



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, DAÑO OXIDANTE
Y LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE LAS PM_{2.5}
COLECTADAS EN TRES DISTINTAS REGIONES DE LA CIUDAD DE
MÉXICO Y EN DOS TEMPORALIDADES EN LA LÍNEA CELULAR
A549”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

LAURA BECERRA ARECHIGA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

Dra. MARÍA ANTONIA LUNAGÓMEZ ROCHA (UJAT)

EN CODIRECCIÓN DE:

Dra. YAZMÍN DEBRAY GARCÍA (INER)

Cunduacán, Tabasco, a octubre 2024



UJAT

UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División
Académica
de Ciencias
Básicas



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
RECONOCIMIENTO DEL GOBIERNO DEL ESTADO DE TABASCO
GOBIERNO DE MÉXICO

DIRECCIÓN

Cunduacán, Tabasco; a 03 de octubre de 2024.

**C. LAURA BECERRA ARECHIGA
PASANTE DE LA LIC. EN QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTE**

Por medio del presente, me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, DAÑO OXIDANTE Y LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE LAS PM_{2.5} COLECTADAS EN TRES DISTINTAS REGIONES DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y EN DOS TEMPORALIDADES EN LA LÍNEA CELULAR A549”**, dirigido por la Dra. María Antonia Lunagómez Rocha con la colaboración de la Dra. Yazmín Debray García, bajo la modalidad de titulación por **TESIS**. La comisión de revisión conformada por el Dr. Oswaldo Ignacio Hernández Abreu, Dr. Carlos Javier López Victorio, Dra. Hermicenda Pérez Vidal, Dr. Adib Abiu Silahua Pavón y la Mtra. Ana Cecilia Hidalgo Martínez, liberó el documento en virtud de que reúne los requisitos para el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente.

Sin otro particular, reciba usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA**



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

C.c.p. Archivo.

DIR'DRA.HPV/kfvg

Km.1 Carretera Cunduacán-Jalpa de Méndez, A.P. 24, C.P. 86690, Cunduacán, Tab., México.
Tel/Fax: (993) 3581500 Ext. 6702,6701 E-Mail: direccion.dacb@ujat.mx

www.ujat.mx

En la Ciudad de Cunduacán, el día 15 del mes de octubre del año 2024, el que suscribe Laura Becerra Arechiga alumna del Programa de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, con número de matrícula 182A20045, adscrito a la División Académica de Ciencias Básicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autora de la Tesis presentada para la obtención del grado de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo y titulada “Evaluación de los efectos citotóxicos, daño oxidante y la transición epitelio-mesénquima de las PM_{2.5} colectadas entres distintas regiones de la Ciudad de México y en dos temporalidades en la línea celular A549”, dirigida por las Dras. María Antonia Lunagomez Rocha (UJAT) y Yazmín DebrayGarcía (INER).

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Cunduacán, Tabasco a 15 de octubre de 2024



Laura Becerra Arechiga
182A20045

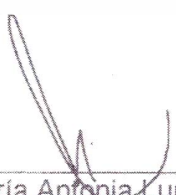
Carta de Cesión de Derechos

Cunduacán, Tabasco a 15 de octubre del 2024

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR(A) y/o AUTORES(RAS) en la producción, creación y/o realización de la obra denominada "EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, DAÑO OXIDANTE Y LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE LAS PM2.5 COLECTADAS EN TRES DISTINTAS REGIONES DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y EN DOS TEMPORALIDADES EN LA LÍNEA CELULAR A549". Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un periodo de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES:

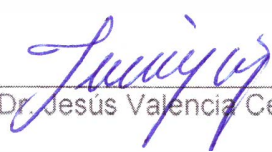

Laura Becerra Arechiga
182A20045


Dra. María Antonia Lunagómez Rocha


Dra. Yazmin Debray García

TESTIGOS:


Dra. María de los Angeles Andrade Oliva


Dr. Jesús Valencia Cervantes

LICENCIATURA - EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, DAÑO OXIDANTE Y LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE LAS PM2.5 COLECTADAS EN TRES DISTINTAS REGIONES DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y EN DOS TEMPORALIDADES EN LA LÍNEA CELULAR A549

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.cinvestav.mx Internet	709 palabras — 3%
2	hdl.handle.net Internet	446 palabras — 2%
3	revistas.javeriana.edu.co Internet	198 palabras — 1%
4	www.scielo.org.co Internet	198 palabras — 1%
5	gacetajuchiman.ujat.mx Internet	175 palabras — 1%
6	docplayer.es Internet	144 palabras — 1%
7	riunet.upv.es Internet	136 palabras — 1%
8	eprints.ucm.es Internet	123 palabras — 1%

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. María Antonia Lunagomez Rocha, quien me motivó y dio la oportunidad de participar en este proyecto y contribuir así al crecimiento de mi desarrollo académico y profesional.

A mi codirectora de tesis la Dra. Yazmín Debray García, junto con la doctora María de los Ángeles Andrade Oliva por abrirme las puertas de su laboratorio, así como haber tenido la infinita paciencia al orientarme y apoyarme durante todo el proceso de mi tesis.

A la M.C Larissa por coordinar la colaboración entre las instituciones implicadas en este proyecto, pero sobre todo por su calidad humana y apoyo incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Toxicología Ambiental Javier Delgado y Víctor Manuel Baños por ayudarme a resolver mis dudas, apoyarme en todo momento y brindarme su amistad y cariño.

A mis compañeras, amigas de generación y ahora colegas Diana Laura, Verónica y Karina, por estar en las buenas y en las malas, motivarme cuando más lo necesitaba, y por ofrecerme su cariño y amistad incondicional.

A mis padres, José Manuel y Lolis, y a mi hermana, Lorena, a quienes dedico esta tesis debido a que su amor incondicional, sacrificio y apoyo inquebrantable han sido la base de mi educación y de todas mis realizaciones. Su presencia y palabras de aliento han sido un faro en los momentos difíciles y una fuente de alegría en los momentos de triunfo.

Al consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis de grado. Con relación al proyecto No. 840342 de la convocatoria Ciencias Fronteras 2019 con el nombre “Bioaccesibilidad de metales-metaloides de las PM_{2.5} en líquido pleural de pacientes con cáncer pulmonar de la Ciudad de México”.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT:	2
ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
2.1. Antecedentes internacionales	7
2.2. Antecedentes nacionales	8
2.3. Antecedentes regionales del área de estudio	11
III. MARCO TEÓRICO	13
3.1. Contaminación atmosférica	13
3.2. Material particulado (PM)	13
3.3. Línea celular A549	15
3.4. Transición epitelio-mesénquima	16
3.5. Marcadores epiteliales	17
3.5.1. E-cadherina	17
3.5.2. Citoqueratinas ácidas y básicas	18
3.6. Marcadores mesenquimales	18
3.6.1. Vimentina	18
3.6.2. α -actina del músculo liso (α -SMA)	19
3.7. Estrés oxidante	19
3.8. Marcadores de estrés oxidante	20
3.8.1. Nrf2	22
3.8.2. SOD-2	22
3.8.3. HMGB1	23
3.8.4. γ -GCS	24
3.8.5. NF- κ B	24
3.9. Fluidos pulmonares simulados	24
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	28
V. HIPÓTESIS	28
VI. OBJETIVOS	29
6.1. Objetivo general	29
6.2. Objetivos específicos	29
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	30
DISEÑO EXPERIMENTAL	31
7.1. Cultivo celular	iv 31

7.2. Viabilidad celular	32
7.3. Determinación de IC50	33
7.4. Exposición de línea celular A549 a PM2.5 para obtención de proteínas.....	33
7.5. Extracción de proteínas	34
7.6. Cuantificación de proteínas por método de Lowry.....	35
7.7. Expresión de proteínas por Western Blot.....	36
VIII. RESULTADOS	38
8.1. Morfología de las células A549 por microscopía de campo claro	38
8.2. Viabilidad de la línea celular A549 expuesta a fluidos artificiales por 24 h.....	40
8.2.1 Curva de inhibición de la viabilidad de células A549 expuesta a distintas concentraciones de PM2.5 diluidas en la solución SELF.	42
8.3. Evaluación del daño oxidante sobre la línea celular A549 expuesta a PM2.5 en solución SELF.	43
8.3.1. Activación de la vía de Nrf2 por exposición a PM2.5.....	43
8.3.2. Expresión de la enzima antioxidante SOD-2	44
8.3.3. Expresión del factor de transcripción NF- κ B	45
8.3.4. Expresión de la enzima antioxidante γ -GCSc.....	47
8.3.5. Expresión de HMGB1	48
8.4. Evaluación de la transición epitelio-mesénquima sobre la línea celular A549 expuesta a PM2.5 en solución SELF.....	49
8.4.1. Expresión del marcador epitelial E-Cadherina.....	49
8.4.2. Expresión del marcador epitelial citoqueratina ácida.....	50
8.4.3. Expresión del marcador mesenquimal α -SMA.....	51
8.4.4. Expresión del marcador mesenquimal Vimentina.....	52
IX. DISCUSIÓN	53
9.1. Viabilidad de la línea celular A549 expuesta a fluido pulmonar simulado	53
9.2. Evaluación del daño oxidante sobre la línea celular A549 expuesta a PM2.5 en solución SELF	53
9.2.1. Comparación con el control	53
9.2.2. Comparación entre temporalidad seca-caliente y seca-fría	54
9.2.3. Comparación entre las estaciones UIZ, PED y LAA	57
9.3. Evaluación de la transición epitelio-mesénquima sobre la línea celular A549 expuesta a PM2.5 en solución SELF	58
9.3.1. Comparación con el control	58
9.3.2. Comparación entre temporalidad seca-caliente y seca-fría	59
9.3.3. Comparación entre las estaciones UIZ, PED y LAA	60
X. CONCLUSIÓN.....	63
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ANEXOS	73
--------------	----

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad por distintos cánceres. Número estimado de casos de incidencia y muertes en México, de ambos sexos y todas las edades por distintos cánceres.....	8
Figura 2. Cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana para PM _{2.5} (datos del monitoreo manual 2022). Los datos de la calidad del aire en los últimos 20 años indican que el valor del percentil 99 del promedio de 24 horas supera los 41 µg/m ³ del valor límite del promedio de 24 horas, a excepción del 2020, y el valor límite del promedio anual sobrepasa los 10 µg/m ³ permisibles conforme a la NOM-025-SSA1-2021	10
Figura 3. Distribución de las alcaldías por zona de la Ciudad de México.	11
Figura 4. Diseño experimental: evaluación del daño oxidante y transición epitelio-mesénquima por PM _{2.5} de la Ciudad de México en la línea Celular A549.....	31
Figura 5. Morfología de las células A549 por exposición a la solución SELF. En el panel de arriba se observan imágenes representativas por microscopía de campo claro de la morfología de las células en el tiempo cero de exposición y en el panel de abajo después de 24 horas de exposición a proporciones de 100% de solución SELF, 50:50 y 80:20. Las imágenes se tomaron con el objetivo 40X	39
Figura 6. Viabilidad por MTT en células A549 expuestas a fluidos pulmonares simulados a distintas proporciones. A) Viabilidad celular por exposición de manera directa (100%) o diluidas con medio de exposición en proporción 50:50 o 80:20 de los fluidos pulmonares simulados; B) viabilidad celular por exposición a los fluidos pulmonares simulados en proporción 80:20, 90:10 y 95:05; C) Representación de viabilidad a distintas proporciones de la solución SELF. Todos los datos expresan el promedio ± error estándar (SEM) de tres experimentos independientes, por cuadruplicado. La línea roja indica el límite para elegir la concentración que compromete la viabilidad en máximo 20%.....	41

Figura 7. Inhibición de la viabilidad de células A549 expuestas a PM_{2.5}. a) Curvas representativas de inhibición de la viabilidad de células A549 expuestas a distintas concentraciones de PM_{2.5} diluidas en SELF al 5% y con ajuste a la ecuación a un sitio. El eje horizontal muestra el logaritmo de las concentraciones de PM_{2.5} (µg/mL) y el eje vertical el porcentaje de viabilidad medido mediante el ensayo de MTT. La línea punteada color rojo permite distinguir las concentraciones que comprometen la viabilidad en más del 20%.; b) tabla con valores de IC₅₀, pIC₅₀ (-Log IC₅₀) e inhibición máxima (Imax) por la exposición a PM de las estaciones de monitoreo LAA, UIZ y PED en las temporalidades seca caliente (sc) y seca fría (sf). Los datos se expresan como el porcentaje del control y son el promedio ± error estándar (SEM) de cuatro experimentos independientes, por triplicado. ANOVA de una vía y post-hoc Tukey's. Los datos no mostraron significancia estadística. 43

Figura 8. La exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} activa la vía de Nrf2 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot para las proteínas Nrf2 y p-Nrf2: control (DMEM+SELF), LAA_{sc}, UIZ_{sc}, PED_{sc}, LAA_{sf}, UIZ_{sf} y PED_{sf}. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. 44

Figura 9. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de SOD-2 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de SOD-2 para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAA_{sc}, UIZ_{sc}, PED_{sc}, LAA_{sf}, UIZ_{sf} y PED_{sf}. La proteína GADPH se utilizó como housekeeping y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's 45

Figura 10. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de NF-κβ en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de NF-κβ para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAA_{sc}, UIZ_{sc}, PED_{sc}, LAA_{sf}, UIZ_{sf} y PED_{sf}. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's..... 46

Figura 11. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM _{2.5} en la expresión de γ -GCSsc en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de γ -GCSsc para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's	47
Figura 12. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM _{2.5} en la expresión de HMGB1 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de HMGB1 para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's	48
Figura 13. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM _{2.5} en la expresión de E-Cadherina en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de E-Cadherina para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's	49
Figura 14. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM _{2.5} en la expresión de citoqueratina en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de Citoqueratina ácida para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's	50

Figura 15. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de αSMA en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de αSMA para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's..... 51

Figura 16. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de Vimentina en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de Vimentina αSMA para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's..... 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Daños celulares por componentes de PM _{2.5}	20
Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y su actividad.	21
Tabla 3. Biomarcadores de estrés oxidante, transición epitelio-mesénquima y control de carga.	30
Tabla 4. Comparativa de la expresión de marcadores para estrés oxidantes entre las estaciones según su temporalidad	58
Tabla 5. Comparativa de la expresión de marcadores para TEM entre las estaciones según su temporalidad	61

“EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS, DAÑO OXIDANTE Y LA
TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA DE LAS PM_{2.5} COLECTADAS EN TRES
DISTINTAS REGIONES DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y EN DOS TEMPORALIDADES
EN LA LÍNEA CELULAR A549”

RESUMEN

Las partículas PM_{2.5} tienen un impacto importante en la salud debido a su capacidad de llegar a los alveolos pulmonares. Las interacciones entre sus componentes químicos y los sistemas biológicos juegan un papel crucial en el desarrollo de enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón en personas expuestas a ellas. Sin embargo, los efectos nocivos de las PM_{2.5} no solo dependen de sus concentraciones y de los componentes peligrosos provenientes de diversas fuentes, están además determinados por las fracciones bioaccesibles. Este trabajo empleó el fluido pulmonar epitelial simulado (SELF) como vehículo para evaluar los componentes biodisponibles de las PM_{2.5} y su efecto en la inducción de estrés oxidante en las células y la transición de células de un estado epitelial a un estado mesenquimal ante la exposición a células de epitelio alveolar humano A549. Se expusieron células A549 en monocapa, por 24 horas, a 10 µg/mL de PM_{2.5} disueltas en solución SELF, provenientes de tres regiones de la ciudad de México: estación pedregal (PED), unidad de monitoreo Iztapalapa (UIZ) y laboratorio de análisis ambiental del norte (LAA); y de dos temporalidades: seca caliente (marzo-agosto) y seca fría (noviembre-febrero) del 2022. Se evaluó la viabilidad celular por el método de MTT, se determinó la IC₅₀, la expresión de proteínas de estrés oxidante (SOD2, γ-GCS, pNrf2, NF-κβ, HMGB1) y de la transición epitelio mesénquima (CK-ácida, E-cadherina, vimentina, α-SMA) por el método de western blot. Se encontró que la exposición a los componentes del PM_{2.5} disuelto en SELF induce daño oxidante y transición epitelio mesénquima parcial dependiente de la temporalidad y zona de colecta del PM, lo cual se puede atribuir a la variabilidad en su composición. La mayor expresión de marcadores de estrés oxidante se observó durante la temporalidad seca-fría con respecto a la seca-caliente, activándose diferente vía de defensa contra el daño generado. Mientras que, para la TEM, lo más destacado se apreció en la temporalidad seca-caliente con respecto a la seca fría y, finalmente, las partículas provenientes de las estaciones PED y LAA generan mayor respuesta celular, siendo UIZ la aparentemente manejable para la célula, en los parámetros analizados.

Palabras clave: PM_{2.5}, Material particulado 2.5; estrés oxidante; transición epitelio-mesénquima, cáncer de pulmón, soluciones artificiales

ABSTRACT:

PM_{2.5} particles have a significant impact on health due to their ability to reach the lung alveoli. Interactions between their chemical components and biological systems play a crucial role in the development of cardiopulmonary diseases and lung cancer in people exposed to them. However, the harmful effects of PM_{2.5} not only depend on its concentrations and the hazardous components coming from various sources, they are also determined by the bioaccessible fractions. This work used simulated epithelial lung fluid (SELF) as a vehicle to evaluate the bioavailable components of PM_{2.5} and its effect on the induction of oxidant stress in cells and the transition of cells from an epithelial state to a mesenchymal state upon exposure. Human alveolar epithelial cells (A549) were exposed in monolayer, for 24 hours, to 10 µg/mL of PM_{2.5} dissolved in SELF solution, from three regions of Mexico City: Pedregal station (PED), Iztapalapa monitoring unit (UIZ) and laboratory northern environmental analysis (LAA); and two temporalities: hot dry (March-August) and cold dry (November-February) of 2022. Cell viability was evaluated by the MTT method, the IC₅₀, the expression of oxidant stress proteins (SOD2, γ-GCS, pNrf2, NF-kβ, HMGB1) and epithelial-mesenchymal transition (CK-acid, E-cadherin, vimentin, α-SMA) were determined by the western blot method. It was found that exposure to the components of PM_{2.5} dissolved in SELF induces oxidative damage and partial epithelial-mesenchymal transition dependent on the timing and area of PM collection, which can be attributed to the variability in its composition. The greatest expression of oxidant stress markers is observed during the dry-cold season compared to the dry-hot season, activating a different defense pathway against the damage generated. While, for the TEM, the most notable was seen in the hot-dry temporality with respect to the cold dry one and, finally, the particles from the PED and LAA stations generate the greatest cellular response, with UIZ being the one that was apparently manageable for the cell, in the analyzed parameters.

Keywords: PM_{2.5}; Particulate matter 2.5; oxidative stress; epithelial-mesenchymal transition; lung cancer; artificial solutions.

ABREVIATURAS

α -SMA	α -actina del músculo liso
A549	Línea celular de epitelio alveolar humano tipo II
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
AP-1	Proteína activadora 1
Cat	Catalasa
CDMX	Ciudad de México
CO	Monóxido de carbono
CK ácida	Citoqueratina ácida
DMEM	Medio mínimo esencial fortificado
DMSO	Dimetilsulfoxido
E-Cad	E-cadherina
γ -GCS	Gamma-glutamylcisteinsintetasa
GPx	Glutathión peroxidasa
GSH	Glutathión reducido
GSH/GSSG	Cociente glutathión reducido y glutathión oxidado
GSSG	Glutathión oxidado
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HO-1	Hemoxygenasa 1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HMGB1	Proteínas de alta movilidad del grupo 1
IC ₅₀	Concentración inhibitoria 50
I _{max}	Inhibición máxima
IL	Interleucina
LAA	Laboratorio de Análisis Ambiental
LPS	Lipopolisacáridos
μ g /mL	Microgramo por mililitro
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MTT	Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
NO	Monóxido de nitrógeno
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NF- κ B	Factor nuclear κ B
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
NQO1/ NADPH	Quinona oxido reductasa
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ [•]	Anión superóxido
O ₃	Ozono
•OH	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Plomo
pIC ₅₀	- Logaritmo de la Concentración Inhibitoria 50
PED	Estación Pedregal
P-Nrf2	Nrf2 fosforilado
PM	Material particulado
PM _{2.5}	Partículas de tamaño aerodinámico $\leq 2.5\mu$ m o finas
SOD	Superóxido dismutasa
SO ₂	Dióxido de azufre

SELF	Fluido pulmonar epitelial simulado
SLF	Fluido pulmonar simulado
SC	Temporalidad Seca caliente
SF	Temporalidad Seca fría
TNF	Factor de necrosis tumoral
TEM	Transición epitelio-mesénquima
UIZ	Estación UAM Iztapalapa
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación del aire se ha vuelto un factor de riesgo para la salud en todo el mundo, por ser una de las principales causas de muerte a nivel mundial debido al aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer de pulmón y neumopatías crónicas y agudas. Se estima que en 2019 la contaminación del aire ambiente (exterior) provocó 4.2 millones de muertes prematuras a nivel mundial (OMS, 2022). El material particulado (por sus siglas en inglés PM) es de los principales indicadores de contaminación el aire, debido a la variedad de estudios científicos que han demostrado los efectos adversos para la salud asociados a la exposición crónica y aguda a este contaminante. El material particulado está conformado por una mezcla compleja de compuestos en estado líquido o sólido, constituida a su vez por elementos químicos y biológicos, como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales se asocian con daño oxidante a nivel celular. El PM tiene origen natural cuando proviene de las erupciones volcánicas, incendios forestales o erosión, y antropogénico cuando se origina de emisiones derivadas de la industria. A su vez, se clasifica como fuente primaria si las partículas se emiten directamente a la atmósfera y secundarias si se forman en la atmósfera mediante procesos de conversión de gas a partículas. De acuerdo a su diámetro aerodinámico, éstas se clasifican en PM₁₀, partículas menores o iguales a 10 micras; PM_{2.5}, partículas menores o iguales a 2.5 micras también llamadas partículas finas y; PM_{0.1}, menores o iguales a 0.1 micras (NOM-025-SSA1-2021, 2021). Su tamaño es la característica física la más relevante para establecer su toxicidad debido a que entre más pequeñas, pueden penetrar hasta el espacio alveolar del pulmón (Poblano Bata, 2018).

