambas líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo F12K (F12-Kaighn Num. Cat. 21127-022) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (gibco Num. Cat.16000-044) para las células A549 y con 15 % para los fibroblastos. Las células epiteliales así como los fibroblastos se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (NUAIRE, NU-4750). Una vez que las células alcanzaron una 80% de confluencia se emplearon para los experimentos. Todos los experimentos se hicieron de forma independiente y al menos por triplicado.

### **Co-cultivos**

Para la realización de co-cultivos se utilizaron placas con dos compartimentos (transwell). Las transwell son una herramienta de cultivo celular que permite cultivar

dos líneas celulares al mismo tiempo. Ésta placa cuenta con dos compartimentos independientes, uno es una placa común de 6 pozos (para este estudio) y el otro es un inserto que puede ser removido o reinsertado dentro de la placa de 6 pozos. La base del inserto tiene poros de 0.4  $\mu\text{m}$  para de esta manera permitir el flujo de sustancias hacia ambos compartimentos o cultivos (Figura 4).

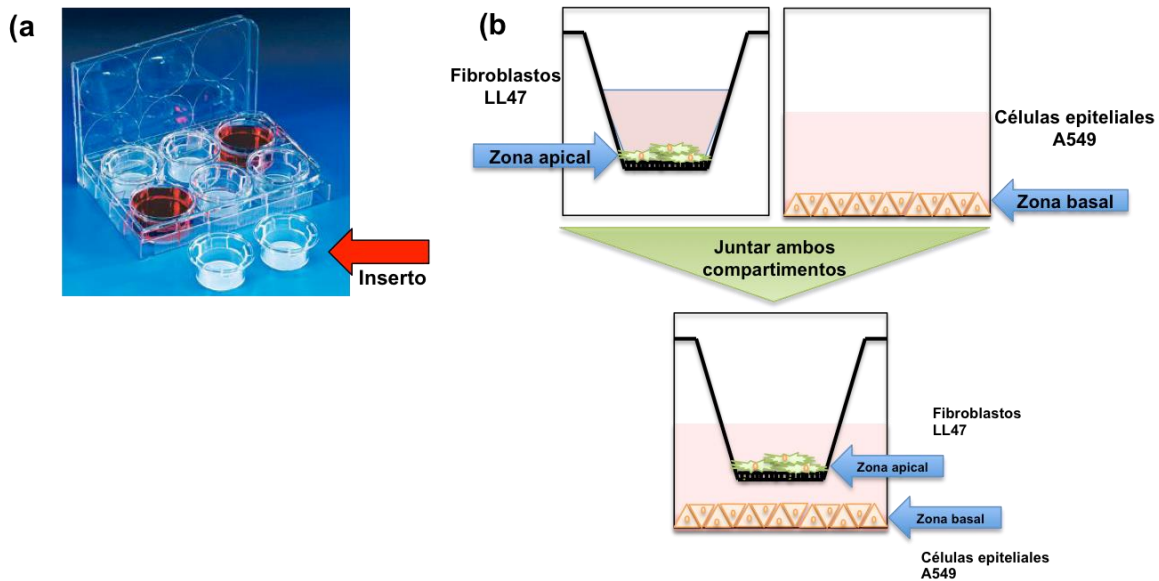


Figura 4. Co-cultivo en cámara transwell. a) Fotografía de una transwell, esta consiste en un doble compartimento que cuenta con un inserto (compartimento removible) y el otro compartimento es una placa, para este caso de 6 pozos. b) Las células se siembran por separado, en el inserto se sembraron los fibroblastos y en la placa de 6 pozos las células epiteliales, posteriormente se unen los dos compartimentos (después del tiempo de adhesión) y en este momento se considera co-cultivo.

Las dos líneas celulares fueron sembradas por separado; los fibroblastos LL47 fueron sembrados en los insertos (Costar 3412), se sembraron 220,000 fibroblastos para tener una confluencia del 60-70% y se llevaron a un volumen final de 2 mL de medio suplementado en la parte externa y de 1.5 mL en el inserto; las células epiteliales A549 fueron sembradas en placas de 6 pozos y se sembraron 350,000 células para tener una confluencia de 60-70% en un volumen de 1 mL de medio F12K suplementado. Ambos cultivos se dejaron adherir por 24 horas antes de realizarles algún tratamiento.

Los cultivos de fibroblastos LL47 y de células epiteliales A549 se juntaron justo antes de ser expuestos y únicamente se expusieron los fibroblastos a las PM<sub>10</sub> (Figura 4).

### **Exposición a PM<sub>10</sub>**

Las PM<sub>10</sub> se pesaron y se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos inmediatamente antes de los experimentos. Se realizaron suspensiones de 1 mg/mL de PM<sub>10</sub> en medio F12K libre de suero, y de estas suspensiones se tomó el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 10 µg/cm<sup>2</sup> en el cultivo celular.

Antes de ser expuestos los fibroblastos se removió el medio de cultivo, y éstos se lavaron con PBS (Tris Buffer Salino, gibco), posteriormente se expusieron a las partículas en medio libre de suero, debido a que el suero puede ser un quelante de metales, además de contener factores de crecimiento como TGF-β1 por lo que podría enmascarar los efectos inducidos por las PM<sub>10</sub>. Las células en co-cultivo se expusieron por 24 y 48 horas.

### **Transfecciones con siRNA contra el mRNA de TGF-β1**

Para determinar la participación de TGF-β1 en la expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima, se llevaron a cabo transfecciones con un siRNA comercial dirigido contra el mRNA de TGF-β1 (Santacruz Cat: sc-270322), brevemente la técnica de siRNA consiste en introducir en la célula un pequeño RNA de interferencia (siRNA), el siRNA (para este caso son tres secuencias dirigidas contra el mRNA de TGF-β1) se une con su cadena de RNA mensajero del gen blanco que se desea silenciar, entonces se induce el mecanismo que se encarga de degradar el RNA mensajero.

Para llevar a cabo la transfección se utilizó el reactivo Xfect RNA Transfection Reagent (Cat. No. 631450) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 24 horas después de haber sido sembrados los fibroblastos en los insertos, se utilizaron dos microtubos para preparar el reactivo de transfección como a continuación se describe:

En el tubo 1 (siRNA) se hizo una dilución para obtener una concentración de 200 nM del siRNA dirigido contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 (Santacruz Cat: sc-270322); en el tubo 2 se llevó a cabo una mezcla de buffer más un polímero de transfección; las mezclas se juntaron y se dejaron incubar por 10 minutos para que se formara el complejo de transfección. Durante la incubación del complejo, se le cambio el medio de cultivo a los fibroblastos por medio de cultivo fresco. Posteriormente, se agregó el complejo de transfección a los fibroblastos mediante goteo con ayuda de una micropipeta y moviendo en círculos para evitar que se concentrara en un solo punto y de esta manera reducir la citotoxicidad. Los fibroblastos se dejaron incubar a 37 °C por 4 horas, y se les retiró el medio con los reactivos de transfección y se agregó medio de cultivo fresco. Pasado el tiempo de incubación se dejaron por otras 18 horas antes de exponer a las PM<sub>10</sub>.

### **Extracción de RNA**

La extracción del RNA se llevó a cabo únicamente de los fibroblastos para evaluar la expresión del RNA mensajero de TGF- $\beta$ 1. Se removió el medio de cultivo y se pasaron los insertos a placas de 6 pozos, entonces se agregó 1.5 mL de tripsina (gibco Cat 25300054) a cada inserto, posteriormente se incubaron a 37 °C por siete minutos. Se recuperó el sobrenadante y se pasaron a microtubos de 1.5 mL, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El botón celular fue resuspendido en 1 mL de Trizol (Gibco BRL, Invitrogen) para lisar las células. El lisado se resuspendió varias veces con una micropipeta y se incubó por 5 minutos. Para realizar la separación de las fases a cada tubo se le agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo por cada mL de Trizol y se agitó fuertemente (sin vortex), dejándolo reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos; una vez formadas las fases, la fase acuosa contenía el RNA; la orgánica a las proteínas; y la interfase al DNA, y se centrifugó a 13,700 g a 4 °C por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa con cuidado de tomar o tocar a las otras fases. Un gel representativo de integridad de RNA se puede observar en el anexo 3.

