



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**El efecto de las partículas contaminantes  $PM_{2.5}$  de la  
Ciudad de México en la diferenciación de monocitos  
humanos en un modelo *in vitro*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ FRANCISCO CRUZ FLORES**



**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. MARTHA TORRES ROJAS**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

- |  |   |
|--|---|
| <p>1. Datos del alumno<br/>Apellido paterno<br/>Apellido materno<br/>Nombre(s)<br/>Teléfono<br/>Universidad Nacional Autónoma de México<br/>Facultad de Ciencias<br/>Carrera<br/>Número de cuenta</p> <p>2. Datos del tutor<br/>Grado<br/>Nombre(s)<br/>Apellido paterno<br/>Apellido materno</p> <p>3. Datos del sinodal 1<br/>Grado<br/>Nombre(s)<br/>Apellido paterno<br/>Apellido materno</p> <p>4. Datos del sinodal 2<br/>Grado<br/>Nombre(s)<br/>Apellido paterno<br/>Apellido Materno</p> <p>5. Datos del sinodal 3<br/>Grado<br/>Nombre(s)<br/>Apellido paterno<br/>Apellido materno</p> <p>6. Datos del sinodal 4<br/>Grado<br/>Nombre(s)<br/>Apellido paterno<br/>Apellido materno</p> <p>7. Datos del trabajo escrito<br/>Título<br/>Subtítulo<br/>Número de páginas<br/>Año 2018.</p> | <p>1. Datos del alumno<br/>Cruz<br/>Flores<br/>José Francisco<br/>5510157688<br/>Universidad Nacional Autónoma de México<br/>Facultad de Ciencias<br/>Biología<br/>311002632</p> <p>2. Datos del tutor<br/>Dra.<br/>Martha<br/>Torres<br/>Rojas</p> <p>3. Datos del sinodal 1<br/>Dra.<br/>María Eugenia<br/>Gonsebatt<br/>Bonaparte</p> <p>4. Datos del sinodal 2<br/>Dr.<br/>René de Jesús<br/>Cárdenas<br/>Vázquez</p> <p>5. Datos del sinodal 3<br/>Dra.<br/>Yolanda<br/>González<br/>Hernández</p> <p>6. Datos del sinodal 4<br/>Dra.<br/>Esmeralda<br/>Juárez<br/>Carvajal</p> <p>7. Datos del trabajo escrito<br/>El efecto de las partículas contaminantes PM<sub>2.5</sub> de la Ciudad de México en la diferenciación de monocitos humanos en un modelo <i>in vitro</i>. 59 p</p> |
|--|---|

## **Dedicatoria y agradecimientos.**

A mis padres, Adriana y Francisco quienes han estado conmigo apoyándome siempre, gracias por enseñarme las cosas básicas de la vida, porque debido a ustedes he llegado a ser lo que soy. Gracias por la comprensión y por la preocupación que en cada momento he recibido de su parte. Gracias por su consejo, siempre invaluable. Este logro también es de ustedes.

A mis hermanos, Jorge e Ismael, quienes siempre me han ayudado y sobre todo han tratado de entenderme. Quienes además de hermanos, también los veo como muy buenos amigos. Sé que hay veces que las cosas se tornan difíciles, pero también sé que siempre contaré con su apoyo.

A mi abuela, que aunque ya no se encuentre con nosotros, espero que se sienta orgullosa en cualquier lugar en donde se encuentre.

A la Dra. Martha Torres Rojas, mi tutora, por aceptarme como su alumno y por su guía durante este trabajo. Gracias por su apoyo, su consejo y su paciencia.

Al QFB. Manuel Salgado por toda la ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Depto. de Investigación en Microbiología del INER, por brindarme su ayuda cada vez que la requerí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi segundo hogar.

A mis amigos Jair, Edgar, Ere, Mario, Melissa, Ale, Mau por todos los momentos, la ayuda y el apoyo.

A Sofía quien siempre me ha brindado un oído, un hombro y una sonrisa. Gracias por estar siempre, en las buenas y malas, por tu comprensión y consejo. Gracias por las palabras de aliento, las risas y aventuras.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b>	3
<b>Resumen</b>	6
<b>1. Marco Teórico</b>	8
<b>2. Introducción</b>	9
2.1 El material particulado.	9
2.2 La respuesta inmune en el sistema respiratorio.	10
2.3 Monocitos.	12
2.4 Macrófagos.	13
2.5 El efecto de las partículas PM <sub>2.5</sub> en células humanas.	16
<b>3. Justificación</b>	17
<b>4. Hipótesis</b>	18
<b>5. Objetivos</b>	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos particulares	18
<b>6. Métodos</b>	18
6.1 Obtención de la muestra biológica.	19
6.2 Muestreo de partículas.	19
6.3 Células y condiciones de cultivo.	19
6.4 Obtención de monocitos.	20
6.5 Prueba de pureza y viabilidad.	21
6.6 Diferenciación de monocitos en presencia de PM <sub>2.5</sub> .	21
6.7 Evaluación de las moléculas de superficie en MDMs expuestos a PM <sub>2.5</sub> .	21
6.8 Estrategia de análisis de la expresión de receptores de membrana analizados en BD FACSDiva Software.	21
6.9 Evaluación de internalización por los MDMs.	24
6.10 Cuantificación de TNF $\alpha$ .	24
6.11 Análisis estadístico.	24
<b>7. Resultados</b>	24
7.1 La exposición a PM <sub>2.5</sub> durante la diferenciación de los MDMs disminuye la muerte celular en MDMs.	24
7.2 La exposición a partículas PM <sub>2.5</sub> afecta la morfología celular de los MDMs.	25
7.3 La exposición a partículas PM <sub>2.5</sub> disminuye la expresión de CD14, CD33 y CD36, y aumenta la expresión de CD206 en MDMs.	27
7.4 La exposición a partículas PM <sub>2.5</sub> durante la diferenciación aumenta el número de moléculas CD206, mientras que disminuye CD14 y CD33.	30
7.5 La exposición a las partículas PM <sub>2.5</sub> induce la producción de una mayor cantidad de TNF $\alpha$ .	33
<b>8. Discusión</b>	34

<b>9. Conclusiones</b>	39
<b>10. Referencias</b>	39
<b>11. Anexos</b>	46

## Abreviaturas.

ABC	ATP binding cassette
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo (Aryl hydrocarbon receptor)
CD	Cluster de diferenciación
cél/mL	Células por mililitro
Cl-	Ion cloro
Co	Cobalto
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono
CPD	Citrato-Fosfato-Dextrosa
CYP1A1	Citocromo P450 1 A1 (Cytochrome P450 1 A1)
CYP2E1	Citocromo P450 2e1 (Cytochrome P450 2e1)
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño ( <i>Damage associated molecular patterns</i> )
DC-SIGN	ICAM específico de células dendríticas no unido a integrinas (Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin)
DEP	Partículas de escape de diesel (Diesel Exhaust Particles)
DNA	Ácido desoxiribonucleico (deoxyribonucleic acid)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidermal. (Epidermal Growth Factor Receptor)
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (Enzyme linked immunoadsorption assay)
F-	Ion fluoruro
Fc	Fracción cristalizable o fracción constante.
FcγR	Receptor de Fc de IgG
Fe	Hierro
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein isotyocianate)
FMOs	Flourescencia menos uno (Flourescence minus one)
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos (granulocytes Colony Stimulating Factor)
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de

	Monocitos y Granulocitos (Granulocytes and Monocytes Colony Stimulating Factor)
ICAM	Molécula de adhesión intracelular (Intracellular adhesion molecule)
IFN $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia.
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratórias
ITIM	Motivos de inmunoreceptor inhibitorios basados en tirosina. (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs)
LBP	Proteína de unión a LPS ( <i>LPS binding protein</i> )
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low Density Lipoprotein)
LPS	Lipopolisacarido
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos ( <i>Microorganism associated molecular pattern</i> )
M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Monocitos (Monocytes Colony Stimulating Factor)
MDMs	Macrófagos derivados de monocitos (Monocyte-Derived Macrophages)
MD-2	Factor de diferenciación mieloide 2 (Myeloid differentiation factor 2)
MHCII	Complejo Principal de Histocompatibilidad clase 2 (Major Histocompatibility Complex Class 2)
Min	Minutos
miR-24	Micro RNA-24
MR	Receptor de manosa (Mannose Receptor)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero (Messenger Ribonucleic Acid)
MyD-88	Proteína de diferenciación mieloide de respuesta primaria 88 (Myeloid differentiation primary response 88)
NF- $\kappa$ Bc	Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas. (Nuclear Factor kappa-light-chain-



	enhancer of activated B cells)
Ni	Níquel
NO <sub>3</sub> -	Nitrato
PAH	Hidrocarburos policíclicos aromáticos ( <i>Polycyclic aromatic hidrocarbon</i> )
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen associated molecular patterns</i> )
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica (Periferic blood mononuclear cells)
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino (Phosphate Buffered Saline)
Pg/mL	Picogramos por mililitro
PI-3 cinasa	Fosfoinositol-3 cinasa (Phosphoinositol-3 kinase)
PM	Material particulado ( <i>Particulate matter</i> )
PM <sub>2.5</sub>	Material particulado fino (<2.5µm)
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (Phorbol 12-myristate 13-acetate)
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (Patterns recognition receptors)
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
ROS	Espécies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SCF	Factor de Células Troncales (Stem Cells Factor)
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ion sulfato
SP	Proteína Surfactante (Surfactant protein)
SRA	Receptor Scavenger A (Scavenger Receptor A)
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming Growth Factor β)
TLR	Receptor tipo Toll (Toll-like receptor)
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa (Tumoral Necrosis Factor alpha)
UAM	Universidad Autónoma Metropolitana
V	Vanadio
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## RESUMEN

**Introducción.** La exposición al material particulado de la atmósfera representa un riesgo para la salud, ya que debido a su composición puede ser de alto grado de toxicidad para el organismo. Se han comprobado sus efectos tóxicos en diferentes tipos celulares, aumentando la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8, IL-12, etc.), responsables de la inflamación local y sistémica, disminuyendo la viabilidad celular y aumentando el tamaño celular. Las vías aéreas son la principal vía de entrada del material particulado, por lo que las células epiteliales, los macrófagos alveolares y los monocitos son las primeras células en entrar en contacto con éste.

Los macrófagos presentan una amplia gama de receptores en su superficie que son utilizados para el reconocimiento de agentes externos y estructuras propias del organismo. Algunas de las moléculas que los macrófagos expresan son CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209, quienes además de desempeñar su función de receptores también nos ayudan a identificar el fenotipo de la célula y determinar la subpoblación a la que pertenece.

La población de macrófagos alveolares es mantenida tanto por progenitores residentes de tejido, como por monocitos reclutados de la circulación. Aunque la diferenciación de monocitos hacia macrófagos alveolares se da en muy baja proporción en homeostasis, al haber una depleción de los macrófagos alveolares son los monocitos quienes se diferencian para mantener la población de macrófagos alveolares en el pulmón. Por lo tanto, es importante conocer el efecto que causa el material particulado en los monocitos, pues su acción permanece sin ser bien entendida aún.

**Objetivo.** Analizar el efecto de la exposición a las partículas PM<sub>2.5</sub> (1 $\mu$ g, 5 $\mu$ g y 10 $\mu$ g) en la expresión de moléculas de CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209 en superficie celular y la producción de TNF $\alpha$  durante la diferenciación de monocitos de sangre periférica a macrófagos de donadores sanos.

**Método.** Se obtuvieron monocitos a partir de paquetes leucocitarios del Banco de sangre del INER, los cuales fueron diferenciados a macrófagos derivados de monocitos (MDMs) en ausencia o con 1 $\mu$ g/mL, 5 $\mu$ g/mL y 10 $\mu$ g/mL de material particulado PM<sub>2.5</sub> durante siete días. Posteriormente, se evaluó la expresión de CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209 en la superficie celular por medio de citometría de flujo. La presencia de partículas dentro de las células fue analizada por medio de microscopía y la producción de TNF $\alpha$  se cuantificó en los sobrenadantes del cultivo mediante la técnica de ELISA.

**Resultados.** La exposición de los monocitos a 10 $\mu$ g/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> incrementa el número de vesículas intracelulares. Asimismo se observó que la exposición a 10 $\mu$ g/mL de PM<sub>2.5</sub> disminuye significativamente la muerte celular en

los MDMs ( $P < 0.005$ ). En adición, la exposición a  $PM_{2.5}$  causó una disminución en la expresión de CD14 ( $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.05$ ), CD33 ( $10\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.05$ ) y CD36 ( $10\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.05$ ) y un aumento en la expresión de CD206 ( $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0.005$ ). La exposición a  $10\mu\text{g/mL}$  además induce la producción de  $TNF\alpha$  en el medio ( $P < 0.005$ ).

Cabe mencionar que los resultados presentaron una tendencia de dosis-dependencia. Sin embargo, sólo se observó diferencia significativa al exponerse a  $10\mu\text{g/mL}$  y en algunos casos a  $5\mu\text{g/mL}$ , aumentando el efecto mencionado conforme al aumento de la concentración de partículas a las que se expusieron las células.

**Conclusión.** La exposición de los monocitos a las partículas  $PM_{2.5}$  durante su diferenciación causa una disminución en la expresión de CD14, CD33 y CD36, quienes funcionan como receptores, lo cual podría proyectarse en una afección negativa en sus propiedades de reconocimiento, causando susceptibilidad del individuo a infecciones. Dicha exposición también causa un aumento en el tamaño de las células, en la presencia de vesículas y la inducción de  $TNF\alpha$ .

## 1. Marco teórico.

Diversos estudios han descrito que la exposición a material particulado  $PM_{2.5}$  induce la producción de citocinas proinflamatorias como  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , etc. en macrófagos (Goto, et. al., 2004; Ohyama, et. al., 2012; Chaudhuri, et. al., 2012; Williams, et. al., 2011). Sin embargo, los estudios se han realizado en ciudades alrededor del mundo, principalmente de China e India, quienes tienen un alto índice de contaminación ambiental en sus grandes ciudades. Más aún, en general se trabaja con células provenientes de animales, líneas celulares o células ya diferenciadas, y expuestas a tiempos cortos (horas) o con concentraciones muy altas de material particulado (hasta  $650\mu g/mL$ ), por lo que no existen trabajos que reflejen el efecto de las partículas  $PM_{2.5}$  en la diferenciación de células humanas. Siendo los monocitos quienes se convertirán en macrófagos alveolares al llegar al pulmón, es importante el estudio del efecto de las partículas, con la composición presente en la Ciudad de México, sobre dichas células y su diferenciación.

La exposición a la contaminación ambiental causó en el 2010, 3.1 millones de muertes alrededor del mundo. También es causa de la reducción de la esperanza de vida (WHO, 2013). El problema va en aumento debido al crecimiento industrial y urbano de las grandes ciudades, en donde aumenta la demanda de energía, productos, vialidades, viviendas y motores que funcionan por medio de la combustión de combustibles fósiles aumentando así los contaminantes presentes en el aire. Dentro de dichos contaminantes se encuentra el material particulado de diámetros aéreos que van desde 0.1 a  $10\mu m$  (compuesto de un componente inorgánico y uno orgánico) y el ozono, los cuales son los dos principales contaminantes al nivel de suelo (Yan, et. al., 2016).

La exposición al material particulado está asociado al aumento en la morbilidad y mortalidad de patologías pulmonares (Goto, et. al., 2004; Zhao, et. al., 2016; Su, et. al., 2017; Williams, et. al., 2011). Así mismo la exposición a material particulado se asocia con el incremento en la admisión hospitalaria (Chaudhuri, et. al., 2012; Rodrigues, et. al., 2017). Dentro de las categorías de material particulado, las partículas  $PM_{2.5}$  muestran mayor toxicidad debido a su multielementariedad, causando por ejemplo, la liberación prematura de células mieloides como monocitos y granulocitos de la médula ósea (Goto, et. al., 2004), además de que pueden alcanzar la parte baja de los pulmones (Rodrigues, et. al., 2017).

Al ser las vías aéreas la principal vía de entrada para el material particulado, éste debe pasar por la mucosa nasal, las vellosidades nasales, etc. antes de llegar al pulmón. Sin embargo, dichas barreras no son completamente impenetrables y es posible que las partículas alcancen los alveolos (Yan, et. al., 2016). Es aquí en donde se encuentran con las primeras células del sistema inmune, los macrófagos

alveolares, que son residentes del pulmón y que serán reemplazados por monocitos provenientes de la circulación, cuando esta población no pueda ser renovada por sus progenitores residentes de tejido (Chaudhuri, et. al., 2012; Misharin, et. al., 2017), y por las células polimorfonucleares, como los neutrófilos, quienes hasta hace un tiempo se creía que eran la principal línea de defensa en contra de los contaminantes (Albright & Glodstein, 1996). En la actualidad se sabe que las células epiteliales también juegan un papel importante en la defensa contra agentes extraños como las partículas.

## **2. Introducción.**

### **2.1 El material particulado.**

El material particulado (PM, por sus siglas en inglés) es el término usado para referirse a la mezcla de partículas sólidas y líquidas (gotas) encontradas en el aire (EPA, 2016), las cuales junto con el ozono representan dos principales contaminantes a nivel de suelo (Yan, et. al., 2016). El PM está constituido principalmente de una parte inorgánica, en donde se pueden encontrar metales de transición (V, Fe, Co, Ni, etc.), iones inorgánicos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ , etc.) y una parte orgánica, en donde se puede encontrar principalmente la endotoxina (lipopolisacárido), esporas, granos de polen e hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, por sus siglas en inglés). Su composición depende de la geografía y la temporada, por lo que son de diferentes tamaños, composición y concentración (Jia, et. al., 2017; Shukla et. al., 2000; Who, 2013; Brook *et. al.*, 2004). El PM se categoriza con base en su diámetro aerodinámico: el PM grueso o  $\text{PM}_{2.5-10}$  que se deposita principalmente en grandes vías aéreas, el PM fino o  $\text{PM}_{2.5}$  ( $>2.5\mu\text{m}$ ) que se deposita a través del tracto respiratorio, particularmente en pequeñas vías aéreas y alveolos, y el PM ultrafino o  $\text{PM}_{0.1}$  que se deposita en alveolos (Yan, et. al., 2016; Lawal, 2017). La inmunotoxicidad del material particulado se relaciona con su sitio de depósito, ya que de eso depende el tipo de células con las que tendrá contacto, y por ende su efecto.

Las partículas pueden ser primarias, emitidas directamente al aire, o secundarias, formadas en la atmósfera a partir de precursores gaseosos. Las partículas primarias pueden provenir de fuentes antropogénicas como la combustión de combustibles (sólidos como biomasa o carbón, o combustibles fósiles como petróleo), procesos industriales (como la construcción, minería y fundición de metales), procesos ligados al tráfico de automotores (como abrasión de frenos y llantas) o actividades humanas (como fumar, agricultura) o de fuentes no antropogénicas, como la erosión del suelo (WHO, 2013; Blaszczyk *et. al.*, 2016).

Debido al cambio en el estilo de vida, la demanda de energía y vehículos motorizados, la exposición a contaminantes va en aumento (Michael, et. al., 2013).

Existe un gran número de estudios epidemiológicos que se enfocan en el estudio de la asociación de la exposición a partículas contaminantes con el incremento de la mortalidad, disfunción pulmonar y síntomas respiratorios (Zhao, et. al, 2016; Yan, et. al. 2016; Michael, et. al., 2013; WHO, 2013). Específicamente se ha demostrado que la exposición a las partículas PM<sub>2.5</sub> está relacionada a la inmunotoxicidad en el sistema respiratorio (Su, et. al., 2017).