Para evaluar la biodisponibilidad de los metales asociados con PM, recientemente se han desarrollado varios fluidos pulmonares simulados como herramientas *in vitro* para predecir la bioaccesibilidad por inhalación, un avance importante más allá de las pruebas tradicionales de solubilidad en agua (Luo *et al.*, 2019).

Distintos estudios han demostrado que el estrés oxidante desempeña un papel fundamental en la citotoxicidad inducida por PM_{2.5} (Jones, 2008; Sies, 2015). Por otro lado, el proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) establecido como la pérdida

de fenotipos epiteliales y adquisición de fenotipos mesenquimatosos como respuesta a un estímulo interno o externo, está relacionado a la invasión y metástasis del cáncer debido al impulso crítico y potencial para el inicio y la progresión del tumor (Bernal *et al.*, 2019). Diversos estudios han reportado que la exposición *in vitro* tanto aguda como crónica a concentraciones medias y altas de PM_{2.5} genera cambios característicos en la expresión génica de los marcadores TEM y en factores transcripcionales.

Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la exposición a PM_{2.5} contribuye a las alteraciones que promueven el cáncer de pulmón no se ha dilucidado por completo. Por otro lado, se desconoce cuánto de los componentes de PM_{2.5} se retiene en el tejido o cuál de los elementos está relacionado con la promoción del cáncer de pulmón y la bioaccesibilidad pulmonar ha sido poco indagada en la última década. Pocos investigadores han decidido cambiar los métodos tradicionales de exposición de contaminantes hacia el uso de fluidos artificiales de pulmón, los cuales pretenden de manera general simular las condiciones fisiológicas naturales, proporcionando una estimación de la cantidad de metal disponible para la absorción en el torrente sanguíneo (Julien *et al.*, 2011).

Por tanto, es de interés para este proyecto evaluar el efecto citotóxico de la biodisponibilidad de metales-metaloides del PM_{2.5} en el fluido pulmonar simulado SELF en la línea celular A549.

II. ANTECEDENTES.

2.1. Antecedentes internacionales

La exposición aguda y crónica a partículas atmosféricas de tipo PM_{2.5} está clasificada como factor de riesgo ambiental para la salud (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 2022). Según estudios epidemiológicos, el PM_{2.5} está asociado a la muerte prematura debido a enfermedades como la cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares, cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e infecciones respiratorias (Becerra Pérez & Ramos Álvarez, 2020). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2016 alrededor de 249 mil muertes prematuras fueron atribuibles a la contaminación del aire exterior y cerca de 83 mil muertes prematuras fueron imputables a la contaminación del aire debido al uso de combustibles sólidos en la vivienda en las Américas (OMS, 2016).

La toxicidad de PM_{2.5} se ha asociado con la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los componentes de las partículas y ambos conceptos están relacionados entre sí. La biodisponibilidad es el grado en que una sustancia alcanza circulación sistémica e incluye el metabolismo, el transporte y la distribución tisular; mientras que el término bioaccesibilidad indica la disponibilidad *in vitro* que tiene el compuesto al organismo cuando es disuelto en un fluido (Julien *et al.*, 2011). Todo componente, soluble en agua o en grasas, puede interactuar con el epitelio respiratorio. Entre ellos, los metales y metaloides, forman parte de los compuestos solubles en agua, participando en reacciones oxidorreductoras que aumentan el proceso inflamatorio y el estrés oxidante. Estos elementos están relacionados a su vez con un mayor daño en macromoléculas, como las proteínas y el ADN (Luo *et al.*, 2019). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) reportó que en el 2010 hubo 223000 muertes por cáncer de pulmón en todo el mundo por la contaminación del aire y ha clasificado a dicho contaminante dentro del Grupo 1, carcinógeno para los humanos (Kelland, 2013). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la exposición a PM_{2.5} contribuye a las alteraciones que promueven el cáncer de pulmón no se ha dilucidado por completo y se desconoce cuánto de los componentes de PM_{2.5} se retiene en el tejido o bien, cuál de los elementos está relacionado con la promoción del cáncer

de pulmón.

En un estudio realizado en Reino Unido, donde buscaban evaluar el contenido de plomo (Pb) pseudototal, se aplicó un fluido pulmonar de epitelio simulado in vitro (SELF), los resultados indicaron un bajo potencial de bioaccesibilidad por inhalación de Pb en muestras de polvo de calles urbanas cuando se modelan utilizando las condiciones de pH neutro de la solución (Dean *et al.*, 2017).

Por ello, es de nuestro interés evaluar la bioaccesibilidad de metales-metaloides de PM_{2.5} en el fluido artificial simulado y su efecto citotóxico en la línea celular A549.

2.2. Antecedentes nacionales

En 2017, la Clínica del Pulmón del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) advirtió que el cáncer de pulmón era la primera causa de muerte por cáncer en México y en el mundo (Secretaría de Salud, 2017). Para el año 2020, en el país se presentaron alrededor de 7,588 casos nuevos y casi el mismo número de muertes por estaneoplasia, como se muestra en la Figura 1 (Bray *et al.*, 2018).

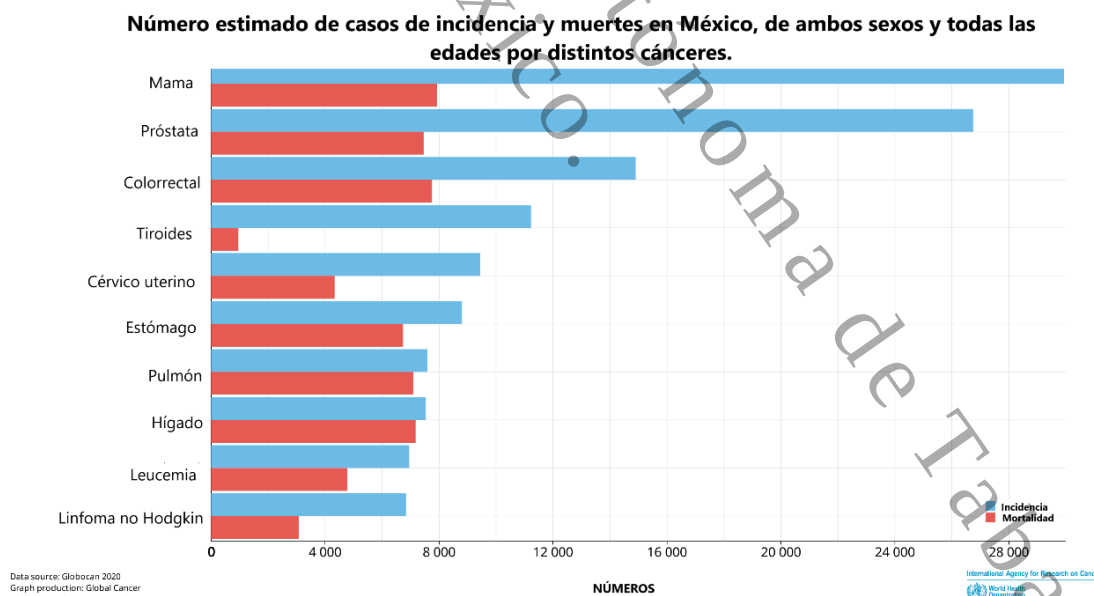


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad por distintos cánceres. Número estimado de casos de incidencia y muertes en México, de ambos sexos y todas las edades por distintos cánceres. Fuente: (Bray *et al.*, 2018)

En un estudio realizado en las tres ciudades más importantes del Estado de Sinaloa

México, para 2017, se reportó que éstas sobrepasaban la concentración promedio anual de $PM_{2.5}$ a los límites máximos recomendados por la norma internacional de la OMS y la Norma Oficial Mexicana NOM-025-SSA1-2021. Asimismo, estimaron que las muertes totales evitables tan solo en las tres principales ciudades de dicho estado serían de 354 si cumpliera con la normativa de la OMS y 261 con la Norma Mexicana, respectivamente (Becerra Pérez & Ramos Álvarez, 2020).

En México, la NOM-025-SSA1-2021 establece como límite máximo permisible para el $PM_{2.5}$ de $41 \mu g/m^3$ en un promedio a 24 h, y $10 \mu g/m^3$ en un promedio anual. En la Ciudad de México (CDMX), las concentraciones promedio de $PM_{2.5}$ superan las establecidas por la normativa nacional (figura 2) y las establecidas por la OMS, aumentando el riesgo para la salud especialmente de los grupos susceptibles y vulnerables.

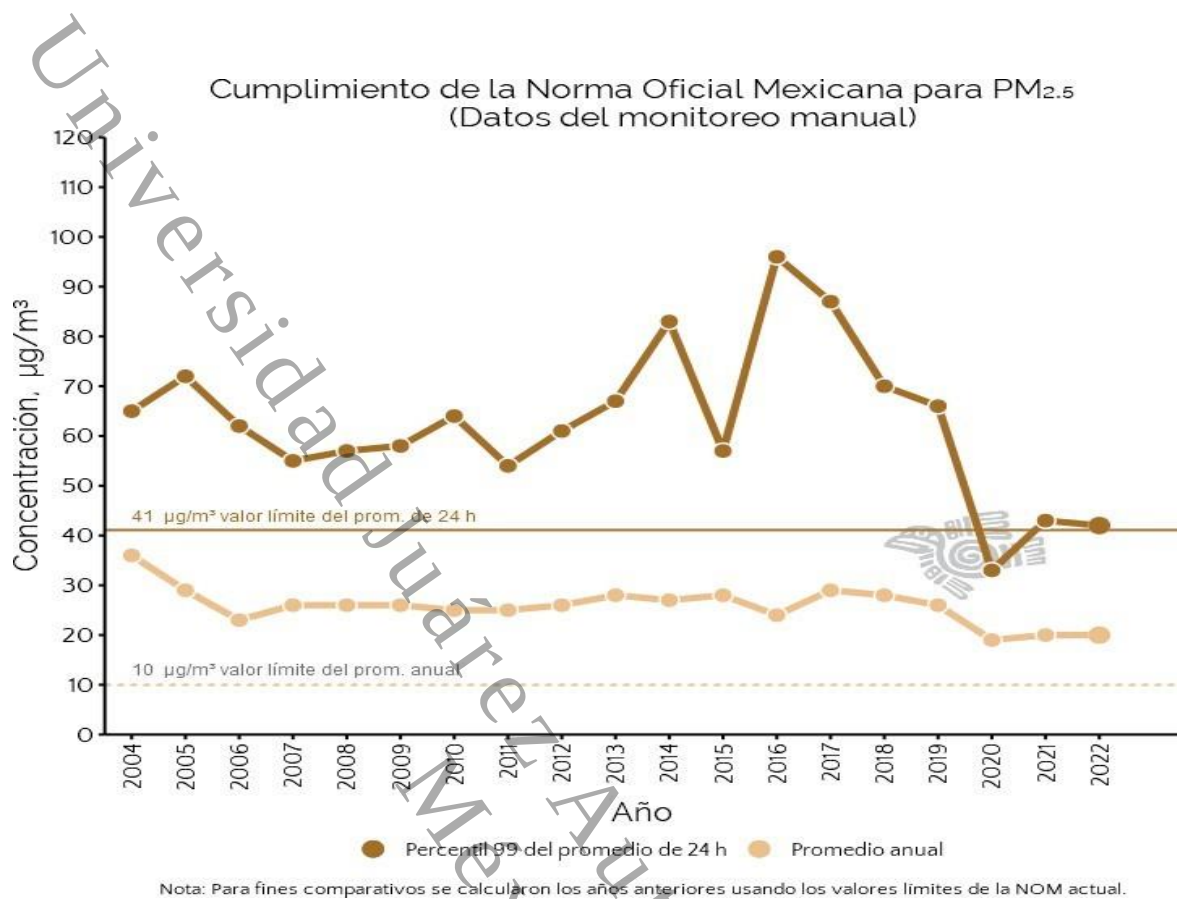


Figura 2. Cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana para PM_{2.5} (datos del monitoreo manual 2022). Los datos de la calidad del aire en los últimos 20 años indican que el valor del percentil 99 del promedio de 24 horas supera los 41 µg/m³ del valor límite del promedio de 24 horas, a excepción del 2020, y el valor límite del promedio anual sobrepasa los 10 µg/m³ permisibles conforme a la NOM-025-SSA1-2021. Fuente: (INECC, 2022).

2.3. Antecedentes regionales del área de estudio

Las estaciones de monitoreo de la calidad del aire que integran el Sistema de Monitoreo Atmosférico están distribuidas en las distintas alcaldías de la CDMX, que se divide en cuatro zonas: norte, sur, centro-poniente y oriente (Figura 3). Las estaciones de interés para este proyecto son la UIZ (UAM Iztapalapa), PED (Pedregal) y LAA (Laboratorio de Análisis Ambiental) que se encuentran ubicadas en las alcaldías Iztapalapa (zona oriente), Álvaro Obregón (zona centro) y Gustavo A. Madero (zona norte), respectivamente. Para dichas estaciones son importantes las emisiones de partículas generadas por ramas industriales como la industria química, del papel y metálica; así como, las emisiones contaminantes generadas en las vialidades altamente congestionadas y la fabricación de productos a base de minerales no metálicos y las actividades agrícolas por el movimiento de tierra durante la labranza (Roldán, 2016).

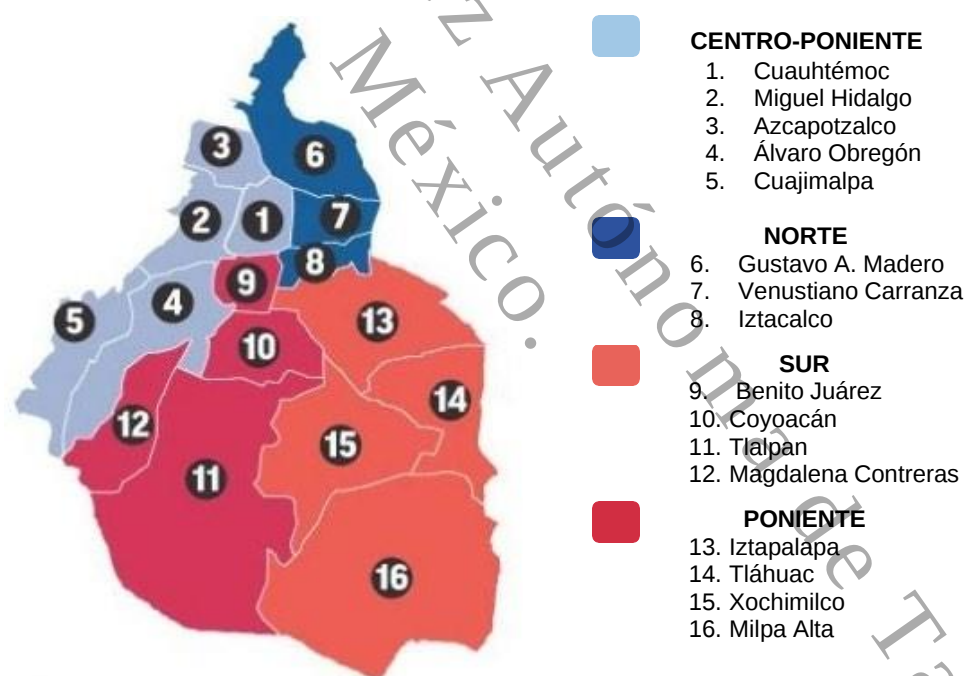


Figura 3. Distribución de las alcaldías por zona de la Ciudad de México. Fuente: (Sierra, 2014).

Además de la ubicación geográfica, la temporalidad es un factor que puede propiciar mayor o menor concentración de contaminantes entre las distintas épocas del año; con excepción de la temporada de lluvia, de junio a septiembre, el resto del año la CDMX

es susceptible a altos niveles de contaminación. Durante los meses cálidos de la temporada seca caliente (marzo-agosto), el ozono y los aerosoles secundarios son los principales responsables del deterioro de la calidad del aire, mientras que la temporada seca fría que es en el invierno (noviembre-febrero) son las partículas suspendidas las que reportan mayores concentraciones (INECC, 2022).

En un estudio realizado en la CDMX en el periodo de abril del 2006 a febrero de 2007 donde se evaluó la variación temporal de hidrocarburos aromáticos nitropolicíclicos en PM_{10} y $PM_{2.5}$ recolectados en el norte de la ciudad, se encontró una concentración anual media de $38.6 \mu g / m^3$ para $PM_{2.5}$, además de una concentración de materia orgánica extraíble con solvente (SEOM) con variaciones relacionadas con la época del año y el tamaño de partícula; siendo mayor el porcentaje de SEOM en $PM_{2.5}$, durante la estación de seca-fría (Valle-Hernández *et al.*, 2010).

III. MARCO TEÓRICO.

3.1. Contaminación atmosférica

La contaminación del aire es un problema de salud pública a nivel mundial, sobre todo en países industrializados. En ella se encuentra presente el contaminante criterio llamado material particulado (PM) para el cual se ha demostrado que la exposición aguda y crónica a las partículas finas ($PM_{2.5}$) está asociada con el aumento de enfermedades no transmisibles como infecciones respiratorias, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares y cáncer de pulmón (Arias-Pérez *et al.*, 2020; Turner *et al.*, 2011).

Los contaminantes criterio son aquellos que cuentan con una norma y se utilizan como indicadores de la calidad del aire. Las normas se crean conforme a su impacto en la salud o el medio ambiente. Actualmente se miden de manera continua en la Ciudad de México siete contaminantes criterio: ozono (O_3), dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrógeno (NO_2), PM_{10} , $PM_{2.5}$, y plomo (Pb) (INECC, 2022).

3.2. Material particulado (PM)

El PM se compone de una mezcla compleja de sustancias en estado líquido o sólido, constituida a su vez por elementos químicos y biológicos, como metales pesados, materiales carbonosos como hollín de diésel, el polvo de la agricultura y las partículas resultantes de procesos productivos, variedad de compuestos orgánicos como polen de plantas, esporas y microorganismos (virus, bacterias, hongos) o componentes, como los lipopolisacáridos (LPS), que juegan un papel esencial en la inflamación, compuestos volátiles e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) los cuales se asocian con daño oxidante a nivel celular (Arias-Pérez *et al.*, 2020).

De acuerdo con su diámetro aerodinámico, el PM puede clasificarse en menores o iguales a 10 micras (PM_{10}), en menores o iguales a 2.5 micras ($PM_{2.5}$) y menores o iguales a 0.1 micras ($PM_{0.1}$). El diámetro aerodinámico es un parámetro importante para caracterizar el comportamiento de las partículas en la atmósfera, y también determina su capacidad de penetración y retención en diversas regiones de las vías respiratorias (NOM-025-SSA1-2021, 2021).

Se conoce como $PM_{2.5}$ a las partículas con un diámetro aerodinámico igual o menor a 2.5 micrómetros, siendo esta característica física la más relevante para establecer su toxicidad; lo anterior se debe a que las partículas que miden menos de 10 micrómetros preponderan en la fracción respirable y penetran hasta el espacio alveolar del pulmón (NOM-025-SSA1-2014, 2014). Además, las $PM_{2.5}$ son toxicológicamente relevantes debido a la naturaleza heterogénea y compleja de sus constituyentes, así como a los tipos de interacciones (aditivas, sinérgicas y antagónicas) entre estos compuestos y los sistemas biológicos (Poblano Bata, 2018).

Por su origen, se pueden clasificar como naturales, provenientes de erupciones volcánicas, incendios forestales, erosión del suelo, etc., o antropogénicas como las emisiones de la industria, el transporte y la ignición de combustibles fósiles, entre otras. Además, pueden clasificarse como primarias, aquellas producidas directamente por alguna fuente contaminante, o secundarias, las que se forman en la atmósfera, como resultado de la interacción química entre gases y partículas primarias (Andrade Oliva, 2021; NOM-025-SSA1-2014, 2014).

3.3. Toxicocinética del $PM_{2.5}$

La fácil absorción de los compuestos que componen el $PM_{2.5}$ en el epitelio respiratorio está directamente relacionada con la liposolubilidad de sus componentes. Se ha observado que la membrana celular de las células del epitelio alveolar es la mejor barrera para los compuestos orgánicos no polares, los cuales tienen un acceso limitado debido a las uniones estrechas de la membrana celular y al tamaño de los poros (Poblano Bata, 2018).

El epitelio alveolar consta de células tipo I y tipo II. Las células epiteliales alveolares tipo I son células especializadas para el intercambio de gases y no son metabólicamente competentes, las células epiteliales alveolares tipo II son metabólicamente activas, es decir, llevan a cabo diversas funciones fisiológicas y biológicas. Por lo tanto, los cambios en las células alveolares II perjudican el funcionamiento normal de todo el epitelio alveolar. Los principales mecanismos propuestos para explicar los efectos tóxicos de

PM_{2.5} son la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), estrés oxidante, inflamación y la alteración de la función mitocondrial o de la NAD(P)H-oxidasa (Andrade Oliva, 2021; Poblano Bata, 2018).