El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con 500  $\mu$ l de isopropanol a 4 °C y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a



13,700 g por 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75 % a 4 °C mezclándose perfectamente con el vórtex y se centrifugó ahora a 5,000 g por 7 minutos. La pastilla se secó con vacío dejándola reposar de 10 a 15 minutos y finalmente se resuspendió en 40 µl de agua libre de RNAsas.

El RNA fue cuantificado en un nanodrop (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Para corroborar la integridad del RNA, se tomó una muestra de 500 ng de RNA total y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en amortiguador TBE (tris-HCl 0.89M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 25 mM) teñido con GelRed.

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se hizo a partir de 300 ng de RNA y se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied # Cat: 436814) siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen final de 20 µL. La síntesis se realizó en un solo ciclo bajo las siguientes condiciones: Paso 1; 25 °C por 10 minutos; paso 2, 37 °C por 120 minutos; paso 3, 85 °C por 5 minutos.

### **q-PCR del mRNA de TGF-β1**

El PCR en tiempo real se realizó con 10 ng de cDNA de fibroblastos expuestos a 10 µg/cm<sup>2</sup> PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas en co-cultivo con células epiteliales A549. El PCR se hizo mezclando la máster mix con 0.5 µl de primer FW 10 µM de TGF-β1, 0.5 µl de primer RW 10 µM de TGF-β1, 0.5 µl de ROX para obtener un volumen de 25 µl por reacción. Todas las muestras se cargaron por triplicado y se llevaron a cabo las reacciones en el termociclador StepOne plus (Applied biosystems 4376600) mediante el siguiente programa:

Desnaturalización: 95 °C por 10 minutos; Amplificación 40 ciclos 95 °C por 15 segundos. 60 °C por 1 minuto. 95 °C por 15 segundos. La cuantificación en la expresión del gen de TGF-β1 se calculó con base en el método del Ct ( $2^{-\Delta\Delta}$ ), para el cual se utilizó como parámetro de normalización la amplificación del gen endógeno GAPDH. Los oligonucleótidos utilizados tanto para TGF-β1 como para GAPDH fueron los siguientes:

### **Secuencia de oligonucleótidos de TGF- $\beta$ 1**

Forward 5'-TGA AGC AAT AGT TGG TGT CCA-3'

Reverse 5'-GCA GGG ATA ACA CAC TGC AA-3'

### **Secuencia oligonucleótidos de GAPDH**

Forward 5'- GACCACAGTCCATGCCATC-3'

Reverse 5'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-3'

### **Niveles de proteínas asociadas a TEM**

Posterior a la exposición de los co-cultivos a las PM<sub>10</sub>, en las células epiteliales A549, se determinaron los niveles de las proteínas asociadas a TEM por medio de la técnica de Western blot. Las células fueron lisadas con buffer de lisis (20 mM Tris, 1% NP-40 y 150mM NaCl, pH 8.0) y un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma, P8340) y un coctel inhibidor de fosfatasas (Sigma, P2850). Los lisados fueron centrifugados por 5 minutos a 16,000g en microcentrífuga refrigerada (4 °C) y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso. La cuantificación de proteínas se realizó por el método del Ácido bicinonínico, y se usó albumina sérica bovina (BSA) como patrón de concentración conocida.

La electroforesis fue realizada en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y se cargaron 30  $\mu$ g de proteína por cada carril y se separaron por 1:30 horas a 170 volts. La transferencia de proteínas se hizo a una membrana de PVDF (0.45  $\mu$ m) (Amersham) en cámara de transferencia semiseca a 25 volts por 30 minutos. La membrana fue bloqueada 1 hora con leche descremada al 5% en TBS-Tween al 0.2% para evitar la unión inespecífica del anticuerpo. Las concentraciones de los anticuerpos fueron las siguientes: p-Smad2/3-anti-rabbit (Cell Signaling #8828) 1:1000; E-caderina-anti-mouse (Millipore MAB3194) a una dilución de 1:2000; Vimentina-anti-rabbit (abcam ab92547) a una dilución de 1:2000;  $\alpha$ -SMA-anti-mouse (abcam ab7817) a una dilución de 1:2000, todos los anticuerpos se dejaron incubando toda la noche a 4°C y en agitación suave.

Pasado el tiempo de incubación, se lavó la membrana tres veces con TBS-Tween al 0.2% y se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios p-Smad2/3 1:1000, E-caderina 1:2000, vimentina 1:2000 y  $\alpha$ -SMA 1:2000 acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). El revelado se hizo mediante quimioluminiscencia utilizando el kit de Immobilon Western (Millipore WBKLS0100) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las bandas se observaron en el fotodocumentador (ChemiDoc-It TS3 Imager UVP).

Como control interno de carga se usó  $\beta$ -actina para E-Caderina y  $\alpha$ -SMA, para lo que se empleó el anticuerpo primario contra  $\beta$ -actina (anticuerpo monoclonal, donado por el Dr. Manuel Hernández, Cinvestav-IPN), a una dilución 1:2000 y una dilución 1:3000 para el anticuerpo secundario (anti-ratón acoplado a HRP), para vimentina se usó GAPDH (sc-32233) 1:2000 primario y 1:3000 (anti-ratón) secundario. Las condiciones de incubación y revelado fueron las mismas descritas anteriormente. El análisis densitométrico de las bandas se hizo con el software de análisis de imagen ImageJ v 1.48b. (Rasband 1997-2008).

### **Activación de fibroblastos a través de $\alpha$ -SMA (inmunofluorescencias)**

En laminillas de 8 pozos, se sembraron 14,500 fibroblastos LL47 por pozo y 24 horas después fueron transfectados como se describió en la sección de transfecciones con siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1.

Posterior a la transfección los fibroblastos fueron expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 h. Después de la exposición los fibroblastos fueron fijados con paraformaldehído al 4% por una hora a 37°C. Las laminillas se lavaron con Tris Buffer Salino (TBS) 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 150mM de NaCl, y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% por 5 minutos. Enseguida se lavaron las laminillas con TBS por 5 minutos, tres veces. Después se amortiguaron los fibroblastos con borhidruro de sodio al 0.1% en TBS por 5 minutos, para minimizar la autofluorescencia. Los fibroblastos se bloquearon con buffer de bloqueo [10% suero de caballo, 1% de BSA (albúmina de suero bovino) en TBS] por una hora a temperatura ambiente en agitación, a continuación se lavaron una vez con TBS por 5 minutos. El marcaje se hizo con anti- $\alpha$ -SMA (ab7817) a una concentración de

1:100 en un amortiguador de 1% BSA en TBS 1 y se incubó a 4°C toda la noche. La laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-Mouse-AlexaFluor 488 (Jackson ImmunoResearch Cat. 703-095-155) a una concentración de 1:200 a temperatura ambiente protegido de la luz por 45 minutos. Se hicieron 3 lavados con TBS de 5 minutos, cada uno protegido de la luz. Enseguida se procedió al montaje de la laminilla con ProLong Gold (Invitrogen Cat P36935) antigraze reagent con DAPI y se almacenara en refrigeración.

### **Captura de imágenes de inmunofluorescencias de $\alpha$ -SMA en fibroblastos**

Las imágenes fueron tomadas en el microscopio de fluorescencia vertical Axioskop2 mot plus Carl Zeiss (Axio\_cam HRm Carl Zeiss). Por cada pozo se tomaron al menos 100 células de campos distintos y representativos de la población celular. El análisis densitométrico de las fotos se hizo con el software de análisis de imagen ImageJ v 1.48b. (Rasband 1997-2008). Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

### **Evaluación de la forma activa de TGF- $\beta$ 1 (ELISA)**

La forma activa de TGF- $\beta$ 1 se determinó por ELISA (R&D systems Cat: DB100B) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, posterior a la exposición a PM<sub>10</sub>, se recuperó el sobrenadante de los co-cultivos y se centrifugaron por 30 minutos a 16,000 x g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó -70 °C hasta el momento de su uso. Las muestras de sobrenadantes (100  $\mu$ L por tratamiento), se activaron con 20  $\mu$ L de HCl 1 N, para cuantificar la forma activa de TGF- $\beta$ 1.