Las partículas menores a 10µm de diámetro representan mayor riesgo a la salud, debido a que pueden llegar profundo en los pulmones, y en algunos casos incluso llegar al torrente sanguíneo (EPA, 2016). El sistema respiratorio constituye el blanco primario del material particulado inhalado (Michael, et. al., 2013), el cual, dependiendo de su tamaño y composición puede llegar a representar un riesgo para la salud pulmonar de las personas. La exposición a las partículas PM<sub>2.5</sub> puede modificar la respuesta inmune, haciendo susceptibles a los individuos a infecciones, generando inflamación y daño al tejido.

## **2.2 La respuesta inmune en el sistema respiratorio.**

El sistema inmune desempeña una importante función en el pulmón y en todo el sistema respiratorio, pues es este uno de los sistemas con mayor contacto con el exterior debido a que se encarga de filtrar aproximadamente 8000 a 9000 litros de aire diariamente (Kopf, et. al., 2015). El contacto entre el sistema respiratorio y el aire implica el reconocimiento tanto de agentes inocuos como de agentes que pueden causar daño al sistema. El sistema inmune es el encargado de reconocer agentes internos y externos al cuerpo (discriminar lo propio de lo ajeno), y actuar para mantener la homeostasis en el cuerpo por medio de la respuesta inmune.

Existen dos ramas efectoras principales de la respuesta inmune: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata tiene un tiempo de respuesta corto, pues los mecanismos efectores que la conforman se encuentran presentes sin importar si existe el reconocimiento de algún patógeno o no. Los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata se pueden dividir en una parte física (compuesta por el epitelio, el vello nasal y la mucosa) que funciona como barrera, una parte humoral (compuesta por moléculas como la lisozima, lactoferrina, etc.) con una función antimicrobiana y una parte celular (compuesta por células polimorfonucleares de linaje mieloide y por células mononucleares de linaje mieloide como los monocitos, macrófagos y células dendríticas) el cual se encarga de llevar a cabo el reconocimiento de patrones asociados a microorganismos y patógenos (MAMPS y/o PAMPS) mediante sus receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). A pesar de tratarse de una respuesta rápida, la diversidad de reconocimiento se encuentra limitada a lo codificado en la línea germinal, además de ser considerada una respuesta más antigua que la respuesta adaptativa (Martin & Frever, 2005; Abbas, et. al., 2015; Owen, et. al., 2013).

La inmunidad innata en el pulmón se compone de su estructura ramificada, las barreras de moco, uniones estrechas del epitelio y una abundancia de moléculas antimicrobianas como lisozima, lactoferrina, LL37, proteína surfactante, colectinas y LBP (proteína de unión a LPS). Asimismo, tiene un componente leucocitario, en donde destacan los macrófagos residentes de tejido (~95% macrófagos alveolares), células dendríticas y neutrófilos (~1%), esto en condiciones normales (Martin & Frever, 2005; Whitsett & Alenghat, 2015; Kopf, et. al., 2015).

La respuesta inmune adaptativa o inmunidad adaptativa tarda más en responder a nuevos retos en comparación a la inmunidad innata. Al igual que la respuesta inmune innata, tiene una parte efectora celular (linfocitos T y linfocitos B) y una humoral (constituida por inmunoglobulinas). Los linfocitos T y B tienen una alta especificidad a los antígenos microbianos y no microbianos, ya que exhibe una gran diversidad de reconocimiento. La generación de la diversidad de receptores de esta rama se debe principalmente a la recombinación somática de fragmentos génicos. Las principales células efectoras son los linfocitos, tanto linfocitos T como linfocitos B. A diferencia de la respuesta inmune innata, la adaptativa genera memoria y es capaz de responder de forma específica a un antígeno antes reconocido, concediendo al hospedero inmunidad protectora (Abbas, et. al., 2015; McComb, et. al., 2013; Murphy, et. al., 2009).

En el pulmón, al igual que en el sistema gastrointestinal, la mucosa es la primera en exponerse a diferentes formaciones de microorganismos y material particulado, tanto orgánico como inorgánico, en donde la inmunidad innata juega un papel crítico en la respuesta al PM. Las células epiteliales tienen un papel muy importante en el pulmón, pues contienen el crecimiento de microorganismos mediante el movimiento de fluido y moco por parte de las células ciliadas, que atrapan el material particulado y lo desplazan hacia las vías aéreas superiores (Martin & Frever, 2005).

Cuando ingresa un patrón asociado a patógenos (PAMP), un patrón asociado a microorganismos (MAMP) o un patrón asociado a daño (DAMP), se reconocen por medio de los PRRs (expresados tanto en células epiteliales, como en células del sistema inmune) y se lleva a cabo el reclutamiento de células efectoras del sistema inmune innata en primera instancia, y más tarde del sistema inmune adaptativo (Fig. 1). Las células del sistema inmune requieren de una señalización por medio de moléculas para potenciar o atenuar la respuesta inmune, estas moléculas pueden ser expresadas y/o secretadas por otras células del sistema inmune y por células que no pertenecen al sistema inmune, por ejemplo: la activación de los TLRs promueve la producción de citocinas proinflamatorias ( $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6, etc.) y a su vez el reclutamiento celular, la producción de SP-A y SP-D (Proteína surfactante) promueven la fagocitosis, etc. (Martin & Frever, 2005).

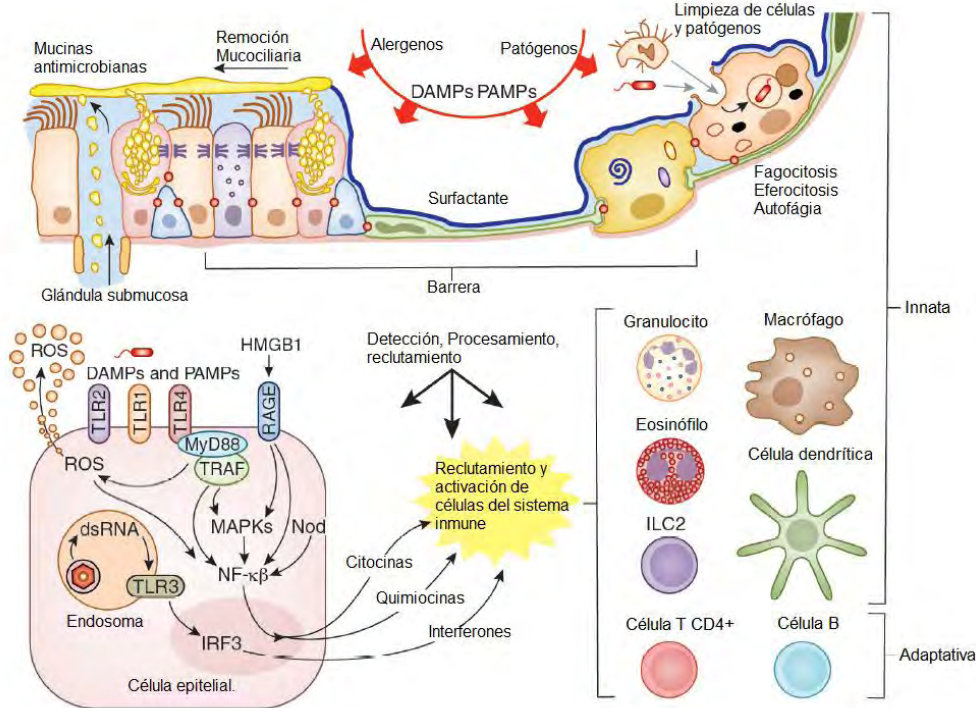


Figura 1. Inmunidad innata en el pulmón. La inmunidad innata en el pulmón está compuesta por un componente físico (barreras), un componente químico (moléculas antimicrobianas, etc.) y un componente celular (macrófagos alveolares, neutrófilos, etc.). La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra agentes extraños en el pulmón. Cuando existe un reconocimiento de patrones por medio de los PRRs se desencadena una respuesta y reclutamiento celular, así como la activación de la respuesta inmune adaptativa. Imagen tomada y modificada de Witsett & Alenghat, 2015.

### 2.3 Monocitos.

Los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Forman parte de la respuesta inmune innata (Abbas *et al.*, 2015), y representan un nexo entre las dos etapas de la respuesta inmune, ya que son células profesionales presentadoras de antígenos (Geissman, *et al.*, 2010). El linaje mielóide (incluidos los monocitos) se produce en el hígado fetal de forma intrauterina y en la médula ósea después del nacimiento a partir de células troncales hematopoyéticas y progenitores comunes. La diferenciación se da por medio de señales intra y extracelulares altamente reguladas (Geissman, *et al.*, 2010; Balandrán, *et al.*, 2017). La diferenciación de las células troncales hematopoyéticas de médula ósea hacia los monocitos maduros sigue un orden jerárquico de estadios intermedios (fig. 2) en donde es necesaria la presencia de GM-CSF (factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos), M-CSF (factor estimulador de colonias de monocitos), G-CSF (Factor estimulador de colonias de granulocitos), IL-3, IL-6 y SCF (factor de células troncales) para pasar de un estadio a otro (Balandrán, *et al.*, 2017; Pollard, 2009).



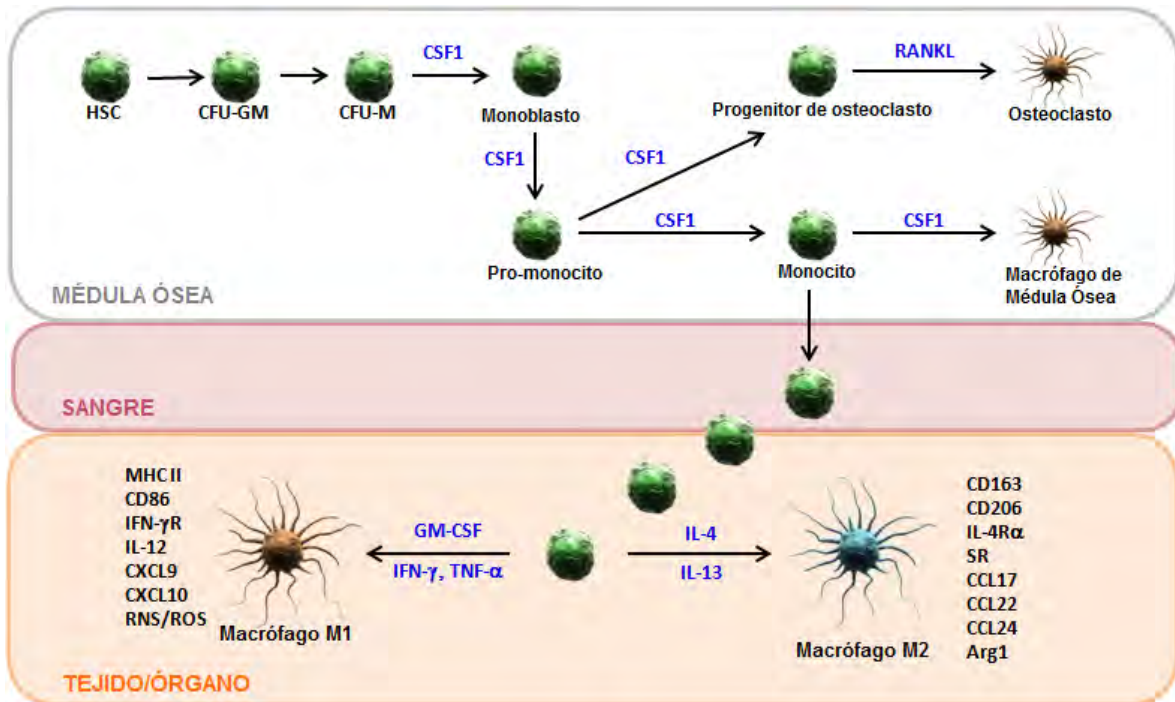


Figura 2. Desarrollo y diferenciación de una célula troncal hematopoyética (HSC) hacia un monocito maduro y posteriormente a un macrófago. La diferenciación se lleva a cabo en la médula ósea (MO) hasta que la célula es un monocito. Posteriormente puede o no salir de la MO hacia el torrente sanguíneo y migrar a algún tejido u órgano para terminar la diferenciación hacia un macrófago. Factor estimulador de colonias 1 (CSF1), unidad formadora de colonias granulo-monocíticas (CFU-GM, por sus siglas en inglés), unidad formadora de colonias monocíticas (CFU-M, por sus siglas en inglés). Imagen tomada y modificada de BioLegend, 2018.

Los monocitos están equipados con receptores de quimiocinas, citocinas y PRRs, que regulan la migración desde la sangre a los tejidos en respuesta a un proceso inflamatorio (Geissman, et. al., 2010). Permanecen en circulación 21 días, en donde participan como efectores de la respuesta inmune o pueden migrar a algún tejido para concluir su diferenciación hacia macrófagos. En circulación se pueden distinguir tres subpoblaciones de monocitos con base en el nivel de expresión de CD14 y CD16: los clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>), y los no clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). Además de la expresión heterogénea de otros marcadores, pues estos poseen un transcriptoma extremadamente diverso (Ziegler-Heitbrock, et. al., 2010; Chow, et. al., 2011).

## 2.4 Macrófagos

Los macrófagos son células residentes de tejido linfóide y no linfóide, involucrados en generar un estado de homeostasis en los tejidos por medio de la limpieza de células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento (Geissman *et. al.*, 2010; Chow, et. al., 2011). Están equipados con receptores de reconocimiento de patógenos que hacen más eficiente su capacidad de fagocitosis e inducen la producción de citocinas inflamatorias (Gordon, 2002). Son heterogéneos, en cuanto a su especialización en microambientes particulares.

Tienen diferente nombre según su localización en tejido como osteoclastos (en huesos), macrófagos alveolares (en pulmón), células de Kupffer (en hígado), etc. (Italiani y Boraschi, 2014). Estas células pueden adquirir capacidades funcionales especiales dependiendo de los estímulos a los que se exponen. Algunas citocinas producidas por subpoblaciones de linfocitos T activan a los macrófagos por la vía clásica (proinflamatorios o M1), mientras que otras citocinas los activan por la vía alternativa (antiinflamatorios o M2) (Abbas *et. al.*, 2015). La principal diferencia entre estas células es que en las M2 en el metabolismo de la arginina ésta se cambia hacia ornitina y poliaminas, mientras que en las M1 la arginina se convierte a citrulina y a óxido nítrico (Mills, 2012), así como se representa en la figura 3.

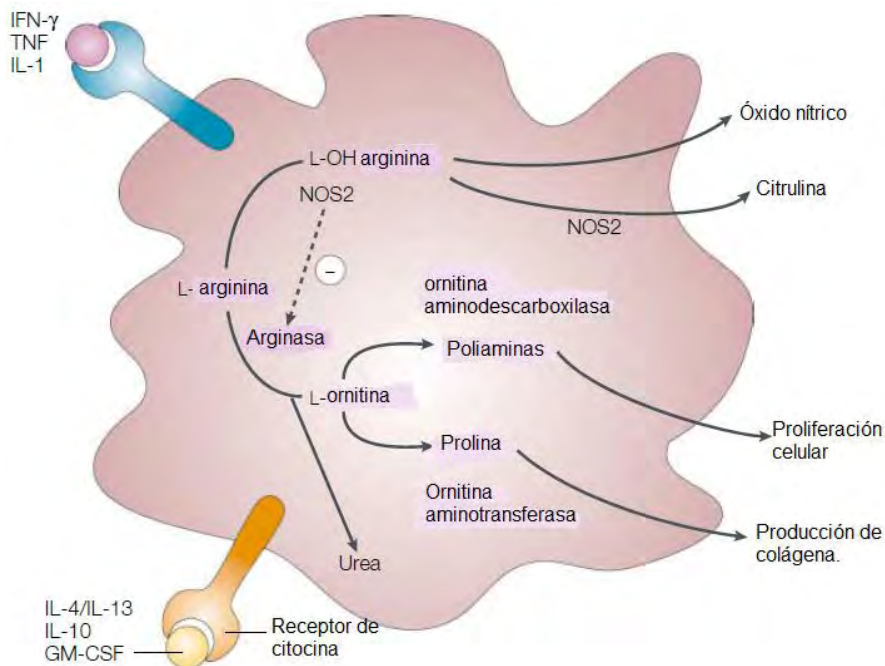


Figura 3. Metabolismo de la L-arginina en los macrófagos al recibir un estímulo de citocinas (IFN $\gamma$ , TNF, IL-1, GM-CSF, IL-10, IL-4 y/o IL-13). La polarización de los macrófagos hacia su fenotipo M1 ó M2 es dependiente de los estímulos que la célula reciba. El estímulo dado por la IL-10, IL-4, IL-13 y/o GM-CSF causa la polarización hacia el fenotipo M2, mientras que el estímulo por IFN $\gamma$ , TNF y/o IL-1 propicia la polarización hacia el fenotipo M1. Imagen tomada y modificada de Gordon, 2003.

Las células polarizadas expresan marcadores diferencialmente, dependiendo de si se trata de M1 o M2. Las células M1 expresan moléculas de MHCII, CD14 y producen TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 y otras citocinas proinflamatorias (Gordon, 2003), mientras que las células M2 expresan receptores de manosa, CD23, CD163, CD206 y producen IL-10 y TGF $\beta$ . La polarización de los macrófagos se puede llevar a cabo de forma *in vitro*. Se pueden utilizar LPS, IFN- $\gamma$  y PMA para polarizar hacia M1, mientras que para llevar a cabo la polarización hacia M2 se puede utilizar IL-4, IL-13 y M-CSF (Magatti *et. al.*, 2017; Chimal-Ramírez *et. al.*, 2016; Moganti *et. al.*, 2017).

Los macrófagos expresan moléculas en la superficie celular, que pueden ser usadas para la identificación inmunofenotípica de subpoblaciones celulares, entre las moléculas más importantes están:

- CD14. Es una proteína mielóide-específica rica en repeticiones de leucina muy abundante en monocitos y macrófagos (Meng, et. al., 2008). Esta molécula es considerada como un receptor de reconocimiento de patrones (PRR), pues tiene la capacidad de reconocer PAMPs, DAMPs o MAMPs. Sin embargo, se le involucra más con el reconocimiento de LPS, en el que participan otras moléculas como LBP, MD-2, MyD-88 y TLR-4 (Martin & Frevert, 2005).
- CD16. Esta molécula pertenece a una familia de glicoproteínas de membrana que presentan afinidad a la fracción Fc de los IgG llamada Fc $\gamma$ R y están ampliamente distribuidas en las células hematopoyéticas (Li, et. al., 2007). En específico, CD16 (Fc $\gamma$ R III) presenta baja afinidad a IgG por lo que se compromete solo con complejos antígeno-anticuerpo, lo que asegura una apropiada señalización en condiciones fisiológicas (Bournazos, Wang & Ravetch, 2016).
- CD33. Es perteneciente a la familia de las lectinas parecidas a inmunoglobulinas de unión a ácido siálico (siglecs, por sus siglas en inglés). Está presente en células inmunes como progenitores mieloides y monocitos. Tiene función inhibitoria gracias a que posee un motivo ITIM en su parte citoplasmática (Cao & Crocker, 2010; Brinkman-Van der Linden, et. al., 2003). El gen que codifica para esta proteína se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 19 en humanos y aunque también existe esta molécula en el ratón, su ligando es diferente al del ser humano (Peiper, et. al., 1988; Brinkman-Van der Linden, et. al., 2003).
- CD36. Es un receptor de ácidos grasos de alta afinidad que facilita la red de consumo de ácidos grasos por el músculo y tejido adiposo. Se expresa ampliamente en varios tipos celulares como: plaquetas, células del sistema inmune, adipocitos, miocitos, enterocitos, células enteroendócrinas, etc. (Pepino, et. al., 2014). Tiene acciones inmunometabólicas, pues su señalización puede involucrar rutas relacionadas a angiogénesis, inflamación y aterosclerosis (Pepino, et. al., 2014; Cifarelli, et. al., 2017).
- CD163. Pertenece a la super familia de los receptores scavenger (basureros) ricos en cisteína clase B, también llamado M130, PI55 o receptor scavenger de hemoglobina. Es expresado por el linaje de los monocitos y macrófagos, con abundante expresión en macrófagos residentes de tejido (Onofre, et. al., 2009). Se cree que tiene un papel regulatorio en la eritropoyesis. Asimismo, se ha observado que disminuye la inflamación sistémica y participa en la inducción de tolerancia y la regeneración tisular (Moestrup & Moller, 2004). Es una molécula que sirve para identificar la subpoblación M2c de los macrófagos, quienes tienen acción antiinflamatoria y pro-fibrótica (Olmes, et. al., 2016).