La toxicocinética de PM_{2.5} está influenciada por factores intrínsecos (de la partícula) y extrínsecos (propios del individuo). Los primeros incluyen factores físicos como la forma, el tamaño, la densidad, la higroscopicidad y la carga de superficie de la partícula. Asimismo, su cinética y depósito también están influenciados por los factores biológicos del organismo huésped como: el patrón de respiración (volumen y ritmo respiratorio), ruta de respiración (nasal u oral) y anatomía de las vías respiratorias. El depósito de estas partículas en el tracto respiratorio ocurre principalmente mediante cinco mecanismos: impactación, sedimentación, difusión, intercepción y atracción electrostática (Debray García, 2010; Poblano Bata, 2018).

En general, los diversos estudios sobre la constitución de PM_{2.5} ligada con la toxicidad de las células A549, han demostrado que el extracto soluble en agua, los metales de transición y los compuestos orgánicos pueden causar citotoxicidad, incluida la disminución de la actividad celular y genera un aumento de la reacción inflamatoria. Además, el daño a la membrana celular y la ultraestructura celular de las mitocondrias es igualmente uno de los aspectos más importantes de la citotoxicidad (Jia *et al.*, 2017). Jia y colaboradores (2017) aseguran que los ingredientes orgánicos, como los HAPs y el carbón, juegan un papel destacado en la genotoxicidad y los efectos inflamatorios respectivamente; en cambio, los componentes metálicos ofrecen una mayor contribución al daño oxidante y los componentes inorgánicos no metálicos proporcionan una reducción de la viabilidad.

3.3. Línea celular A549

La línea celular A549, son células epiteliales alveolares de tipo II cuyo origen es del pulmón de un hombre blanco de 58 años con carcinoma (ATCC, 2022); su reproducción es rápida ya que la población se duplica en 22 horas formando una monocapa ya que son células adherentes (Vizcarra Valdés, 2016).

Este tipo de célula en un pulmón normal es escamoso y realiza la tarea de difundir agua, electrolitos y otras sustancias a través de la superficie de los alvéolos de los pulmones.

Estas células son epiteliales basales alveolares humanas y crecen de forma adherente como una monocapa *in vitro* (Jiménez Salazar *et al.*, 2012).

La mayoría de las células epiteliales adultas no cancerosas son capaces de detectar y responder a los cambios en el microambiente circundante. Por ejemplo, cuando una célula se siente rodeada por otras células, deja de dividirse. De esta manera, las células crecen según sea necesario, pero se detienen cuando se quedan sin espacio. En cambio, las células cancerosas pierden su mecanismo de inhibición por contacto, mantienen su independencia y continúan proliferando y migrando incluso cuando están rodeadas de otras células, formando grupos de células y tumores, esto debido principalmente a la sobreexpresión de factores de transcripción involucrados en un proceso llamado transición epitelial-mesenquimatoso (TEM), y por lo tanto aceleran la proliferación celular (Jiménez *et al.*, 2012).

3.4. Transición epitelio-mesénquima

El proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) permite que una célula epitelial adquiera transitoriamente un fenotipo mesenquimatoso en respuesta a un estímulo interno o externo. La TEM está asociada tanto con procesos fisiológicos normales durante la embriogénesis, cicatrización y fibrosis de órganos (como el cáncer). Los cambios asociados incluyen pérdida de polaridad celular, adquisición de capacidad migratoria, capacidad invasiva, resistencia a la apoptosis y aumento de la producción de componentes de la matriz extracelular. Todos estos están mediados por cambios en la expresión génica de proteínas específicas. El proceso TEM se divide en tres fases: células no migratorias, células premigratorias y células migratorias (Bernal *et al.*, 2019; Troncoso *et al.*, 2017).

Para reconocer las diferencias entre los fenotipos epitelial y mesenquimal, es necesario entender aquello que los caracteriza e identifica; por ejemplo, el primero se destaca por conservar una interacción cohesiva célula-célula basada en la formación de capas celulares, con tres dominios de membrana (apical, lateral y basal), uniones intercelulares dentro de cada compartimento que les impiden migrar y la expresión de proteínas que son reconocidos como marcadores de este fenotipo tales como E-cadherina, citoqueratinas 8, 18, 19 y claudinas 4, 2. El fenotipo mesenquimal, en

cambio, se distingue por la pérdida de la interacción intercelular, carencia de polarización, morfología celular alargada con prolongaciones denominadas filopodios, adquisición de la capacidad migratoria y expresión de marcadores moleculares como lo son vimentina, α -SMA, las moléculas de adhesión intercelular y N-cadherina (Bernal *et al.*, 2019; Troncoso *et al.*, 2017).

Variedad de investigaciones exteriorizan que la transición epitelio-mesénquima podría precipitar la transformación de las células epiteliales a las células mesenquimales, lo cual funciona como un impulso crítico y potencial para el inicio y la progresión del tumor ya que a menudo se activa durante el proceso de invasión y metástasis del cáncer (Y. Wanget *al.*, 2020). El proceso de TEM está regulado por factores transcripcionales, incluidos Snail1 y Snail2. En los carcinomas, Snail1 reprime transcripcionalmente la E-cadherina (E-Cad) y regula positivamente los genes mesenquimales. Además, en un estudio de Wang *et al.* (2019) se determinó que la expresión de Snail1 y Snail2 aumenta con la exposición crónica a PM_{2.5} (Benedetti & Reyes, 2015).

3.5. Marcadores epiteliales

3.5.1. E-cadherina

Las cadherinas son un grupo de glicoproteínas transmembranales, cuya función es la adhesión célula-célula dependiente de iones calcio que determinan la estructura del tejido, y controlan la formación y disociación del contacto celular en el desarrollo. Por lo tanto, una de las principales características del proceso TEM es la represión transcripcional de E-cadherina (Bernal *et al.*, 2019). Se unen por medio de un complejo de factores citosólicos al citoesqueleto de actina, lo que determina la plasticidad de las uniones intercelulares y las diversas funciones de señalización de estas moléculas (Troncoso *et al.*, 2017). Las moléculas de cadherinas se unen en forma homotípica en presencia de calcio, mediante interacciones entre sus dominios extracelulares, mientras que los intracelulares se unen a los filamentos del citoesqueleto. Esta unión depende del ensamblaje de un grupo de proteínas intracelulares de anclaje en la cola de las moléculas de cadherinas, principalmente β -catenina y placoglobina. En la mayoría de los carcinomas la progresión tumoral se asocia con pérdida de expresión y/o función de la E-cadherina por las células tumorales, cuya conexión con la TEM se ha establecido

en muchos estudios, que además la han relacionado con invasividad, metástasis y mal pronóstico (Benedetti & Reyes, 2015).

3.5.2. Citoqueratinas ácidas y básicas

Las citoqueratinas (también llamadas queratinas) pertenecen a la familia de las proteínas de filamentos intermedios que se encuentran en el citoesqueleto intracitoplasmático del tejido epitelial. De acuerdo con su peso molecular y carga eléctrica, las queratinas se clasifican en dos grupos:

Tipo 1: citoqueratinas ácidas, de bajo peso molecular.

Tipo 2: citoqueratinas básicas y neutras, de alto peso molecular.

Ciertas citoqueratinas se pueden encontrar en cantidades mayores que las normales en pacientes con diferentes tipos de cánceres de células epiteliales, como cánceres de pulmón, mama, colorrectal, vejiga y de la cabeza y el cuello; por lo tanto, una citoqueratina es un tipo de marcador tumoral (Da Freitas *et al.*, 2013). Los filamentos de citoqueratina se asocian con los desmosomas en la periferia celular. La unión de los filamentos de citoqueratina con la desmoplaquina favorece la formación de placas de adhesión que resisten el estrés a nivel tisular. La interacción entre los filamentos de citoqueratina con los desmosomas mantiene la forma celular y facilita los contactos de célula a célula. La citoqueratina también asegura la localización adecuada de la E-cadherina, a través de esta interacción, la E-cadherina se localiza en la porción basolateral de la membrana celular para formar uniones adherentes que sirven tanto en la adhesión como en la señalización célula-célula. Por lo tanto, cuando se interrumpe la producción de citoqueratina, la E-cadherina está mal localizada en la membrana basolateral y las células pierden polaridad (Kuburich *et al.*, 2022).

3.6. Marcadores mesenquimales

3.6.1. Vimentina

La vimentina es una proteína de filamentos intermedios tipo III, responsable de mantener la forma e integridad de la célula y estabilizar las interacciones citoesqueléticas, como el posicionamiento, el anclaje de orgánulos, la adhesión célula-célula y célula-sustrato. Una característica de las células que adquieren el fenotipo

mesenquimal durante el proceso de TEM lo constituye la sobreexpresión de la vimentina, esto debido a una asociación entre la expresión de Vimentina y una capacidad invasiva incrementada en células cancerosas (Bernal *et al.*, 2019). La vimentina proporciona principalmente resistencia al estrés y la compresión a nivel de una sola célula, a diferencia de las redes de citoqueratina, que median la resistencia a nivel tisular al estrés mecánico y la compresión. La vimentina forma una red hiperelástica que mantiene la viabilidad celular al mejorar la capacidad de estiramiento, la fuerza, la resiliencia y la tenacidad de las células al dispersar el estrés mecánico local a otras regiones de la célula; esto es esencial cuando las células son migratorias (Kuburich *et al.*, 2022).

3.6.2. α -actina del músculo liso (α -SMA)

La α -actina del músculo liso (α -SMA), es una isoforma de actina que contribuye a la tensión mecánica generada por las células, normalmente se restringe a las células del músculo liso vascular, pero la SMA también se puede expresar en ciertas células no musculares, sobre todo en los miofibroblastos. Estas células están presentes en la cicatrización de heridas, cicatrices y lesiones fibrocontractivas donde contribuyen a la fibrosis. En los miofibroblastos, las fuerzas de tracción generadas por células asociadas con SMA contribuyen a la remodelación de la matriz, pero las fuerzas mecánicas exógenas también pueden aumentar la expresión de α -SMA. Las fuerzas mecánicas tienen un fuerte impacto en una gran cantidad de procesos biológicos, incluida la regulación de la forma celular, la diferenciación, la motilidad, la supervivencia y las alteraciones metabólicas necesarias para la cicatrización de heridas y la homeostasis de los tejidos (Wang *et al.*, 2006).

Durante la TEM aumenta la expresión de α -actina del músculo liso (α -SMA), un biomarcador para la diferenciación de miofibroblastos en el tejido pulmonar fibrótico. Por lo tanto, la regulación de la expresión de α -SMA es fundamental para la inducción de miofibroblastos y la génesis de la fibrosis (Ding *et al.*, 2021).

3.7. Estrés oxidante

El estrés oxidante se define como un desequilibrio en los prooxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, debido a un aumento de la generación de especies reactivas

de oxígeno (ERO) que da como resultado daño macromolecular y la interrupción de la señalización y el control redox (Jones, 2008; Sies, 2015). Dicho daño macromolecular suele estar ligado al aumento de los radicales libres, los cuales se caracterizan por ser moléculas pequeñas que tienen un electrón desapareado, y por ello tienden a ser reactivos. Las ERO incluyen radicales libres, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), y oxidantes como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Otros componentes que causan estrés oxidante se desglosan en la tabla 1 (Fainstein & Fainstein, 2007).

Tabla 1. Daños celulares por componentes de $PM_{2.5}$

Tipo	Agentes	Efectos
Componentes inorgánicos	Metales (Ca, n, Si, Zn)	Daño oxidante, lipoperoxidación
	No metales (P, S)	Reducción a la viabilidad
	Metales de transición (Cu, Mn, Fe)	Daño oxidante y efectos inflamatorios
Componentes orgánicos	Carbón	Efectos inflamatorios
	HAP	Genotoxicidad
	Quinonas	Genotoxicidad y efectos inflamatorios
	Elementos biológicos (esporas, virus, bacterias)	Reacciones de hipersensibilidad,

Fuente: (Jia et al., 2017; Poblano Bata, 2018)

3.8. Marcadores de estrés oxidante

Diferentes enzimas antioxidantes, como el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el glutatión peroxidasa, la hemoxigenasa 1 (HO-1) y la peroxirredoxina, desempeñan un papel fundamental contra las ERO en los sistemas biológicos. Entre los factores de transcripción que se activan por ERO destacan el factor nuclear κB (NF- κB), la proteína activadora 1 (AP1) y los factores relacionados al factor nuclear eritroide-2 (NF-E2)

conocidos como Nrfs (del inglés: Nuclear Factor Erythroid 2- related factor). No solo hay antioxidantes enzimáticos, también están los no enzimáticos como los mencionados en la tabla 2 (Fainstein & Fainstein, 2007).

Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y su actividad.

Enzimáticos		
	Actividad	Fuente
Superóxido dismutasa (SOD)	Transforma los radicales $O_2^{\bullet}$ peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	(Jaramillo Juárez <i>et al.</i> , 2012)
Glutación (GSH)	Reduce las ERO	(Gallardo <i>et al.</i> , 2014)
Hemo oxigenasa	Tiene como producto bilirrubina y biliverdina las cuales poseen actividad antioxidante	(Orozco & Pedraza, 2010)
No enzimáticos		
Vitamina C	Neutraliza EROs en fase acuosa, regenera la vitamina E	(Insua, 2003)
Ácido úrico	Elimina los radicales hidroxilos	(Zamora, 2007)
Ubiquinonas	Derivado de quinonas lipídicas solubles, cuyas formas reducidas tienen efectos eficaces como antioxidantes	(Zamora, 2007)
Bilirrubinas	Producto del metabolismo del grupo hem de la hemoglobina y tiene un efecto antioxidante a nivel extracelular	(Zamora, 2007)

3.8.1. Nrf2

La vía Nrf2 se considera la más importante en la célula para proteger contra el estrés oxidante. El análisis de promotores identificó una secuencia específica de unión que actúa en cis designada como elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés Antioxidant Response Element), que controla la expresión basal e inducible de genes antioxidantes en respuesta a xenobióticos, antioxidantes, metales pesados y luz ultravioleta. Esta secuencia central está presente en todos los genes posteriores de Nrf2 que responden a antioxidantes y xenobióticos. Nrf2 se une a ARE y regula la expresión e inducción de genes de enzimas antioxidante mediadas por ARE en respuesta a una variedad de estímulos. Se ha consolidado que la sobreexpresión del cDNA de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión e inducción de NQO1 en respuesta a antioxidantes y xenobióticos. No obstante, su expresión se mantiene en constante regulación, ya que la célula debe conservar un determinado estado redox para perseverar en homeostasis. Una alteración en dicho estado puede modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción, por lo que Nrf2 no se encuentra libre y activo en todo momento, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidante (Kaspar *et al.*, 2009).

La actividad de Nrf2 está regulada en parte por la proteína Keap1 asociada a la actina, que inicialmente se propuso que actuara uniendo y anclando el factor de transcripción en el citoplasma. Se pensó que la activación de Nrf2 en respuesta a señales de estrés era el resultado de una interrupción de esta asociación, liberando Nrf2 para su translocación en el núcleo para efectuar su actividad transcripcional (Nguyen *et al.*, 2009).

3.8.2. SOD-2

En los organismos aerobios, el radical $O_2^{\bullet}$ es producido por diferentes fuentes. Es una especie reactiva de oxígeno que da origen a otras EROS capaces de oxidar distintas biomoléculas. Para evitar la propagación de la cadena oxidativa, la superóxido dismutasa (SOD) transforma los radicales $O_2^{\bullet}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que luego se convierte en agua mediante catalasa o peroxidasa de glutatión (GSH) y oxígeno molecular. Además, protege a las deshidratasas contra la inactivación producida por el superóxido. El radical $O_2^{\bullet}$ tiene un tiempo de vida muy corto gracias a la acción de la

SOD. En este contexto se han identificado cuatro tipos de esta enzima y todas ellas tienen en común la presencia de cofactores como Cu y Zn (dinucleares), y Fe, Mn o Ni (mononucleares). En el humano existen varias formas de esta enzima: SOD-Cu y SOD-Zn en el citosol; SOD-Mn en las mitocondrias y SOD-Cu o SOD-Zn de localización extracelular. Debido a su ubicación mitocondrial, SOD2 es la principal defensa contra la toxicidad de los radicales O_2^* (Jaramillo Juárez *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2006).

3.8.3. HMGB1

Las proteínas de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1, por sus siglas en inglés high mobility group box 1 protein) reciben su nombre por su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. HMGB1 contiene dos dominios de caja HMG de unión a ADN (N-terminal A y central B) y una cola ácida C-terminal. En la mayoría de las células, se encuentra en el núcleo, donde actúa como acompañante del ADN para ayudar a mantener la homeostasis nuclear. Posteriormente se descubrió que también se expresaba en las membranas de la superficie celular, el citosol y las mitocondrias y se liberaba en el espacio extracelular. Tiene muchas funciones biológicas dentro y fuera de la célula; paradójicamente, se ha informado que HMGB1 promueve tanto la supervivencia celular como la muerte celular al regular múltiples vías de señalización del cáncer (Kang *et al.*, 2013). La secreción de HMGB1 puede considerarse una invención evolutiva más reciente, para reutilizar la misma señal que indica daño tisular sin tener realmente muerte celular (Raucci *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que HMGB1 es secretado activamente por macrófagos y actúa como un mediador tardío de endotoxemia y sepsis; actualmente se sabe que diversos tipos de células, además de los macrófagos, secretan HMGB1 en condiciones de estrés. La pérdida de HMGB1 aumenta el daño del ADN y disminuye la eficiencia de reparación del ADN en respuesta a la quimioterapia, la irradiación y el estrés oxidante (Raucci *et al.*, 2007).

3.8.4. γ -GCS

La enzima que cataliza el primer paso limitante de la síntesis de *novo* del glutatión reducido (GSH) es la gamma glutamilcisteína sintetasa (γ -GCS), por lo tanto, su regulación génica es uno de los principales determinantes de la homeostasis del GSH (Carnicer *et al.*, 2006). Recordando que el sistema de oxidación-reducción basado en GSH juega un papel esencial en el mantenimiento de un equilibrio dinámico de GSH/GSSG y se convierte en uno de los sistemas de defensa antioxidantes más importantes en el mantenimiento de los procesos fisiológicos en las células pulmonares. También se convierte en un factor importante en la detección del nivel de estrés oxidante. GSH funciona como una importante barrera antioxidante en los tejidos pulmonares en la protección de las células contra el daño causado por los oxidantes (Li *et al.*, 2017).

Asimismo, la enzima gamma-GCS humana está regulada por la proteína activadora1 (AP1) y los elementos de respuesta antioxidante. Tanto la expresión de GSH como la de γ -GCS están moduladas por oxidantes, antioxidantes fenólicos y agentes inflamatorios y antiinflamatorios en las células pulmonares. γ -GCS está regulado tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Rahman & Macnee, 1999).

3.8.5. NF- κ B

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) comprende una familia de factores de transcripción implicados en la regulación de una amplia variedad de respuestas biológicas. NF- κ B es sensible a redox, existe en forma inactiva a través de su asociación con las proteínas I κ B en el citoplasma. Las EROs impulsan modificaciones de proteínas I κ B; por ejemplo, la fosforilación por el inhibidor de la quinasa NF- κ B (IKK) conduce a su degradación. Estos eventos permiten que el NF- κ B activo se transloque al núcleo, donde induce la expresión de varias moléculas, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleucina (IL)-1 β y la IL-6, que están involucradas en el proceso inflamatorio (Dolcet *et al.*, 2005; Sul & Ra, 2021).

3.9. Fluidos pulmonares simulados

Es necesario tener un amplio conocimiento detallado de los componentes tóxicos, la

distribución espacial y los riesgos potenciales de las PM_{2.5} para obtener un mayor control de la contaminación del aire ambiental. No obstante, la mayoría de los estándares actuales de calidad del aire y las estrategias de reducción de emisiones por lo general se basan en las concentraciones totales de PM con poca consideración de los principales componentes tóxicos. Además, solo una fracción de los contaminantes en el PM inhalado está biodisponible en última instancia para los humanos debido a la especiación química y los efectos a la matriz. Por lo anterior, las concentraciones totales de partículas y metales en el ambiente no pueden evaluar con precisión los riesgos para la salud, y la biodisponibilidad (fracción de un compuesto que alcanza la circulación para ejercer acción en el organismo, el cual implica un proceso complejo de varias etapas diferentes: fases de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de los metales en el aire se ha convertido en una problemática importante en la evaluación de la contaminación del aire (Luo *et al.*, 2019; Pérez-Perez *et al.*, 2020).

La solubilidad de los metales puede abordarse con el término bioaccesibilidad pulmonar, que es definida como la cantidad de una sustancia soluble en un entorno de fluido pulmonar simulado. Por lo tanto, proporciona una estimación de la cantidad de metal disponible para la absorción en el torrente sanguíneo, es decir, la fracción biodisponible (Julien *et al.*, 2011).

Los sitios de depósito y las dosis de partículas inhaladas en los pulmones son factores importantes para evaluar los efectos tóxicos, pero otros factores, como el tamaño, la forma y la composición química de las partículas, también son relevantes para evaluar la toxicidad de las partículas inhaladas en las células y los tejidos del compartimiento del pulmón. En consecuencia, la solubilidad de los metales presentes en las partículas inhaladas en el líquido pulmonar puede considerarse un criterio clave para una evaluación toxicológica (Julien *et al.*, 2011).