Se hizo una curva de calibración con diluciones seriadas de la proteína purificada de TGF- $\beta$ 1 para determinar la concentración de las muestras evaluadas. Las muestras se incubaron en la placa de ELISA por dos horas, después se hicieron cuatro lavados y posteriormente se incubo por otras dos horas con el anticuerpo de TGF- $\beta$ 1 conjugado, se hicieron cuatro lavados y después se incubo la placa con la solución sustrato por 30 minutos, pasado el tiempo se realizó la detención de la reacción y se determinó la densidad óptica a 450 nm en un lector de placas (TECAN Infinite M200PRO).

### **Activación de MMP-2 y 9 (zimograma)**

Para evaluar la actividad de las MMP-2 y MMP-9 se realizó mediante un zimografía, esta es una técnica electroforética que permite observar actividad de enzimas. Para llevar a cabo la medición de las MMPs, se recuperó el sobrenadante de los co-cultivos y se centrifugó por 30 minutos a 16,000g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas y se precipitaron con etanol absoluto a -70 °C toda la noche. Posteriormente se centrifugaron por 30 minutos a 16,000g a 4°C. El botón se resuspendió en 40 µL de Tris 100 mM y se cuantificó la proteína obtenida como se describió en la sección de Western Blot. Se cargaron 20 µg de proteína dentro de un gel al 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE) con 0.1% de gelatina porcina. Las muestras fueron pasadas por un SDS-PAGE sin hervir y sin β-mercaptoetanol para no desnaturalizar las proteínas e inhibir la actividad enzimática, el SDS-PAGE se lavó e incubado durante 3 horas en Tris 100 mM y 2.5 % de Triton X-100 (pH 7.5) para eliminar el SDS. Después el gel se incubó en Tris 100 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5 por 12 horas para favorecer la actividad de las proteasas, posteriormente el gel fue teñido 20 minutos en azul brillante de Coomassie R250. La proteólisis se observó cómo bandas blancas y para determinar la activación se realizaron densitometrías de estas bandas como se describió en la sección de Western blot.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante una t-student usando el software Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). En todos los casos se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue menor al 5%.

## Resultados

### La PM<sub>10</sub> inducen el mRNA de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>

Para determinar si las PM<sub>10</sub> inducen la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos, se evaluó su expresión en fibroblastos en co-cultivo expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas. Se observó que las PM<sub>10</sub> inducen un aumento del 110 % en la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 a las 24 (\* $p$ <0.05 vs NT) y a las 48 horas de exposición se inducen un 60% el mRNA de TGF- $\beta$ 1 (\*\* $p$ <0.005 vs NT), además cuando los fibroblastos fueron pre-incubados con el siRNA dirigido contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 se observó la inhibición en la expresión del mensajero hasta en un 95% (\*\* $p$ <0.0005 vs NT) en ambos tiempos de evaluados (Fig. 5).

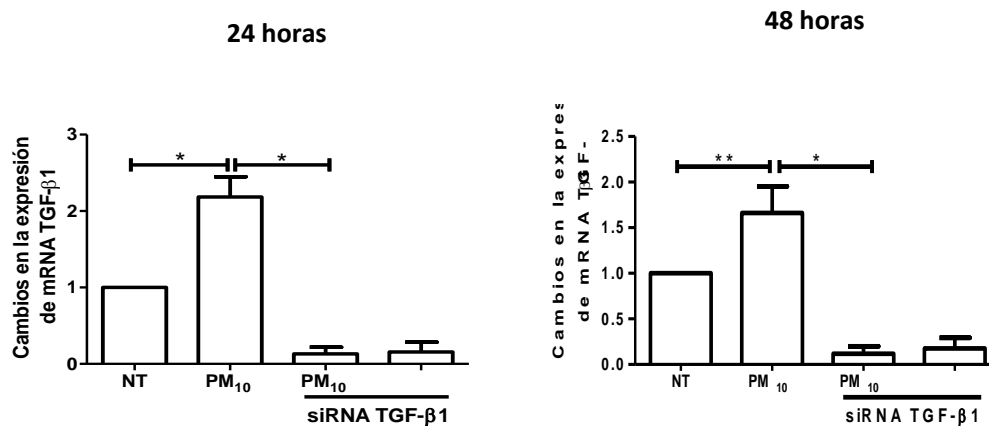


Figura 5. Expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>. Mediante q-PCR se evaluaron los niveles del mRNA TGF- $\beta$ 1 en fibroblastos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas en co-cultivo con células epiteliales. Se observó que las PM<sub>10</sub> inducen la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en 110% (\* $p$ <0.05 vs NT) a 24 horas y un 60% (\*\*<0.005 vs NT) a 48 horas. La preincubación de los fibroblastos con el siRNA contra TGF- $\beta$ 1 más PM<sub>10</sub> previene la expresión de mRNA de TGF- $\beta$ 1 en un 95% (\*\* $p$ <0.0005 vs NT) en ambos tiempos.

### Las PM<sub>10</sub> inducen la forma activa de TGF- $\beta$ 1

Cuando los fibroblastos son activados secretan factores de crecimiento, entre ellos TGF- $\beta$ 1, por lo que se evaluaron en sobrenadantes de co-cultivos entre células epiteliales y fibroblastos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas la concentración de la forma activa de TGF- $\beta$ 1. A las 24 horas, no se observó a TGF- $\beta$ 1 activo, sin embargo, a las 48 horas las PM<sub>10</sub> inducen la secreción de la forma activa de TGF- $\beta$ 1 en un 170 % (\* $p$ <0.05 vs NT) (Fig. 6). Por otro lado, cuando se

preincubaron los fibroblastos con un siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 se previene la activación de este ligando (Fig. 6).

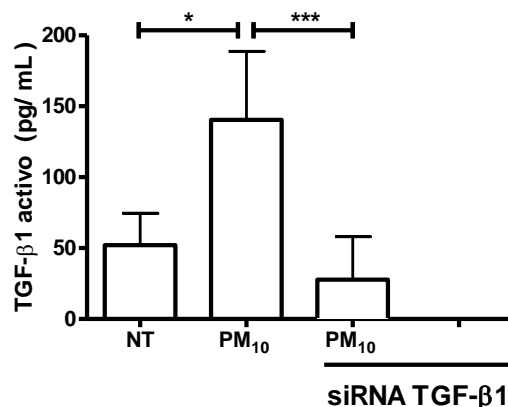


Figura 6. Inducción de la forma activa de TGF- $\beta$ 1 activo en co-cultivos expuestos a PM<sub>10</sub> por 48 horas. En sobrenadantes de co-cultivos entre fibroblastos y células epiteliales expuestos a 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas se evaluó la activación de TGF- $\beta$ 1 por medio de un ensayo de ELISA. Se observó que las PM<sub>10</sub> a las 48 horas inducen la activación de TGF- $\beta$ 1 de 170% con respecto a co-cultivos sin exponer (\*p<0.05 vs NT), y en co-cultivo con fibroblastos preincubados con un siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 y posteriormente expuestos a PM<sub>10</sub> se observó que se previene la activación (\*\*p<0.005 vs PM<sub>10</sub>), a las 24 horas no se observó activación de TGF- $\beta$ 1.

### Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de fibroblastos a través de $\alpha$ -SMA

El aumento en los niveles del mRNA de TGF- $\beta$ 1 en los fibroblastos expuestos, sugiere que las PM<sub>10</sub> son capaces de inducir su activación. Para determinar si las PM<sub>10</sub> inducen la activación de fibroblastos, estos fueron expuestos a 10  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas y evaluamos los niveles de  $\alpha$ -SMA (densitometría). Se observó que las PM<sub>10</sub> a las 24 horas inducen un incremento que no resulto ser significativo, sin embargo, a las 48 horas se observa un aumento del 100% en los niveles de  $\alpha$ -SMA en los fibroblastos expuestos a las partículas (\*p<0.05 vs NT). Para determinar la participación de TGF- $\beta$ 1 en la activación de los fibroblastos, estos fueron preincubados con un siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 y se observó que la preincubación con el siRNA no previene el aumento en los niveles de  $\alpha$ -SMA (Fig. 7).