- CD206. También conocido como MR (receptor de manosa, por sus siglas en inglés). Fue reconocido inicialmente como un receptor involucrado en la limpieza de glicoproteínas endógenas. Está constituida por una parte extracelular conformada por un dominio rico en cisteína, un dominio que contiene repeticiones de fibronectina tipo 2 y múltiples dominios de reconocimiento de carbohidratos parecidos a lectinas tipo C, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática corta (Taylor, et. al., 2005). Esta molécula es capaz de llevar a cabo reconocimiento y está involucrada en la internalización de varios antígenos y patógenos (Izumi, et. al., 2017; Op den Brouw, et. al., 2009; Taylor, et. al., 2005).
- CD209. Conocida también como DC-SIGN, es una molécula de membrana perteneciente a la familia de las lectinas tipo C. Tiene la capacidad de reconocer diferentes ligandos carbohidratos y glicoproteínas incluyendo estructuras ricas en manosa y glicoproteínas de superficie de patógenos como algunas de VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, virus del ébola, *Candida albicans* y virus de hepatitis C por medio de interacciones dependientes de oligomanosa (Bournazos, Wang & Ravetch, 2016; Pederson, Mitchell & Prestegard, 2014; Manzo, et. al., 2012). Se localiza tanto en células dendríticas mieloides, como en subpoblaciones de macrófagos (Manzo, et. al., 2012).

## 2.5 El efecto de las partículas PM<sub>2.5</sub> en células humanas.

La exposición al material particulado se ha asociado a problemas de salud en el ser humano debido a los efectos tóxicos resultantes de su interacción con las células, ya sean epiteliales o sanguíneas. Dicho efecto puede ir desde un cambio en la morfología celular, hasta cambios en la expresión de genes.

Las partículas modifican la morfología celular de los macrófagos, incrementando el tamaño de las células y disminuyendo la cantidad de mitocondrias en la célula (Zhao, et. al., 2016). Aumentan la producción de las especies reactivas de oxígeno y la activación de NF-κB, que induce la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias (Yan, et. al., 2016; Huang, et. al. 2009; Franzi, et. al., 2017). Inducen la expresión de genes codificantes para proteínas pertenecientes a la familia del citocromo P450, como CYP1A1 y CYP2E1 (Cavanagh, et. al., 2009; Saint-George, et. al., 2008).

Por otro lado, se ha observado que las PM<sub>2.5</sub> tienen un efecto en la estructura de la membrana celular y en la mitocondrial en células epiteliales (Gualtieri, et. al., 2009). Causan la activación de EGFR (Receptor de factor de crecimiento epidermal), lo cual puede causar vasoconstricción en las vías aéreas (Yan, et. al., 2016) y un aumento en la expresión de mediadores de la inflamación como IL-1, IL-6, IL-8, TNFα (Jia, et. al., 2017). En los macrófagos la exposición a PM<sub>2.5</sub> causa un aumento de mRNAs correspondientes a la familia del citocromo P450, quienes

son proteínas encargadas de la inactivación de compuestos que pueden resultar tóxicos para la célula (Billet, et. al., 2007).

Así mismo, se ha estudiado el efecto de las partículas  $PM_{2.5}$  en otros tipos de células, en su mayoría líneas celulares en donde hay diferentes extensiones de daño causado por las  $PM_{2.5}$ . Sin embargo, el efecto de dichas partículas en muchas de las células está relacionado a estrés oxidante e inflamación (Jia, et. al., 2017).

### **3. Justificación.**

Se ha comprobado que dentro de las causas de enfermedades respiratorias se encuentra la exposición al material particulado del ambiente atmosférico, el cual puede provenir de diferentes fuentes. Sin embargo, el efecto que este material causa en la salud, y específicamente en células del sistema inmune como los macrófagos aún no se ha estudiado en su totalidad (Zhao, et. al., 2016), por lo tanto es importante generar este conocimiento, en especial en células primarias correspondientes al sistema inmunitario. Debido a que el material particulado ingresa al cuerpo humano por medio de vías aéreas y pueden llegar a ser capaces de pasar a la sangre periférica dependiendo de su tamaño, las primeras células que tienen contacto con éste, además de las células epiteliales, son los macrófagos alveolares y, según sea el caso, los monocitos de sangre periférica.

Los estudios que han tratado de esclarecer el efecto del material particulado  $PM_{2.5}$  en humanos utilizan células ya diferenciadas o de líneas celulares, o en dado caso, en el modelo experimental la exposición a dichas partículas es en un tiempo corto (horas) y con concentraciones de  $PM_{2.5}$  altas (hasta  $650\mu\text{g/mL}$ ), por lo que es importante conocer el efecto de las  $PM_{2.5}$  durante la diferenciación y con una exposición a concentraciones menores, ya que esto reflejaría la exposición a  $PM_{2.5}$  en un habitante común de la Ciudad de México quien en 2016 se exponía a un promedio anual de  $23\mu\text{g/m}^3$  de  $PM_{2.5}$  (Secretaría del medio ambiente de la Ciudad de México, 2017).

Se sabe que la exposición de macrófagos a partículas  $PM_{2.5}$  causa un aumento en la muerte celular y cambios morfológicos en las células, como el aumento de tamaño y disminución del número de mitocondrias. Asimismo, induce la producción de citocinas proinflamatorias, de especies reactivas de oxígeno y causa inflamación en los tejidos. Sin embargo, poco se sabe del efecto que tiene en la diferenciación de éstas células y en la expresión de moléculas de superficie importantes para llevar a cabo su función, por lo que resulta de interés el estudio de los macrófagos expuestos a  $PM_{2.5}$  durante su diferenciación y el impacto que tienen las  $PM_{2.5}$  en CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209, quienes son receptores importantes para el desempeño de los macrófagos.

#### **4. Hipótesis.**

La exposición a partículas  $PM_{2.5}$  de la atmósfera de la Ciudad de México ( $1\mu\text{g/mL}$ ,  $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$ ) durante la diferenciación de monocitos a macrófagos inducirá la muerte celular y la producción de  $TNF\alpha$ . Así mismo, inducirán una expresión diferencial de CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209 en la superficie de los macrófagos con respecto a las células diferenciadas sin exposición.

#### **5. Objetivos.**

##### **5.1 Objetivo general.**

Analizar el efecto de las partículas  $PM_{2.5}$  de la Ciudad de México ( $1\mu\text{g/mL}$ ,  $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$ ) en la viabilidad, la expresión de moléculas de superficie y la producción de  $TNF\alpha$  durante la diferenciación de monocitos de sangre periférica de donadores sanos a macrófagos.

##### **5.2 Objetivos particulares.**

- Identificar la presencia de las partículas en los macrófagos derivados de monocitos (MDMs) expuestos a  $1\mu\text{g/mL}$ ,  $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$  durante su diferenciación (Internalización).
- Analizar la viabilidad de los macrófagos después de la exposición a las partículas durante su diferenciación.
- Analizar la expresión de CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209 en la superficie de los MDMs expuestos a partículas  $PM_{2.5}$ .
- Cuantificar la producción del  $TNF\alpha$  en los sobrenadantes de monocitos diferenciados durante 7 días en presencia de partículas.

#### **6. Métodos.**

##### Reactivos

Medio de cultivo Rosswell Park Memorial Institute (RPMI, Lonza N. Cat. 12167-Q), L-Glutamina (200mM), suero humano inactivado por calor (HyClone, Logan, UT), Amortiguador de Fosfatos Salino (PBS, Lonza N. Cat. 17-S16Q), Solución Separadora de Linfocitos (Lonza N. Cat. 17-829E), colorante de Wright (Sigma-Aldrich N. Cat. WS16-500ML, Azul de tripano (Gibco, N. Cat. 15250-061), Solución de lavado FACS (PBS+ Azida de sodio 0.1%+ Suero fetal bovino 2%), Green-fluorescent reactive dye (1:10, Invitrogen N. Cat. L23101), medio de montaje (mezcla de isómeros), Suero fetal bovino (HyClone, N. Cat. SH30071.03), Superblock (Pierce, N. Cat. 37515), Solución de lavado para ELISA (PBS /0.01M, pH 7.2; Tween-20 al 0.05%), solución de dilución de anticuerpos (PBS 0.01M, pH

7.2; Tween20 al 0.05%, BSA 2%) y solución amortiguadora para el sustrato de fosfatasa (Dietanolamina 1M, MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, pH 9.8).

### **6.1 Obtención de la muestra biológica.**

Los paquetes leucocitarios utilizados fueron proporcionados por el banco de sangre del INER (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias). Existen criterios de inclusión para los donadores como no padecer hipertensión arterial, no padecer diabetes, haber mantenido 12 horas de ayuno previo a la donación, no haber ingerido bebidas alcohólicas 72 horas antes de la donación. La sangre obtenida de la donación es centrifugada para concentrar las células y posteriormente se deposita en una bolsa con CPD (citrate fosfato dextrosa) como anticoagulante. Todas las muestras obtenidas para el procedimiento provinieron de donantes masculinos de entre 25 y 51 años (n=7).

### **6.2 Muestreo de Partículas.**

Se tomaron muestras de material contaminante atmosférico mixto urbano (PM) durante dos años en la estación de monitoreo de Iztapalapa en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-Iztapalapa) que se encuentra en el sureste de la Ciudad de México, la zona metropolitana más grande del continente americano. Para la obtención de las PM<sub>2.5</sub> se utilizaron muestreadores de gran volumen (Tisch TE6070V, Roswell, GA, EE. UU.) con un caudal de aire de  $1.13 \text{ m}^3\text{min}^{-1} \pm 10\%$  para obtener cantidades adecuadas de PM<sub>2.5</sub> en las membranas de nitrocelulosa modificadas. Las muestras de PM se recuperaron de las membranas en forma mecánica y se agruparon por mes, lugar y tamaño de partícula, agrupandolas en muestras anuales a granel de PM<sub>2.5</sub>. Una vez que se recuperaron de las membranas, las PM se conservaron a 4 °C en viales de vidrio horneado en oscuridad, en un desecador. Antes de utilizarlas en los experimentos *in vitro*, las PM se pesaron en una balanza de precisión, fueron esterilizadas por medio de calor húmedo para posteriormente preparar soluciones stock de 1 mg/ml. La suspensión de PM en medio de cultivo se homogeniza con ultrasonidos durante 2 minutos antes de usarse.

### **6.3 Células y condiciones de cultivo.**

A menos que se especifique lo contrario, las condiciones de cultivo celular fueron a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, MD) suplementado con 10% de suero humano inactivado (Hyclone, Logan, UT) y 2mM de L-glutamina.

#### 6.4 Obtención de monocitos.

A partir de los paquetes leucocitarios del banco de sangre del INER se procedió a diluir 100mL de la muestra 1:2 con medio RPMI 1640. Se agregó Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo Norway), y se centrifugó a 1200rpm durante 45 minutos a temperatura ambiente. Con ayuda de una pipeta de transferencia (Corning, NY, USA) se recuperó el anillo de la interfase que contiene las PBMCs (Células mononucleares de sangre periférica; Fig 4). Los monocitos fueron purificados por medio de adherencia en placas Petri (Corning, NY, USA), cultivando las PBMCs por placa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante una hora para su adherencia (60-80x10<sup>6</sup> PBMCs/placa), una vez pasado este tiempo los monocitos fueron colectados. El rendimiento fue de 3.2x10<sup>7</sup> células. Los monocitos obtenidos fueron cultivados durante 24 horas en una placa de 24 pozos a 2x10<sup>6</sup> cél/mL (1mL por pozo; **Anexo A**).

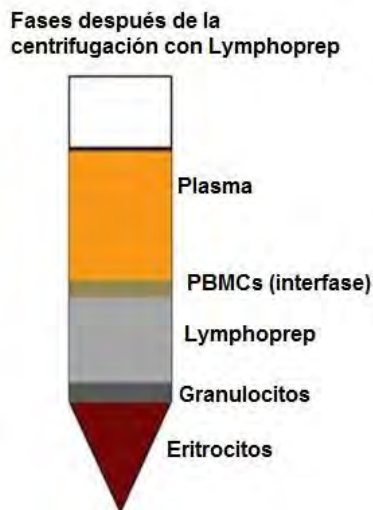


Figura 4. Representación de las diferentes fases obtenidas al centrifugar sangre con Lymphoprep. Posterior a la centrifugación de la sangre, sus componentes se separan de acuerdo a su densidad. Los componentes con mayor densidad se agrupan en el fondo y los de menor densidad en la superficie. Tomada y modificada de <https://www.slideshare.net/shikshachoytoo/blood-concentration-methods>



### **6.5 Prueba de pureza y viabilidad.**

Los monocitos obtenidos fueron teñidos con una sonda de viabilidad (Green-fluorescent reactive dye (1:10, Invitrogen N. Cat. L23101)) y utilizando anticuerpos anti-humano para detectar las células CD14+, CD3+ y CD4+. Las células fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACSAria Fusion, BD Biosciences, EUA) incluyendo FMOs como controles (se adquirieron 100 000 eventos). Los datos de la fueron analizados con el software BD FACSDiva. La pureza en promedio fue del 61.63%, mientras que la viabilidad siempre fue >90% (ver **Anexo A**).

### **6.6 Diferenciación de monocitos en presencia de PM<sub>2.5</sub>**

Los monocitos se expusieron a tres concentraciones de partículas: 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL, como control negativo se utilizaron monocitos sin estímulo (llegando a un volumen de 2mL por pozo) durante seis días, en los cuales permanecieron en cultivo. Después, las células adquirieron la morfología de macrófagos y fueron llamados MDMs (ver **Anexo A**). La exposición se realizó 24 horas después de la obtención de los monocitos.

### **6.7 Evaluación de las moléculas de superficie en MDMs expuestos a PM<sub>2.5</sub>.**

Una vez pasados los seis días de la exposición a las partículas, las células fueron cosechadas y contadas en una cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania), revisando su viabilidad con el colorante de exclusión azul tripano. Se les realizó una tinción de superficie para citometría de flujo con una sonda de viabilidad (Green-Fluorescent Reactive dye) y anticuerpos anti-CD14 acoplado a PETxRed, anti-CD16 acoplado a BV510, anti-CD33 acoplado a APC, anti-CD36 acoplado a PE, anti-CD163 acoplado a PerCP/Cy5.5, anti-CD206 acoplado a APC/Cy7 y anti-CD209 acoplado a PE/Cy7. Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo (FACSAria Fusion) incluyendo FMOs como controles (100 000 eventos). Los datos obtenidos fueron analizados con el software BD FACSDiva. No existe diferencia significativa entre la viabilidad evaluada por medio de azul tripano y por citometría de flujo. (ver **Anexo A**).

### **6.8 Estrategia de análisis de la expresión de receptores de membrana analizados en BD FACSDiva Software.**

Primero se realizó una gráfica de puntos (Dot plot) de Forward Scatter en el eje de las abscisas, contra Side Scatter en el eje de las ordenadas, es decir, tamaño contra granularidad. En esta gráfica se seleccionaron únicamente las células, descartando cualquier fragmento de membrana, o bien partícula libre. A partir de esta selección, se hizo una gráfica de tamaño o Forward Scatter (área vs altura),

en la cual se seleccionaron mediante el tamaño a las células individuales. Posteriormente, se realizó otra gráfica a partir de la selección anterior, graficando Side Scatter (área vs altura), en la cual se realizó una selección de las células individuales con base en su granularidad.

Una vez seleccionadas las células individuales, se seleccionaron las células vivas en el canal de FITC. Se tomaron como células vivas a las que resultaron negativas para FITC. Posteriormente, se seleccionaron las células CD14+, y a partir de esta última selección se seleccionaron las poblaciones positivas para CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209 (las regiones fueron establecidas con ayuda de los controles FMOs). Se tomaron los porcentajes de células positivas de cada molécula, así como la intensidad media de fluorescencia (MIF; Fig. 5).

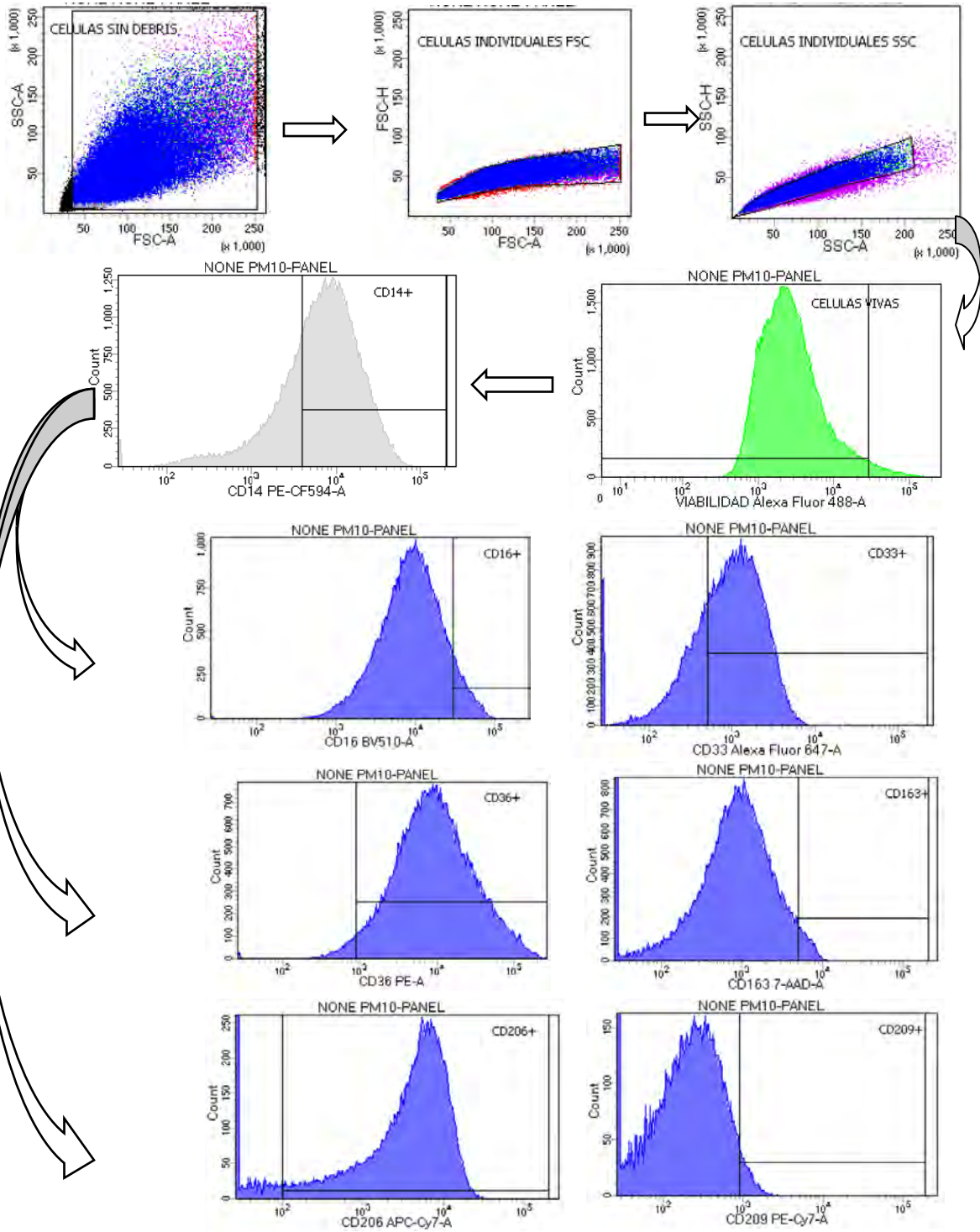


Figura 5. Representación del procedimiento para la selección de poblaciones positivas para CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209. En los histogramas se representa el punto a partir de donde se considera la población positiva de cada molécula (el porcentaje de células tomado como positivo en los FMOs fue restado al porcentaje al final).