Además, distintos estudios de bioaccesibilidad oral llegaron a la conclusión de lo destacable que es la importancia de desarrollar un método *in vitro* específico para las características fisiológicas de la vía de exposición investigada. Con respecto a la inhalación de partículas en el aire, aún no ha surgido una metodología *in vitro* como la opción ideal para realizar mediciones de disolución de metales para estimar la bioaccesibilidad pulmonar (Julien *et al.*, 2011).

Para evaluar la biodisponibilidad en el aire de los metales asociados con PM, recientemente se han desarrollado varios fluidos pulmonares simulados (SLF, por sus siglas en inglés *simulated lung fluid*) como herramientas *in vitro* para predecir la bioaccesibilidad por inhalación, un avance importante más allá de las pruebas tradicionales de solubilidad en agua. Se puede evaluar la bioaccesibilidad de diferentes metales de diferentes fuentes de aerosol (Luo *et al.*, 2019). La solubilidad de los compuestos metálicos en fluidos corporales simulados se usa comúnmente para determinar el riesgo para la salud humana de la exposición a sustancias específicas de interés (Colombo *et al.*, 2008).

Sin embargo, se ha prestado poca atención a la especiación de oligoelementos metálicos en la fase de solución de los fluidos pulmonares, así como a la biodisponibilidad de iones metálicos libres y aquellos que forman complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos (Luo *et al.*, 2019). Esta capacidad de formar complejos fuertes con ligandos tanto orgánicos como inorgánicos significa que no solo pueden alterar la homeostasis celular y desplazar otros iones esenciales, sino también interactuar con grupos funcionales de macromoléculas como proteínas, enzimas y ADN/ARN, y así, interferir con varios procesos celulares (Colombo *et al.*, 2008).

El fluido pulmonar epitelial simulado (SELF, por sus siglas en inglés *simulated epithelial lung fluid*) simula el líquido que recubre el epitelio pulmonar en la región traqueobronquial, por lo que al igual que la solución Gamble (líquido intersticial basal del pulmón profundo), maneja un pH de 7.4 (Dean *et al.*, 2017). Respecto a su composición, una revisión de la literatura publicada indica que las sales inorgánicas, los lípidos surfactantes, las proteínas de gran masa molecular, las proteínas antioxidantes de baja masa molecular y los ácidos orgánicos son todos nativos de los fluidos pulmonares epiteliales de humanos sanos que no fuman, por lo tanto, SELF pretende imitar esta misma condición (Boisa *et al.*, 2014).

IV. JUSTIFICACIÓN

El material particulado es una mezcla compleja y heterogénea de sustancias, el cual adquiere relevancia toxicológica debido a la fácil absorción en el epitelio respiratorio de algunos de los compuestos que lo componen, cumpliendo un papel significativo en la morbilidad de algunas enfermedades respiratorias, como, por ejemplo, el cáncer de pulmón. Además, distintos estudios han confirmado que la presencia de este contaminante dentro del organismo puede desencadenar un daño oxidante en las células e incluso una transformación de las células de un fenotipo epitelial a mesenquimal (Arias-Pérez *et al.*, 2020; Y. Wang *et al.*, 2019). No obstante, gran parte de estas investigaciones y ensayos con PM han tomado como solvente el agua, debido a su capacidad de disgregar adecuadamente el PM. Sin embargo, no es el vehículo más adecuado si se pretende mimetizar las condiciones propias del organismo. Con el interés de evaluar la biodisponibilidad en el aire de los metales asociados con PM se desarrollaron fluidos pulmonares simulados como herramientas *in vitro* para predecir la bioaccesibilidad por inhalación (Colombo *et al.*, 2008).

A su vez, en la Ciudad de México, la concentración media actual de PM_{2.5} supera el límite máximo permisible a 24 h y anual (NOM-025-SSA1-2021, 2021), detectado por las distintas estaciones de monitoreo de la calidad del aire distribuidas en todas las alcaldías de la ciudad; sobre todo en aquellas zonas donde las actividades industriales colaboran con las emisiones contaminantes de PM_{2.5}, que además suele variar la concentración dependiendo de la zona y la temporalidad de la recolección. Debido a lo anterior, en el presente proyecto se evaluó el daño oxidante y la transición epitelio-mesénquima inducido en células de epitelio alveolar humano A549, expuestas a la fracción soluble de PM_{2.5} recolectado en tres distintas zonas de la Ciudad de México en dos diferentes temporalidades, disuelto en un fluido pulmonar artificial simulado (SELF).

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La exposición a $PM_{2.5}$ disuelto en SELF inducirá daño oxidante y la transición epitelio mesénquima en la línea celular A549 dependiente de la temporalidad y zona de colecta del PM?

V. HIPÓTESIS

La exposición a $PM_{2.5}$ disuelto en SELF, induce daño oxidante y transición epitelio mesénquima en la línea celular A549 dependiente de la temporalidad y zona de colecta del PM.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Evaluar el daño oxidante y la transición epitelio-mesénquima en la línea celular A549 por exposición a PM_{2.5} disuelto en SELF de tres distintas regiones de la Ciudad de México y dos diferentes temporalidades.

6.2. Objetivos específicos

1. Valorar la viabilidad por MTT y los cambios morfológicos en diferentes proporciones de la solución SELF
2. Determinar el efecto citotóxico del PM_{2.5} en fluidos pulmonares simulados, obtenido de tres distintas regiones de la Ciudad de México en dos diferentes temporalidades sobre la línea celular A549
3. Evaluar el daño oxidante sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} obtenido de tres diferentes regiones de la Ciudad de México y dos diferentes temporalidades a través de la expresión de proteínas de Nrf2, P-Nrf2, SOD-2, HMGB1, γ -GCS y NF- κ B
4. Evaluar el proceso de transición epitelio-mesénquima sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} obtenido de tres diferentes regiones de la Ciudad de México en dos diferentes temporalidades a través de la expresión de E- cadherina, vimentina, α -SMA y citoqueratina ácida.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Los marcadores utilizados, con los datos del fabricante y la dilución utilizada para los ensayos del estrés oxidante y la transición epitelio mesénquima se especifican en la tabla 3.

Tabla 3. Biomarcadores de estrés oxidante, transición epitelio-mesénquima y control de carga.

Anticuerpo	Marca	Núm. catálogo	Peso molecular (KDa)	Dilución	Ac
Estrés oxidante					
Nrf2	Bioss	BS1074R	67	1:500	Conejo
P-Nrf2	Bioss	BS23531R	68	1:500	Conejo
Γ-GCS	Santa Cruz	SC166345	73	1:250	Conejo
NF-κβ	BioLegend	622602	65	1:250	Conejo
SOD-2	Santa Cruz	SC133134	25	1:250	Ratón
Transición epitelio-mesénquima					
Vimentina	Bioss	BS075612	55-57	1:250	Ratón
E-cadherina	Bioss	BS1009R	80-120	1:250	Conejo
α-SMA	Sigma	A5228	42	1:250	Ratón
Citokeratina básica	Santa Cruz	SC57004	50-70	1:250	Ratón
Citokeratina ácida	Santa Cruz	SC58719	40-65	1:250	Ratón
Housekeeping					
GADPH	Santa Cruz	SC322233	37	1:1000	Ratón

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental para este estudio se esquematiza en el siguiente diagrama.

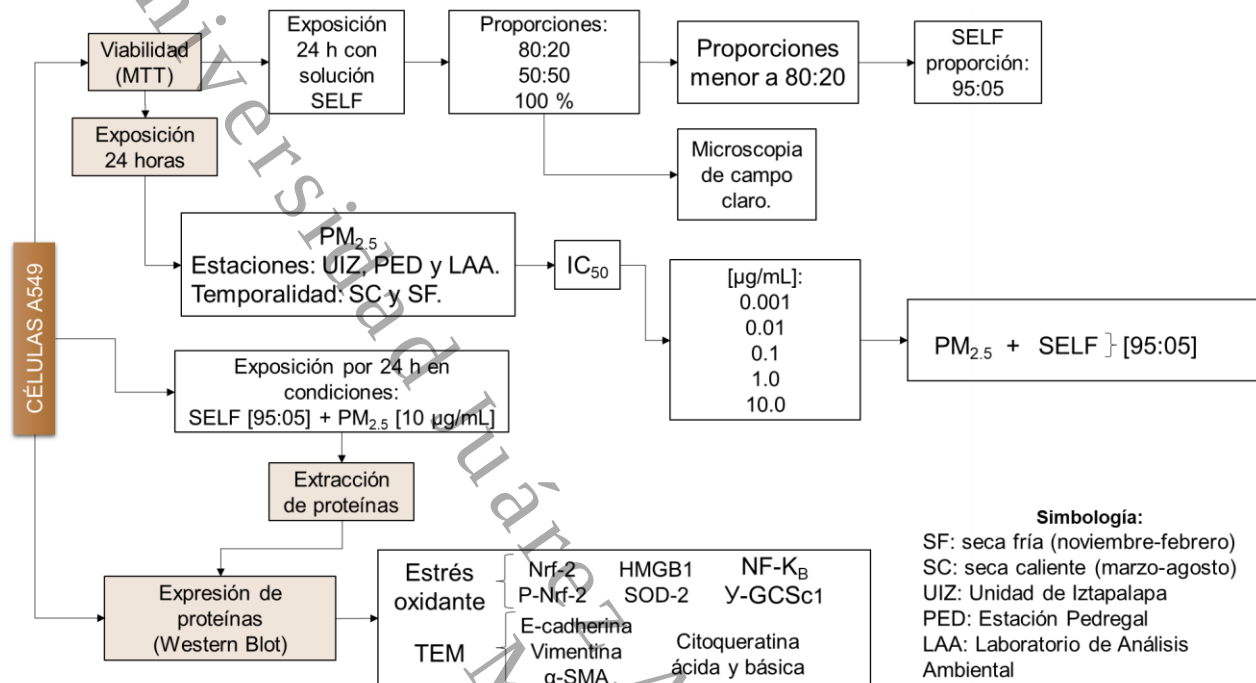


Figura 4. Diseño experimental: evaluación del daño oxidante y transición epitelio-mesénquima por PM_{2.5} de la Ciudad de México en la línea Celular A549.

7.1. Cultivo celular

Se empleó la línea celular A549 proveniente de células epiteliales basales alveolares de adenocarcinoma humano con crecimiento en monocapa obtenida de American Type Culture Collection (ATCC®); las cuales se conservaron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado al 10% de suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies Gibco), 1% de penicilina, streptomycin y neomicina (Sigma Aldrich), en placas estériles (ThermoFisher Scientific) a 37°C, en una atmósfera de CO₂ del 5%. Se realizó el recambio de medio cada tercer día, hasta alcanzar la confluencia deseada, posteriormente se utilizaron para los experimentos de viabilidad y exposición al material particulado.

Para sembrar las células, una vez tenida la cantidad suficiente, se lavaron por 2 minutos con solución buffer de fosfatos 1X (PBS) (Life Technologies Gibco) y se adicionó solución Tripsina-EDTA 1X (Sigma Aldrich) durante 5 minutos a 37°C para obtener una

suspensión celular para posteriormente realizar conteo de las células mediante una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripano, que permite diferenciar células vivas de muertas. Se sembraron 24 horas para asegurar la adherencia celular y realizar las exposiciones.

7.2. Viabilidad celular

Principio

Los métodos de viabilidad celular permiten observar y medir cualitativa y cuantitativamente la viabilidad celular en cultivo, asegurando que la información proporcionada sea verdadera, confiable y reproducible. El ensayo con MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celulares. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el MTT a formazán. Los cristales de formazán insolubles se disuelven utilizando una disolución de solubilización y la disolución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 500-600 nanómetros con un espectrofotómetro multipocillos (Jiménez, 2023; Merck, 2023).

Procedimiento

Se utilizaron cultivos con una densidad de 45,000 células/cm². Las células se sembraron en placas de 96 pozos de fondo plano con 45000 células/cm² por pozo con 100 µl de medio DMEM suplementado al 10% de SFB, se incubaron por 24 horas en condiciones estándar para permitir la adhesión celular a la superficie del pozo.

Para valorar el efecto citotóxico de las soluciones se preparó medio de exposición DMEM suplementado al 0.5% de SFB y 1% de antibiótico; cumplido el tiempo de incubación se eliminó el medio de cultivo y se agregó el medio de exposición en proporción 100, 50:50, 80:20 o 95:05 %, en la solución de interés (SELF). Los ensayos se realizaron por cuatuplicado y se observó la morfología de las células en un microscopio invertido de campo claro a las 0 y 24 horas de incubación.

Finalizado el tiempo de tratamiento se añadieron 10 μ l de MTT en concentración de 5 mg/mL; las placas fueron incubadas durante 3 horas en condiciones estándar. Posteriormente, se retiraron las soluciones y se dejó secar, una vez seco el pozo se agregaron 90 μ l de DMSO seguido de incubación por 10 min a 37°C. Finalmente se leyó la placa a 540 nm con previa agitación media por el espectrofotómetro durante 15 segundos.

7.3. Determinación de IC₅₀

Principio

Los ensayos de citotoxicidad in vitro con técnicas de laboratorio utilizadas para medir la toxicidad de un compuesto o sustancia en células en cultivo; normalmente implican exponer células cultivadas a concentraciones variables de un compuesto y medir el grado de muerte celular o inhibición del crecimiento células. La IC₅₀ (concentración inhibitoria media: la mitad de la concentración inhibitoria máxima) es la concentración del compuesto que provoca una reducción del 50% del efecto buscado, en nuestro caso, en la viabilidad (Capcot, 2023).

Procedimiento

Para determinar el efecto citotóxico de la suspensión de PM_{2.5} con solución SELF, se sembraron 45 000 por células/cm² por pozo en placas de 96 pozos de fondo plano con 100 μ l de medio DMEM suplementado al 10% de SFB, se incubaron por 24 horas en condiciones estándar para permitir la adhesión celular a la superficie del pozo. Posteriormente se desechó el medio y se añadió medio suplementado al 0.5% de SFB y la solución SELF en proporción 95:05 a diversas concentraciones de PM (0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 μ g/mL). Para ello, se hicieron soluciones madre con el material particulado con SELF, se sonicaron por 10 segundos y se hicieron diluciones para tener la concentración deseada. A continuación, se realizó el ensayo de MTT, en las condiciones anteriormente descritas y los resultados de las absorbancias obtenidas se ingresaron en el software GraphPad para graficar los resultados.

7.4. Exposición de línea celular A549 a PM_{2.5} para obtención de proteínas

Las células se sembraron en placas de 6 pozos de fondo plano con 432,000 células por

pozo con 2 mL de medio DMEM suplementado al 10% de SFB, se incubaron por 24 horas en condiciones estándar para permitir la adhesión celular a la superficie del pozo. Subsiguientemente, se expusieron a las suspensiones de PM_{2.5} en la solución SELF (95:05) a una concentración final de 10 µg/mL previamente sonificado y se dejó incubar en condiciones estándar por 24 horas. La condición control tuvo ausencia de PM.

7.5. Extracción de proteínas

Principio

Las proteínas pueden extraerse a partir de las células que constituyen los tejidos u órganos; para ello el primer paso es romper las células o el tejido para tener acceso a las proteínas específicas, obteniéndose lo que se denomina extracto crudo, si es necesario se pueden realizar centrifugaciones diferenciales para obtener fracciones subcelulares o para aislar organelos específicos. Básicamente, las proteínas asociadas a membrana quedarán en el pellet y las solubles en el sobrenadante. La lisis celular y la solubilización de proteínas son fundamentales para un análisis eficaz y un procesamiento eficiente. El método de extracción puede ser enzimático, químico, mecánico o una combinación (Merck, 2023; WordPress, 2008).

Procedimiento

Para la extracción de proteínas, se retiró el sobrenadante, posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se añadieron 300 µl de Buffer de lisis (10mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) a cada pozo. En una cama de hielo se realizaron los raspados de los pozos, recuperándolo en tubos y dejándolo en agitación por 30 min. Posteriormente, se sonicó durante 5 segundos manteniendo los tubos en hielo. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C y se extrajo el sobrenadante, para almacenarlo a -80° C para el consecutivo análisis de proteínas.

7.6. Cuantificación de proteínas por método de Lowry

Principio

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la Ley de Lambert-Beer. Primero sucede la reacción de Biuret., donde los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el cobre en condiciones alcalinas para producir Cu^+ , el cual reacciona con el reactivo de Folin, en la reacción de Folin Ciocalteau, donde el fosfomolibdotungstato se reduce a azul de heteropolimolibdeno por oxidación catalizada por cobre. Las reacciones dan como resultado un color azul fuerte, que depende en parte del contenido de tirosina y triptófano. Para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra a analizar los resultados de absorbancia se interpola a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, por lo general albúmina sérica bovina (BSA, bovine seric albumin), cuya concentración es conocida (Valdés, K., & Valdés, M., 2022).

Procedimiento

La cuantificación de proteínas se realizó por colorimetría. Se utilizó BSA como proteína de referencia para la formación de una curva estándar ocupando seis concentraciones de BSA (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 y 1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) utilizando como diluyente agua MiliQ. Se preparó el Mix de Lowry con el reactivo A (Na_2CO_3 al 2 % disuelto en NaOH 0.1 N), reactivo B (CuSO_4 al 2% disuelto en agua MiliQ) y reactivo C (tartrato de sodio/potasio disuelto en NaOH 0.1 N) en proporción 50:1:1 respectivamente. La muestra se colocó por duplicado en placas de 96 pozos de fondo plano, se agregaron 200 μl del Mix de Lowry a cada pozo, se agitó e incubó a 350 rpm por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se preparó el reactivo de Folin-Ciocalteau con agua MiliQ en proporción 1:4, y se agregaron 20 μl de la solución a cada pozo, se agitó e incubó a 350 rpm por 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las lecturas de absorbancia se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de onda de 620 nm. Las absorbancias se extrapolaron mediante la ecuación de la recta resultante de la curva de referencia.

7.7. Expresión de proteínas por Western Blot

Principio

La técnica de Western blot consiste en la separación de proteínas en función de su tamaño mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), un gel en placa infundido con un agente de disociación llamado dodecilsulfato de sodio (SDS), seguida de la transferencia de las proteínas separadas a una membrana denitrocelulosa o PVDF (transferencia) y la detección de la proteína diana mediante anticuerpos específicos radiomarcados (NIH, 2023).

Procedimiento

Después de cuantificar las proteínas, se procedió a la inmunodetección por Western Blot. Para ello, primero se tomaron 10 µg de proteína por muestra y se le añadieron 5 µl de buffer de carga, se procedió a homogenizar la muestra y se les hizo un spin a 2.5 rpm por 30 segundos en una centrifuga. Las muestras se cargaron en geles al 12% de poliácridamida, los cuales se corrieron a un voltaje constante (100 V) hasta aproximadamente 1 cm antes del borde del gel (durante una hora y media) a temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a 100 V a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol durante dos horas. Se usó un marcador de peso molecular, y la tinción de rojo Ponceau para verificar la correcta transferencia de las proteínas.

Consecutivamente, la membrana se lavó con PBS, se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS durante 1 h, seguidamente se hizo un lavado con PBS 1x por 5 min para retirar la solución de bloqueo, luego se adicionó el anticuerpo primario anti-SOD-2 (1:500 con PBS Tween al 0.1%) y se dejó toda la noche a 4° C. A continuación, se lavó la membrana 3 veces con PBS Tween (0.05%) durante 5 min, se incubó el anticuerpo secundario anti-ratón (1:10,000) durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Nuevamente, la membrana fue lavada 3 veces con PBS Tween (0.1%) y se procedió al revelado de las bandas reconocidas en un cuarto oscuro con luminol.

Una vez detectada la proteína de interés, se utilizaron las mismas membranas para

detectar GADPH como control de carga. Para esto, la membrana se lavó con solución de streapping por 10 min, se hicieron lavados durante 5 min con PBS 1X y PBS Tween al 0.1%, luego se incubó con el Ac GADPH (1:1000) durante toda la noche; se lavó la membrana 3 veces durante 5 min. Y se incubó con el Ac secundario anti-ratón (1:10,000) por dos horas, y se continuó con el mismo procedimiento descrito previamente para detectar la presencia de las bandas correspondientes a GADPH.

Se siguió la misma metodología con las demás proteínas, teniendo como diferencia los anticuerpos empleados y su dilución (descritos en la tabla 1). La dilución y el tiempo de los lavados con PBS Tween al 0.1% después de cada incubación con anticuerpos primarios y secundarios, según si éste último era hecho en conejo (1:10,000; 3 lavados de 5 min), cabra (1:20,000; 3 lavados de 5 min) o ratón (1:10,000; 2 lavados de 3 min).