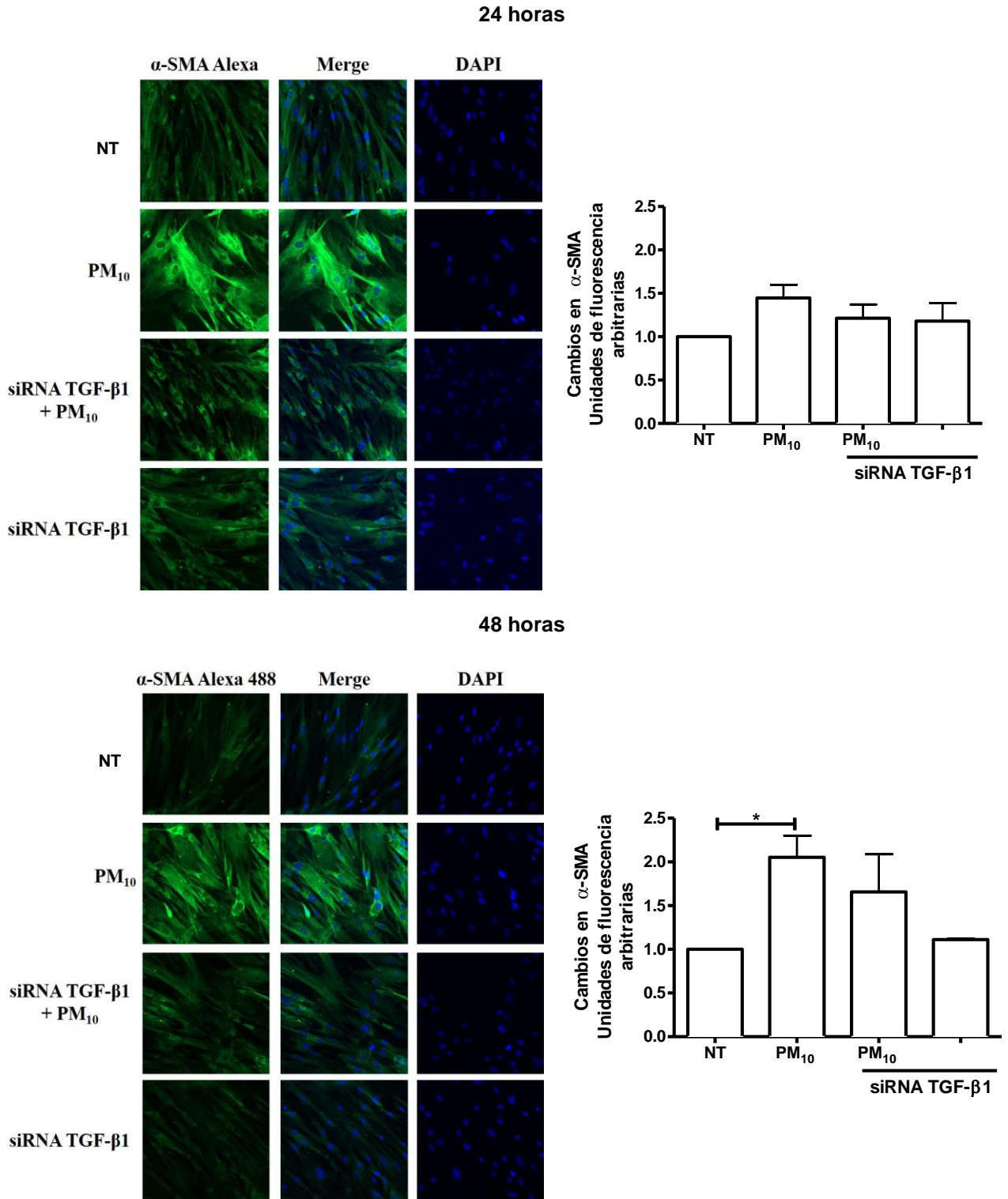


Figura 7. Niveles de  $\alpha$ -SMA en fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>. Los fibroblastos fueron expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas. La localización celular de  $\alpha$ -SMA se determinó mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo dirigido contra  $\alpha$ -SMA y posteriormente se marcaron con Alexa 488, los niveles de  $\alpha$ -SMA se determinaron mediante densitometrías. Se observó que las PM<sub>10</sub> inducen un aumento en los niveles de  $\alpha$ -SMA 48 horas de exposición (\* $p < 0.05$  vs NT). A las 24 horas de exposición se observó una tendencia que no resultó ser significativa.  $n=2$ .



## Las PM<sub>10</sub> inducen la fosforilación de Smad2/3

TGF- $\beta$ 1 induce marcadores de TEM en células epiteliales a través de la fosforilación de Smad2/3. Se evaluaron los niveles de fosforilación de Smad2/3 en células epiteliales A549 en co-cultivo con fibroblastos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas. Observamos que las PM<sub>10</sub> inducen en un 10% la fosforilación de Smad2/3 a las 24 horas (\* $p < 0.05$  vs NT); cuando se pre-incubaron los fibroblastos con el siRNA dirigido contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 se previno la fosforilación de Smad2/3 inducida por las PM<sub>10</sub>. A las 48 horas no se observaron cambios en los niveles de fosforilación de Smad2/3 (Fig. 8).

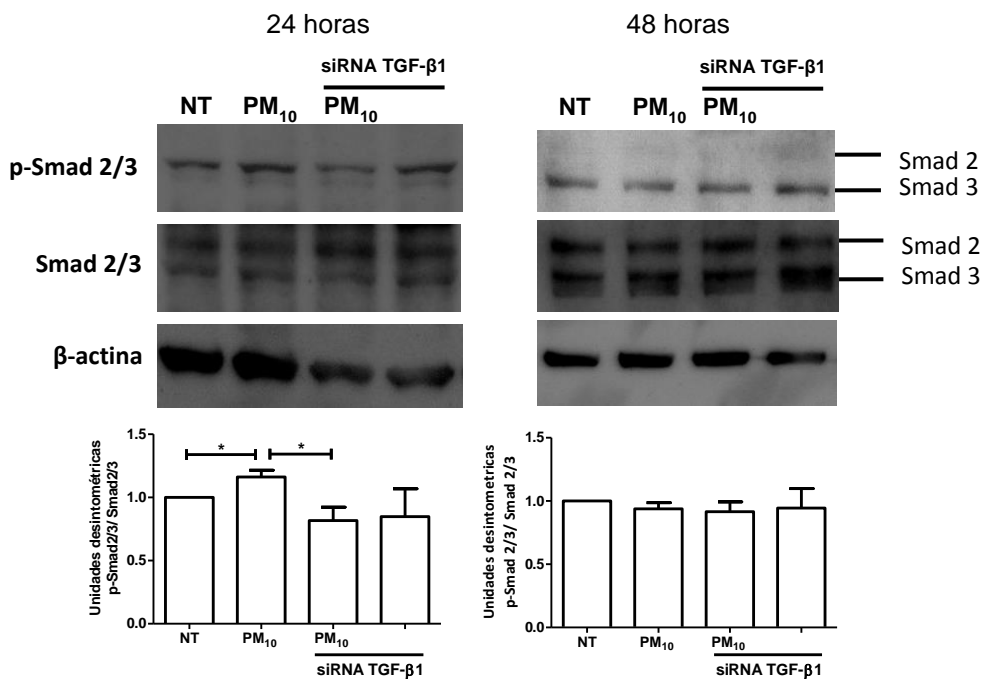


Figura 8. Niveles de fosforilación de Smad2/3 en células epiteliales. En células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas, se evaluaron los niveles de fosforilación de Smad2/3 mediante Western blot. Se observó que las PM<sub>10</sub> inducen un 10% la fosforilación de Smad2/3 a las 24 horas (\* $p < 0.005$  vs NT). Cuando se usó un siRNA contra el mRNA de TGF- $\beta$ 1 y posteriormente se hizo la exposición a las PM<sub>10</sub>, se observó una prevención en la fosforilación de Smad2/3 a 24 horas. A las 48 horas no se observaron cambios en ninguna de las condiciones evaluadas.  $n=3$ .

TGF- $\beta$ 1 es el principal inductor de marcadores de TEM a través de la fosforilación de Smad2/3 y observamos que las PM<sub>10</sub> inducen la fosforilación de Smad2/3 por lo que evaluados los niveles de marcadores de TEM: E-caderina, Vimentina y  $\alpha$ -SMA.

## Las PM<sub>10</sub> inducen marcadores de TEM

### Niveles de E-caderina

En células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas, medimos los niveles de E-caderina y se observó que las PM<sub>10</sub> inducen una disminución de un 10% los niveles de E-caderina a 24 horas (\*\*p<0.005 vs NT) y de un 15% a las 48 horas (\*p<0.05 vs NT) (Fig. 9). Cuando se usó un siRNA contra el mRNA de TGF-β1 y posteriormente se expusieron los co-cultivos a PM<sub>10</sub>, se observó que se previno la disminución de E-caderina a las 48 horas (p<0.05 vs PM<sub>10</sub>) figura 9.