## **6.9 Evaluación de internalización de PM<sub>2.5</sub> por los MDMs.**

Se realizaron preparaciones de los MDMs en portaobjetos utilizando la técnica de citocentrifugación, ajustando antes la suspensión celular a  $1.25 \times 10^5$  cél/mL. Posteriormente las células se fijaron con metanol y se realizó la tinción de Wright para llevar a cabo un conteo celular (un total de 300 células por condición) en un microscopio fotónico (Axio Lab.A1, Zeiss, Göttingen, Alemania) y determinar la presencia de partículas intracelulares (ver **Anexo A**).

## **6.10 Cuantificación de TNF $\alpha$**

La cuantificación de TNF $\alpha$  se llevó a cabo por medio de un ELISA del tipo “Sandwich” en una placa de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc, ThermoFisher, EUA) utilizando 50 $\mu$ L de los sobrenadantes del cultivo de los MDMs en ensayos por duplicado. La absorbancia obtenida fue interpolada en una curva estándar de TNF recombinante (Endogene, STNFA-50).

(ver **Anexo A**).

## **6.11 Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos tanto del Software BD FACSDiva, como de los conteos celulares por microscopía y los datos obtenidos de la cuantificación de TNF $\alpha$  fueron analizados en el software GraphPad Prism 7. Se realizó una prueba de Friedman con un alpha de 0.05 y tomando como significancia  $P < 0.05$ , la cual nos permitió saber si existe una diferencia significativa entre las diferentes condiciones de cultivo probadas en este trabajo. Posteriormente, se realizó una prueba de Dunn’s con un alpha de 0.05 y tomando como significancia  $P < 0.05$ , que nos permitió conocer las condiciones en las que existe diferencia significativa. En el caso de la cuantificación de TNF $\alpha$ , antes de realizar la prueba de Friedman se realizó una regresión lineal para interpolar los valores de absorbancia de las muestras dentro de la curva estándar.

## **7. Resultados.**

### **7.1 La exposición a PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación de los MDMs disminuye la muerte celular en MDMs.**

En reportes anteriores se ha observado que la exposición a PM<sub>2.5</sub> aumenta la muerte de las células, por lo que se decidió comprobar la viabilidad de los MDMs para asegurarnos de que las células con las que se trabajaron estuvieran vivas. La evaluación de la viabilidad celular posterior a la exposición de las partículas PM<sub>2.5</sub> se llevó a cabo mediante citometría de flujo, debido a que es una herramienta que

nos permite analizar un mayor número de células y de forma más rápida que la microscopía.

Los resultados muestran que la exposición a  $PM_{2.5}$  en el intervalo de 1-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no disminuye o afecta la viabilidad celular de los MDMs, mientras que la exposición a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $PM_{2.5}$  disminuye significativamente la muerte de los MDMs con respecto a los MDMs que fueron diferenciados en ausencia de las partículas (Fig. 6).

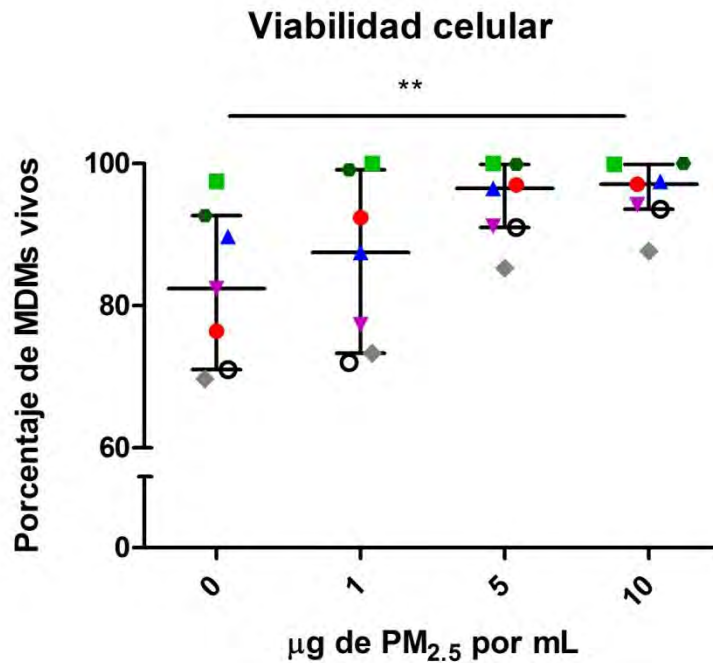


Figura 6. La exposición a 10  $\mu\text{g}$  de  $PM_{2.5}$  durante la diferenciación celular disminuye la muerte de los MDMs. Viabilidad celular de MDMs expuestas a 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $PM_{2.5}$  durante su diferenciación. La viabilidad se determinó con una sonda de viabilidad (Green-fluorescent reactive dye) mediante citometría de flujo. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil ( $n=7$ ). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*\*  $P<0.005$

## 7.2 La exposición a partículas $PM_{2.5}$ afecta la morfología celular de los MDMs.

En el trabajo de Zhao, et. al. se observó que la exposición de macrófagos a  $PM_{2.5}$  induce cambios morfológicos de las células. Por lo tanto, se hizo el análisis de las células expuestas a  $PM_{2.5}$  utilizando microscopía óptica, ya que esta permitió observar tanto la morfología de las células como la presencia de partículas en su interior.

En los MDMs que fueron expuestos a  $PM_{2.5}$  se observaron partículas en el citoplasma, y en muchos casos internalizan más de una partícula (Fig. 7 B, D). Además, los MDMs expuestos a  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  de partículas son morfológicamente diferentes a las células que no se expusieron a las partículas (Fig. 7 A, C), ya que éstas presentan un alto número de vacuolas en su citoplasma (Fig. 7 B, D).

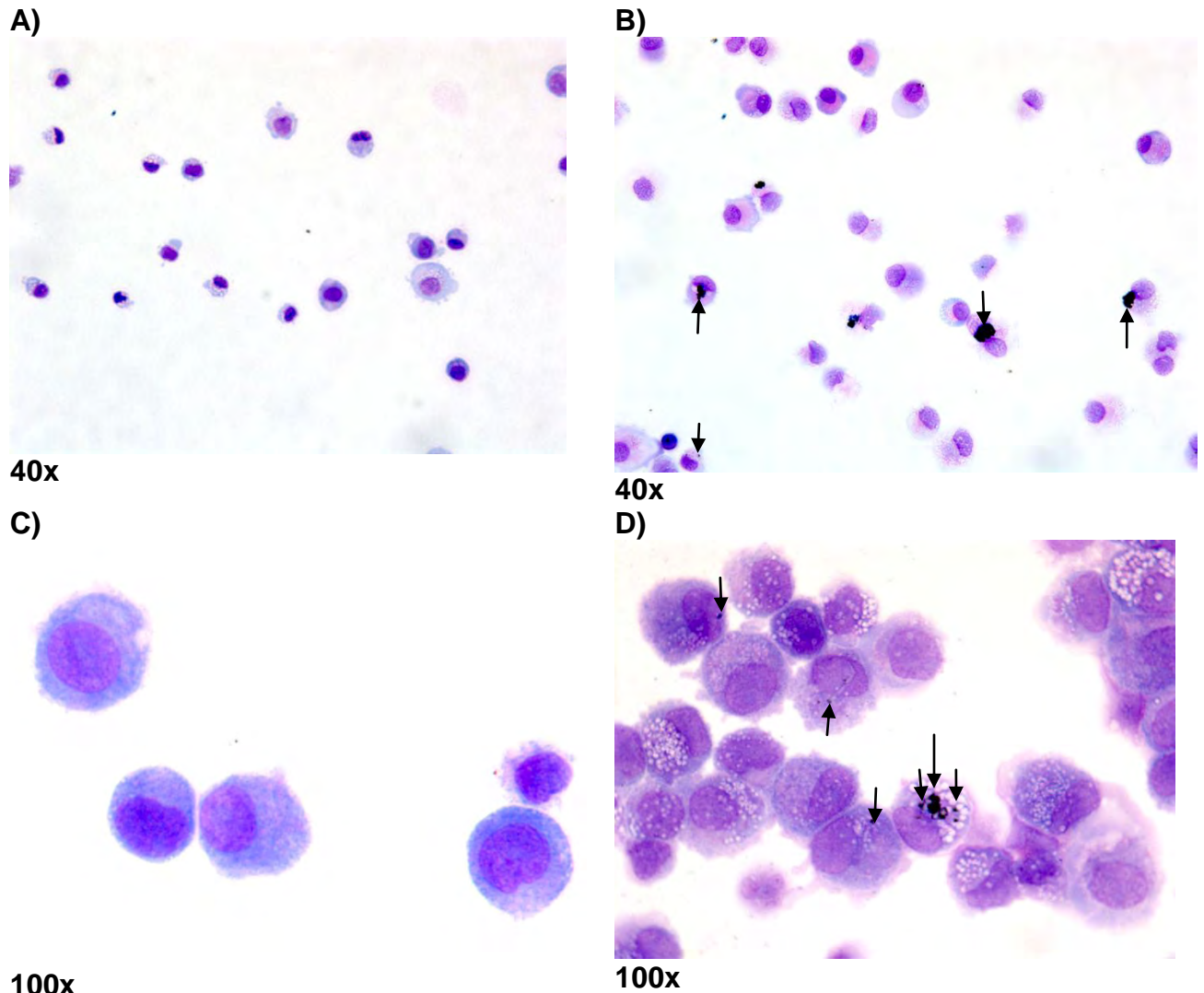
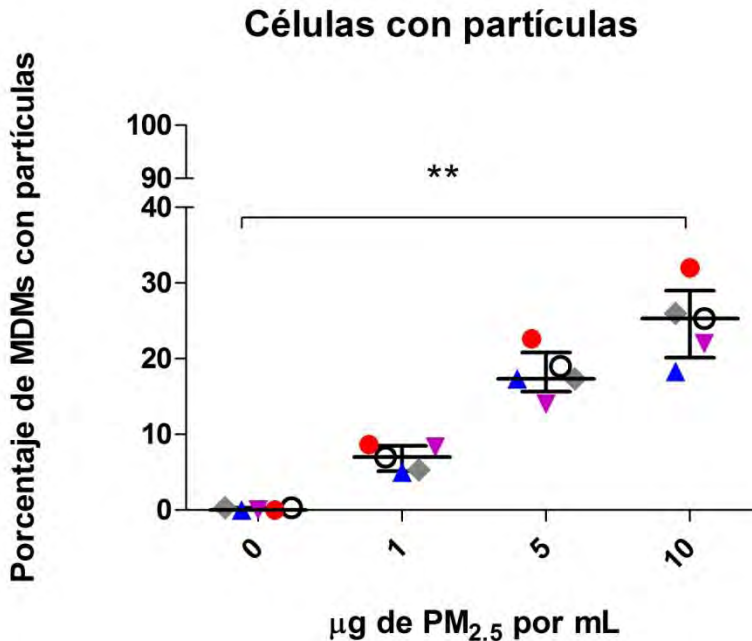


Figura 7. Imágenes morfológicas de MDMs expuestos a  $0\mu\text{g}/\text{mL}$  (A, C) y  $10\mu\text{g}/\text{mL}$  (B, D) de partículas  $PM_{2.5}$  durante su diferenciación. Las imágenes fueron tomadas a un aumento de 40x (A, B) y 100x (C, D) en un microscopio fotónico. Las flechas señalan la presencia de partículas al interior de las células.

Al realizar el conteo de partículas en las células expuestas a las partículas PM<sub>2.5</sub>, se observa que el incremento de la concentración de partículas presente durante la diferenciación celular produce un aumento en el número de células con



partículas en el citoplasma, exhibiendo una tendencia dosis-dependiente, en donde sólo existe diferencia significativa entre el grupo control y las células expuestas a 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> (Fig. 8).

Figura 8. Internalización de partículas por MDMs expuestos a 0µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación. La presencia de partículas en las células fue evaluada contando 300 células por condición por medio de microscopía óptica a un aumento de 100x. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil (n=5). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*\* P<0.005.

### 7.3 La exposición a partículas PM<sub>2.5</sub> disminuye la expresión de CD14, CD33 y CD36, y aumenta la expresión de CD206 en MDMs.

Poco se sabe acerca del efecto de las partículas PM<sub>2.5</sub> en la expresión de los receptores de superficie de los macrófagos por lo que se decidió analizar la proporción de MDMs que se ven afectados en la expresión de CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209. El análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo, ya que con esta técnica es posible realizar el análisis de todas las moléculas simultáneamente.

La exposición a 5µg/mL y 10µg/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación de monocitos disminuye significativamente en el porcentaje de MDMs que expresan CD14 en su superficie (Fig. 9 (A)) en comparación con los MDMs diferenciados en

ausencia de partículas (de 42% a 31% y 33% respectivamente;  $P < 0.05$ ). La exposición a  $10\mu\text{g/mL}$  de partículas  $\text{PM}_{2.5}$  durante la diferenciación de los MDMs causa una disminución significativa en la proporción de células que expresan CD33 en comparación con las células diferenciadas en ausencia de  $\text{PM}_{2.5}$ , como se muestra en la figura 9 (B), en donde la disminución va de 90% a 80% ( $P < 0.005$ ). Además, la exposición a  $10\mu\text{g/mL}$  de partículas  $\text{PM}_{2.5}$  durante la diferenciación celular causa también una disminución significativa en la proporción de células que expresan CD36 (fig. 9 (C)) con respecto a las células sin dicha exposición (de 94% a 83%,  $p < 0.05$ ); en estos dos últimos casos, se observa una tendencia dosis-respuesta a la exposición de  $\text{PM}_{2.5}$ . Por otro lado, la exposición de las células a  $10\mu\text{g/mL}$  de partículas  $\text{PM}_{2.5}$  durante su diferenciación causa un incremento significativo en la proporción de células que expresan CD206 en la superficie (Fig. 10 (A)), el cual va de 88% a 94% ( $P < 0.005$ ). La exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  no causa un efecto en el porcentaje de MDMs que expresan CD16 (Fig.9 (D)), CD163 (Fig.10 (B)) y CD209 (Fig.10 (C)).



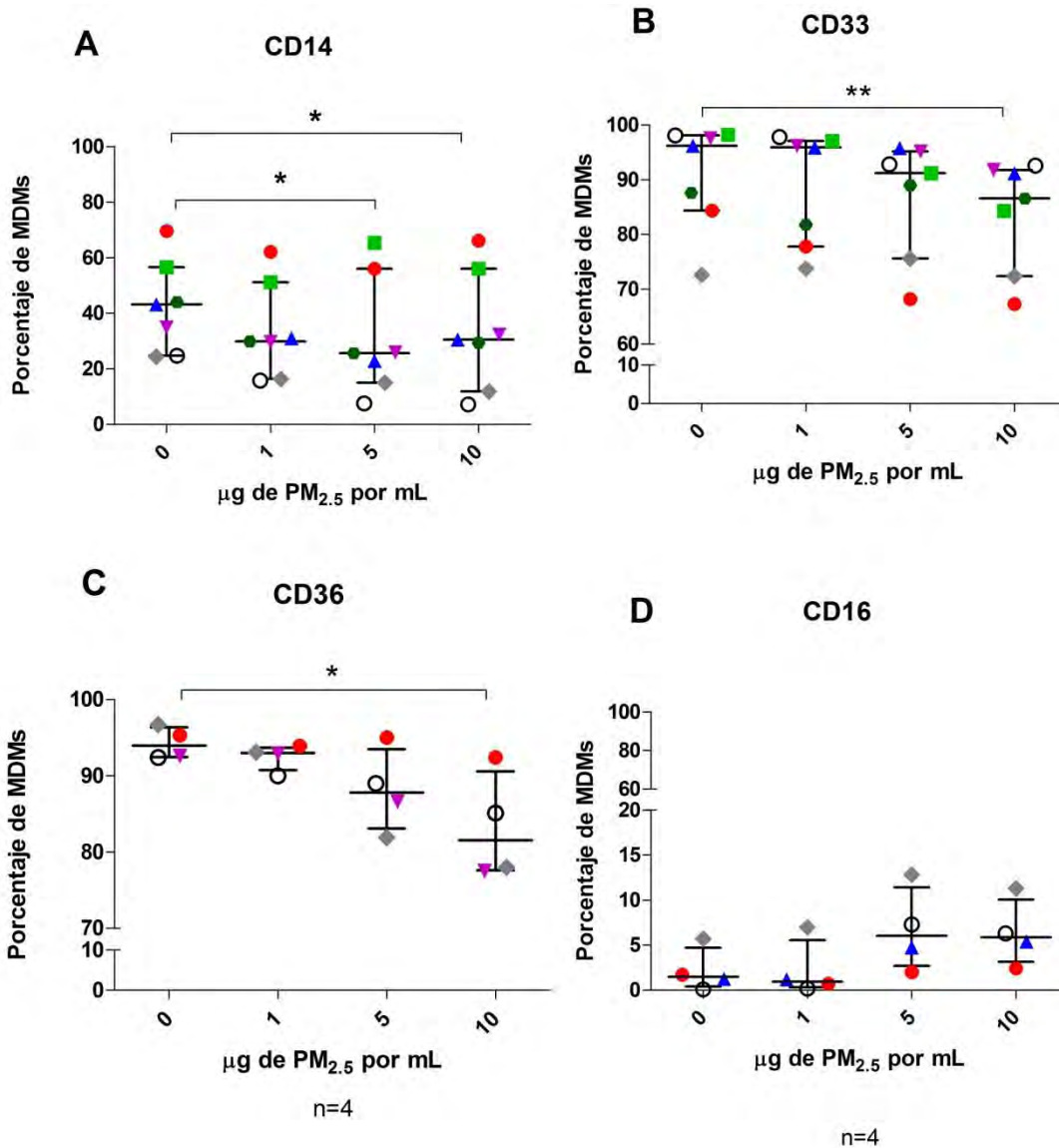


Figura 9. La exposición a PM<sub>2.5</sub> causa una disminución en el porcentaje de células que expresan CD14, CD33 y CD36. Se obtuvo la proporción de células que expresan CD14 (A), CD16 (D), CD33 (B) y CD36 (C) en los MDMs expuestas a 0µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación mediante citometría de flujo. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil (n=7, CD16 y CD36 n=4). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*P<0.05, \*\*P<0.005.