VIII. RESULTADOS

8.1. Morfología de las células A549 por microscopía de campo claro

Para saber qué cantidad utilizar de la solución SELF y que no comprometiera a las células A549, se seleccionaron 3 proporciones de la solución SELF con medio de cultivo, las cuales fueron: 100% de la solución SELF, 50:50 (SELF: medio de cultivo) 80:20 (medio de cultivo: SELF). Las células con cada una de las proporciones se observaron bajo el microscopio de campo claro. En la figura 5 en el panel de arriba se muestran las micrografías tomadas con el objetivo de 40X las células que corresponde al tiempo 0 (momento donde se le colocaron las proporciones seleccionadas de la solución SELF) y en el panel de abajo se muestran después de 24 horas de exposición al fluidopulmonar simulado SELF; en el grupo control al tiempo cero se observa una morfología de empedrado, escamosas formando una monocapa. En el grupo de la proporción 80:20 y 50:50 se aprecia morfología relacionada a lesiones celulares que no significan un riesgo vital para la célula en distintos grados como la tumefacción turbia (altera la regulación del volumen celular) y la degeneración hidrópica vesicular (rotura de organelos, visto como un gran espacio vacío). Sin embargo, para llegar a ésta última se tuvo que pasar por la degeneración microvacuolar (aumento del tamaño mitocondrial de hasta cinco veces el tamaño normal) y degeneración hidrópica vacuolar (acumulación de agua en el retículo endoplásmico) que sólo pueden ser apreciadas por microscopía electrónica (Sacchetti et al., 2016). En contraste, en el panel del 100 % se ven granulosas, este daño se ve más marcado después de 24 horas de exposición. En cuanto a las células de 50:50 y 80:20 se ve más marcado un cambio de la morfología celular en el grupo 50:50 en comparación con el de 80:20 a distintas proporciones de solución con medio de exposición, donde claramente se aprecia una pérdida considerable de las características morfológicas normales de las A549, indicando afectación a las condiciones de exposición.

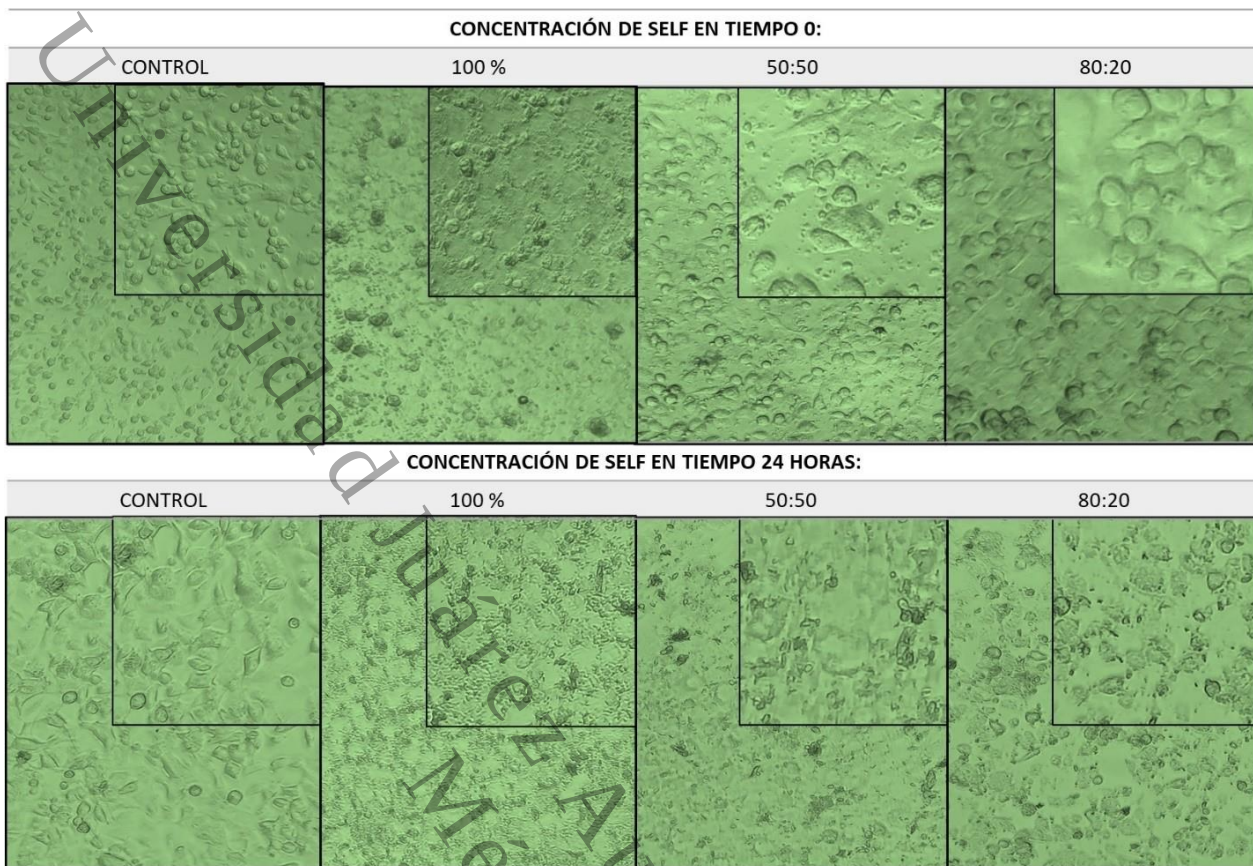


Figura 5. Morfología de las células A549 por exposición a la solución SELF. En el panel de arriba se observan imágenes representativas por microscopía de campo claro de la morfología de las células en el tiempo cero de exposición y en el panel de abajo después de 24 horas de exposición a proporciones de 100% de solución SELF, 50:50 y 80:20. Las imágenes se tomaron con el objetivo 40X.

8.2. Viabilidad de la línea celular A549 expuesta a fluidos artificiales por 24 h.

Cabe destacar que los ensayos de viabilidad a 24 h se realizaron con diversos fluidos artificiales. Cada uno de ellos representa distintas condiciones: el líquido intersticial artificial (AIF), el entorno inmediato de todas las células, producido naturalmente a través del intercambio de sangre transcapilar que rodea las células y los tejidos; el líquido pulmonar epitelial simulado (SELF) el ambiente extracelular del pulmón; el líquido lisosomal artificial (ALF) el fluido dentro de un lisosoma y la solución comercial Gamble el líquido intersticial basal del pulmón profundo. De ellos, se eligió trabajar con SELF por ser de los primeros fluidos con que entra en contacto el PM. Se empezaron con proporciones de 100, 50:50 y 80:20% del fluido de interés y medio de exposición (figura 6A), respectivamente. Se observa que, a mayor proporción de fluido (Gamble, AIF, ALF, SELF) o agua, las células disminuyen la viabilidad. Dichos resultados de la gráfica concuerdan con los efectos previamente observados en microscopía y la morfología de las células. Sin embargo, como en algunos casos, la viabilidad era inferior al 80%, se decidió realizar las proporciones a 90:10 y 95:05 y determinar nuevamente la viabilidad (figura 6B); en la proporción 90:10 hay un aumento moderado de la viabilidad en las soluciones ALF y SELF donde este último con dificultad logra sobrepasar por poco el 80% de viabilidad; en la proporción 95:05 la viabilidad mejora considerablemente en la solución SELF. En este sentido, no se realizó análisis estadístico ya que lo importante no es la significancia con el control o entre ellos, sino la cercanía con el 80% de viabilidad.

Debido a que la solución SELF tiene una mejor disgregación de los componentes que conforman el material particulado, se opta trabajar con dicha solución en la proporción 95:05 para las exposiciones con PM_{2.5}.

La figura 6C, muestra el comportamiento general de SELF, el fluido artificial al que se enfoca este trabajo, sobre la viabilidad celular, la cual es dependiente de la proporción de ésta. Debido a que la solución SELF tiene una mejor disgregación de los componentes que conforman el material particulado, se opta trabajar con dicha solución en la proporción 95:05 para las exposiciones con PM_{2.5}.

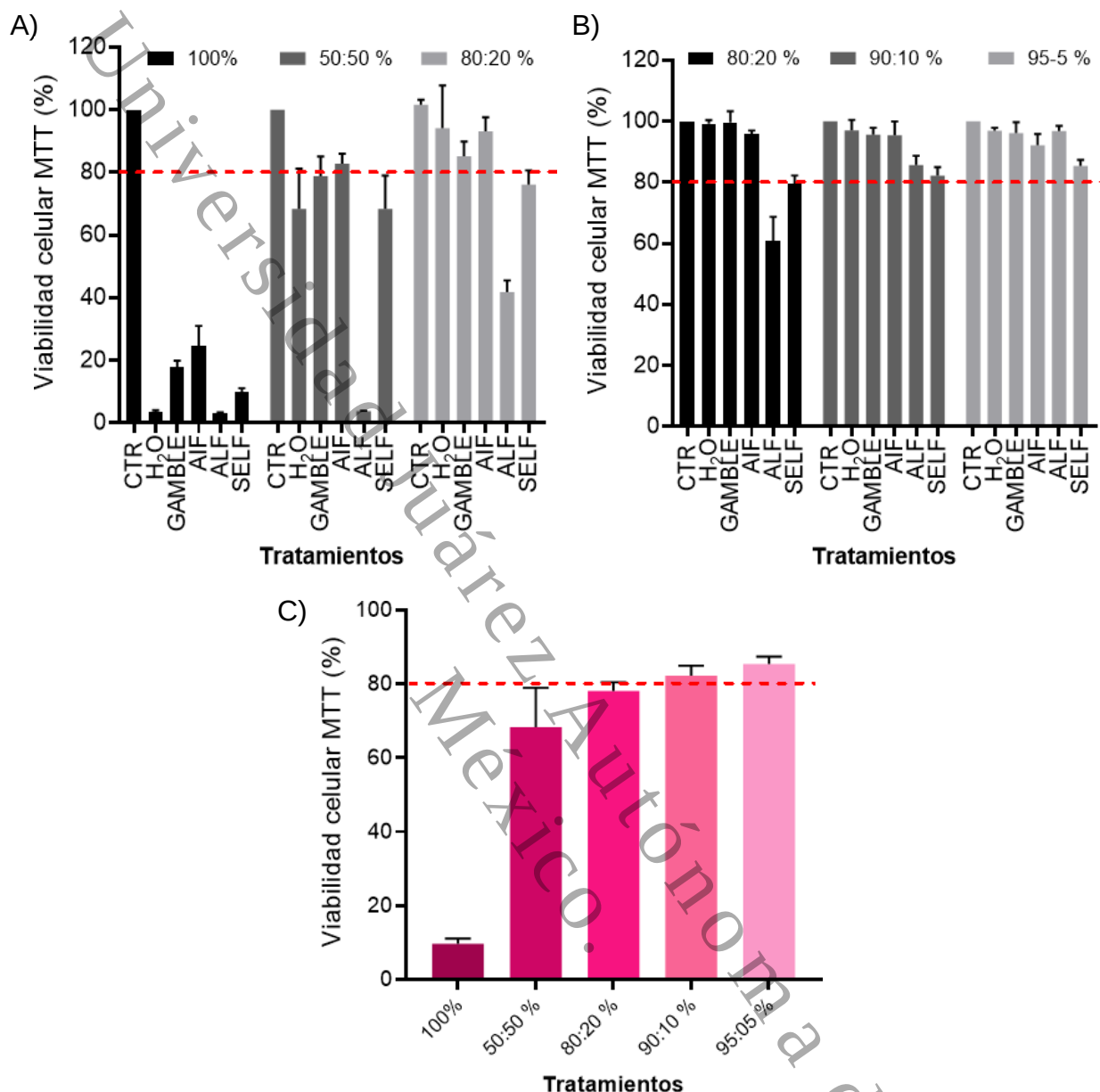


Figura 6. Viabilidad por MTT en células A549 expuestas a fluidos pulmonares simulados a distintas proporciones. **A)** Viabilidad celular por exposición de manera directa (100%) o diluidas con medio de exposición en proporción 50:50 o 80:20 de los fluidos pulmonares simulados; **B)** viabilidad celular por exposición a los fluidos pulmonares simulados en proporción 80:20, 90:10 y 95:05 debido a que en SELF no se cumplía el 80% de viabilidad mínima; **C)** Representación de viabilidad a distintas proporciones de la solución SELF. Todos los datos expresan el promedio $\pm$ error estándar (SEM) de tres experimentos independientes, por cuadruplicado, siendo comparados con el 100% del control (eje Y). La línea roja indica el límite para elegir la concentración que compromete la viabilidad en máximo 20%.

8.2.1 Curva de inhibición de la viabilidad de células A549 expuesta a distintas concentraciones de PM_{2.5} diluidas en la solución SELF.

Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de PM_{2.5} de las tres diferentes estaciones de monitoreo (LAA, UIZ, PED) en dos temporalidades (seca-caliente y seca-fría). Para ello se realizó una curva dosis-respuesta con cada una de las estaciones y temporalidades (figura 7a).

Para representar la curva y poder calcular la IC₅₀ se representa el porcentaje de la viabilidad obtenida (siendo el control 100%) respecto del logaritmo decimal de la concentración de PM_{2.5} con el ajuste a una curva sigmoidea.

Una vez obtenida la curva se realizó una regresión no lineal que evalúa el grado de correlación entre el log de la concentración de PM_{2.5} vs el porcentaje de viabilidad obtenida, obteniéndose la pIC₅₀ (-Log IC₅₀) y la inhibición máxima (I_{max}; figura 4b). Con la pIC₅₀, se obtuvo la IC₅₀ (µg/mL) del PM_{2.5} disuelto en SELF al 5% para las células A549 expuestas por 24 horas. Con los resultados se encontró que no hay diferencia ni en la potencia ni en la inhibición máxima; por lo tanto, ninguna estación ni temporalidades más eficaz que otra en el parámetro de viabilidad celular. Además, observamos que la línea celular A549 es sensible a bajas concentraciones de PM_{2.5}. No obstante, para este trabajo se eligió una concentración alta, que permitiera observar daño a distintos niveles, la concentración elegida fue de 10 µg/mL del PM_{2.5} disuelto en SELF al 5% en las exposiciones a 24 horas.

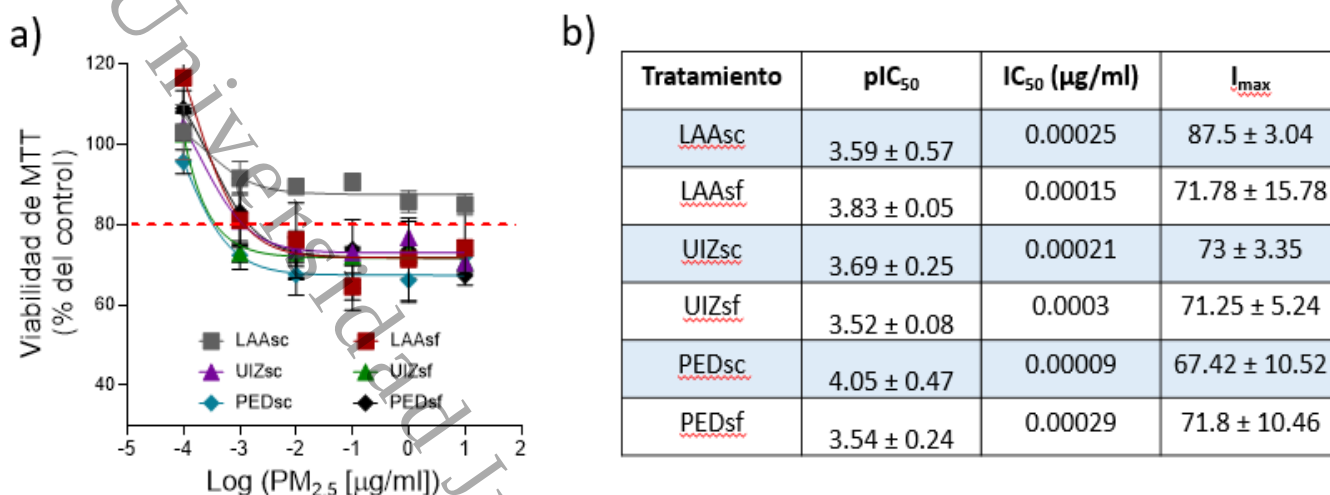


Figura 7. Inhibición de la viabilidad de células A549 expuestas a PM_{2.5}. a) Curvas representativas de inhibición de la viabilidad de células A549 expuestas a distintas concentraciones de PM_{2.5} diluidas en SELF al 5% y con ajuste a la ecuación a un sitio. El eje horizontal muestra el logaritmo de las concentraciones de PM_{2.5} (µg/mL) y el eje vertical el porcentaje de viabilidad medido mediante el ensayo de MTT. La línea punteada color rojo permite distinguir las concentraciones que comprometen la viabilidad en más del 20%.; b) tabla con valores de IC₅₀, pIC₅₀ (-Log IC₅₀) e inhibición máxima (I_{max}) por la exposición a PM de las estaciones de monitoreo LAA, UIZ y PED en las temporalidades seca caliente (sc) y seca fría (sf). Los datos se expresan como el porcentaje del control y son el promedio ± error estándar (SEM) de cuatro experimentos independientes, por triplicado. ANOVA de una vía y post-hoc Tukey's. Los datos no mostraron significancia estadística para la pIC₅₀ o I_{max}.

8.3. Evaluación del daño oxidante sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} en solución SELF.

8.3.1. Activación de la vía de Nrf2 por exposición a PM_{2.5}

La exposición a PM produce especies oxidantes debido a sus componentes. En varios sistemas, se sabe que, en respuesta al aumento de EROs, Nrf2 se libera de Keap1 y se transloca al núcleo celular como Nrf2 fosforilado (p-Nrf2; Kaspar et al., 2009). Por lo tanto, la translocación de Nrf2 al núcleo celular de las A549 se evaluó mediante la

expresión de p-Nrf2/Nrf2 por inmunodetección.

En la figura 8 se observa un incremento significativo en la expresión de p-Nrf2/Nrf2, respecto al control, por la exposición a PM_{2.5} de las estaciones LAA y PED en la temporalidad seca fría; siendo ésta última la más elevada con respecto a las demás estaciones en la misma temporalidad y también respecto a la temporalidad seca caliente. La exposición a PM_{2.5} de UIZ en temporalidad seca caliente o fría, no tuvieron cambios respecto a la condición control. Lo anterior indica que existe una mayor respuesta de Nrf2 ante la exposición a las partículas de PED_{SF} y LAA_{SF}, sugiriendo que existe una señalización redox que induce la activación de la vía de este factor de transcripción.

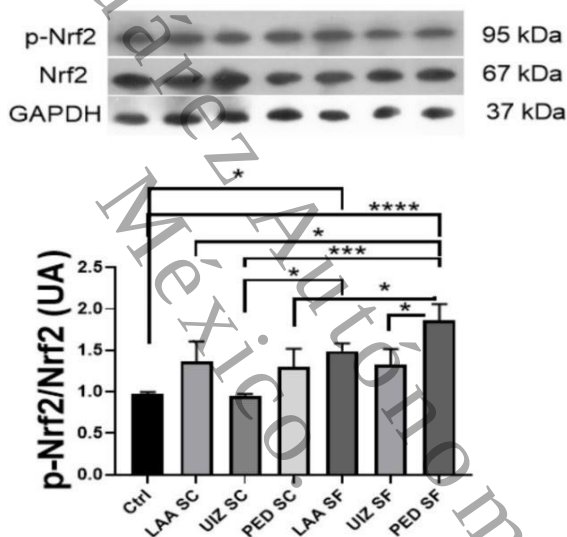


Figura 8. La exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} activa la vía de Nrf2 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot para las proteínas Nrf2 y p-Nrf2: control (DMEM+SELF), LAA_{SC}, UIZ_{SC}, PED_{SC}, LAA_{SF}, UIZ_{SF} y PED_{SF}. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. UA; unidades arbitrarias. ANOVA de una vía, Post- hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

8.3.2. Expresión de la enzima antioxidante SOD-2

La superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), también conocida como SOD-2, tiene como función la catalización y remoción de los aniones superóxido (O₂^{•-}) tóxicos y la subsecuente regulación de la apoptosis mediante la liberación de citocromo C y la

modulación del estado redox de la mitocondria. Por lo tanto, cuando hay un aumento de ROS, también aumenta la producción de este antioxidante.

En la figura 9, se graficó la expresión de SOD-2 en los grupos de interés. Se observó una disminución significativa de esta proteína en la estación PED en temporalidad seca caliente con respecto al control. No obstante, la estación UIZ en la temporalidad seca caliente se aprecia un aumento en la expresión de SOD-2 estadísticamente significativo con respecto a las demás estaciones, independientemente de la temporalidad seca caliente o seca fría. Las demás estaciones no tuvieron diferencias significativas respecto al control, pero sí con UIZ_{sc}.

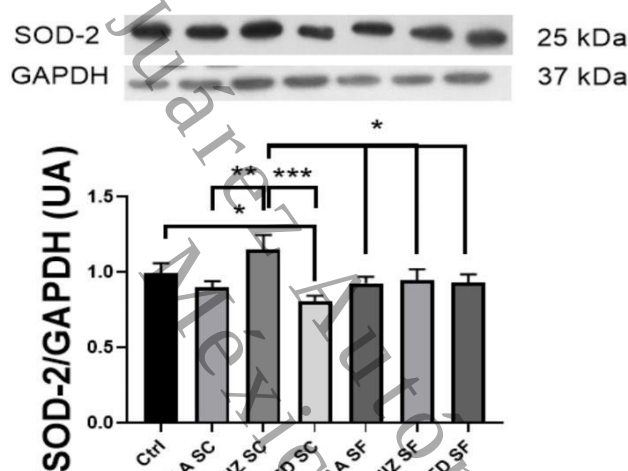


Figura 9. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de SOD-2 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de SOD-2 para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAA_{sc}, UIZ_{sc}, PED_{sc}, LAA_{sf}, UIZ_{sf} y PED_{sf}. La proteína GAPDH se utilizó como housekeeping y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001

8.3.3. Expresión del factor de transcripción NF-κB

En las células, el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) puede actuar como un sensor de estrés oxidante, debido a que su unión al DNA es dependiente del estado redox de la célula.