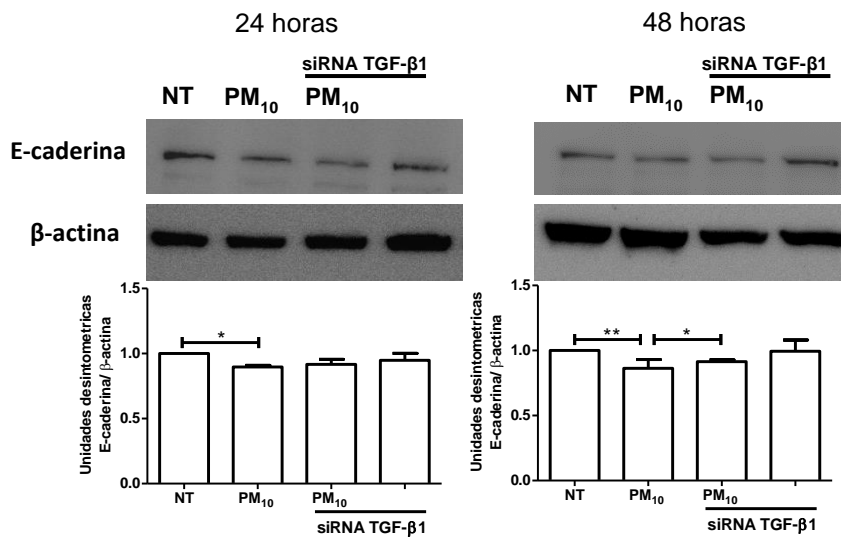


Figura 9. Niveles de E-caderina en células epiteliales. En células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestas a 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas. Se evaluaron los niveles de E-caderina mediante Western blot. Se observó que las PM<sub>10</sub> inducen la disminución de E-caderina a las 24 horas (\*p<0.05 vs NT) así como a las 48 horas (\*\*p<0.005 vs NT). En la células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos preincubados con un siRNA contra el mRNA de TGF-β1 y posteriormente expuestas a PM<sub>10</sub> se observó una prevención en la disminución de los niveles de E-caderina a las 48 horas (\*p<0.05 vs NT). n=3.

### Niveles de Vimentina

Los niveles de Vimentina fueron determinados en células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestas por 24 y horas. Observamos que a las 48 horas las PM<sub>10</sub>

inducen un incremento de 10% en los niveles de vimentina ( $p < 0.05$  vs NT), a las 24 horas no observamos cambios significativos en la inducción de Vimentina (Figura 10). Otra de los marcadores de TEM asociados a cambios en el citoesqueleto es  $\alpha$ -SMA, por lo que evaluamos los niveles de esta proteína.

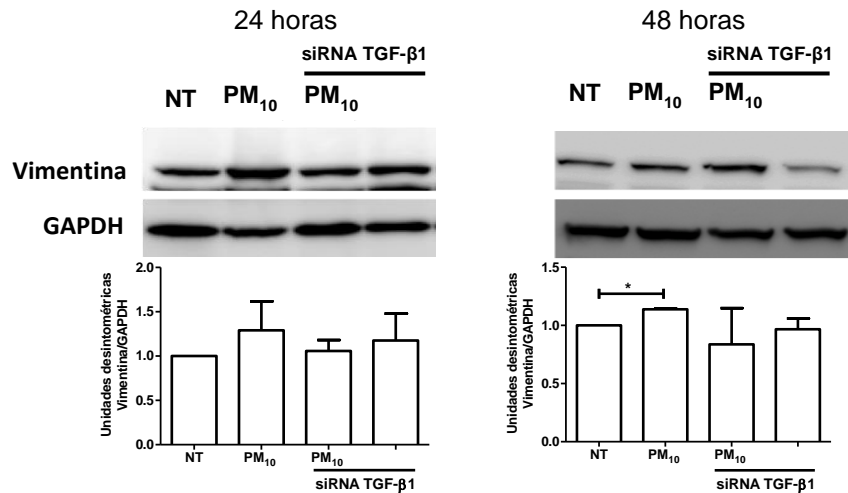


Figura 10. Niveles de Vimentina en células epiteliales. En células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestos a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 24 y 48 horas. Se evaluaron los niveles de Vimentina mediante Western blot. Se observó que las  $\text{PM}_{10}$  a las 24 horas no inducen cambios en los niveles de vimentina. A las 48 horas se observó que las partículas inducen un incremento en los niveles de Vimentina de un 10% ( $*p < 0.05$  vs NT).  $n=3$ .

### Niveles de $\alpha$ -SMA

Los niveles de  $\alpha$ -SMA fueron evaluados en células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestos a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$ . Observamos que las  $\text{PM}_{10}$  inducen un incremento en los niveles de  $\alpha$ -SMA de un 15% ( $p < 0.005$  vs NT) a las 48 horas, sin embargo no observamos cambios a las 24 horas (Figura 11).

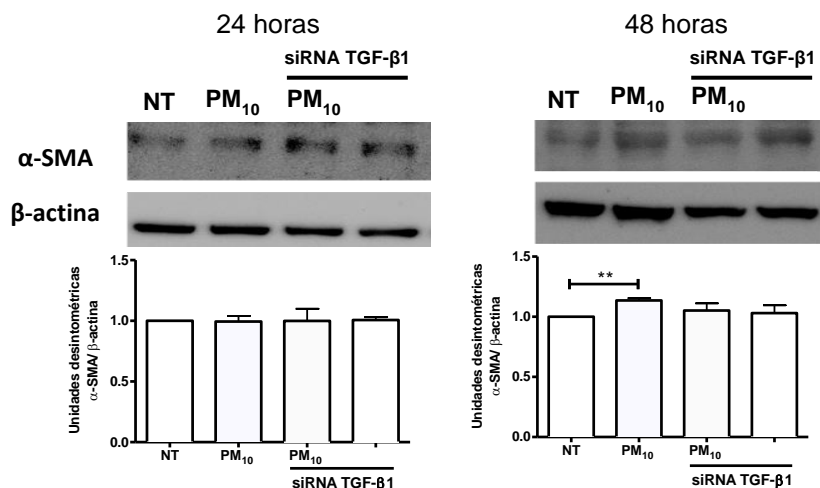
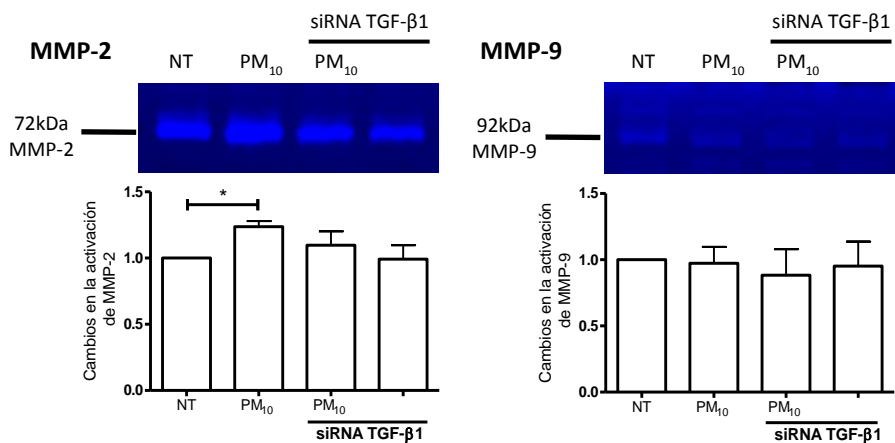


Figura 11. Niveles de  $\alpha$ -SMA en células epiteliales. En células epiteliales en co-cultivo con fibroblastos expuestas a  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de  $\text{PM}_{10}$  por 24 y 48 horas. Se evaluaron los niveles de  $\alpha$ -SMA mediante Western blot. Se observó que las  $\text{PM}_{10}$  a las 24 horas no inducen cambios en los niveles de  $\alpha$ -SMA en ninguna de las condiciones evaluadas. A las 48 horas se observó un incremento en los niveles de  $\alpha$ -SMA de un 15% (\*\* $p < 0.05$  vs NT).  $n=3$ .