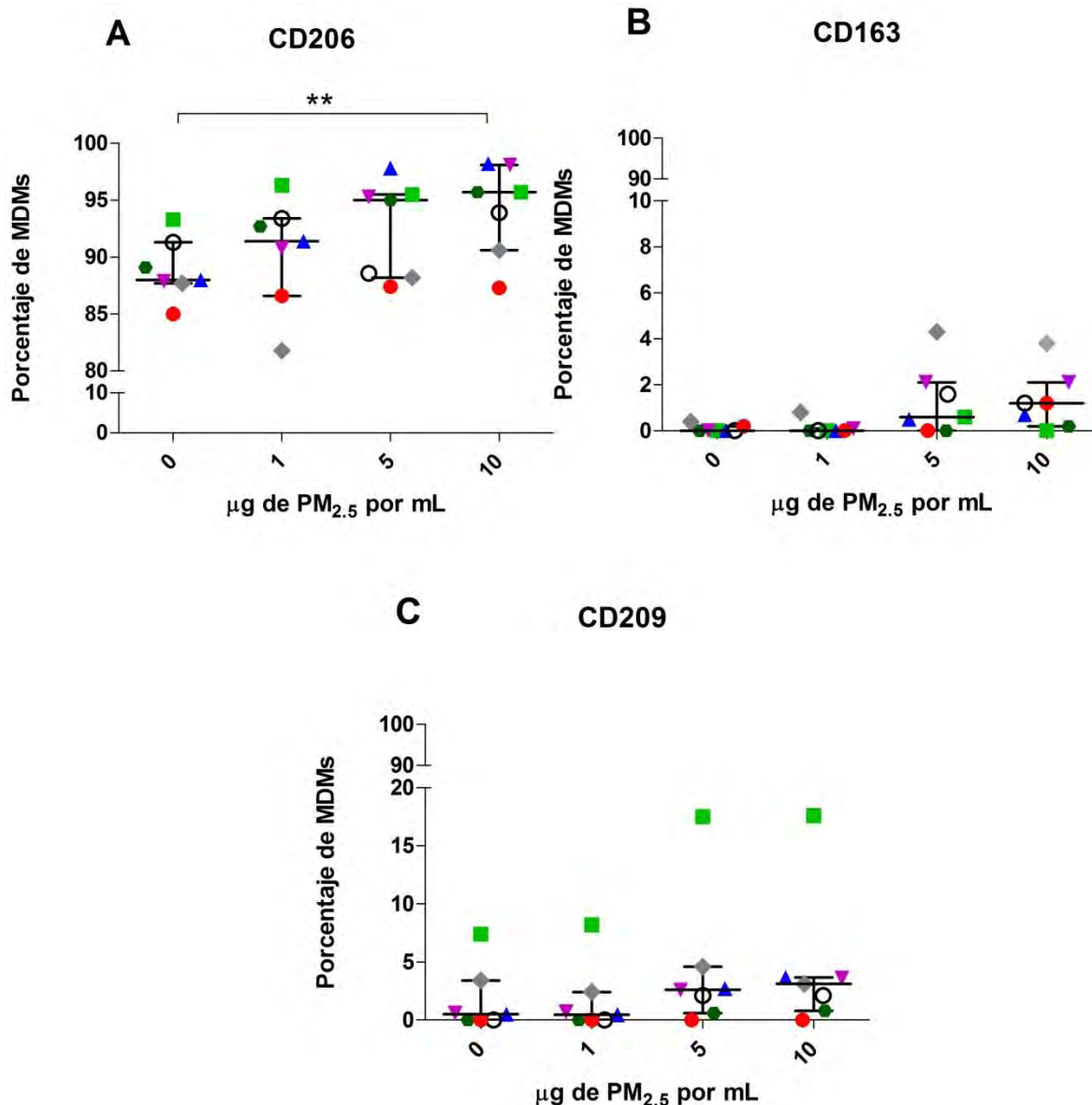


Figura 10. La exposición a PM<sub>2.5</sub> induce la expresión de CD206. Se obtuvo el porcentaje de células que expresan CD163 (B), CD209 (C) y CD206 (A) en los MDMs expuestos a 0µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación mediante citometría de flujo. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil (n=7). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*\*P<0.005.

#### 7.4 La exposición a partículas PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación aumenta el número de moléculas CD206, mientras que disminuye CD14 y CD33.

Dado que se observó una disminución de CD14 y CD33 y un aumento en CD206 en el porcentaje de MDMs expuestos a PM<sub>2.5</sub>, se decidió analizar también el número de moléculas que son expresadas por dichas células. El análisis se realizó mediante citometría de flujo, ya que esta técnica permite el análisis simultáneo de las moléculas y tiene la capacidad de analizar un gran número de células.

Los resultados muestran que la exposición a 5µg/mL y 10µg/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación celular disminuye significativamente el número de moléculas CD14 con respecto a las células que no fueron expuestas a las partículas (Fig 11 (A)). Esto es, de una Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) de 8200 de los MDMs sin partículas a una IMF de 6300 y 6500 en los MDMs expuestos a 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> (P<0.05, en ambos casos).

De igual manera, existe una disminución significativa en la expresión de CD33 en los MDMs expuestos a 10µg/mL de partículas con respecto a los MDMs que no fueron expuestos y con respecto a los MDMs expuestos a 5µg/mL (Fig. 11 (B)). La disminución va desde una IMF de 2500 en las células sin exposición a las partículas y los MDMs expuestos a 5µg/mL a una IMF de 2100 en los MDMs expuestos a 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> (P<0.05).

En contraste a las moléculas anteriores, el número de moléculas CD206 en los MDMs expuestos a 5µg/mL y 10µg/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> se ve aumentado significativamente con respecto a los MDMs diferenciados en ausencia de partículas (Fig. 12 (A)). El aumento va desde una IMF de 2000 registrada en los MDMs diferenciados en ausencia de partículas a una IMF de 4300 en los MDMs expuestos a 5µg/mL de PM<sub>2.5</sub> y a una IMF de 4500 en los MDMs expuestos a 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> (P<0.005, en ambos casos). Tanto el efecto en el número de moléculas CD33 como en la de CD206 es dependiente de la concentración de partículas a las que se exponen las células, alcanzando la significancia al exponer a los MDMs a 10µg de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación.

La exposición a PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación celular no causa efecto en el número de moléculas CD16 (Fig. 11 (C)), CD36 (Fig. 11 (D)), CD163 (Fig. 12 (B)) y CD209 (Fig. 12 (C)) expresadas en los MDMs.

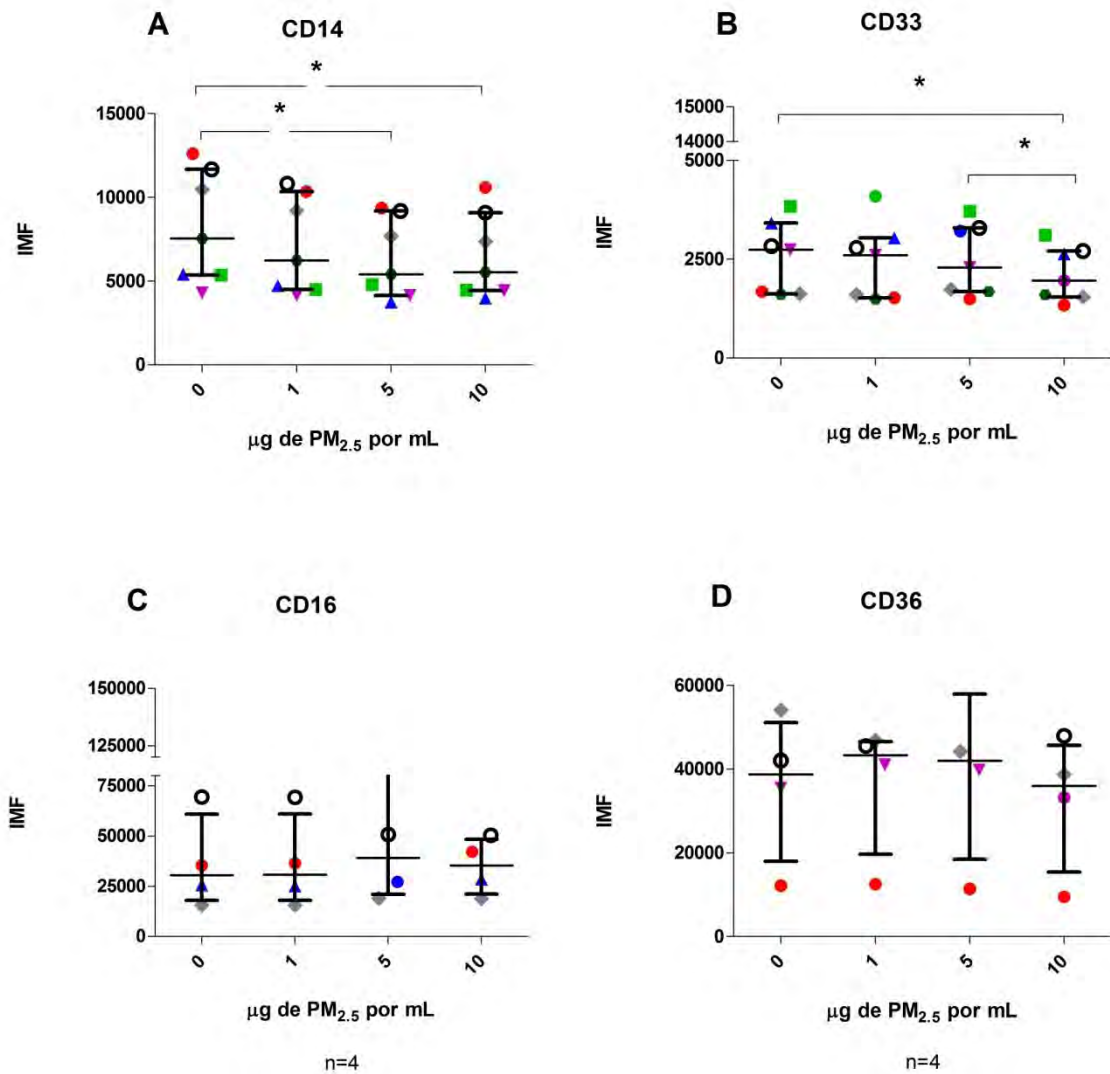


Figura 11. La exposición a PM<sub>2.5</sub> causa la disminución del número de moléculas de CD14 y CD33. Se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD14 (A), de CD16 (C), de CD33 (B) y de CD36 (D) mediante citometría de flujo en las células que fueron expuestas a 0µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil (n=7, excepto en CD16 y CD36, en donde n=4). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*P<0.05.

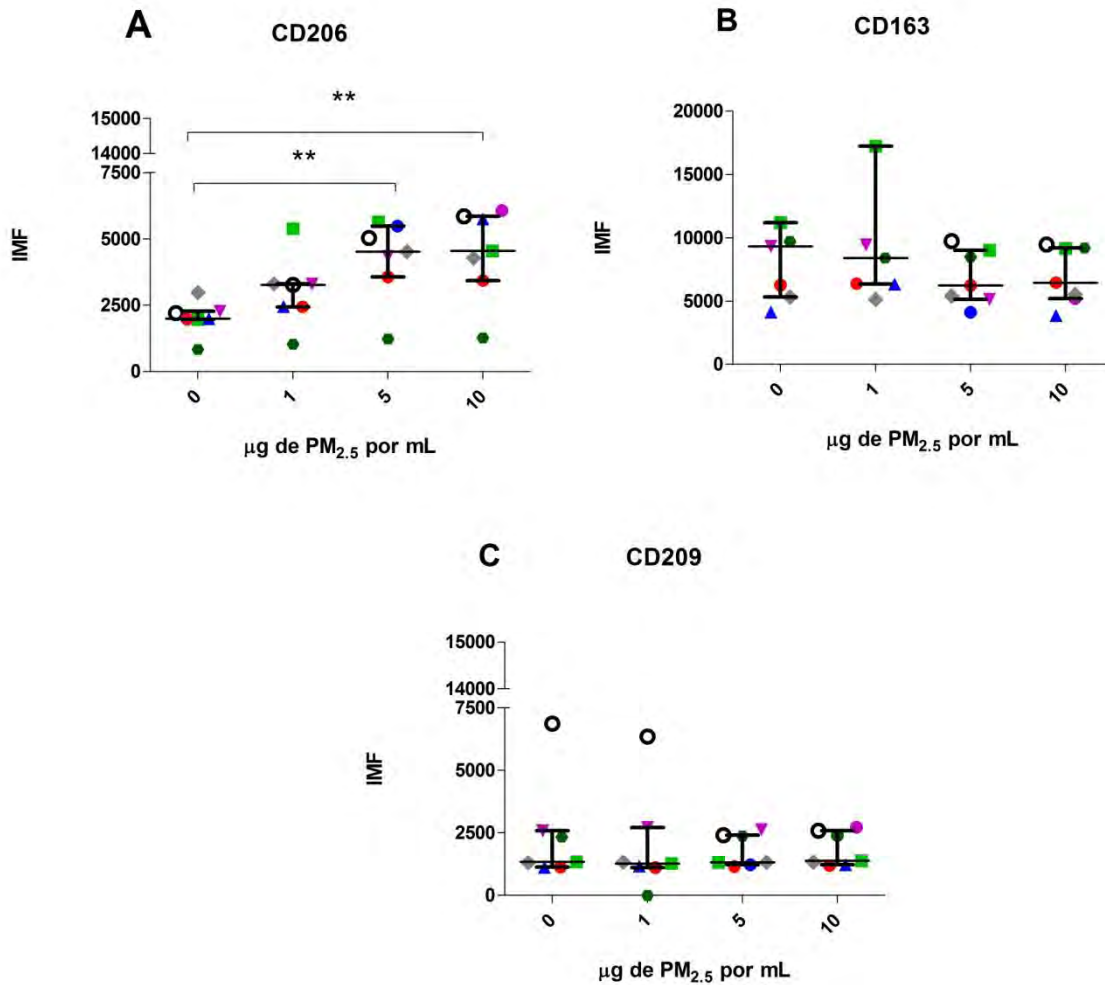


Figura 12. La exposición a PM<sub>2.5</sub> induce la expresión de CD206. Se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD163 (B), de CD209 (C) y de CD206 (A) mediante citometría de flujo en las células que fueron expuestas a 0µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL de PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil (n=7). Además, cada símbolo dentro de las gráficas representa un experimento independiente. \*\*P<0.005.

### 7.5 La exposición a las partículas PM<sub>2.5</sub> induce la producción de una mayor cantidad de TNF $\alpha$ .

Los resultados muestran que la exposición a 10µg/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación celular induce un aumento significativo en la producción de TNF $\alpha$  con respecto a la producción de las células diferenciadas en ausencia de partículas (de 64pg/mL a 207pg/mL; P<0.005) y con respecto a los MDMs expuestos a 1µg/mL (de 91pg/mL a 207pg/mL; P<0.05; Fig. 13). Se puede observar una tendencia de aumento de la producción de TNF $\alpha$  dependiente de la dosis en los MDMs expuestos a PM<sub>2.5</sub> durante su diferenciación, ya que la

concentración de  $\text{TNF}\alpha$  aumenta conforme aumenta la exposición a las partículas  $\text{PM}_{2.5}$  (Fig. 13).

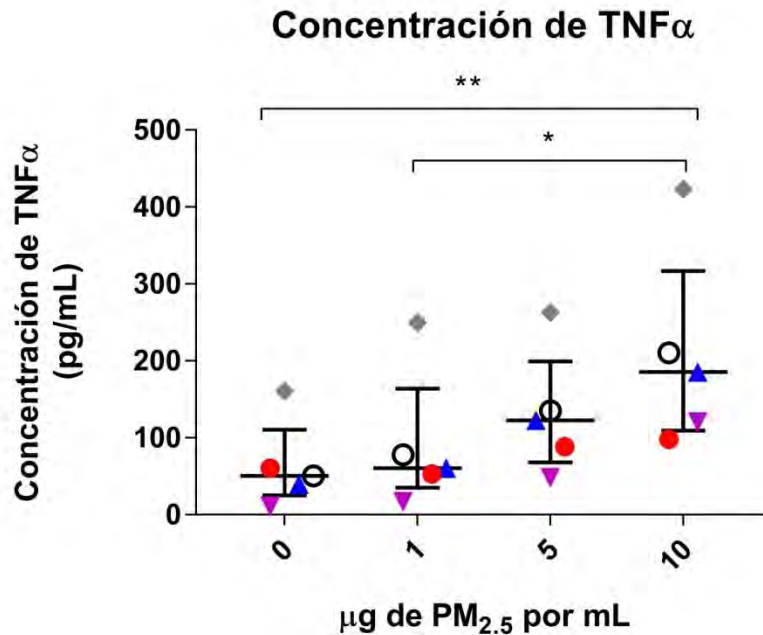


Figura 13. La exposición a  $\text{PM}_{2.5}$  en la diferenciación celular aumenta la producción de  $\text{TNF}\alpha$ . La cuantificación del  $\text{TNF}\alpha$  se llevó a cabo en el sobrenadante de las células que fueron expuestas a  $0\mu\text{g/mL}$ ,  $1\mu\text{g/mL}$ ,  $5\mu\text{g/mL}$  y  $10\mu\text{g/mL}$  de  $\text{PM}_{2.5}$ , por medio de ELISA. Los datos representan la mediana con su respectivo rango intercuartil ( $n=5$ ). Además cada símbolo dentro de la gráfica representa un experimento independiente. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ .

## 8. Discusión

La exposición a material particulado está asociada con daño en el tracto respiratorio y con el aumento en admisiones a hospitales (WHO, 2013; Rodrigues, et. al., 2017; Williams, et. al., 2011). En específico, se ha asociado la exposición a material particulado  $\text{PM}_{2.5}$  con daño celular en células epiteliales de las vías aéreas y células del sistema inmune provocando inflamación, estrés oxidante y un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  y  $\text{TNF}\alpha$  (Yan, et. al., 2016; Michael, et. al., 2013; Su, et. al., 2017). En estudios previos hechos en otras ciudades, principalmente en China, se ha observado que el  $\text{PM}_{2.5}$  altera tanto la función como la morfología de diferentes tipos celulares (Zhao, et. al., 2016; Yan, et. al., 2016; Michael, et. al., 2013). Se ha visto que

algunos productos de la contaminación ambiental de la Ciudad de México, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, causan daño al DNA de linfocitos humanos (García-Suástegui, et. al., 2011).

Al llevar a cabo la exposición de las células a material particulado una de las principales suposiciones que se hace es su efecto negativo en la viabilidad como se observó en trabajos previos, en donde al exponer durante algunas horas macrófagos (MDMs) y líneas celulares RAW264.7 y A549 a concentraciones desde 1 hasta 650  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PM se disminuye significativamente la viabilidad celular (Ohyama, et. al., 2012; Michael, Montang & Dott, 2013; Gualtieri, et. al., 2009). Sin embargo, Zhao et. al. observaron que la viabilidad celular en macrófagos de ratones al exponerlos a 25-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{PM}_{2.5}$  durante 6 horas no se ve afectada negativamente, sino que existió menos muerte celular en las células expuestas a las  $\text{PM}_{2.5}$  (Zhao, et. al., 2016). Un efecto similar se observó en este trabajo, ya que al llevar a cabo la exposición de los monocitos a  $\text{PM}_{2.5}$  puede verse una disminución en la muerte celular en los MDMs, y que sigue una tendencia dosis-dependiente, alcanzando la significancia al exponer las células a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{PM}_{2.5}$ . Aunque las células provienen de organismos diferentes, la exposición se realizó con una menor concentración de partículas que las que ellos utilizaron y por un periodo mayor de tiempo (6 días), los resultados de este trabajo son parecidos a los de Zhao, et. al.

La internalización de las partículas  $\text{PM}_{2.5}$  aumenta conforme aumenta la concentración de partículas, mostrando una tendencia dosis dependiente. Sin embargo, la carencia de diferencia significativa entre los MDMs expuestos a las  $\text{PM}_{2.5}$  sugiere un límite en la internalización de las partículas, lo cual tendría relación con el tamaño de las partículas y el volumen que estas ocupan en la célula (Cannon & Swanson, 1992). Es importante mencionar que el mecanismo de internalización de las partículas no está esclarecido por completo, por lo que la internalización de las partículas podría darse por medio de fagocitosis, endocitosis u otra forma de internalización.

Estudios anteriores han demostrado que la exposición de los macrófagos a las  $\text{PM}_{2.5}$  induce un cambio morfológico en las células aumentando su tamaño, la inclusión de partículas y la formación de vacuolas y/o vesículas (Zhao, et. al., 2016; Bonzini, et. al., 2017), tal como se observó en este trabajo, en específico en los MDMs expuestos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{PM}_{2.5}$ . La presencia de una gran cantidad de vacuolas en el interior de los macrófagos concede la apariencia de células espumosas, quienes pueden presentar marcadores de M1 o marcadores de M1y M2 (Stöger, et. al., 2012). Estas células se encuentran principalmente en el pulmón cuando ocurre un evento de infección por algunos patógenos como *M. tuberculosis*, quien las utiliza como blanco preferido, pues dentro de la célula se encuentran las vesículas con gotas de lípidos que la bacteria puede aprovechar como fuente de nutrientes (Russell, et. al., 2009).