El efecto de la exposición con PM_{2.5} en las células A549 induce un aumento significativo en la expresión del factor nuclear NF- κ B en las estaciones LAA, UIZ en la temporalidad seca fría y PED en temporalidad seca caliente con respecto al control. La expresión de NF- κ B disminuyó ante la exposición de las partículas de la estación UIZ en la temporalidad seca caliente con respecto a las estaciones LAA y PED en la misma temporalidad y LAA_{SF}. En cuanto a la temporalidad seca fría, se observa un decremento significativo en la expresión de NF- κ B en la estación PED con respecto a las estaciones UIZ y LAA. Si comparamos la estación UIZ en ambas temporalidades, se puede apreciar un aumento significativo en la temporalidad seca fría con respecto a la temporalidad seca caliente; tal comportamiento se ve replicado en la estación LAA en la temporalidad seca fría con respecto a UIZ seca caliente (figura 10). Lo anterior sugiere que el PM de la temporalidad seca fría induce más cambios en NF- κ B, que la seca caliente, siendo el comportamiento semejante para LAA y PED; pero UIZ tuvo un comportamiento opuesto en cada temporalidad.

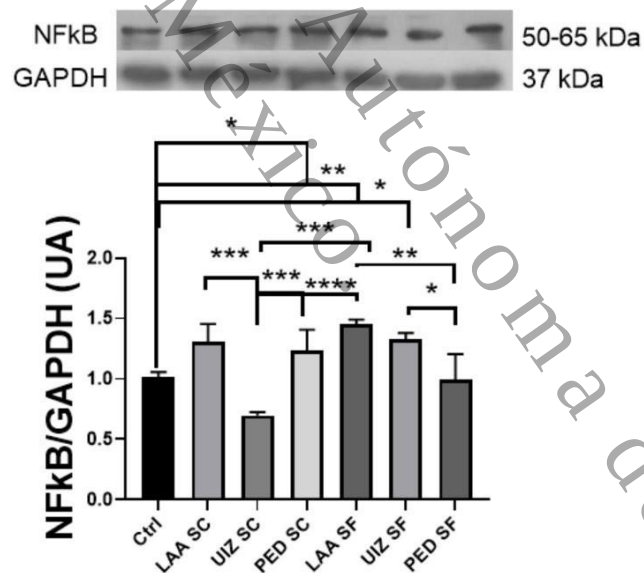


Figura 10. Efecto de la exposición a 10 μ g/mL de PM_{2.5} en la expresión de NF- κ B en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de NF- κ B para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAA_{SC}, UIZ_{SC}, PED_{SC}, LAA_{SF}, UIZ_{SF} y PED_{SF}. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

8.3.4. Expresión de la enzima antioxidante γ -GCSc

La gamma glutamilcisteína sintetasa (γ -GCSc) es la primera enzima limitante en la síntesis de glutatión (GSH) y es relevante debido a que la GSH mitocondrial es crítica en la defensa contra el estrés oxidante generado tanto fisiológicamente como de forma patológica. Existen diversas condiciones que alteran los niveles del mRNA en estado estacionario de la γ -GCSc e incluyen el estrés oxidante, los antioxidantes, y los conjugados del GSH, entre otros (Martínez et al., 2011).

Con respecto a la γ -GCS se observó un aumento significativo en la expresión de proteína en la estación PED en la temporalidad de seca caliente con respecto al control y las demás estaciones y temporalidades. No se observó diferencia significativa entre las estaciones LAA y UIZ en ambas temporalidades. No obstante, la expresión de γ -GCS en la estación PED en temporalidad seca fría es significativamente menor con respecto a la estación PED en la temporalidad seca caliente y a su vez, a la estación LAA en ambas temporalidades (figura 11).

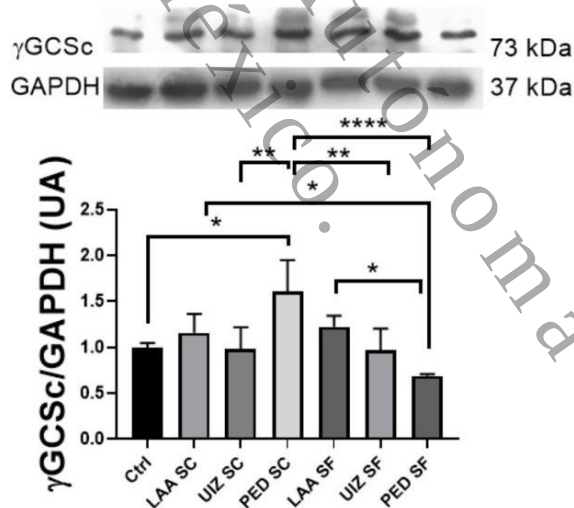


Figura 11. Efecto de la exposición a 10 μ g/mL de $PM_{2.5}$ en la expresión de γ -GCSc en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de γ -GCSc para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$

8.3.5. Expresión de HMGB1

La producción excesiva de EROs (por ejemplo, el H_2O_2) puede provocar daño en macromoléculas lo cual desencadena la translocación y liberación de HMGB1; debido a que es un patrón molecular asociado al daño, induce autofagia durante el estrés oxidante como un mecanismo de defensa celular. Las enzimas antioxidantes (por ejemplo, SOD) inhiben la activación de HMGB1, así como la inducción de autofagia.

En la figura 12, se observa que la exposición a PM en las estaciones PED seca caliente y LAA seca fría incremento significativamente la expresión de HMGB1 con respecto al control y a su vez, cada una fue mayor con LAA_{SC} y PED_{SF}.

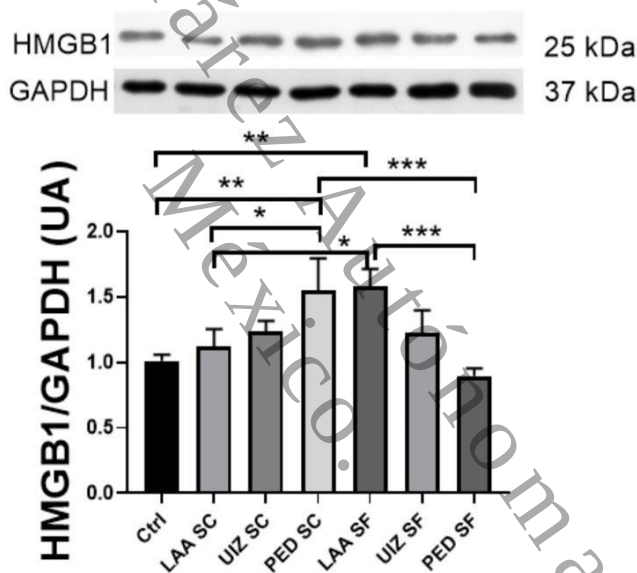


Figura 12. Efecto de la exposición a 10 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{PM}_{2.5}$ en la expresión de HMGB1 en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de HMGB1 para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

8.4. Evaluación de la transición epitelio-mesénquima sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} en solución SELF.

8.4.1. Expresión del marcador epitelial E-Cadherina

La E-cadherina es una proteína transmembrana localizada en las uniones adherentes y en la membrana basolateral de las células epiteliales, cuya función es mantener la polaridad celular y la estructura.

Dicha proteína disminuyó su expresión significativamente en la estación UIZ seca caliente y PED seca fría comparación con el control. En contraste, la expresión de E-cadherina aumentó para LAA en temporalidad seca caliente con respecto al grupo control dicho incremento fue significativo en comparación con las otras estaciones y temporalidades. Asimismo, se observó una expresión significativamente menor en las estaciones LAA y PED en la temporalidad seca fría con respecto a la temporalidad seca caliente (figura 13).

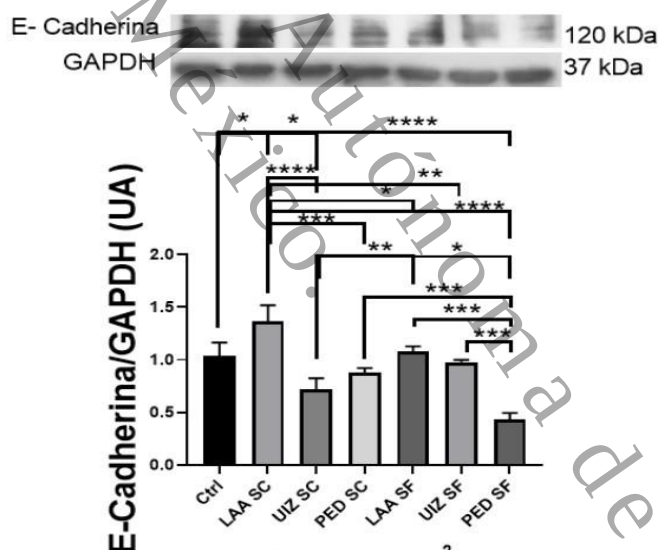


Figura 13. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de E-Cadherina en la línea celular A549. Imágenes representativas de Western blot de E-Cadherina para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GADPH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio ± SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

8.4.2. Expresión del marcador epitelial citoqueratina ácida

Las citoqueratinas son péptidos fibrosos de tipo alfa, y son importantes componentes del citoesqueleto de casi todas las células epiteliales; la citoqueratina ácida es, probablemente, de las queratinas más frecuentemente expresadas dentro de la familia de genes de filamentos intermedios.

Con respecto a la citoqueratina ácida (CK-ácida), en la figura 14 se observó una expresión significativamente mayor para la exposición de LAA en la temporalidad seca caliente en comparación al grupo control y en general con las demás estaciones en ambas temporalidades. Asimismo, se aprecia una menor expresión de esta proteína en la estación PED seca caliente con respecto a las otras estaciones en la misma temporalidad seca caliente. Al comparar las mismas estaciones, se observa que expresión de CK-ácida en LAA y UIZ disminuyó en la temporalidad seca fría en comparación con la seca caliente.

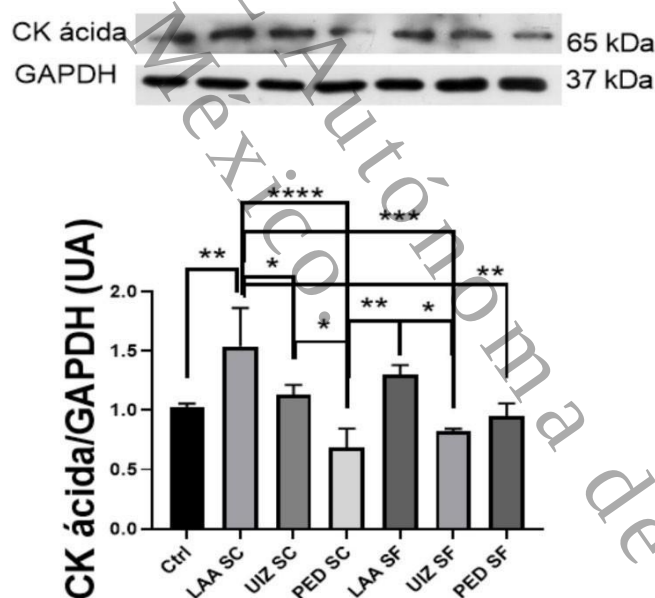


Figura 14. Efecto de la exposición a 10 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{PM}_{2.5}$ en la expresión de citoqueratina en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de Citoqueratina ácida para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

8.4.3. Expresión del marcador mesenquimal α -SMA

La fibrosis es una secuela patológica común de lesión o inflamación tisular y es una causa importante de insuficiencia orgánica. Los subconjuntos de fibroblastos contribuyen a la fibrosis tisular de múltiples maneras, sin embargo, por la ausencia de marcadores bien caracterizados, la actina del músculo liso α (α -SMA) se utiliza a menudo para identificar fibroblastos patológicos.

La figura 15 muestra los cambios de expresión de α -SMA ante la exposición a PM. Se observa un aumento significativo en su expresión en PED en ambas temporalidades con respecto al control y a las otras estaciones y temporalidades. Al comparar temporalidades, se aprecia una disminución en la expresión de α -SMA en PED y UIZ seca caliente a seca fría. No hubo cambios en los demás grupos.

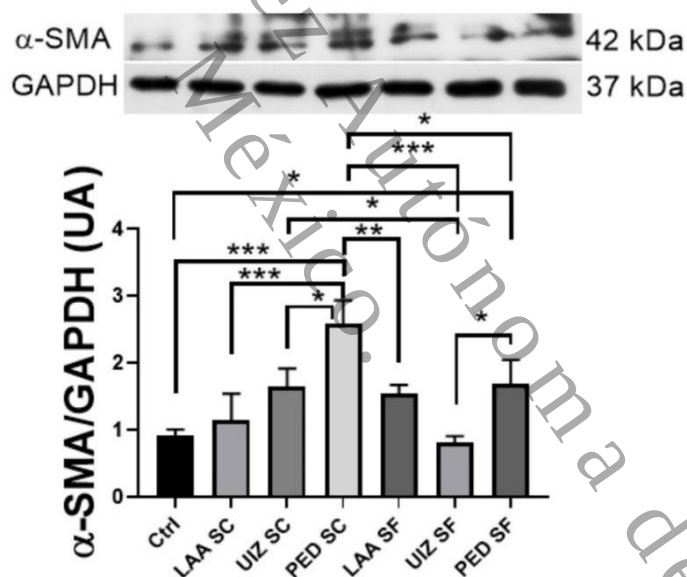


Figura 15. Efecto de la exposición a 10 μ g/mL de PM_{2.5} en la expresión de α -SMA en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de α -SMA para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

8.4.4. Expresión del marcador mesenquimal Vimentina

El fenotipo mesenquimal se caracteriza por cambios morfológicos y moleculares tales como: sobreexpresión de marcadores mesenquimales. Por ejemplo, los filamentos intermedios de citoqueratina son reemplazados por vimentina, la cual confiere forma e integridad a la célula.

En la figura 10, se observa un incremento estadísticamente significativo en la expresión vimentina en LAA en ambas temporalidades y un decremento en su expresión en PED seca fría, con respecto al grupo control. Dicho aumento fue significativo también al compararlo con los demás grupos, y la disminución excepto con UIZ_{SF}. La exposición a PM_{2.5} de la temporalidad seca fría disminuyó la expresión de vimentina, comparado con sus correspondientes en la temporalidad seca (figura 16).

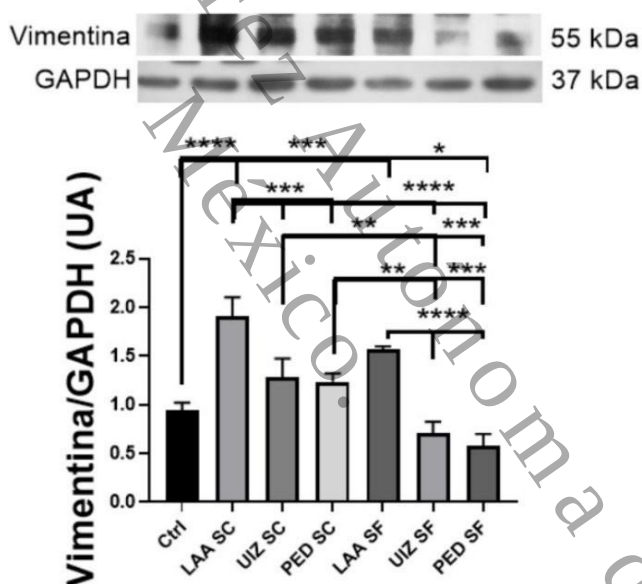


Figura 16. Efecto de la exposición a 10 µg/mL de PM_{2.5} en la expresión de Vimentina en la línea celular A549. Imagen representativa de Western blot de Vimentina para los diferentes grupos control (DMEM+SELF), LAASC, UIZSC, PEDSC, LAASF, UIZSF y PEDSF. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga y su cuantificación se graficó como el promedio $\pm$ SEM, de tres experimentos independientes por triplicado. ANOVA de una vía, Post-hoc Tukey's. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$.

IX. DISCUSIÓN

9.1. Viabilidad de la línea celular A549 expuesta a fluido pulmonar simulado

Los contaminantes unidos a partículas pueden suponer un riesgo para la salud de los seres humanos. Evaluar la exposición inhalatoria basándose únicamente en las concentraciones totales de contaminantes tiende a sobreestimar el riesgo potencial. Para una evaluación más precisa del riesgo, es crucial tener en cuenta la biodisponibilidad; es decir, la parte de los contaminantes que realmente ingresa a la circulación sistémica y que representará un riesgo (Dean *et al.*, 2017). Actualmente los investigadores han optado por utilizar el concepto de bioaccesibilidad en lugar de biodisponibilidad, debido a que su medición es más rápida y económica, especialmente cuando se evalúa la exposición a través de la ingestión oral. No obstante, las partículas contaminantes presentan un comportamiento distinto al ser inhaladas en comparación al ser ingeridas por vía oral. Por lo anterior, en los estudios más recientes se ha incorporado el uso de líquidos específicos que simulen distintas partes del sistema respiratorio humano, tal es el caso del fluido pulmonar simulado SELF, el cual pretende representar el entorno extracelular del pulmón, y por ello fue utilizado en este trabajo. La viabilidad en las células epiteliales alveolares A549 mediante ensayo MTT y microscopia óptica (morfología celular) mostraron que un aumento en la proporción del fluido SELF provoca una disminución en la viabilidad celular, posiblemente dado por los cambios osmóticos a los que se enfrentan las células por la adición de la solución SELF, que puede conllevar a lesiones reversibles e irreversibles (Sacchetti *et al.*, 2016). Los resultados muestran daño celular, a diferencia de Kumar *et al* (2017) que reportan que SELF es biocompatible con las células A549 mediante ensayo de MTT y en conjunto con la microscopía electrónica de transmisión y transcriptómica, indicando claramente que se requiere más investigación para establecer este hallazgo.

9.2. Evaluación del daño oxidante sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} en solución SELF

9.2.1. Comparación con el control

Al comparar los datos con el control se encontraron más cambios en la estación LAA seca-fría y PED seca-caliente. El aumento de p-Nrf2 y NF- κ B para LAA y PED seca-fría

sugiere que éstas partículas inducen el sistema antioxidante (Nguyen *et al.*, 2009) y que su respuesta es suficiente para contrarrestar el daño puesto que no existen diferencias significativas con el control para SOD-2, HMGB1 y γ -GCS. Para LAA y UIZ seca-fría se muestra comportamiento semejante a LAA seca-caliente, sólo que induce únicamente a NF- κ B, lo que sugiere que existen otros mecanismos involucrados para el efecto de los metales bioaccesibles en el PM_{2.5} (ver más adelante; Morante Hernández, 2005). De manera interesante, PED seca caliente muestra un incremento en p-Nrf2, SOD-2 y NF- κ B, lo que indica que para esta exposición existen más mecanismo que se están llevando a cabo, tanto del estrés oxidante por las últimas dos proteínas, como los asociados a NF- κ B, aunque se haya presentado una tendencia al aumento en pNrf2.

9.2.2. Comparación entre temporalidad seca-caliente y seca-fría

Los resultados de la inmunodetección de marcadores de estrés mostraron un incremento en los marcadores Nrf2, NF- κ B para UIZ y PED, en la temporalidad seca fría en comparación con la temporalidad seca-caliente. Cabe destacar que las partículas suspendidas reportan mayores concentraciones en la temporalidad seca-fría invierno; (INECC, 2022). No obstante, la expresión de SOD-2 mostró mayor expresión en UIZ seca-caliente con respecto a seca-fría.

Un proceso clave en la protección celular contra el estrés oxidante o la exposición a sustancias electrofílicas es la activación de la vía de Nrf2 cuya función es regular la expresión de genes que producen proteínas responsables de neutralizar y eliminar sustancias oxidantes y agentes electrofílicos mediante reacciones de conjugación, fortaleciendo así la capacidad antioxidante de la célula (Nguyen *et al.*, 2009). Se ha descubierto que Nrf2 es una proteína altamente inestable y que no es necesaria la activación de Nrf2 en respuesta al estrés al romperse la asociación con la proteína Keap1, lo que liberaba a Nrf2 para que se trasladara al núcleo y llevara a cabo su función de transcripción (Nguyen *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Rodríguez Cotto *et al* (2015) determinaron que la mayor parte de la activación de Nrf2 en extractos de ADE (African dust event) y No ADE se debe a la presencia de metales; asimismo afirmaron que Nrf2 mantiene un nivel basal de respuesta antioxidante y además puede estar

involucrado en la regulación de otras funciones, como la detoxificación o la homeostasis redox celular.

De igual manera, en los resultados de la expresión de HMGB1 se obtuvo que aumenta su expresión dependiendo de la temporalidad y estación, además que hay una relación entre la expresión de Nrf2 y γ -GCS, dado que, cuando aumenta la expresión de γ -GCS HMGB1, disminuye la expresión de pNrf2. (Yu *et al.*, 2015) describió que la supresión de Nrf2 o HO-1 (hemo oxigenasa 1) aumenta significativamente la lesión oxidativa y la liberación de HMGB1, atestiguando el resultado obtenido. Al mismo tiempo, esta proteína nuclear de unión al ADN se ha reportado como un sensor de autofagia en presencia de estrés oxidante (Kang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015).