### Activación de la MMP-2 y MMP-9

Además de la expresión de marcadores de TEM, otro de los eventos que se lleva a cabo es la secreción y activación de metaloproteinasas específicamente la MMP-2 y la MMP-9. Cuando evaluamos la activación de esta metaloproteinasas, observamos que las  $\text{PM}_{10}$  inducen la activación de la MMP-2 tanto a las 24 en un 20% ( $p < 0.05$  vs NT) como a las 48 horas en 15% ( $p < 0.005$  vs NT), mientras que no se observaron cambios en la activación de la MMP-9 en ninguno de los 2 tiempo evaluados (Fig. 12).

### 24 horas



### 48 horas

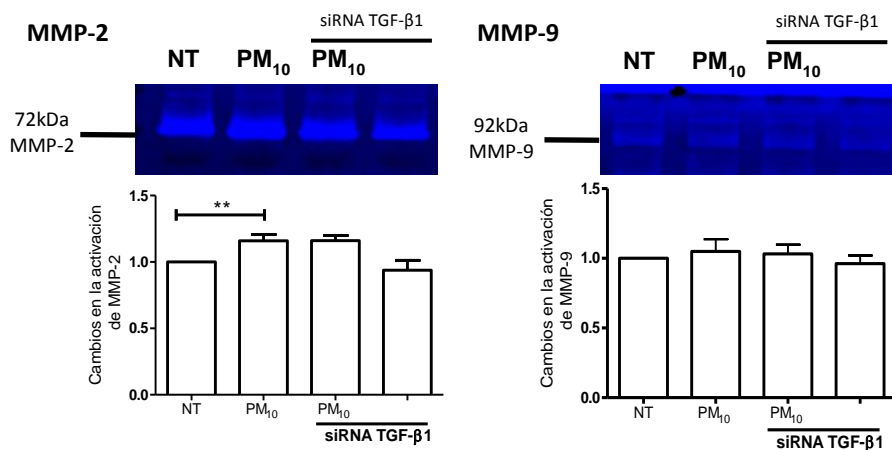


Figura 12. Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de la MMP-2. En sobrenadantes de co-cultivos entre fibroblastos y células epiteliales expuestos a 10 µg/cm<sup>2</sup> de PM<sub>10</sub> por 24 y 48 horas se evaluó la activación de metaloproteinasas (2 y 9) por medio de un zimograma. Se observó que las PM<sub>10</sub> a las inducen la activación de la MMP-2 en un 20% a las 24 horas (\*p<0.05 vs NT) y en un 15% (\*\*0.005 vs NT) a las 48 horas de exposición. No se observaron cambios en la activación de estas metaloproteinasas en sobrenadantes de co-cultivo con fibroblastos preincubados con un siRNA contra el mRNA de TGF-β1 y posteriormente expuestos a PM<sub>10</sub>, así como de sobrenadantes de co-cultivos de fibroblastos preincubados únicamente con el siRNA contra el mRNA de TGF-β1. Por otro lado, no se observó activación de la MMP-9 en ninguno de las condiciones evaluadas, ni en los tiempos evaluados. n=3.

## Discusión de resultados

En este trabajo utilizamos un modelo de co-cultivo entre fibroblastos y células epiteliales, debido a que en un organismo es de suma importancia la interacción que existe entre diferentes estirpes celulares y en el pulmón los fibroblastos y células epiteliales tienen un papel importante en la homeostasis del tejido aunado a que los fibroblastos son secretores innatos de TGF- $\beta$ 1, y éste puede tener impacto en la inducción de marcadores de TEM. En este trabajo encontramos que los fibroblastos expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> inducen la secreción y activación de TGF- $\beta$ 1, y éste induce marcadores de TEM en células epiteliales A549. Los estudios previos con esta concentración demuestran que no induce muerte celular, pero si es una concentración en la cual se pueden observar los efectos toxicológicos de las partículas, además esta concentración es el equivalente a 5 días de exposición (Li et al 2003).

Si bien la TEM es un evento fisiológico normal, se ha visto que bajo ciertas condiciones puede favorecer procesos de transformación e invasión celular, eventos asociados al desarrollo de cáncer (Shiga et al 2015). Una de las principales vías a través de las cuales se lleva a cabo la TEM es mediante la secreción y activación de TGF- $\beta$ 1; los fibroblastos son células que juegan un papel importante en la secreción de ésta citocina (Abulaiti et al 2013). En el modelo de co-cultivo utilizado en este trabajo se observó que los fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub> inducen la secreción y activación de TGF- $\beta$ 1. Trabajos previos con PM<sub>10</sub> o componentes de las PM<sub>2.5</sub>, demostraron que las PMs inducen la formación de ROS y que este evento es uno de los mecanismos mediante el cual se induce y activa de TGF- $\beta$ 1 en células epiteliales (Kyung et al 2012, Thevenot et al 2013).

Actualmente se sabe que las PM<sub>10</sub> inducen la formación de ROS, a través de varios mecanismos y debido a diferentes componentes de las partículas, con metales mediante una reacción de Fenton (García-Cuellar et al 2002, Chirino et al 2010), y mediada por el metabolismo de los compuestos orgánicos de las partículas al activar el citocromo P450 (CYP1A1) (Risom et al 2005).

La citocina TGF- $\beta$ 1 regula marcadores de TEM a través de la fosforilación de Smad2/3 en células epiteliales. Después de que TGF- $\beta$ 1 fosforila a Smad2/3, este se une a Smad4 y formar un complejo que transloca al núcleo donde puede actuar por una parte, como represor de la expresión de E-caderina mediante la inducción de Snail1 y Snail2, y por otro lado favorece la expresión de los marcadores de mesenquimales Vimentina y  $\alpha$ -SMA (Brzozowa et al 2015)..

TGF- $\beta$ 1 induce la disminución de las uniones célula-célula mediadas por E-Caderina y este proceso favorece la migración e invasión celular, lo cual se asocia a transformación celular y metástasis por lo que estos eventos participan de manera importante en cáncer (Brzozowa et al 2015). En este trabajo observamos que las PM<sub>10</sub> disminuyen los niveles de E-caderina y que esta disminución está relacionada con la activación de TGF- $\beta$ 1. En trabajos previos se demostró que las PM<sub>10</sub> inducen la pérdida de E-caderina (Morales-Bárcenas et al 2015), y en este trabajo demostramos que una de las vías que participa de manera importante y que además se asocia a cáncer es la de TGF- $\beta$ 1.

En este trabajo se reportamos que en el modelo de co-cultivo entre fibroblastos y célula epiteliales, las PM<sub>10</sub> disminuyen los niveles de E-caderina: así como el aumento de los niveles de Vimentina y estos cambios en el citoesqueleto son marcadores de células mesenquimales que son inducidos por TGF- $\beta$ 1, y se asocian a cambios en el citoesqueleto que pueden potencializar la migración de células que han activado el programa de TEM (Miyazono 2009, Shirkoohi 2013). Además de Vimentina, las PM<sub>10</sub> inducen  $\alpha$ -SMA que es otro marcador mesenquimal, y que también está implicada en el potencial invasivo de las células que han entrado en la TEM, debido a que es una proteína que se asocia a células fibroblastoides. que además potencializa la migración es uno de los marcadores importantes de TEM y el incremento de ambas proteínas Vimentina y  $\alpha$ -SMA se asocia con el tipo 3 de TEM asociado cáncer (Shirkoohi 2013). Si bien, en éste trabajo no se evaluó migración e invasión, en trabajos previos se demostró que las PM<sub>10</sub> inducen capacidad invasiva en células A549 (Morales-Bárcenas et al 2015), en este sentido, en este trabajo demostramos que una de las vías mediante la cual se favorece este

evento es a través del incremento de estos marcadores Vimentina y  $\alpha$ -SMA mediados por la vía de TGF- $\beta$ 1.

Un evento importante en los procesos de TEM y de invasión, es la secreción de MMPs, en particular de la MMP2 y 9, debido a que participan en la remodelación de la matriz extracelular y en TEM este evento es inducido por TGF- $\beta$ 1 (Massagué et al 2000, Miyazono 2009, Shirkoohi 2013). Observamos que las PM<sub>10</sub> inducen la activación de la MMP-2. Trabajos previos muestran que las PM<sub>10</sub> inducen la secreción tanto de la MMP2 como de la MMP 9 (Morales-Bárceñas et al 2015), sin embargo, en este estudio se demostró que principalmente la actividad de la MMP2 es inducida por la vía de TGF- $\beta$ 1. Lo que sugiere que las PM<sub>10</sub> inducen remodelación de la matriz extracelular (MEC).