La polarización hacia macrófagos espumosos es resultado de una desregulación en la entrada y salida de lipoproteínas de baja densidad (LDL) del suero, debido ya sea a la activación de TLR's o por estímulos proinflamatorios como el  $TNF\alpha$ , (Russell, et. al., 2009). En el metabolismo de las LDL están involucradas moléculas de superficie encargadas de la internalización, en las que se encuentran los receptores para LDL, SRA (receptor scavenger A, por sus siglas en inglés) y CD36 (Russell, et. al., 2009; Pepino, et. al., 2014), siendo ésta última una de las moléculas afectadas por las partículas  $PM_{2.5}$  en este trabajo. La polarización hacia macrófagos espumosos no es exclusiva de los macrófagos residentes de pulmón, pues Xu et. al. (2015) observaron que los monocitos de sangre periférica pueden diferenciarse hacia macrófagos espumosos en un modelo de hiperlipidemia. Es importante comprobar que los MDMs que presentan las vesículas en este trabajo en realidad sean células espumosas, ya que implicaría una susceptibilidad hacia la infección por *M. tuberculosis*. Además, la desregulación del metabolismo de las LDL debe comprobarse, pues es importante saber cuál de las moléculas involucradas en dicho metabolismo está causando la formación de los macrófagos espumosos, ya que sería ésta una molécula más que se está afectando debido a la exposición de las  $PM_{2.5}$ . Las principales moléculas que podrían afectarse para dar lugar a los macrófagos espumosos son los receptores de LDL, quienes podrían estar siendo regulados positivamente, o los transportadores ABC (ATP-binding cassette) de forma negativa.

Poco es sabido del efecto de las partículas  $PM_{2.5}$  sobre moléculas de superficie que desempeñan una función importante en el macrófago. En este trabajo se evaluó dicho efecto sobre 7 moléculas de superficie (CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209), en donde se observó una disminución significativa en tres de ellas. La primera de las moléculas disminuidas es CD14, la cual es conocida por ser parte importante en el reconocimiento de PAMPS, MAMPS y DAMPS (Martin & Frevert, 2005). En el trabajo realizado por Chaudhuri et. al. (2012) encontraron que al exponer MDMs a partículas de escape de diesel (DEP, por sus siglas en inglés) se reduce la expresión de CD14 significativamente al medirla por citometría de flujo, similar a lo observado en este trabajo tanto en el porcentaje de células que la expresan, como en el número de moléculas CD14. Dicha disminución de CD14 puede causar una desregulación en la señalización del reconocimiento de patrones, ya que es conocida como un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) y un correceptor importante en el reconocimiento de LPS, presente en muchas bacterias, en conjunto con el TLR4 (Martin & Frevert, 2005).

En segunda instancia, se observó que la expresión de CD33 disminuyó significativamente, tanto en la cantidad de células que expresan esta molécula, como en la cantidad de moléculas expresadas. Existen estudios en los que se describe la capacidad inhibitoria en expansión celular, producción de citocinas, activación celular e inducción de la apoptosis tanto por CD33 como por otras moléculas de su misma familia, la cual se atribuye principalmente a sus motivos



ITIM (Cao & Crocker, 2010). Algunos patógenos pueden utilizar CD33 como mecanismo de evasión de la respuesta inmune al producir su propio ácido siálico, tal como lo hace *Streptococcus* (Cao & Crocker, 2010). La disminución de esta molécula podría causar un aumento en la activación celular, lo cual podría conducir posteriormente a inflamación a través de la producción de  $TNF\alpha$ .

La tercera molécula disminuida es CD36, una molécula importante en el metabolismo de los ácidos grasos y principalmente del colesterol, ya que funciona como receptor de estos. En este estudio, a diferencia de las demás moléculas, CD36 solo disminuyó significativamente en el porcentaje de las células que la presentan. Sin embargo, es necesario el aumento del número de muestras para disminuir la dispersión observada en la IMF y corroborar con mayor exactitud si las  $PM_{2.5}$  afectan o no la cantidad de moléculas CD36 que se expresan.

En contraste con lo observado en CD14, CD33 y CD36, la exposición a  $PM_{2.5}$  causa un aumento significativo tanto en el porcentaje de células que expresan CD206, como en el número de moléculas expresadas. Esta molécula es perteneciente a la familia de los receptores de lectinas tipo C, capaz de llevar a cabo el reconocimiento de carbohidratos como la manosa, fucosa, N-acetil glucosamina y estructuras sulfatadas (Salazar, et. al., 2015; Miller, et. al., 2008). Un posible mecanismo por el cual las  $PM_{2.5}$  afectan la respuesta inmune de los individuos, aumentando su susceptibilidad a infecciones es mediante el aumento de este receptor, ya que se ha observado que mediante CD206 se puede llevar a cabo el reconocimiento de microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, y algunos virus, quienes producen sus propios carbohidratos para llevar a cabo su ingreso a la célula (Miller, et. al., 2008; Taylor, et. al., 2005; Miller, et. al., 2008; Op den Brouw, et. al., 2009). Además, se ha observado que el aumento en la expresión de CD206 causa la disminución de la polarización de los linfocitos hacia el tipo de respuesta  $T_H1$ , encargada de la eliminación de patógenos (Salazar, et. al., 2016). Asumiendo que el aumento de CD206 implica la polarización de los macrófagos hacia M2, podrían estar actuando de tal manera que haya la generación de fibrosis en el tejido y polarización de los linfocitos a  $T_H2$ , los cuales también están implicados en las respuestas alérgicas.

El aumento en la expresión del receptor de manosa (CD206) es significativo y se puede correlacionar con la cantidad de partículas a las que se exponen las células. Dicho aumento podría deberse a que las partículas utilizan esta molécula como vía de entrada, tal como lo hacen algunos microorganismos. Sin embargo, el aumento en la expresión de CD206 puede ser causado por una desregulación intracelular que propicie la expresión en la membrana, ya sea a nivel de transcripción, traducción y/o moléculas que regulan su expresión. Fordham et. al. (2015) se dieron cuenta de que existe una regulación positiva de CD206 cuando se aumenta la expresión de miR-24, un micro RNA que tiene como blanco la subunidad p110 $\delta$  de la proteína PI-3 cinasa, quien está involucrada en vías de señalización de la activación y polarización del macrófago.

Es bien sabido que el  $TNF\alpha$  es una de las principales citocinas proinflamatorias junto a  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$ , etc. y es importante para la sobrevivencia ante patógenos intracelulares. Sin embargo, también es capaz de regular la producción de otros mediadores proinflamatorios como prostaglandinas, colagenasa,  $IL-1$  y GM-CSF (Gómez-Reino Carnota, 2002; Pfeffer, 2003). En este trabajo se observó un incremento de la producción de  $TNF\alpha$  correlacionado a la cantidad de partículas a las cuales se expusieron las células, lo cual podría tener relación con la disminución en la expresión de CD33, pues se ha visto que la disminución de CD33 induce un incremento en la producción de  $TNF\alpha$  (Gonzalez, et. al., 2012). En trabajos anteriores también se observa un incremento de  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $IL-8$  (Musah, DeJarnett & Hoyle, 2012; Cavanagh, et. al., 2009; Albright & Goldstein, 1996; Zhao, et. al., 2016), reafirmando la acción proinflamatoria que tiene el material particulado en el organismo. La producción excesiva de  $TNF\alpha$ , así como de otras citocinas proinflamatorias puede causar eventos de inflamación crónica en los tejidos y la activación del fenotipo  $T_H1$  por parte de los linfocitos, llegando incluso a eventos de inmunopatogénesis.

Al observar dicho aumento de la producción de  $TNF\alpha$  se podría pensar que los macrófagos presentan una polarización de tipo M1 (proinflamatoria). Sin embargo, se puede ver una contradicción en esta aseveración, ya que el receptor de manosa (CD206) también es un marcador de polarización hacia macrófagos de tipo M2 (antiinflamatorios). Por lo tanto, para corroborar el fenotipo de los MDMs sería necesario realizar otros ensayos que puedan ayudarnos a comprobar la polarización que siguen dichos macrófagos.

El material particulado  $PM_{2.5}$  tiene un efecto en la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos en aspectos morfológicos y fisiológicos. Aún quedan por responder algunas interrogantes que surgen a partir de este trabajo, como lo son: probar que las células que continúan viables después de la exposición a las  $PM_{2.5}$  son funcionales, analizar el mecanismo de internalización de las partículas a la célula (fagocitosis, endocitosis, picnocirosis, etc.), comprobar que las células que presentan la gran cantidad de vesículas en realidad sean macrófagos espumosos y analizar la forma en que se convierten los MDMs en estas células, evaluar el efecto en la respuesta inmune que es mediada por CD14 en los MDMs expuestos a  $PM_{2.5}$ , así como llevar a cabo el análisis de la tolerancia inducida por CD33 en los MDMs expuestos a  $PM_{2.5}$ , disminuir la dispersión observada en la IMF de CD36 aumentando el tamaño de muestra, analizar el mecanismo afectado en los MDMs expuestos a  $PM_{2.5}$  y que es el causante del aumento en la expresión de CD206, y por último, determinar la polarización que siguieron los MDMs expuestos al material particulado. Para responder a dichas interrogantes aún deben hacerse diferentes ensayos que puedan ayudarnos a esclarecer con mayor exactitud el efecto que tiene la exposición a partículas  $PM_{2.5}$  en MDMs que son expuestos a ellas durante su diferenciación.

## 9. Conclusiones

La exposición a 5 y 10 µg/mL de partículas PM<sub>2.5</sub> durante la diferenciación celular de MDMs tiene efecto negativo en la expresión de CD14, CD33 y CD36, y positivo en la expresión de CD206 en la superficie celular, en donde funcionan como receptores. Además, propician la generación de vacuolas en las células, disminuyen la muerte celular y causan un aumento en la producción de citocinas como el TNF $\alpha$ .

## 10. Referencias.

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S., (2015). *Inmunología celular y molecular*. 8<sup>va</sup> edición. España. Elsevier Saunders. Pp. 1-12, 13,14, 51-84.
2. Albright, J.F. & Goldstein, R.A.(1996). *Airborne pollutants and the immune system*. *Otolaryngol Head Neck Surg* 114: 232-8.
3. Balandrán, J.C., Enciso, J. & Pelayo, R. (2017). *El sistema hematopoyético como paradigma de la diferenciación celular*. En Chávez-González, M.A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E. & Lamas, M. *Células troncales: biología y aplicaciones en biomedicina* (pp. 209-229). Ciudad de México. Porrúa.
4. Billet, S., Garcon, G., Dagher, Z., Verdin, A., Ledoux, F., Cazier, F., Courcot, D., Aboukais, A. & Shirali, P. (2007). *Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549)*. *Envir Research*. 105: 212-223.
5. BioLegend. *Macrophages*. Consultado el 10 de abril de 2018. Disponible en: <https://www.biolegend.com/macrophages>
6. Blszczyk, E., Rogula-Kozłowska, W., Klejnowski, K., Fulara, I. & Mielżyńska-Švach, D. (2016). *Polycyclic aromatic hydrocarbons bound to outdoor and indoor airborne particles (PM<sub>2.5</sub>) and their mutagenicity and carcinogenicity in Silesian kindergartens, Poland*. *Air Qual Atmos & Health*. 1-12. doi: 10.1007/s11869-016-0457-5
7. Bonzini, M., Pergoli, L., Cantone, L., Hoxha, M., Spinazzè, A., Del Buono, L., Favero, C., Carugno, M., Angelici, L., Broggi, L., Cattaneo, A., Pesatori, A.C. & Bollati, V. (217). *Short-term particulate matter exposure induces extracellular vesicle release in overweight subjects*. *Env Res*. 155: 228-234.
8. Bournazos, S., Wang, T.T. & Ravetch, J.V. (2016). *The role and function of Fc $\gamma$  receptor on myeloid cells*. *Microbiol Spectr*. 4(6): 1-19.
9. Brinkman-Van der Linden, E.C.M., Angata, T., Reynolds, S.A., Powell, L.D., Hedrick, S.M. & Varki, A. (2003). *CD33/siglec-3 binding specificity*,

- expression pattern, and consequences of gene deletion in mice. Mol Cell Biol.* 23(12): 4199-4206.
10. Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S. C. Jr. & Tager, I. (2004). *Air pollution and cardiovascular disease: a statement for health care professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. Circulation* 109: 2655-2671.
  11. Cannon, G.J. & Swanson, J.A. (1992). *The macrophage capacity for phagocytosis. J Cell Scienc.* 101: 907-913.
  12. Cao, H. & Crocker, P.R. (2010). *Evolution of CD33-related siglecs: regulate host immune functions and escaping pathogen exploitation?. Immun.* 132: 18-26.
  13. Cavanagh, Jo-Anne E., Trought, K., Brown, L. & Duggan, S. (2009). *Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. Scien of the Tot Envir.* 407: 5007-5018.
  14. Chadhuri, N., Jary, H., Lea, S., Khan, N., Piddock, K.C., Dockrell, D.H., Donaldson, K., Duffin, R., Singh, D., Parker, L.C. & Sabroe, I. (2012). *Diesel exhaust particle exposure In Vitro alters monocyte differentiation and function. Plos One* 7(12): e51107.
  15. Chimal-Ramírez, G.K., Espinoza-Sánchez, N.A., Chávez-Sánchez, L., Arriaga-Pizano, L. & Fuentes-Pananá, E.M. (2016). *Monocyte differentiation towards protumor activity does not correlate with M1 or M2 phenotypes. J. Immun. Res., Vol.2016, ID: 6031486, 16p.*
  16. Chow A., Brown, B.D. & Merad, M. (2011). *Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. Nat. Rev. Immun.* 11: 788-798.
  17. Cifarelli, V., Ivanov, S., Xie, Y., Son, N.-H., Saunders, B.T., Pietka, T.A., Shew, T.M., Yoshino, J., Sundaresan, S., Davidson, N.O., Goldberg, I.J., Gelman, A.E., Zinselmeier, B.H., Randolph, G.J. & Abumrad, N.A. *CD36 deficiency impairs the small intestinal barrier and induces subclinical inflammation in mice. Cell Mol Gastroent Hep.* 3(1):82-98.
  18. EURO WHO. (2013). *Health Effects of Particulate Matter.* Consultado el 10 de marzo de 2017. Disponible en: [http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0006/189051/Health-effects-of-particulate-matter-final-Eng.pdf](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0006/189051/Health-effects-of-particulate-matter-final-Eng.pdf)
  19. Forham, J.B., Naqvi, A.R. & Nares, S. (2015). *miR-24 regulates macrophage polarization and plasticity. J Clin Cell Immunol.* 6(5): doi: 10.4172/2155-9899.1000362.
  20. Franzi, L.M., Linderholm, A.L., Rabowsky, M. & Last, J.A. (2017). *Lung toxicity in mice of airborne particulate matter from a modern layer hen facility containing proposition 2-compliant animal caging. Tox and Ind Health.* 33(3): 211-221.
  21. García-Suástegui, W.A., Huerta-Chagoya, A., Carrasco-Colín, K.L., Pratt, M.M., John, K., Petrosyan, P., Rubio, J., Poirier, M.C. & Gonsebatt, M.E.

- (2011). *Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City*. *Mutagen*. 26(3): 385-391.
22. Geissman, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M. & Ley, K. (2010). *Development of monocytes, macrophages and dendritic cells*. *Science* 327(5966): 656-661.
  23. Gómez-Reino Carnota, J.J. (2002). *El papel del factor de necrosis tumoral en la inflamación y el daño articular en la artritis reumatoide*. *Rev Esp Reum Supl*. 1(2): 1-4.
  24. Gonzalez, Y., Herrera, M.T., Soldevila, G., Garcia-Garcia, L., Fabián, G., Pérez-Armendariz, Bobadilla, K., Guzmán-Beltrán, S., Sada, E. & Torres, M. (2012). *High glucose concentrations induce TNF- $\alpha$  production through the down-regulation of CD33 in primary human monocytes*. *BMC Immun*. 13:19.
  25. Gordon, S. (2003) *Alternative activation of macrophages*. *Nat. Rev. Immun.*, (3): 23-35.
  26. Gordon, S. (2002). *Pattern recognition receptors*. *Cell*, 111: 927-930.
  27. Goto, Y., Ishii, H., Hogg, J.C., Shih, C.H., Yatera, K., Vincent, R. & van Eeden S.F. (2004). *Particulate matter air pollution stimulates monocytes release from the bone marrow*. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 891-897.
  28. Gualtieri, M., Mantecca, P., Corvaja, V., Longhin, E., Perrone, M.G., Bolzacchini, E. & Camatini, M. (2009). *Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549)*. *Toxicology Lett*. 188: 52-62.
  29. Huang, Yuh-Chin T., Li, Z., Carter, J.D., Soukup, J.M., Shwartz, D.A. & Yang, I.V. (2009). *Fine ambient particles induce oxidative stress and metal binding genes in human alveolar macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 41: 544-552.
  30. Italiani, P. & Boraschi, D. (2014). *From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation*. *Front. in Immun*. 5(514): 1-22.
  31. Izumi, G., Koga, K., Takamura, M., Makabe, T., Nagai, M., Urata, Y., Harada, M., Hirata, T., Hirota, Y., Fujii, T. & Osuga, Y. (2017). *Mannose receptor is highly expressed by peritoneal dendritic cells in endometriosis*. *Fertil Steril*. 107(1): 167-173.
  32. Jia, Yi-Yang, Wang, Q. & Liu, T. (2017). *Toxicity research of PM<sub>2.5</sub> compositions in vitro*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14(3), 232.
  33. Kopf, M., Schneider, C. & Nobs, S. (2015). *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. *Nature Immunology* 16(1): 36-44.
  34. Lawal, A.O. (2017). *Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: the role of Nrf2 and AhR-mediated pathway*. *Toxicol Lett*. 15(270): 88-95.
  35. Li, P., Jiang, N., Nagarajan, S., Wohlhueter, R., Selvaraj, P. & Zhu, C. (2007). *Affinity and kinetic analysis of Fc $\gamma$  receptor IIIa (CD16a) binding to IgG ligands*. *J Biol Chem* 282(9): 6210-6221.