Por otro lado, el factor de transcripción nuclear NF- κ B dentro de los numerosos procesos en los que interviene son la respuesta adaptativa a cambios en el balance redox celular, inflamación, respuesta celular inmune, regulación del ciclo celular, diferenciación y protección frente a la apoptosis (Morante Hernández, 2005). Algunos investigadores, en experimentos *in vitro*, han observado que una reducción en los niveles de glutatión (GSH) en el hígado, tanto en el citosol como en las mitocondrias, junto con un aumento en la peroxidación lipídica, están asociados con la activación de NF- κ B y modificaciones en la expresión de genes nucleares (Morante Hernández, 2005). Lo anterior ilustra en parte el comportamiento de PED seca-caliente sugiriendo así la activación NF- κ B (y no Nrf2) como consecuencia al aumento de ROS y eventualmente la capacidad de defensa antioxidante ya que la enzima γ -GCS se considera el paso limitante en la biosíntesis del GSH y se puede vislumbrar que la activación de la γ -GCS es el mecanismo para contrarrestar el estrés oxidante generado; lo anterior porque SOD-2 está disminuida. Siendo lo opuesto para PED seca-fría, donde γ -GCS está disminuida.

En la literatura se menciona que dos reguladores clave de la respuesta celular al estrés oxidante, los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, pueden unirse a regiones específicas en el promotor de los genes que codifican para SOD-2, Gpx y CAT en las células del músculo esquelético, promoviendo así la síntesis de estas enzimas (Carvajal, 2019). Esto sugiere que, al haber un aumento de ROS, puede aumentar la producción de SOD-2 mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B. Para UIZ seca-caliente, parece ser contradictorio ya que se mostró un incremento en la expresión de

SOD-2 en la temporalidad seca-caliente, pero un decremento en la expresión de NF- κ B, sugiriendo así que el aumento en la expresión de SOD-2 pueda deberse a la activación de otra vía distinta.

Por otra parte, las partículas tienen diversos orígenes, incluyendo la quema de biomasa y otros procesos que no están principalmente relacionados con la combustión (Rodríguez Méndez, 2020). Gran parte de las partículas con diámetros superiores a 2.5 μ m provienen de la resuspensión de polvo del suelo, especialmente por el tráfico de vehículos, lo cual es más notable en áreas con alta actividad vehicular (Neria Hernández, 2020). Tradicionalmente, los niveles máximos de concentración se han detectado en estaciones de monitoreo al norte de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), debido a la contribución de polvo resuspendido desde las áreas agrícolas del norte, la presencia de industrias en esa región y el intenso tráfico vehicular (Neria Hernández, 2020). Las concentraciones más altas de elementos se registraron durante la temporada Seca-Fría (noviembre-febrero), ya que las temperaturas más bajas durante este período provocan inversiones térmicas y una capa de mezcla inferior, lo que resulta en una dispersión inadecuada de contaminantes y una mayor acumulación. Durante la temporada seca-fría, se han registrado los niveles más altos de PM_{2.5} en ZMCM, con un historial que muestra picos máximos en áreas centrales y del norte de la ZMCM. No obstante, eventos de alta concentración de PM_{2.5}, como el ocurrido durante la contingencia de mayo de 2019, han afectado la calidad del aire en toda la zona metropolitana debido a incendios masivos en el centro y sur del país. (Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México, 2024). La temporada Seca-Caliente (marzo- mayo) también presenta altas concentraciones debido a la menor humedad relativa y la baja velocidad del viento causadas por sistemas de alta presión, lo que conduce a una dispersión deficiente de contaminantes (Neria Hernández, 2020).

En un estudio realizado por Al Hanai *et al.*, (2019) donde buscaron evaluar la asociación entre las variaciones temporales en la composición química y las fuentes de PM_{2.5} urbanas y el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria en un modelo de macrófagos alveolares (MA), realizaron una campaña de muestreo de un año de duración recolectando muestras de PM_{2.5} en la Universidad Sharif en Teherán, Irán, hallaron varios metales (incluidos As, Cd, Cr, V, Ni y Zn) los cuales estuvieron presentes en

concentraciones más altas en la temporada de seca-fría, lo que sugiere la importancia de fuentes como la combustión de combustible diésel, la abrasión de metales y el desgaste de neumáticos, el aceite lubricante y las industrias locales. En los meses más fríos; en cuanto a los compuestos orgánicos medidos en PM_{2.5} (como HAP, hópanos, levoglucosano, n-alcanos y ácidos orgánicos) aumentaron tres veces en seca-fría en comparación con la seca-caliente, lo que puede atribuirse al aumento de la contribución de fuentes como la combustión incompleta, la quema de biomasa y la combustión de petróleo residual. Estos resultados sugieren que las especies PM_{2.5} que impulsan la producción de ROS son más abundantes durante los meses de invierno en Teherán (Al Hanai *et al.*, 2019).

Por lo anterior, se puede inferir que, en la temporalidad seca-fría se favoreció la formación de especies reactivas de oxígeno que indujo la activación del sistema antioxidante mediante la vía de Nrf2 en la línea celular A549, mientras que, en la temporalidad seca-caliente, por el contrario, fue probablemente a través de la vía de AP-1, visto que γ -GCS y SOD-2 aumentaron su expresión en esta temporalidad.

9.2.3. Comparación entre las estaciones UIZ, PED y LAA

En la ZMCM en el año 2021, la mayor contribución a la emisión de PM_{2.5} fue el transporte (42%), generado por los vehículos pesados de carga y de transporte público que utilizan diésel, seguido de los autos particulares y las motocicletas. Las fuentes de área aportan el 40%, principalmente a la quema de cielo abierto de residuos sólidos y al tránsito sobre vialidades pavimentadas. El sector industrial tiene una contribución del 3%, especialmente en la generación, transmisión y distribución de energía eléctrica (Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México, 2024). A nivel estación, para el límite de 24 horas de la NOM, la CDMX presentó su máximo en los sitios LAA, UIZ y PED de 24, 21 y 17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente.

En la tabla 4 se aprecian los resultados de la inmunodetección de marcadores de estrés. Para la temporada seca-caliente, las estaciones que presentaron más cambios fueron LAA y PED, ambas activando la vía NF- κ B para compensar el estrés oxidante, aunque con cambios opuestos en las demás proteínas y siendo UIZ la que ofreció una modulación de la respuesta antioxidante sólo para SOD-2. En la temporalidad seca-fría, el comportamiento fue semejante a la otra temporalidad, LAA y PED ofrecen mayor

respuesta a la exposición y muestran activación de la defensa antioxidante mediante la vía de Nrf2; mientras que UIZ presenta activación de NF- κ B y disminución de Nrf2, sin cambio en las demás proteínas. Lo anterior indica que la temporalidad seca fría induce mayor respuesta que la caliente y que el PM de UIZ no es un inductor tan fuerte de estrés oxidante, de modo que no es necesario activar factores de transcripción a su respuesta; en cambio, LAA y PED producen más estrés oxidante que se traduce en una mayor respuesta antioxidante.

Tabla 4. Comparativa de la expresión de marcadores para estrés oxidantes entre las estaciones según su temporalidad.

MARCADORES	ESTACIONES					
	Seca-caliente			Seca-fría		
	LAA	UIZ	PED	LAA	UIZ	PED
Nrf2	-	↓	-	↑	↓	↑
SOD-2	↓	↑	↓	-	-	-
NF- κ B	↑	↓	↑	↑	↑	↓
γ -GCS	-	↓	↑	↑	-	↓
HMGB1	↓	↓	↑	↑	-	↓

9.3. Evaluación de la transición epitelio-mesénquima sobre la línea celular A549 expuesta a PM_{2.5} en solución SELF

9.3.1. Comparación con el control

La transición epitelio-mesénquimal (TEM) es el proceso mediante el cual una célula epitelial sufre múltiples cambios donde transforma temporalmente su fenotipo a uno de una célula mesenquimal, en respuesta a estímulos tanto internos como externos (Troncoso *et al.*, 2017).

La metástasis implica la propagación de células cancerosas desde el sitio original del tumor hacia tejidos cercanos y órganos distantes. La transición del estado epitelial al mesenquimal es un proceso central en este fenómeno tumoral. Se ha observado que las

especies reactivas de oxígeno facilitan esta transición al aumentar la expresión y la actividad de ciertas metaloproteinasas, las cuales participan en la degradación de los componentes de la matriz extracelular mediante procesos de proteólisis (Alonso Díaz *et al.*, 2021). Por ejemplo, en el estudio realizado por Zuñiga Eulogio (2019) reportó que el efecto crónico del cadmio sobre células epiteliales mamarias no tumorales puede inducir estrés oxidante, favorecer la inhibición de los sistemas de reparación del DNA y promover la TEM. Asimismo, en una investigación llevada a cabo por Wang Y. *et al.*, (2019) concluyeron que la exposición crónica a PM_{2.5} en células A549 induce comportamientos malignos, resultando en la adquisición de propiedades de TEM en ratones.

Respecto al control, LAA seca-caliente trata de compensar los cambios al aumentar la expresión de los marcadores epiteliales E-cadherina y citoqueratina frente a vimentina. LAA seca-fría induce cambios mesenquimales al incrementar vimentina. PED seca-fría induce TEM donde es mayor la regulación mesénquima ya que disminuye E-cadherina y vimentina, pero aumenta α -SMA. UIZ seca caliente sólo disminuye E-cadherina, sin alterar otras proteínas, por lo que el cambio apenas inicia y puede ser reversible. Con conclusión semejante, PED seca-caliente aumentando α -SMA, sin alterar otras proteínas. UIZ seca-fría no presenta cambios significativos. Los datos sugieren que la exposición a PM_{2.5} puede promover el proceso de TEM de manera parcial (ver discusión abajo), siendo las más inductoras LAA y PED.

9.3.2. Comparación entre temporalidad seca-caliente y seca-fría

Los resultados de la inmunodetección de marcadores de fenotipo epitelial mostraron un incremento en los marcadores E-cadherina y citoqueratina ácida en LAA seca-caliente y sólo E-cadherina para PED en la misma temporalidad, comparada con la seca-fría. Del mismo modo, los marcadores del fenotipo mesenquimal α -SMA y vimentina aumentaron su expresión en la temporalidad seca-caliente con respecto a la seca-fría, proponiendo así que la exposición tras 24 horas de PM_{2.5} en las células A549 puede inducir un estado de transición parcial en donde se expresan marcadores para ambos fenotipos al mismo tiempo.

En un principio se planteaba que la transición epitelio-mesenquimal era un proceso que debía finalizarse completamente para adquirir un fenotipo mesenquimal pleno, mientras

que la transición mesenquimal-epitelial era el proceso reversible que permitía volver al fenotipo epitelial original (Miguel *et al.*, 2021). Sin embargo, numerosas pruebas indican que la transición epitelio-mesenquimal en células cancerosas suele ocurrir de manera parcial. Este proceso parcial de TEM conduce a la existencia de una amplia gama de fenotipos intermedios, lo cual promueve la plasticidad celular y tiene implicaciones en la heterogeneidad dentro del tumor (Miguel *et al.*, 2021).

Troncoso *et al.*, (2017) ilustran que la TEM se divide en tres etapas: células no migratorias, células premigratorias y células migratorias; en el período premigratorias representa una fase transitoria que precede el inicio de la transición epitelio-mesenquimal; las células han experimentado una pérdida parcial de su polaridad característica de una célula epitelial, lo cual se debe a la represión y activación simultánea de genes relacionados con proteínas de adhesión celular como E-cadherina, ocludinas y claudinas, así como con proteínas mesenquimales como N-cadherina, vimentina y metaloproteasas.

9.3.3. Comparación entre las estaciones UIZ, PED y LAA

Como se aprecia en la tabla 5, los resultados de la inmunodetección de marcadores de TEM mostraron comportamiento muy semejante entre las dos temporalidades. LAA muestra. LAA muestra un aparente comportamiento de compensación puesto que al aumentar tanto las proteínas marcadoras epiteliales como alguna mesenquimal. UIZ muestra un patrón en el que no prevalece ninguna de las dos, por lo que posiblemente no se esté llevando a cabo el proceso de TEM y otro esté ocurriendo (ej. arresto celular) y PED muestra tendencia hacia la TEM al disminuir las proteínas epiteliales y aumentar la mesenquimal. Por lo anterior, se puede afirmar que en la estación UIZ no existe evidencia que indiquen que la exposición a PM_{2.5} por 24 horas genere la aparición de marcadores para la TEM. No obstante, se sugiere que el PM de las estaciones LAA y PED puede inducir una fase de transición de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal.

Tabla 5. Comparativa de la expresión de marcadores para TEM entre las estaciones según su temporalidad.

MARCADORES	ESTACIONES					
	Seca-caliente			Seca-fría		
	LAA	UIZ	PED	LAA	UIZ	PED
E-cadherina	↑	↓	↓	↑	-	↓
CK-Ácida	↑	↓	↓	↑	↓	-
α-SMA	↓	↓	↑	↓	↓	↑
Vimentina	↑	↓	↓	↑	↓	↓

Aunque el proceso de TEM ha sido más analizado en las células neoplásicas, no hay que descartar la importancia que adquiere este proceso ante una respuesta inflamatoria debido a que, en los tejidos epiteliales, este proceso puede activar la transición epitelio-mesénquima. Durante esta transición, las células comienzan a expresar marcadores mesenquimales además de retener algunos epiteliales, mientras que la membrana basal comienza a deteriorarse (Álvaro Sánchez, 2019). Estas células se separan del epitelio, atraviesan la membrana basal y se acumulan en el espacio intersticial del tejido, guiadas por factores de crecimiento y moléculas quimioatrayentes liberadas como parte del proceso inflamatorio asociado al daño tisular. Es en este espacio intersticial donde finalmente pierden todos los marcadores epiteliales y adoptan completamente un fenotipo fibroblástico (mesenquimal; Álvaro Sánchez, 2019).

En conjunto, este trabajo contribuye al campo de la toxicología ambiental al proporcionar mayor entendimiento sobre la respuesta *in vitro* a la exposición de PM_{2.5} utilizando como vehículo el fluido SELF. Los hallazgos subrayan la importancia en cuanto a la complejidad de los efectos del PM_{2.5} en la salud celular, mostrando cómo la exposición a diferentes condiciones ambientales puede modular significativamente la respuesta celular y los procesos de transición epitelio-mesenquimal, lo cual tiene implicaciones importantes para entender los impactos biológicos del PM en suspensión. Además, se identificaron áreas para futuras investigaciones (perspectivas), como indagar el por qué

las vías de defensa antioxidante que se activaron varían según la estación de origen del PM_{2.5}, o incluso determinar el tiempo en horas necesario para que el proceso de transición epitelio mesénquima se dé por completo y no parcialmente.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

X. CONCLUSIÓN

La exposición a los componentes del PM_{2.5} disuelto en SELF durante 24 horas, induce daño oxidante y transición epitelio mesénquima parcial en la línea celular A549 dependiente de la temporalidad y zona de colecta del PM, lo cual se puede deber a cambios en su composición. Así mismo, se induce mayor expresión de marcadores de estrés oxidante durante la temporalidad seca-fría con respecto a la seca-caliente, activándose diferente vía de defensa contra el daño generado. Mientras que, para la TEM, lo más destacado se dio en la temporalidad seca-caliente con respecto a la seca fría y, finalmente, las partículas provenientes de estaciones PED y LAA generan mayor respuesta celular, siendo UIZ la aparentemente manejable para la célula, en los parámetros analizados.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2022). Efectos del material particulado (PM) sobre la salud y el medioambiente US EPA. Revisado el 05 de mayo 2023 en <https://espanol.epa.gov/espanol/efectos-del-material-particulado-pm-sobre-la-salud-y-el-medioambiente>
- Al Hanai, A. H., Antkiewicz, D. S., Hemming, J. D. C., Shafer, M. M., Lai, A. M., Arhami, M., Hosseini, V., & Schauer, J. J. (2019). Seasonal variations in the oxidative stress and inflammatory potential of PM_{2.5} in Tehran using an alveolar macrophage model; The role of chemical composition and sources. *Environment International*, 123, 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.023>
- Alonso Díaz, T., Cueto González, J., Martínez Carrasco, J., & Reyes Reyes, E. (2021). Estrés oxidativo, terapia antioxidante y cáncer. 19(2). Revisado el 18 de mayo 2023 en <http://orcid.org/0000-0002-7723-6279>
- Álvaro Sánchez, V. (2019). Análisis de la transición epitelio-mesénquima en un modelo patológico de células de epitelio pigmentario humanas para degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Universidad de Salamanca.
- Andrade Oliva, M. de los Á. (2021). La exposición a partículas atmosféricas finas (PF) y ultrafinas (PUF) altera la transmisión dopaminérgica del neoestriado de la rata [Tesis Doctoral]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Arias, M. L., García, P. S., López, C. N., Vázquez, B. S., González, Q. I., García, R. P., Valenciano, M. I., Fernández, M. D., Álvarez, A. E., Martín, F. J., Torres, R. M., Andía, C. J., & Díaz, N. M. (2016). Effects of the catalase antioxidant enzyme in vascular calcification and bone demineralization Work awarded a scholarship Research Molecular Biology Bone FEIOMM 2012. <https://doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100003>
- Arias-Pérez, R. D., Taborda, N. A., Gómez, D. M., Narvaez, J. F., Porras, J., & Hernandez, J. C. (2020). Inflammatory effects of particulate matter air pollution. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 27, Issue 34, pp. 42390–42404). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10574-w>

- ATCC. (2022). A549-CRM-CCL-185. <https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185> Becerra Pérez, L. A., & Ramos Álvarez, R. A. (2020). Evaluación del impacto en la salud por partículas PM_{2.5} en Sinaloa, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 36(2), 249–259. <https://doi.org/10.20937/RICA.53463>
- Benedetti, I., & Reyes, N. (2015). Transición epitelial-mesénquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia. IATREIA*, 28(4), 420–433. <https://doi.org/10.17533/udea>
- Bernal, C., Otálora, B. A., González, D. M., Bermúdez, L. G., Montoya, C. F., Valderrama, A., Cristina, O., Castillo, A. C., Niederbacher, N., Pinzón, M. J., Camero, C., García, F. J., Grajales, D. M., Cañas, A., Rojas, A. P., & Sánchez Velásquez, P. A. (2019). Control epigenético en la transición epitelio-mesénquima. *Universitas Médica*, 61(1). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-1.epig>
- Boisa, N., Elom, N., Dean, J. R., Deary, M. E., Bird, G., & Entwistle, J. A. (2014). Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the PM₁₀ size fraction of soil. *Environment International*, 70, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.021>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018, November). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; Wiley. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Capcot. (2023). ¿Qué es la Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) y como se calcula? Revisado el 06 de mayo 2023 en <https://www.capcot.com.mx/blogs/qu%C3%A9-es-la-concentraci%C3%B3n-inhibitoria-media-ic50-y-como-se-calcula>
- Carnicer, M. J., Bernardini, S., Bellincampi, L., Noguera, N. I., Nuccetelli, M., Ammatuna, E., Breccia, M., Lo-Coco, F., & Federici, G. (2006). Role of γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) gene expression as marker of drug sensitivity in acute myeloid leukemias. *Clinica Chimica Acta*, 365(1–2), 342–345. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.012>
- Carvajal, C. C. (2019). Especies Reactivas Del Oxígeno: Formación, Funcion Y Estrés Oxidativo. *Revista Medicina Legal De Costa Rica*, 36(1).
- Colombo, C., Monhemius, A. J., & Plant, J. A. (2008). Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung

- fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 722–730.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.011>
- Da Freitas, L., Saenz, A. M., Ruiz, Á., & González, F. (2013). Dermatología Pediátrica Latinoamericana Queratinocitos y queratinización. *Dermatología Pediátrica Latinoamericana*, 11(1), 5–13.
- Dean, J. R., Elom, N. I., & Entwistle, J. A. (2017). Use of simulated epithelial lung fluid in assessing the human health risk of Pb in urban street dust. *Science of the Total Environment*, 579, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.085>
- Debray García, Y. (2010). Evaluación de la Respuesta Inflamatoria y Daño Oxidante en Pumon de Ratas Expuestas a Partículas Atmosféricas (PM) de la Ciudad de México. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
- Ding, H., Chen, J., Qin, J., Chen, R., & Yi, Z. (2021). TGF- β -induced α -SMA expression is mediated by C/EBP β acetylation in human alveolar epithelial cells. *Molecular Medicine*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00283-6>
- INECC. (2022). Dirección de Monitoreo atmosférico. Sistema Nacional de Información de la Calidad del Aire. Revisado el 22 de junio 2023 en <https://sinaica.inecc.gob.mx/>.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF-kB in development and progression of human cancer. In *Virchows Archiv* (Vol. 446, Issue 5, pp. 475–482). <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
- Fainstein, K., & Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La Historia De Un Nuevo Factor De Transcripción Que Responde A Estrés Oxidativo (Vol. 26, Issue 1).
- Gallardo, I. F. B., Camacho, M. E. I., Robles, L. I. V., Celis, A. C., & Partida, A. H. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/J.CC.2015.06.002>
- Insua, M. F. (2023, noviembre). Radicales libres, estrés oxidativo y ejercicio. *EFDeportes*. Revisado el 19 de mayo 2023 en <https://efdeportes.com/efd66/oxid.htm>.
- Jaramillo Juárez, F., Rincón Sánchez, A. R., & Martínez Saldaña, M. C. (2012). Estrés Oxidativo y su impacto en la salud (Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ed.; 1st ed.). Textos Universitarios.
- Jia, Y. Y., Wang, Q., & Liu, T. (2017). Toxicity Research of PM2.5 Compositions in Vitro. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(3).