En este trabajo se demostró que las PM inducen marcadores de TEM, si bien el modelo no nos permite ver TEM, si se pueden observar marcadores relacionados con éste evento el cual se asocia a transformación, migración celular y metástasis en tumores. Sin embargo, éstos marcadores pueden favorecer un microambiente que puede propiciar la transformación celular, por lo que no podemos descartar que las PM podrían favorecer transformación celular a través de la inducción de marcadores asociados a TEM.

Por otro lado, de éste trabajo surge la duda de si en tumores ya establecidos las PM<sub>10</sub> favorecerán procesos de invasión o metástasis a través de la TEM inducido TGF- $\beta$ 1, por lo que este es un evento que vale la pena valorar en trabajos posteriores.

## **Conclusiones**

La exposición a 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de PM<sub>10</sub> inducen la expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima. En fibroblastos inducen la expresión del mRNA de TGF- $\beta$ 1, además de la activación de los mismos. También se induce TGF- $\beta$ 1 en su forma activa y esta tiene impacto en las células epiteliales las cuales expresan marcadores de TEM a través de la vía de TGF-B1 ya que se lleva a cabo la



fosforilación de Smad2/3 y se induce la disminución de marcadores epiteliales como E-caderina y a su vez aumentan marcadores mesenquimales como Vimentina y  $\alpha$ -SMA.

Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de la MMP-2, esta metaloproteínasa se asocia a remodelación de matriz extracelular y también a migración e invasión celular.

La expresión de marcadores de TEM se induce a través de la vía de TGF- $\beta$ 1, además que los cambios más evidentes en la expresión de marcadores de TEM suceden a las 48 horas de exposición.

La expresión de marcadores de TEM inducidos por las PM<sub>10</sub> es importante ya que aunque no evaluamos migración e invasión, estos se asocian a cáncer ya que en tumor establecido puede favorecer migración, invasión celular y metástasis a través de TEM por lo que las perspectivas de este trabajo son las siguientes.

### **Perspectivas**

Ya que las partículas inducen marcadores de TEM uno de los siguientes puntos a investigar es si las PM<sub>10</sub> pueden inducir en este mismo modelo de co-cultivo migración e invasión celular en células epiteliales, ya que este proceso se ve potencializado por la TEM.

Las PM<sub>10</sub> inducen la activación de fibroblastos, por lo que otro punto a evaluar en fibroblastos es si las partículas pueden inducir su constante activación y además de secretar TGF- $\beta$ 1, evaluar si secretan otras citocinas que puedan tener un efecto de sinergia en la inducción de marcadores de TEM, además por su importancia en el desarrollo y progresión del cáncer es interesante comparar los efectos de las partículas sobre fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) y observar si las partículas y CAF potencializan la expresión de marcadores de TEM en células epiteliales, ya que este es uno de los mecanismos en la propagación del cáncer.

## Literatura citada

- Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, et al. 2013. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF-beta signaling by IL-6. *Lung cancer* 82: 204-13
- Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, et al. 2002. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environmental health perspectives* 110: 715-20
- Alfaro-Moreno E, Torres V, Miranda J, Martinez L, Garcia-Cuellar C, et al. 2009. Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. *Environ Res* 109: 528-35
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342: 1350-8
- Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzwinski S, Loomis D. 1998. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993-1995. *Environmental health perspectives* 106: 849-55
- Brzozowa M, Michalski M, Wyrobiec G, Piecuch A, Dittfeld A, et al. 2015. The role of Snail1 transcription factor in colorectal cancer progression and metastasis. *Contemp Oncol (Pozn)* 19: 265-70
- Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Butterworth FM, Amador-Munoz O. 2004. The effects of seasonal weather on the genotoxicity, cytokinetic properties, cytotoxicity and organochemical content of extracts of airborne particulates in Mexico City. *Mutat Res* 558: 7-17
- Chen X, Zhang LW, Huang JJ, Song FJ, Zhang LP, et al. 2016. Long-term exposure to urban air pollution and lung cancer mortality: A 12-year cohort study in Northern China. *The Science of the total environment* 571: 855-61
- Chirino YI, Garcia-Cuellar CM, Garcia-Garcia C, Soto-Reyes E, Osornio-Vargas AR, et al. 2017. Airborne particulate matter in vitro exposure induces cytoskeleton remodeling through activation of the ROCK-MYPT1-MLC pathway in A549 epithelial lung cells. *Toxicology letters* 272: 29-37
- Chirino YI, Sanchez-Perez Y, Osornio-Vargas AR, Rosas I, Garcia-Cuellar CM. 2015. Sampling and composition of airborne particulate matter (PM10) from two locations of Mexico City. *Data in brief* 4: 353-6
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Jones BR, et al. 2011. TGFbeta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300: L887-97
- Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. 1999. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 17: 27-34
- Englert N. 2004. Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicology letters* 149: 235-42
- Fleming BM, Yelin R, James RG, Schultheiss TM. 2013. A role for Vg1/Nodal signaling in specification of the intermediate mesoderm. *Development* 140: 1819-29

- Guan L, Rui W, Bai R, Zhang W, Zhang F, Ding W. 2016. Effects of Size-Fractionated Particulate Matter on Cellular Oxidant Radical Generation in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells. *International journal of environmental research and public health* 13
- Jobling MF, Mott JD, Finnegan MT, Jurukovski V, Erickson AC, et al. 2006. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiation research* 166: 839-48
- Jolly MK, Ward C, Eapen MS, Myers S, Hallgren O, et al. 2017. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*
- Kalluri R, Weinberg RA. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420-8
- Kyung SY, Yoon JY, Kim YJ, Lee SP, Park JW, Jeong SH. 2012. Asian Dust Particles Induce TGF-beta(1) via Reactive Oxygen Species in Bronchial Epithelial Cells. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 73: 84-92
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178-96
- Larue L, Bellacosa A. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24: 7443-54
- Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. 2003. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. *Clinical immunology* 109: 250-65
- Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncol* 14: 1262-3
- Massagué J, Blain SW, Lo RS. 2000. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309
- Miyazono K. 2009. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85: 314-23
- Morales-Bárceñas R, Chirino YI, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Melendez-Zajgla J, et al. 2015. Particulate matter (PM10) induces metalloprotease activity and invasion in airway epithelial cells. *Toxicology letters* 237: 167-73
- Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132-41
- Pope CA, 3rd, Dockery DW. 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc* 56: 709-42
- Risom L, Moller P, Loft S. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 592: 119-37
- Roubicek DA, Gutierrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrian-Garcia ME, Ostrosky-Wegman P. 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res* 631: 9-15
- Salcido-Neyoy ME, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas AR, Gonsebatt ME, Melendez-Zajgla J, et al. 2015. Induction of c-Jun by air particulate matter (PM(1)(0)) of

- Mexico city: Participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental pollution* 203: 175-82
- Sánchez-Pérez Y, Chirino YI, Osornio-Vargas AR, Morales-Barcenas R, Gutierrez-Ruiz C, et al. 2009. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. *Cancer Lett* 278: 192-200
- Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, Sram RJ, Kalina I, et al. 2007. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines. *Mutat Res* 620: 123-34
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H. 2015. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 7: 2443-58
- Shirkoochi R. 2013. Epithelial mesenchymal transition from a natural gestational orchestration to a bizarre cancer disturbance. *Cancer science* 104: 28-35
- Thevenot PT, Saravia J, Jin N, Giaimo JD, Chustz RE, et al. 2013. Radical-containing ultrafine particulate matter initiates epithelial-to-mesenchymal transitions in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48: 188-97
- Thiery JP, Sleeman JP. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 131-42
- Trasande L, Thurston GD. 2005. The role of air pollution in asthma and other pediatric morbidities. *The Journal of allergy and clinical immunology* 115: 689-99
- Wendt MK, Tian M, Schiemann WP. 2012. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF-beta-induced EMT during cancer progression. *Cell Tissue Res* 347: 85-101
- Wrana JL, Attisano L. 2000. The Smad pathway. *Cytokine & growth factor reviews* 11: 5-13

## **Anexos**

### **Anexo 1. Los tipos de transición epitelio mesénquima TEM de tipo 1**

Una vez que comienza la gastrulación de un huevo fertilizado, este genera tres tipos de capas embrionarias, por lo que en el desarrollo embrionario, la célula adquiere la capacidad de migrar para formar las diferentes capas embrionarias que dan origen al endodermo, mesodermo y ectodermo. Las células en este tejido expresan E-caderina y exhiben una polaridad apical y basal. La formación de la línea primitiva es considerada como una señal del inicio de la gastrulación, que conduce a la formación de las tres capas de tejido embrionario que generan a todos los tejidos del cuerpo. La línea primitiva es formada por una invaginación en la línea media de la capa de epiblastos que son células que están presentes en la gastrulación y que forman la parte inferior del embrión para después extenderse en dirección a la futura cabeza. Las células tipo epiteliales de los epiblastos entran en un programa para un cambio dictado específicamente por la expresión de proteínas asociadas con la migración celular y diferenciación.