36. Magatti, M., Vertua, E., De Munari, S., Caro, M., Caruso, M., Silini, A., Delgado, M. & Parolini, O. (2017). *Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features*. J. Tissue Eng. Regen. Med. 11: 2895-2911.
37. Manzo, C., Torreno-Pina, J.A., Joosten, B., Reinieren-Beeren, I., Gualda, E.J., Loza-Alvarez, P., Figdor, C.G., Garcia-Parajo, M.F. & Cambi, A. (2012). *The neck region of the C-type lectin DC-SIGN regulates its surface spatiotemporal organization and virus-binding capacity on antigen-presenting cells*. J Biol Chem. 287(47): 38946-38955.
38. Martin, T.R. & Frever, C.W. (2005). *Innate immunity in the lungs*. Proc. Am. Thorac. Soc. 2: 403-411.
39. McComb, S., Thiriot, A., Krishnan, L. & Stark, F.C. (2013). *Introduction of immune system*. Meth. Mol. Biol. 1061: 1-20
40. Meng, J., Parroche, P., Golenbock, D.T. & McKnight, C.J. (2008). *The differential impact of disulfide bonds and N-linked glycosylation on the stability and function of CD14*. J Biol Chem. 283(6): 3376-3384.
41. Michael, S., Montag, M. & Dott, W. (2013). *Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter*. Environ. Pollut. 183: 19-29.
42. Miller, J.L., deWet, B.J.M., Martinez-Pomares, L., Radcliffe, C.M., Dwek, R.A., Rudd, P.M. & Gordon, S. (2008). *The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages*. PLoS Pathog. 4(2): e17.
43. Mills, C.D. (2012). *M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease*. Crit Rev Immunol 32(6): 463-88.
44. Misharin, A.V., Morales-Nebreda, L., Reyfman, P.A., Cuda, C.M., Walter, J.M., McQuattie-Pimentel, A.C., Chen, C., Anekalla, K.R., Joshi, N., Williams, K.J.N., Abdala-Valencia, H., Yacoub, T.J., Chi, M., Chiu, S., Gonzalez-Gonzalez, F.J., Gates, K., Lam, A.P, Nicholson, T.T., Homan, P.J., Soberanes, S., Dominguez, S., Morgan, V.K., Saber, R., Shaffer, A., Hinchcliff, M., Marshall, S.A., Bharat, A., Berdnikovs, S., Bhorade, S.M., Bartom, E.T., Morimoto, R.I., Balch, W.E., Sznajder, J.I., Chandel, N.S., Mutlu, G.M., Jain, M., Gottardi, C.J., Singer, B.D., Ridge, K.M., Bagheri, N., Shilatfard, A., Budinger, G.R.S. & Perlman, H. (2017). *Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span*. J Exp Med. 214(8): 2387-2404.
45. Moestrup, S.K. & Moller, H.J. (2004). *CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response*. Ann Med. 36: 347-354.
46. Moganti, K., Li, F., Schmuttermaier, C., Riemann, S., Klüter, H., Gratchev, A., Harmsen, M.C. & Kzhyshkowska, J. (2017). *Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages*. Immunobio., 222(10): 952-959.

47. Murphy, K., Travers, P. & Walport M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. 7<sup>ma</sup> edición. Distrito Federal, México. McGraw Hill Education. Pp. 3-13, 39-58.
48. Musah, S., DeJarnett, N. & Hoyle, G.W. (2012). *Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates interactions between macrophages and epithelial cells underlying proinflammatory gene expression induced by particulate matter*. Toxicology. 299: 125-132.
49. Ohyama, M., Akasaka, S., Otake, T., Morinaga, K., Kim, Y.W., Moon, K.W., Kameda, T. & Adachi, S. (2012). *Effects of atmospheric particles and several model particles of particulate matter components on human monocyte-derived macrophage oxidative responses*. J Clin Toxicol 2:121.
50. Olmes, G., Büttner-Herold, M., Ferrazzi, F., Distel, L., Amann, K. & Daniel, C. (2016). *CD163<sup>+</sup> M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis*. Arth Res & Ther. 18:90.
51. Onofre, G., Koláčková, M., Jankovičová, K. & Krejsek, J. (2009). *Scavenger receptor CD163 and its biological functions*. Act Med. 52(2): 57-61.
52. Op den Brouw, M.L., Binda, R.S., Geijtenbeek, T.B.H., Janssen, H.L.A. & Woltman, A.M. (2009). *The mannose receptor acts as hepatitis B virus surface antigen receptor mediating interaction with intrahepatic dendritic cells*. Virology. 393: 84-90.
53. Owen, J.A., Punt, J. & Stranford, S.A. (2013). *Kuby Inmunología*. 7<sup>ma</sup> edición. Distrito Federal, México. McGraw Hill Education. Pp. 141-181.
54. Pederson, K., Mitchell, D.A. & Prestegard, J.H. (2014). *Structural characterization of the DC-SIGN-Lewis<sup>x</sup> complex*. Biochem. 53: 5700-5709.
55. Peiper, S.C., Ashmun, R.A. & Look, A.T. (1988). *Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a human gene encoding the CD33 myeloid differentiation antigen*. Blood. 72(1): 314-321.
56. Pepino, M.Y., Kuda, O., Samovski, D. & Abumrad, N.A. (2014). *Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism*. Annu Rev Nutr. 34: 281-303.
57. Pfeffer, K. (2003). *Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors*. Cyt Grow Fact Rev. 14: 185-191.
58. Pollard, J.W. (2009). *Trophic macrophages in development and disease*. Nat. Rev. Immun. 9: 259-270.
59. Rodrigues, P.C.O., Pinheiro, S.L., Junger, W., Ignotti, E. & Hacon, S.S. (2017). *Climatic variability and morbidity and mortality associated with particulate matter*. Rev Saude Publica 51:91.
60. Russell, D.G., Cardona, P-J., Kim, M-J., Allain, S. & Altare, F. (2009). *Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma*. Nat Immun., 9: 943-948.
61. Saint-Georges, F., Abbas, I., Billet, S., Verdin, A., Gosset, P., Mulliez, P., Shirali, P., Garcon, G. (2008). *Gene expression induction of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in*

- isolated human alveolar macrophages in response to airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>)*. Toxicology. 244:220-230.
62. Salazar, F., Hall, L., Negm, O.H., Awuah, D., Tighe, P.J., Shakib, F. & Ghaemmaghami, A.M. (2016). *The mannose receptor negatively modulates the toll-like receptor 4-aryl hydrocarbon receptor-indoleamine 2,3-dioxygenase axis in dendritic cells affecting T helper cell polarization*. J Allergy Clin Immunol. 137(6):1841-1851.
  63. Secretaría del medio ambiente de la Ciudad de México. (2017). *Calidad del aire en la Ciudad de México, informe 2016*. Dirección general de gestión de la calidad del aire, Dirección de monitoreo atmosférico. Ciudad de México. Pp. 72.
  64. Shukla, A., Timblin, C., Berube, K., Gordon, T., McKinney, W., Driscoll, K., Vacek, P. & Mossman, B.T. (2000). *Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-κB- related genes and oxidant-dependent NF-κB activation in vitro*. Am. J. Respir. Cell Mol. Bio. 23(2): 182-187.
  65. Stöger, J.L., Gijbels, M.J.J., Van der Velden, S., Manca, M., Van der Loos, C.M., Biessen, E.A.L., Daemen, M.J.A.P., Lutgens, E. & de Winther, M.P.J. (2012). *Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis*. Atherosc. 225: 461-468.
  66. Su, R., Jin, X., Zhang, W., Li, Z., Liu, X. & Ren, J. (2016). *Particulate matter exposure induces the autophagy of macrophages via oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway*. Chemosphere 167: 444-453.
  67. Taylor, P.R., Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. (2005). *The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition*. Trends Immun. 26(2): 104-110.
  68. US EPA. (2016). *Particulate Matter (PM) Pollution*. Consultado el 9 de marzo de 2017. Disponible en: <https://www.epa.gov/pm-pollution/particulate-matter-pm-basics#PM>
  69. Whitsett, J.A. & Alenghat, T. (2015). *Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity*. Nature Immunology 16(1): 27-35
  70. Williams, L., Ulrich, C.M., Larson, T., Wener, M.H., Wood, B., Chen-Levy, Z., Campbell, P.T., Potter, J., McTiernan, A. & De Roos, A.J. (2011). *Fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) air pollution and immune status among women in the Seattle area*. Arch of Env & Occup Health 66(3): 155-165.
  71. Xu, L., Dai-Perrard, X., Perrard, J.L., Yang, D., Xiao, X., Teng, B-B., Simon, S.I., Ballantyne, C.M., Wu, H. (2015). *Foamy monocytes form early and contribute to nascent atherosclerosis in mice with hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 35(8): 1787-1797.
  72. Yan, Z., Jin, Y., An, Z., Liu, Y., Samet, J.M. & Wu, W. (2016). *Inflammatory cell signaling following exposures to particulate matter and ozone*. Biochim Biophys Acta. 1860(12): 2826-34.
  73. Zhao, Q., Chen, H., Yang, T., Rui, W., Liu, F., Zhang, F., Zhao, Y. & Ding, W. (2016). *Direct effects of airborne PM<sub>2.5</sub> exposure on macrophage polarizations*. Biochim. Biophys. Acta – gen. Subj. 1860(12): 2835-2843.



74. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Yong-Jun, L., MacPherson, G., Randolph G.J., Scherberich, J., Shmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J.M. & Lutz, M.B. (2010). *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. *Blood* 116(16): e74-e80.

## 11. Anexos

### Anexo A.

#### Obtención de Monocitos.

Se añadieron 20mL de medio RPMI 1640 suplementado con 2mM de L-glutamina (RPMI+G, a temperatura ambiente) en tubos de polipropileno de 50mL, posteriormente se vertieron 20mL del concentrado leucocitario obtenido del banco de sangre para después introducir una pipeta Pasteur hasta el fondo del tubo, y con ayuda de una pipeta de transferencia y se añadieron 10mL de solución separadora de linfocitos (Lymphoprep) a temperatura ambiente a través de la pipeta Pasteur, evitando mezclar la sangre con la solución separadora de linfocitos.

Una vez adicionados los 10mL de solución separadora de linfocitos a los tubos, éstos fueron centrifugados a 1200rpm (rotaciones por minuto) a temperatura ambiente durante 45 minutos y sin freno (para no romper la diferencia de densidad generada).

El anillo correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica ó PBMCs (mostrado en la figura 4) fue recuperado intentando recuperar la menor cantidad posible de solución separadora de linfocitos (Lymphoprep) y se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml.

Posteriormente se llevaron a cabo tres lavados llenando los tubos con medio RPMI+G hasta tener un volumen de 50mL, mezclando y centrifugando por 15 minutos a 1200rpm a temperatura ambiente programando la centrifuga con freno y a la máxima aceleración; decantando el sobrenadante y resuspendiendo con ayuda del Vortex después de la centrifugación (se juntó el contenido de ambos tubos al terminar el primer lavado), esto para eliminar la solución separadora de linfocitos que pudo haber quedado en el tubo por error además de los eritrocitos.

Después del segundo lavado se hizo un conteo celular, así como la medición de la viabilidad celular con ayuda de una cámara de Neubauer y haciendo una dilución 1:2 de la suspensión de células con azul tripano; esto es tomando 10 $\mu$ L de suspensión de células y 10 $\mu$ L de azul tripano, mezclándolos, poniéndolos en la cámara de Neubauer y viéndolos en el microscopio a un aumento de 40x.

Al término del tercer lavado y ya hecho el conteo celular, se resuspendieron las células en medio RPMI+G+SH 10% (RPMI+G+10% de suero humano inactivado por calor) suficiente como para repartir de 60 a 80 millones de células en placas de Petri de poliestireno tratadas para cultivo celular de 100mm x 20mm y una pequeña alícuota para un posterior ensayo de pureza (la cual fue guardada a 4°C hasta su utilización).

Posteriormente se colocaron de 60 a 80 millones de células por placa Petri y con medio RPMI+G+SH 10% se llevó a un volumen total de 10mL por placa.

Las placas Petri fueron incubadas durante una hora a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>; en la incubadora también se atemperó una alícuota de medio RPMI+G (suficiente como para hacer tres lavados de 5mL a cada placa), durante esta hora de incubación el objetivo fue que las células (monocitos) se adhirieran a la placa.

Posterior a la incubación, el medio de cultivo se retiró con cuidado y posteriormente se llevaron a cabo los tres lavados, esto añadiendo los 5mL de medio atemperado por una orilla de la placa; los lavados sirven para deshacerse de las células no adherentes, pues las únicas que nos interesan son las células adherentes.

Al término de los lavados a cada placa se le agregaron 5mL de PBS (Lonza, Walkersville, MD) frío; en este punto ya no fue necesario agregarlo en una orilla, sino que hacerlo a lo largo de la placa era mejor, pues lo que intentábamos en este punto era separar los monocitos de la superficie de la placa. Después de agregarle el PBS las placas se colocaron dentro del refrigerador durante 15 minutos (aproximadamente a 4°C).

Pasados los 15 minutos las placas fueron raspadas con ayuda de un Cell Lifter (Corning, NY, USA) para despegar las células que aún seguían adheridas; esto poniendo el Cell Lifter en un ángulo aproximado de 45° sin hacer una presión excesiva y sin hacer movimientos hacia atrás pasando el Cell Lifter por toda la placa. La suspensión de células adherentes fue trasladada a un tubo de 50mL, posteriormente se agregaron nuevamente 5mL de PBS frío y se repitió el procedimiento en los lugares donde aún quedaban células adheridas a la placa.

Las células fueron centrifugadas a 1200rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con ayuda del Vortex (Vortex-genie 2, Scientific Industries Inc., USA).

Se le agregaron 10mL de medio RPMI+G+SH 10% y se llevó a cabo un conteo celular y medición de la viabilidad celular de la misma manera que al contar las PBMCs.

Posteriormente, la suspensión de células fue ajustada a  $2 \times 10^6$  cél/mL.

Se colocó 1mL de la suspensión de células en 16 pozos de una placa de 24 pozos de poliestireno de ultra baja adherencia (dejando una alícuota para una posterior prueba de pureza, la cual fue guardada a 4°C hasta su utilización) como se muestra en la figura A.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>	X	X	X	X		
<b>B</b>	X	X	X	X		
<b>C</b>	X	X	X	X		
<b>D</b>	X	X	X	X		

Figura A. Representación de la placa de 24 pozos de ultra baja adherencia. Las casillas marcadas con "X" representan los pozos en los que fueron cultivados los monocitos; 1mL de suspensión a  $2 \times 10^6$  cél/mL

Las células fueron incubadas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

### Exposición de las células a las partículas PM<sub>2.5</sub>

Se tomó un vial con partículas PM<sub>2.5</sub> previamente pesadas. Se necesitó un vial con al menos 65µg de partículas, pues se distribuyeron como se muestra en la figura B.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>A</b>	NONE	1µg	5µg	10µg		
<b>B</b>	NONE	1µg	5µg	10µg		
<b>C</b>	NONE	1µg	5µg	10µg		
<b>D</b>	NONE	1µg	5µg	10µg		

Figura B. Representación de la placa de 24 pozos de ultra baja adherencia en donde fueron cultivados los monocitos. Aquí se muestra la cantidad de partículas destinadas para cada pozo en donde se cultivaron los monocitos previamente.

Después de tomar el vial de partículas, éstas fueron esterilizadas con ayuda de un vaso de precipitados y gasas; en el vaso se puso una gasa y sobre esta el vial de partículas con la tapa un poco floja, y encima del vial otra gasa. El vaso de precipitados con las partículas se introdujo en una autoclave y se llevó a cabo la esterilización a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Posterior a la esterilización, se hizo una suspensión a 1mg/mL ó 1000µg/mL de las partículas en medio RPMI+G+SH 10%, esto agregando un volumen equivalente al peso de las partículas, por ejemplo: si las partículas pesan 0.2mg o 200µg se agregaron 200µL de medio RPMI+G+SH 10%.

Después se disgregaron las partículas por medio de agitación con ayuda del Vortex y el empleo de un sonicador (ULTRASONIK 28x, NEY DENTAL INTERNATIONAL, California, EUA) durante 2 minutos.

Se preparó el volumen necesario de la suspensión de partículas para llevar a cabo la exposición de las células colocadas en los 20 pozos de las placas de ultra baja adherencia, teniendo en cuenta que a cada pozo le fue adicionado 1mL de la suspensión correspondiente. Las suspensiones con diferente concentración de partículas (10µg/mL, 5µg/mL y 1 µg/mL) fueron preparadas a partir de la

suspensión original de 1mg/mL con ayuda de la ecuación  $C_1V_1=C_2V_2$  haciendo un exceso de 1mL de cada suspensión; después de los cálculos, se requirieron 96 $\mu$ L de la suspensión de 1mg/mL (es por eso por lo que el peso mínimo necesario de partículas es de 0.1mg).

Posteriormente se expusieron las células de los pozos con la suspensión de partículas correspondiente siguiendo los esquemas anteriores; 1mL de suspensión correspondiente a cada pozo.

Las células fueron incubadas durante otros seis días a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. (revisando cada 2 días el medio para comprobar que no hubiese contaminación y que no hubiera cambio de pH)

#### Prueba de Pureza y viabilidad.

En esta prueba fue hecha en el mismo día de la estimulación. Además, se requirieron anticuerpos acoplados a fluorocromos, los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Sonda de viabilidad FITC (Green-Fluorescent Reactive Dye 1:10, Invitrogen, N. Cat. L-23101)
- Anti-CD3 acoplado a PE/Cy7 (BioLegend, N. Cat. 300420)
- Anti-CD4 acoplado a APC/Cy7 (BioLegend, N. Cat. 300518)
- Anti-CD14 acoplado a PETxRed (Invitrogen, REF. MHCD1417)

Se prepararon los cocteles de anticuerpos necesarios para el panel de pureza y los FMOs correspondientes para cada fluorocromo en tubos de fondo cónico de 0.6mL (siempre trabajando protegidos de la luz y teniendo los viales de los anticuerpos en hielo, pues la luz puede alterar o degradar el fluorocromo al cual está acoplado el anticuerpo y la temperatura puede afectar al mismo anticuerpo):

- El panel de pureza fue hecho mezclando 3 $\mu$ L de cada anticuerpo (1 $\mu$ L por cada tubo en el cual se utilizó esta mezcla más 1 $\mu$ L de exceso), como se muestra en la tabla 1.

Panel de tinción	Volumen de cada Ac a mezclar
Anti CD4 - APC/Cy7 (25 $\mu$ g/mL)	3 $\mu$ L
Anti CD3 - PE/Cy7 (25 $\mu$ g/mL)	3 $\mu$ L
Anti CD14 - PETxRed	3 $\mu$ L
TOTAL	9 $\mu$ L

Tabla 1. Cantidad de anticuerpo acoplado a fluoroforos utilizado para elaborar la mezcla que permitió saber el porcentaje de pureza de los monocitos cultivados anteriormente.

- Los FMOs fueron preparados utilizando 3 $\mu$ L de cada anticuerpo marcado con una "x" en la tabla 2.

	CD3 PE/Cy7	CD4 APC/Cy7	CD14 PETxRed
FMO FITC	X	X	X
FMO PE/Cy7	-	X	X
FMO APC/Cy7	X	-	X
FMO PETxRed	X	X	-

Tabla 2. Forma de elaboración de las mezclas utilizadas para los FMOs. Las "X" muestran los anticuerpos añadidos a la mezcla para el FMO correspondiente, los "-" muestran los anticuerpos que no fueron añadidos a la mezcla.

Después de preparar los cocteles de anticuerpos se etiquetaron 14 tubos de 5mL de polipropileno de fondo redondo de la siguiente manera:

- |                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| 1. PBMCs Sin tinción    | 8. Monocitos Sin tinción     |
| 2. PBMCs Pureza         | 9. Monocitos Pureza          |
| 3. PBMCs Viabilidad     | 10. Monocitos Viabilidad     |
| 4. PBMCs FMO CD3        | 11. Monocitos FMO CD3        |
| 5. PBMCs FMO CD4        | 12. Monocitos FMO CD4        |
| 6. PBMCs FMO CD14       | 13. Monocitos FMO CD14       |
| 7. PBMCs FMO Viabilidad | 14. Monocitos FMO Viabilidad |

Se prepararon 14mL de solución de sonda de viabilidad; 1 $\mu$ L de sonda de viabilidad (FITC, 1:10) por cada mililitro de PBS (Amortiguador de fosfatos salino).

Posteriormente se distribuyeron 200 $\mu$ L de las suspensiones de células en los tubos marcados.

Luego se agregó a cada tubo 1mL de solución de sonda de viabilidad, excepto a los tubos marcados como "Sin tinción" y "FMO Viabilidad", a estos últimos únicamente se les agregó 1mL de PBS.

Las células fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz; esta incubación sirve para que la sonda de viabilidad actúe, es decir, entre en las células que han perdido la permeabilidad de su membrana (células muertas).

Posteriormente se centrifugaron las células a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C, y después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con ayuda del Vortex.

Después de resuspender, a cada tubo le fueron agregados 10 $\mu$ L de SFB (Suero Fetal Bovino), se agitó con ayuda del Vortex y se incubaron durante 5 minutos con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos a los cuales pudiera ser posible que se unieran los anticuerpos acoplados a fluorocromos evitando así un posterior error falso positivo.