Los cambios que sufren las células asociados a la gastrulación son dependientes y son orquestados por la vía de señalización de las Wnt, un ejemplo de la importancia de esta familia de proteínas es que si no está presente la Wnt 3 no se puede llevar a cabo la TEM durante la gastrulación. La subsecuente formación de la línea primitiva está asociada a la expresión de la Wntc8, la expresión ectópica de Wntc8 en embriones conduce a la formación de múltiples líneas primitivas. La súper familia de proteínas del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) como Nodal y Vg1 participan en esta fase del desarrollo ya que son mediadoras de la acción de las Wnts, y sus deficiencias pueden provocar defectos en la formación del mesodermo debido a la ausencia funcional de la TEM. Las proteínas de la familia de Wnts, en cooperación con los receptores de crecimiento de fibroblastos (FGF) regulan la TEM, además de los factores de transcripción Snail, Eomes y Mesps que en conjunto orquestan la TEM en la gastrulación (Fleming et al 2013, Kalluri &

Weinberg 2009). Inicialmente las células premigratorias expresan genes como Sox, Snail y Slug que les sirven a las células para que subsecuentemente puedan entrar en la TEM y como una consecuencia entonces separarse de los pliegues neurales para volverse motiles y dispersarse hacia otras partes del embrión donde se diferenciaran en otros tipos celulares como los melanocitos que dan la coloración a la piel, una vez que las células han migrado a su destino entonces pueden establecerse ahí por el proceso de TME (Kalluri & Weinberg 2009).

## **TEM de tipo 2**

Esta clasificación está asociada con la regeneración de tejidos y la fibrosis de órganos. La fibrosis es el proceso mediante el cual los órganos o tejidos se vuelven rígidos por la secreción en exceso de componentes de tejido conectivo. La fibrosis de órganos, que ocurre en numerosos tejidos epiteliales esta mediada por la liberación de células inflamatorias y fibroblastos que liberan señales de inflamación, así como componentes de MEC que incluyen colágenas, lamininas y elastinas. Específicamente la TEM se encuentra asociada con la fibrosis de pulmón, hígado, riñón e intestino, mediante el aumento de la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1 o S100A4) que está asociada a proteínas del citoesqueleto como S100 y  $\alpha$ -SMA. Estas proteínas se han promovido como marcadores característicos de productos mesenquimales generados por la TEM que ocurre durante el desarrollo de fibrosis de varios órganos (Blobe et al 2000).

Por otro lado, marcadores como vimentina y desmina han sido usados para identificar células epiteliales de pulmón, hígado, riñón e intestino que están a la mitad del proceso de someterse a la TEM asociada con inflamación crónica. Tales células continúan exhibiendo una morfología específica epitelial y marcadores moleculares como E-caderina y citoqueratina, además de la expresión de marcadores mesenquimales como  $\alpha$ -SMA y FSP1. Estas células son a menudo representantes de estados intermedios de TEM, ya que los marcadores epiteliales se continúan expresando, pero nuevos marcadores mesenquimales se van adquiriendo. Eventualmente, las células salen de la capa epitelial abriéndose paso a través de la membrana basal y se acomodan en el tejido intersticial donde se

deshacen de todos sus marcadores epiteliales y ganan el fenotipo de fibroblasto. En modelos de ratón, las lesiones inflamatorias en riñones pueden resultar en el reclutamiento de diversas células que pueden desencadenar la TEM a través de la liberación de TGF- $\beta$  y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial (EGF) y FGF-2. Muchas de las células reclutadas son macrófagos y fibroblastos que se acumulan en el sitio de la inflamación y liberan los factores de crecimiento antes mencionados. Además, liberan quimiocinas y metaloproteasas (MMPs), entre las MMPs más notables se encuentran la MMP-2 y la MMP-9 (Degryse et al 2011, Duivenvoorden et al 1999).

Las células epiteliales bajo la influencia de todas esas señales moleculares participan en el daño a la membrana basal y degradación focal de colágena de tipo IV y laminina que ocasiona la migración de las células hacia el área intersticial (espacio entre las capas de células epiteliales) atraídas por gradientes de factores de crecimiento u otros quimioatrayentes.

Se sabe que las células endoteliales (células que recubren los vasos sanguíneos) pueden sufrir un cambio de fenotipo conocido como transición endotelio mesénquima (TeM) que puede contribuir con la TEM de tipo 2. El desarrollo de la fibrosis se puede volver un proceso patológico, debido a que la participación de la TeM en las microvasculaturas puede inducir el desarrollo una fibrosis cardiaca por la formación de nuevos fibroblastos, por ejemplo. En cultivos de tejidos se ha visto que a través de la vía de señalización de TGF- $\beta$  las células endoteliales de los capilares pueden entrar en TeM y pierden marcadores endoteliales como CD31 y  $\alpha_5\beta_3$  así como la adquisición de marcadores de fibroblastos y miofibroblastos como FSP1,  $\alpha$ -SMA, vimentina y colágeno 1, aunque aún no está muy bien definida la vía de señalización, se sabe que muchas de las moléculas que regulan la TEM juegan un papel importante en la TeM y el desarrollo de fibrosis.

TGF- $\beta$  induce TEM por la vía de señalización de Smad2/3 y participa en la progresión de TEM que induce fibrosis. Utilizando un antagonista de TGF- $\beta$  como la BMP-7, se ha visto que inhibe la vía de TGF- $\beta$  de forma endógena y bloquea la TEM mediada por TGF- $\beta$ . Por otra parte, si se revierte el efecto de TGF- $\beta$ , hay

incremento de E-caderina, una proteína característica de una célula epitelial, y la restauración de los niveles de E-caderina esta mediada por la vía de BMP-7, ya que se activa el receptor de la quinasa parecida a activina-2/3/6 (ALK-2/3/6) y rio abajo el factor de transcripción Smad 4/5. Al inducir BMP-7 puede revertir el proceso de la TEM y reparar el daño producido por la fibrosis en las células epiteliales y se cree que puede ser por la TME. La reversibilidad también se ha asociado a la restauración de la funcionalidad de los tejidos y órganos.

## **Anexo 2. Clasificación de carcinogénicos por la IARC**

Tabla 3. Clasificación de carcinogénicos por la IARC

Grupo 1	Carcinogénico para humanos
Grupo 2A	Probable carcinogénico para humanos
Grupo 2B	Posible carcinógeno para humanos
Grupo 3	No clasificado como carcinogénico para humanos
Grupo 4	Probablemente no carcinogénico para humanos

## **Anexo 3. Gel de integridad de RNA extraído de fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub>**

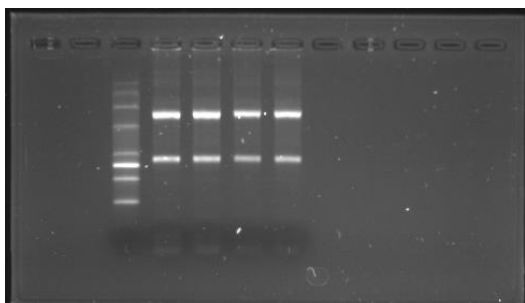


Figura 13. Imagen representativa de gel de integridad de RNA. En el gel de agarosa al 1.5% se cargaron 500 ng de RNA extraído de fibroblastos expuestos a PM<sub>10</sub> en co-cultivo con células epiteliales A549.