Al término de la incubación se agregaron los cocteles de anticuerpos a los tubos correspondientes, es decir: a los tubos marcados como "Pureza" se les agregó

3 $\mu$ L de la mezcla correspondiente a cada tubo; a los tubos correspondientes a "FMOs" se les agregó 2 $\mu$ L de la mezcla correspondiente a cada tubo (excepto a los tubos marcados como "FMO FITC", al cual, al igual que al tubo de "Pureza", se les agregaron 3 $\mu$ L de la mezcla de anticuerpos correspondiente).

Al término de la adición de la mezcla de anticuerpos a sus respectivos tubos, estos fueron incubados durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz; nuevamente la incubación sirve para que los anticuerpos se unan a sus epítomos correspondientes.

Después de la incubación a cada tubo se le agregó 1mL de solución de lavado FACS y se centrifugaron a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C.

Al salir de la incubación se decantó el sobrenadante de cada tubo y se resuspendió el botón de células con ayuda del Vortex, posteriormente se le agregaron 300 $\mu$ L de solución de lavado FACS a cada tubo y se agitaron.

Las células fueron guardadas hasta la adquisición en el citómetro de flujo (el día siguiente) a 4°C.

Antes de la adquisición en el citómetro de flujo fue necesario preparar tubos de compensación como controles del equipo, los cuales fueron preparados de la siguiente manera:

Cinco tubos de 5mL de poliestireno de fondo redondo fueron etiquetados como se muestra a continuación:

1. Negativo
2. APC/Cy7
3. PE/Cy7
4. PETxRed
5. FITC

A cada tubo se le agregaron 300 $\mu$ L de PBS y una gota de perlas de control negativas.

Posteriormente a los tubos 2 a 5 se les agregó una gota de perlas de control positivas.

Se les adicionó 0.2 $\mu$ L del fluorocromo correspondiente a cada tubo, se agitaron y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Al término de la incubación se le adicionó a cada tubo 1mL de PBS y fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C

Después se decantó el sobrenadante de cada tubo y se resuspendieron con ayuda del Vortex, posteriormente se les adicionó 200 $\mu$ L de PBS a cada tubo y fueron adquiridos en el citómetro de flujo inmediatamente.

La adquisición de las células (100,000 eventos) se llevó a cabo en un citómetro de flujo BD FACSAria Fusion y su análisis se hizo con el programa BD FACSDiva.

Adquisición de las células por medio de citometría de flujo.

Al igual que en la prueba de pureza, en esta prueba también fue necesario el empleo de anticuerpos específicos para ciertas moléculas de superficie de las células acoplados a fluorocromos, los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Sonda de viabilidad FITC (Green-Fluorescent Reactive Dye 1:10, Invitrogen, N. Cat. L23101)
- Anti-CD14 acoplado a PETxRed (Invitrogen, REF. MHCD1417)
- Anti-CD16 acoplado a BV510 (BioLegend, N. Cat. 302048)
- Anti-CD33 acoplado a APC (BioLegend, N. Cat. 303408)
- Anti-CD36 acoplado a PE (BioLegend, N. Cat. 336206)
- Anti-CD163 acoplado a PerCP/Cy5.5 (BioLegend, 333608)
- Anti-CD206 acoplado a APC/Cy7 (BioLegend, N. Cat. 321120)
- Anti-CD209 acoplado a PE/Cy7 (BioLegend, N. Cat. 330114)

Cabe mencionar que esta tinción se llevó a cabo después de los seis días de incubación de los monocitos.

Al igual que en la prueba anterior, primero se prepararon todos los cocteles de anticuerpos que se iban a usar, tanto para el tubo problema, como para sus FMOs (controles) en tubos Eppendorf de 0.6mL, y trabajando siempre protegiendo los viales de anticuerpos de la luz y manteniéndolos el mayor tiempo posible en hielo.

Las mezclas fueron hechas de la siguiente manera:

- El coctel del panel fue hecho mezclando 5µL de cada anticuerpo (1µL por cada tubo en el que se usó este coctel más 1µL de exceso) como se muestra en la tabla 3.

Panel de tinción	Volumen de cada Ac para mezclar
CD14 – PETxRed	5µL
CD16 – BV510 (200µg/mL)	5 µL
CD33 – APC (25 µg/mL)	5 µL
CD36 – PE (25 µg/mL)	5 µL
CD163 – PerCP/Cy5.5 (200 µg/mL)	5 µL
CD206 – APC/Cy7 (400 µg/mL)	5 µL
CD209 – PE/Cy7 (50 µg/mL)	5 µL
TOTAL	35 µL

Tabla 3. Cantidad de anticuerpo acoplado a fluorocromos utilizado para elaborar la mezcla que permitió saber el porcentaje de células que expresan CD14, CD16, CD33, CD36, CD163, CD206 y CD209, y la cantidad de dichas moléculas expresadas.



- Los cocteles de anticuerpos para los FMOs fueron preparados mezclando 5µL de cada anticuerpo marcado con una “+” en la tabla 4.

Clave	Ac/Fluorocromo Tubo	CD14 PETxRed	CD16 BV510	CD33 APC	CD36 PE	CD163 PerCP/Cy5.5	CD206 APC/Cy7	CD209 PE/Cy7
F1	FMO FITC	+	+	+	+	+	+	+
F2	FMO PETxRed	-	+	+	+	+	+	+
F3	FMO BV510	+	-	+	+	+	+	+
F4	FMO APC	+	+	-	+	+	+	+
F5	FMO PE	+	+	+	-	+	+	+
F6	FMO PerCP/Cy5.5	+	+	+	+	-	+	+
F7	FMO APC/Cy7	+	+	+	+	+	-	+
F8	FMO PE/Cy7	+	+	+	+	+	+	-

Tabla 4. Forma de elaboración de las mezclas utilizadas para los FMOs. Las “+” muestran los anticuerpos añadidos a la mezcla para el FMO correspondiente, los “-” muestran los anticuerpos que no fueron añadidos a la mezcla.

Después de haber preparado los cocteles de anticuerpos fueron etiquetados 40 tubos de 5mL de polipropileno de fondo redondo de la siguiente manera:

- None sin tinción
- None Panel
- None FMO FITC
- None FMO PE
- None FMO PETxRed
- None FMO APC
- None FMO PE/Cy7
- None FMO APC/Cy7
- None FMO PerCP/Cy5.5
- None FMO BV510
- PM1 sin tinción
- PM1 Panel
- PM1 FMO FITC
- PM1 FMO PE
- PM1 FMO PETxRed
- PM1 FMO APC
- PM1 FMO PE/Cy7
- PM1 FMO APC/Cy7
- PM1 FMO PerCP/Cy5.5
- PM1 FMO BV510
- PM5 sin tinción
- PM5 Panel
- PM5 FMO FITC
- PM5 FMO PE
- PM5 FMO PETxRed
- PM5 FMO APC
- PM5 FMO PE/Cy7
- PM5 FMO APC/Cy7
- PM5 FMO PerCP/Cy5.5
- PM5 FMO BV510
- PM10 sin tinción
- PM10 Panel
- PM10 FMO FITC
- PM10 FMO PE
- PM10 FMO PETxRed
- PM10 FMO APC
- PM10 FMO PE/Cy7
- PM10 FMO APC/Cy7
- PM10 FMO PerCP/Cy5.5
- PM10 FMO BV510

Ya con los tubos etiquetados se sacaron de la incubadora las células colocadas en la placa de ultra baja adherencia, pues las células colocadas en la placa de adherencia normal se usaron para extracción de mRNA.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron recolectados en tubos de fondo redondo de polipropileno de 15mL de acuerdo con las condiciones de exposición a las partículas, y posteriormente se alicuotaron en 4 tubos de fondo cónico de 1.5mL (4 tubos por estímulo; 1mL en cada tubo), los cuales fueron guardados en congelación (-21°C) hasta su uso.

Inmediatamente después de la recuperación de los sobrenadantes de los cultivos se agregó a cada pozo 1mL de PBS y con ayuda de una micropipeta se recuperaron las células subiendo y bajando el PBS. El PBS con las células de cada estímulo fue recuperado en un tubo de polipropileno para centrifuga de fondo cónico de 50mL (uno por cada estímulo; los pozos fueron revisados con ayuda del microscopio para verificar que no hubiera células aun adheridas en el pozo, en el caso de que aún hubiera se repitió el paso).

Se realizó un conteo celular con ayuda de la cámara de Neubauer, revisando también la viabilidad celular con azul tripano; esto haciendo una dilución 1:2 de la suspensión de células y el azul tripano.

Posteriormente se centrifugaron las células colocadas en los tubos de 50mL a 1500rpm durante 10 minutos a 4°C, después se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con ayuda del Vortex.

La suspensión de células fue ajustada a  $1 \times 10^6$  cel/mL con PBS.

Después se etiquetaron 2 tubos de 5mL de polipropileno de fondo redondo por cada estímulo: uno para hacer cytopspin (el cual fue guardado a 4°C hasta su uso) y otro correspondiente a los tubos "Sin Tinción" y "FMO FITC", y en cada tubo se separaron 0.5mL de la suspensión de células correspondiente.

Posteriormente, los tubos de 50mL y el tubo de 5mL correspondiente para los tubos "Sin Tinción" y "FMO FITC" fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C. Mientras tanto, se preparó la sonda de viabilidad necesaria para todas las células presentes en los tubos de 50mL; 1µL de sonda de viabilidad (FITC) por cada mililitro de PBS, y 1mL de PBS por cada millón de células.

Al salir de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con ayuda del Vortex.

Se vertió la sonda de viabilidad correspondiente a la cantidad de células en los tubos de 50mL, mientras que al tubo de 5mL se le agregó únicamente 1mL de PBS.

Después se incubaron los tubos durante 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz; esto para que la sonda de viabilidad actúe y entre a las células que perdieron la permeabilidad de su membrana.

A los tubos se les agregó solución de lavado FACS en el mismo volumen agregado de sonda de viabilidad o de PBS.

Los tubos fueron centrifugados a 1500rpm durante 5 minutos a 4°C. Mientras tanto, se adicionaron 10µL de SFB a cada uno de los 44 tubos etiquetados previamente, esto último con la intención de bloquear los sitios inespecíficos a los cuales se pudieran unir los anticuerpos en las células.

Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con ayuda del Vortex.

Posteriormente a los tubos de 50mL se les adicionaron 2mL de solución de lavado FACS, mientras que al tubo de 5mL se le adicionaron únicamente 0.5mL; luego los tubos fueron agitados para resuspender bien las células.

Teniendo ya las suspensiones celulares, estas fueron repartidas respectivamente conforme al estímulo; 200µL de suspensión celular en su respectivo tubo marcado, teniendo cuidado de agitar el tubo después de repartir a dos o tres tubos marcados.

Una vez repartidas las células se llevó a cabo la adición de los anticuerpos a sus respectivos tubos: a los tubos marcados como “Sin Tinción” no se les agregó ningún anticuerpo, a los tubos marcados como “Panel” se les agregaron 7µL de la mezcla correspondiente, a los tubos marcados como “FMO” se les agregaron 6µL de la mezcla correspondiente de anticuerpos (en estos se extremó el cuidado para no confundirse de coctel de anticuerpos).

Posteriormente se incubaron los tubos 20 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz, esto para que los anticuerpos se unieran a sus epítopos correspondientes.

Una vez pasados los 20 minutos, se le agregó a cada tubo 1mL de solución de lavado FACS y se centrifugaron a 1500rpm por 5 minutos a 4°C.

Al salir de la centrifugación se decantó el sobrenadante de cada tubo y se resuspendieron las células con ayuda del Vortex.

Posteriormente se le agregaron 300µL de solución de lavado FACS a cada tubo y estos fueron guardados hasta la adquisición en el citómetro de flujo (el día siguiente) a 4°C y protegidos de la luz.

Antes de la adquisición de las muestras fue necesario la preparación de tubos de compensación tal como se describió en la “Prueba de pureza” acoplándose al número de anticuerpos utilizados.

La adquisición de las células (100,000 eventos) se llevó a cabo en un citómetro de flujo y su análisis se hizo con el programa BD FACSDiva.

#### Prueba de internalización por microscopía.

Para este procedimiento se utilizó el tubo de 5mL de polipropileno de fondo redondo con  $0.5 \times 10^6$  células separado en la tinción de citometría de flujo.

La suspensión celular de este tubo fue ajustada a  $1.25 \times 10^5$  cél/mL con PBS.

Posteriormente se armaron de 3-4 camisas para citocentrífuga por condición, así mismo se marcaron los portaobjetos necesarios; se requirieron que los portaobjetos fueran cubiertos anteriormente con poli L-lisina para que se retuviera correctamente la muestra.

Una vez armadas las camisas y marcados los portaobjetos necesarios, estos fueron colocados en la citocentrífuga junto con un papel filtro especial entre la camisa y el portaobjetos.

Posteriormente se colocaron 200 $\mu$ L de la suspensión de células en las copas de las camisas y se centrifugaron durante 2 minutos a velocidad baja (500rpm) a temperatura ambiente.

Terminada la centrifugación, se expusieron a los portaobjetos al aire para posteriormente fijar la preparación añadiendo metanol puro en la zona de la muestra.

Teniendo las preparaciones fijadas se llevó a cabo una tinción de Wright: esto se realizó cubriendo el área de la muestra con colorante de Wright durante 5 minutos, posteriormente se agregaron unas gotas de agua desionizada durante otros 5 minutos, después se lavaron las preparaciones con agua desionizada y finalmente se dejaron secar al aire.

Con las preparaciones ya teñidas se llevó a cabo el montaje de cada una añadiendo una gota de líquido de montaje sobre la muestra y cubriéndola con un cubreobjetos para después dejar secar el líquido de montaje; en este paso fue necesario hacerlo con mucho cuidado de no dejar algún tipo de burbuja en el líquido de montaje, pues esta podría intervenir en pasos posteriores.

Una vez fijadas las preparaciones, estas fueron visualizadas a través del microscopio fotónico a un aumento de 40x y 100x. Al mismo tiempo se contabilizaron las células, tanto las que tenían presencia de partículas como las que no las tenían llegando a un conteo total de 300 células por condición.

### Cuantificación de TNF $\alpha$

Este ensayo se llevó a cabo mediante un ELISA (Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima) utilizando como muestra los sobrenadantes de los cultivos celulares que fueron expuestos a partículas, así como los que no fueron expuestos, y preservados a -21°C, además, se utilizaron los siguientes anticuerpos y moléculas:

- Anticuerpo de captura: Anticuerpo anti-TNF alfa humano (Thermo scientific, N. Cat. M303)
- Anticuerpo secundario (ENDOGEN, N. Cat. M302B)
- TNF $\alpha$  recombinante (Endogene, STNFA-50)
- Estreptavidina-fosfatasa alcalina (Jackson, N. Cat. 016-050-084)
- Sustrato de fosfatasa (Sigma, N. Cat. S0942)

En un principio se sensibilizó una placa de 96 pozos MaxiSorp de fondo plano; esto se llevó a cabo diluyendo 1:200 el anticuerpo de captura, esto es, a 5mL de PBS se le adicionaron 25 $\mu$ L de anticuerpo, posteriormente se agregaron 50 $\mu$ L de la dilución en cada pozo, se cubrió la placa con parafilm y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se desechó la solución del anticuerpo de captura de un solo movimiento a la tarja y se lavó la placa tres veces con solución de lavado para ELISA llenando el pozo y secando perfectamente.

Posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 $\mu$ L de Superblock, se cubrió con parafilm la placa y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Durante esta incubación se sacaron las muestras a temperatura ambiente para que se descongelaran, asimismo se prepararon las diluciones correspondientes para la curva estándar como se muestra en la tabla 5 (la concentración inicial del TNF $\alpha$  recombinante para la curva estándar era de 5ng/mL).

Dilución	Concentración (pg/mL)	Volumen del estándar o de la dilución	Volumen del diluyente
1	1000	48µL del estándar	192mL de medio RPMI+G+SH 10%
2	500	120mL de la dilución 1	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
3	250	120mL de la dilución 2	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
4	125	120mL de la dilución 3	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
5	62.5	120mL de la dilución 4	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
6	31.25	120mL de la solución 5	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
7	15.625	120mL de la solución 6	120mL de medio RPMI+G+SH 10%
8	7.8125	120mL de la solución 7	120mL de medio RPMI+G+SH 10%

Tabla 5. En esta se muestran las concentraciones de TNF $\alpha$  que tienen las diluciones necesarias para realizar la curva estándar, así como el volumen necesario del stock de TNF $\alpha$  o de las diluciones anteriores, y el volumen de diluyente necesario para llegar a la concentración deseada de cada dilución.

Pasados los 30 minutos se lavó la placa nuevamente tres veces con solución de lavado llenando los pozos y secándolos perfectamente cada vez.

Una vez terminados los lavados se agregaron 50µL de la muestra correspondiente a cada pozo, 50µL de los estándares de la curva y 50µL de los blancos, todos estos por duplicado como se muestra en la figura C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	Dil.7	Dil.7	NONE 005	NONE 005	NONE 009	NONE 009	NONE 012	NONE 012		
B	RPMI	RPMI	Dil.8	Dil.8	1mg 005	1mg 005	1mg 009	1mg 009	1mg 012	1mg 012		
C	Dil.1	Dil.1			5mg 005	5mg 005	5mg 009	5mg 009	5mg 012	5mg 012		
D	Dil.2	Dil.2			10mg 005	10mg 005	10mg 009	10mg 009	10mg 012	10mg 012		
E	Dil.3	Dil.3			NONE 006	NONE 006	NONE 010	NONE 010				
F	Dil.4	Dil.4			1mg 006	1mg 006	1mg 010	1mg 010				
G	Dil.5	Dil.5			5mg 006	5mg 006	5mg 010	5mg 010				
H	Dil.6	Dil.6			10mg 006	10mg 006	10mg 010	10mg 010				

Figura C. Representación del acomodo de la curva estándar y de las muestras de sobrenadante en la placa de 96 pozos MaxiSorp de fondo plano.

Después de colocar las muestras la placa fue cubierta con parafilm y se incubó a 37°C durante 2 horas.

Pasadas las 2 horas se hicieron nuevamente tres lavados con solución de lavado.

Después se le adicionaron 50µL de una dilución 1:1000 de anticuerpo secundario a cada pozo, esto es, se adicionaron 5µL de anticuerpo a 5mL de solución de dilución de anticuerpos y se repartieron 50µL en cada pozo.

Posteriormente se cubrió con parafilm y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Pasada la incubación, la placa se lavó seis veces con solución de lavado llenando completamente los pozos y secando muy bien en cada lavado.

Al terminar los lavados, se adicionó la estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en solución de dilución de anticuerpos, esto es, 2.5µL de la estreptavidina-fosfatasa alcalina en 5mL de solución, y posteriormente se repartieron 50µL de la dilución en cada pozo.

Nuevamente se cubrió con parafilm la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Al término de la incubación, se lavó la placa seis veces con solución de lavado y posteriormente se le agregaron a cada pozo 50µL de sustrato de fosfatasa; esta última solución se preparó añadiendo una pastilla de sustrato de fosfatasa en 5mL de solución amortiguadora para el sustrato de fosfatasa.

Posteriormente se esperó a que en los pozos se desarrollara el color dejando la placa a temperatura ambiente y protegida de la luz (aproximadamente 20 minutos), después se hizo la lectura de la placa en un lector de ELISA a 405nm; en el momento en que la lectura de los pozos con mayor concentración de TNF $\alpha$  de la curva estándar llegó a 1.4 se detuvo la reacción añadiendo a cada pozo 50µL de solución de NaOH al 1M.

Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa GraphPad Prism7, en donde se hizo una regresión lineal con los datos de la curva estándar y se interpolaron los datos de los experimentos.