<https://doi.org/10.3390/IJERPH14030232>

- Jiménez Salazar, J. E., González Núñez, L., Königsberg Fainstein, M., Gómez Quiroz, L. E., Zentella Dehesa, A., & Damián Matsumura, P. (2012). Estructura y función de las uniones en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama. *Educación Bioquímica* 31(2), 49–59. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb122c.pdf>
- Jiménez, P. R. (2023). Evaluación de la dosis de un fármaco en células tumorales. Universidad Politécnica de Madrid.
- Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), C868. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00283.2008>
- Julien, C., Esperanza, P., Bruno, M., & Alleman, L. Y. (2011). Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(3), 621–630. <https://doi.org/10.1039/c0em00439a>
- Kang, R., Livesey, K. M., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. In *Autophagy* (Vol. 7, Issue 8, pp. 904–906). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/auto.7.8.15704>
- Kang, R., Zhang, Q., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2013). HMGB1 in cancer: Good, bad, or both? *Clinical Cancer Research*, 19(15), 4046–4057. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0495>
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2: Nrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 47, Issue 9, pp. 1304–1309). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035>
- Kelland, K. (2013). Contaminación ambiental es una de las principales causas de cáncer: OMS. Reuters. Revisado el 23 de abril 2023 en <https://www.reuters.com/article/world/contaminacin-ambiental-es-una-de-las-principales-causas-de-cncer-oms-idUSSIE99G02L/>
- Kuburich, N. A., den Hollander, P., Pietz, J. T., & Mani, S. A. (2022). Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 86, pp. 816–826). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.006>
- Kumar, A., Terakosolphan, W., Hassoun, M., Vandera, K. K., Novicky, A., Harvey, R.,

- Royall, P. G., Bicer, E. M., Eriksson, J., Edwards, K., Valkenborg, D., Nelissen, I., Hassall, D., Mudway, I. S., & Forbes, B. (2017). A Biocompatible Synthetic Lung Fluid Based on Human Respiratory Tract Lining Fluid Composition. *Pharmaceutical Research*, 34(12), 2454–2465. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2169-4>
- Li, C., Shi, Q., Yan, Y., Kong, Y., Meng, Y., Wang, T., Zhang, X., Bao, H., & Li, Y. (2017). Recuperating Lung Decoction Attenuates the Oxidative Stress State of Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Inhibiting the MAPK/AP-1 Signal Pathway and Regulating γ -GCS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9264914>
- Luo, X., Zhao, Z., Xie, J., Luo, J., Chen, Y., Li, H., & Jin, L. (2019). Pulmonary bioaccessibility of trace metals in PM_{2.5} from different megacities simulated by lung fluid extraction and DGT method. *Chemosphere*, 218, 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.079>
- Martin, F. M., Bydlon, G., & Friedman, J. S. (2006). SOD2- Deficiency Sideroblastic Anemia and Red Blood Cell Oxidative Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8, 1217–1225. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1217>
- Martínez, S. A., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2011). El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. *Implicancias Terapéuticas. Acta Toxicológica Argentina*, 19(2), 61–79. <http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v19n2/v19n2a02.pdf>
- Merck. (2023a). Lisis y Extracción de Proteínas. Sigma Aldrich. Revisado el 15 de junio 2023 en https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/protein-biology/lysis-and-protein-extraction?srsId=AfmBOoovgwx7OUP4kRxJAAJtB5hZpTRgFq_o67QWx0yDnmtV6d20EyoJ
- Merck. (2023). Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT. Sigma Aldrich. Revisado el 15 de junio 2023 en <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt?srsId=AfmBOoq6zPlk1WkvROov9SloheTof7QiTMr2kOWVQaDW3o43W0DA4uMS>
- Miguel, J., Sánchez, P., Rosa, D., Rivera, F., Ramón, J., & Ibáñez, M. (2021). Aproximaciones moleculares para la identificación de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas del cáncer de pulmón no microcítico: células madre tumorales, transición epitelial-

mesenquimal y modelos de xenoinjertos derivados de pacientes. Morante Hernández, M. (2005). Estudio del estrés oxidativo hepático en un modelo “in vivo” de deficiencia de vitamina E : papel de NF-κB en la regulación de los genes de la γ-glutamylcisteína sintetasa y genes implicados en el control del ciclo celular. Universitat de València, Servei de Publicacions.

NIH. (2023). Western Blot. National Human Genome Research Institute. Revisado el 16 de julio 2023 en <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot>

Neria Hernández, A. A. (2020). Análisis de la composición elemental de partículas finas (PM_{2.5}) mediante la técnica PIXE para inferir tendencias, identificar fuentes de emisión y su posible impacto al microclima de Tlalnepantla, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México.

Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 284, Issue 20, pp. 13291–13295). <https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200>

NOM-025-SSA1-2021(2021). Revisado el 02 de mayo 2023 en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5633855&fecha=27/10/2021#gsc.tab=0

NOM-025-SSA1-2014 (2014). Revisado el 02 de mayo 2023 en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014# OMS.

(2016). Calidad del aire. <https://www.paho.org/es/temas/calidad-aire>

OMS. (2022). Calidad del aire ambiente (exterior) y salud. Revisado el 12 de mayo 2023 en [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)

Orozco Ibarra, M., & Pedraza Chaverri, J. (2010). Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Arch Neurociencia*, 47–55.

Pérez-Pérez, L. M., Toro Sánchez, C. L. Del, Sánchez Chavez, E., González Vega, R. I., Reyes Díaz, A., Borboa Flores, J., Soto Parra, J. M., Flores-Cordova, M. A., Pérez-Pérez, L. M., Toro Sánchez, C. L. Del, Sánchez Chavez, E., González Vega, R. I., Reyes Díaz, A., Borboa Flores, J., Soto Parra, J. M., & Flores-Cordova, M. A. (2020). Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de diferentes variedades de frijol

- (*Phaseolus vulgaris* L.) en México, mediante un sistema gastrointestinal in vitro. *Biotechnia*, 22(1), 117–125. <https://doi.org/10.18633/BIOTECNIA.V22I1.1159>
- Poblano Bata, J. (2018). Caracterización de la materia orgánica extraída de PM2.5 y su efecto citotóxico en la línea celular de epitelio alveolar humano A549.
- Rahman, I., & Macnee, W. (1999). invited review Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. In *Lung Cell. Mol. Physiol* (Vol. 21). <http://www.ajplung.org>
- Raucci, A., Palumbo, R., & Bianchi, M. E. (2007). HMGB1: A signal of necrosis. In *Autoimmunity* (Vol. 40, Issue 4, pp. 285–289). <https://doi.org/10.1080/08916930701356978>
- Rodríguez Méndez, E. E. (2020). Variación temporal y espacial de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y especies carbonáceas en partículas atmosféricas de las ciudades de Cuernavaca y Cuautla [Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://hdl.handle.net/11191/7179>
- Rodríguez-Cotto, R. I., Ortiz-Martínez, M. G., & Jiménez-Vélez, B. D. (2015). Organic extracts from African dust storms stimulate oxidative stress and induce inflammatory responses in human lung cells through Nrf2 but not NF-κB. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 845–856. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.015>
- Roldán, N. (2016, June 17). Dime dónde vives y te diré si es la zona con más contaminación del Valle de México. *Animal político*. Revisado el 24 de agosto 2023 en <https://www.animalpolitico.com/sociedad/dime-donde-vives-y-te-dire-si-es-la-zona-mas-contaminada-del-valle-de-mexico>
- Sacchetti, M., Macchi, I., Tiezzi, A., La Cava, M., Massaro-Giordano, G., & Lambiase, A. (2016). Pathophysiology of corneal dystrophies: from cellular genetic alteration to clinical findings. *Journal of Cellular Physiology*, 231(2), 261-269.
- Secretaría de Salud. (2017). 144. Tabaquismo, principal causa de cáncer de pulmón | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/prensa/144-tabaquismo-principal-causa-de-cancer-de-pulmon?idiom=es-MX>
- Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México. (2024). Calidad del aire en la Ciudad de México, Informe 2021.
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. In *Redox Biology* (Vol. 4, pp.180–183). Elsevier B.V.

- <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Sul, O. J., & Ra, S. W. (2021). Quercetin prevents lps-induced oxidative stress and inflammation by modulating nox2/ros/nf-kb in lung epithelial cells. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26226949>
- Troncoso, D., Madariaga Ithzayana, Aldana, S., Herreño, A., Chaparro, V., Molina, M., Rey, L., Ramírez, A., Montoya, C., Valderrama, A., Cañas, A., & Rojas, A. (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Universitas Médica*, 58(4). <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm>
- Turner, M. C., Krewski, D., Pope, C. A., Chen, Y., Gapstur, S. M., & Thun, M. J. (2011). Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(12), 1374–1381. <https://doi.org/10.1164/rccm.201106-1011OC>
- Valdés, K., & Valdés, M. (2022). Determinación de la concentración de proteínas por un método colorimétrico: Método de Lowry. Revisado el 12 de julio 2023 en <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-autonoma-de-chiriqui/quimica-clinica-ii/metodo-de-lowry-determinacion-de-la-concentracion-de-proteinas-por-un-metodo-colorimetrico/40650680>
- Valle-Hernández, B. L., Mugica-Álvarez, V., Salinas-Talavera, E., Amador-Muñoz, O., Murillo-Tovar, M. A., Villalobos-Pietrini, R., & De Vizcaya-Ruíz, A. (2010). Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern Mexico City. *Science of the Total Environment*, 408(22), 5429–5438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.065>
- Vizcarra Valdés, J. B. (2016). Expresión de alcohol deshidrogenasa 1 beta y su efecto sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer pulmonar A549. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Wang, J., Zohar, R., & McCulloch, C. A. (2006). Multiple roles of α -smooth muscle actin in mechanotransduction. In *Experimental Cell Research* (Vol. 312, Issue 3, pp. 205–214). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.004>
- Wang, Y., Zhong, Y., Hou, T., Liao, J., Zhang, C., Sun, C., & Wang, G. (2019). PM2.5 induces EMT and promotes CSC properties by activating Notch pathway in vivo and vitro. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.086>

- Wang, Y., Zhong, Y., Zhang, C., Liao, J., & Wang, G. (2020). PM2.5 downregulates MicroRNA-139-5p and induces EMT in Bronchiolar Epithelium Cells by targeting Notch1. *Journal of Cancer*, 11(19), 5758–5767. <https://doi.org/10.7150/jca.46976>
- WordPress. (2008). TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. <https://ibcmunq.wordpress.com/wp-content/uploads/2008/05/tp2.pdf>
- Yu, Y., Tang, D., & Kang, R. (2015). Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Frontiers in Physiology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00093>
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46934102>
- Zuñiga Eulogio, M. D. (2019). Efecto crónico del cadmio sobre marcadores de transición epitelio-mesenquimal en células de epitelio mamario no tumoral. Universidad Autónoma de Guerrero.

ANEXOS

Loading buffer				
	1 X	2 X	3X	4X
Tris 1M (pH: 6.8)	1 mL	2 mL	2 mL	2 mL
SDS 10%	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
2-mercapto	100 µl	200 µl	300 µl	400 µl
Glicerol	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL
H ₂ O	6.8 mL	3.7 mL	1.6 mL	-
Rojo de fenol	0.1mL	0.1 mL	0.1mL	0.1mL

Buffer de corrida		
	5X	10X
Glicina	72 g	144 g
Tris base	15 g	30 g
SDS 10%	5 g	10 g
H ₂ O hasta	Aforar hasta 1 L	
Se debe ajustar el pH a 8.3		

Buffer stripping	
	Para 1 Litro
Glicina	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 mL
H ₂ O hasta	Aforar hasta 1 L
Se debe ajustar el pH a 2.2	

Buffer de transferencia (solución base)			Buffer de transferencia
	5X	10X	1X
Tris base	7.25 g	14.5 g	Por cada litro son: 200 mL de metanol Solución base (200 mL si es 5X o 100 mL si es 10X) Aforar hasta 1 L
Glicina	36 g	72 g	
H ₂ O hasta	Aforar hasta 1 L		
Se debe ajustar el pH a 8.3			

Rojo de Ponceau	
Ácido acético	2 %
Rojo	0.5 g

Solución de bloqueo	
Leche descremada	5 g
H ₂ O hasta	50

Upper buffer	
Tris base	30 g
SDS	0.8 g
H ₂ O hasta	200 mL
Disolver Tris y ajustar pH: 6.8, agregar SDS y disolver. Aforar a 200 mL. Filtrar solución con un	

Lower buffer	
Tris base	36.3 g
SDS	0.8 g
H ₂ O hasta	200 mL
Disolver Tris y ajustar pH: 8.7, agregar SDS y disolver. Aforar a 200 mL. Filtrar solución con un	

PBS para Western Blot (10X)	
NaCl	40.88 g
KCl	1.006 g
Na ₂ HPO ₄	13.54 g
KH ₂ PO ₄	1.225g
H ₂ O hasta	200 mL

PBS Tween 0.1%	
PBS 10X	100 mL
Tween 20	1 mL
H ₂ O hasta	1000 mL

Composición y concentración de fluido artificial intersticial (AIF) (g/L) (Stopford et al., 2003)		
Orden de adición	REACTIVO	Cantidad de reactivo para 500 mL de disolución
1	Cloruro de Magnesio Hexa-hidratado 0.1 M	5.0 mL
2	Cloruro de sodio 0.7 M	75.0 mL
3	Cloruro de potasio	0.1492 g
4	Fosfato disódico 0.1 M	4.9 mL
5	Sulfato de sodio 0.1 M	2.4 mL
6	Cloruro de Calcio 0.1 M	11.8 mL
7	Acetato de sodio Tri hidratado	0.4763 g
8	Bicarbonato de sodio	1.3021 g
9	Citrato de sodio Di hidratado	0.0490 g
10	pH (ajustado con HCl al 37%)	7.4

Composición y concentración del fluido lisosomal artificial (ALF) (g/L) (Colombo et al., 2008).		
Orden de adición	REACTIVOS	Cantidad de reactivo para 1 L de disolución
1	Cloruro de Magnesio Hexahidratado 0.1 M	1.2 mL
2	Cloruro de sodio 0.7 M	40.0 mL
3	Cloruro de Calcio 0.1 M	4.2 mL
4	Sulfato de sodio 0.1 M	2.4 mL
5	Fosfato disódico 0.1 M	2.4 mL
6	Tartrato disódico	0.0454 g
7	Citrato de sodio Di hidratado	0.0389 g
8	ácido cítrico	10.4522 g
9	Piruvato de sodio	0.0860 g
10	Glicina	0.0295 g
11	Lactato de sodio	0.0459 g
12	hidróxido de sodio	3.03645 g
13	Agua inyectable	1 L
14	pH (ajustado con HCl u NaOH)(Boisa et al., 2014)	4.5 +/- 0.1

Composición y concentración del líquido pulmonar epitelial simulado (SELF)(Boisa et al., 2014).		
Orden de adición	Reactivos	Cantidad de reactivo para 1 L de disolución
A) REACTIVOS INORGÁNICOS.		
1	Cloruro de sodio 0.7 M	75.0 mL
2	Cloruro de Calcio 0.1 M	8.2 mL
3	Fosfato disódico 0.1 M	5.2 mL
4	Bicarbonato de sodio	1.3500 g
5	Cloruro de potasio	0.1491 g
6	Cloruro de Magnesio Hexahidratado 0.1 M	5.0 mL
7	Sulfato de sodio 0.1 M	2.5 mL
B) REACTIVOS ORGÁNICOS		
8	Ácido ascórbico	0.0054 g
9	Ácido úrico	0.0084 g
10	Glutación	0.0153 g
C) REACTIVOS ADICIONALES		
11	Albumina	0.1300 g
12	L-Cisteína	0.0622 g
13	Dipalmitoilfosfatidilcolina	0.0505 g
14	Glicina	0.1880 g
15	Mucina	0.2500 g

Alojamiento de la Tesis en el Repositorio Institucional	
Título de Tesis:	Evaluación de los efectos citotóxicos, daño oxidante y la transición epitelio-mesénquima de las PM _{2.5} colectadas en tres distintas regiones de la ciudad de México y en dos temporalidades en la línea celular A549.
Autor(a) de la Tesis:	Laura Becerra Arechiga
ORCID:	0009-0001-4033-3996
Resumen de la Tesis:	Las partículas PM_{2.5} tienen un impacto importante en la salud debido a su capacidad de llegar a los alveolos pulmonares. Las interacciones entre sus componentes químicos y los sistemas biológicos juegan un papel crucial en el desarrollo de enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón en personas expuestas a ellas. Sin embargo, los efectos nocivos de las PM_{2.5} no solo dependen de sus concentraciones y de los componentes peligrosos provenientes de diversas fuentes, están además determinados por las fracciones bioaccesibles. Este trabajo empleó el fluido pulmonar epitelial simulado (SELF) como vehículo para evaluar los componentes biodisponibles de las PM_{2.5} y su efecto en la inducción de estrés oxidante en las células y la transición de células de un estado epitelial a un estado mesenquimal ante la exposición a células de epitelio alveolar humano A549. Se expusieron células A549 en monocapa, por 24 horas, a 10 µg/mL de PM_{2.5} disueltas en solución SELF, provenientes de tres regiones de la ciudad de México: estación pedregal (PED), unidad de monitoreo Iztapalapa (UIZ) y laboratorio de análisis ambiental del norte (LAA); y de dos temporalidades: seca caliente (marzo-agosto) y seca fría (noviembre-febrero) del 2022. Se evaluó la viabilidad celular por el método de MTT, se determinó la IC₅₀, la expresión de proteínas de estrés oxidante (SOD2, γ-GCS, pNrf2, NF-κβ, HMGB1) y de la transición epitelio mesénquima (CK-ácida, E-cadherina, vimentina, α-SMA) por el método de western blot. Se encontró que la exposición a los componentes del PM_{2.5} disuelto en SELF induce daño oxidante y transición epitelio mesénquima parcial dependiente de la temporalidad y zona de colecta del PM, lo cual se puede atribuir a la variabilidad en su composición. La mayor expresión de marcadores de estrés oxidante se observó durante la temporalidad seca-fría con respecto a la seca- caliente, activándose diferente vía de defensa contra el daño generado. Mientras que, para la TEM, lo más destacado se apreció en la temporalidad seca-caliente con respecto a la seca fría y, finalmente, las partículas provenientes de las estaciones PED y LAA generan mayor respuesta celular, siendo UIZ la aparentemente manejable para la célula, en los parámetros analizados.

Palabras claves de la Tesis:	PM2.5, Material particulado 2.5; estrés oxidante; transición epitelio-mesénquima, cáncer de pulmón, soluciones artificiales.
Referencias citadas:	[1] Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (2022). Efectos del material particulado (PM) sobre la salud y el medioambiente US EPA. Revisado el 05 de mayo 2023 en https://espanol.epa.gov/espanol/efectos-del-material-particulado-pm-sobre-la-salud-y-el-medioambiente [2] Al Hanai, A. H., Antkiewicz, D. S., Hemming, J. D. C., Shafer, M. M., Lai, A. M., Arhami, M., Hosseini, V., & Schauer, J. J. (2019). Seasonal variations in the oxidative stress and inflammatory potential of PM2.5 in Tehran using an alveolar macrophage model; The role of chemical composition and sources. <i>Environment International</i>, 123, 417– 427. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.023 [3] Alonso Díaz, T., Cueto González, J., Martínez Carrasco, J., & Reyes Reyes, E. (2021). Estrés oxidativo, terapia antioxidante y cáncer. 19(2). Revisado el 18 de mayo 2023 en http://orcid.org/0000-0002-7723-6279 [4] Álvaro Sánchez, V. (2019). Análisis de la transición epitelio-mesénquima en un modelo patológico de células de epitelio pigmentario humanas para degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Universidad de Salamanca. [5] Andrade Oliva, M. de los Á. (2021). La exposición a partículas atmosféricas finas (PF) y ultrafinas (PUF) altera la transmisión dopaminérgica del neóstriado de la rata [Tesis Doctoral]. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. [6] Arias, M. L., García, P. S., López, C. N., Vázquez, B. S., González, Q. I., García, R. P., Valenciano, M. I., Fernández, M. D., Álvarez, A. E., Martín, F. J., Torres, R. M., Andía, C. J., & Díaz, N. M. (2016). Effects of the catalase antioxidant enzyme in vascular calcification and bone demineralization Work awarded a scholarship Research Molecular Biology Bone FEIOMM 2012. https://doi.org/10.4321/S1889-836X2017000100003 [7] Arias-Pérez, R. D., Taborda, N. A., Gómez, D. M., Narvaez, J. F., Porras, J., & Hernandez, J. C. (2020). Inflammatory effects of particulate matter air pollution. In <i>Environmental Science and Pollution Research</i> (Vol. 27, Issue 34, pp. 42390– 42404). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s11356-020-10574-w [8] ATCC. (2022). A549-CRM-CCL-185. https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185 Becerra Pérez, L. A., & Ramos Álvarez, R. A. (2020). Evaluación del impacto en la salud por partículas PM2.5 en Sinaloa, México. <i>Revista Internacional de Contaminación Ambiental</i>, 36(2), 249–259. https://doi.org/10.20937/RICA.53463

- [9] Benedetti, I., & Reyes, N. (2015). Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *Iatreia*. IATREIA, 28(4), 420–433. <https://doi.org/10.17533/udea>
- [10] Bernal, C., Otálora, B. A., González, D. M., Bermúdez, L. G., Montoya, C. F., Valderrama, A., Cristina, O., Castillo, A. C., Niederbacher, N., Pinzón, M. J., Camero, C., García, F. J., Grajales, D. M., Cañas, A., Rojas, A. P., & Sánchez Velásquez, P. A. (2019). Control epigenético en la transición epitelio-mesénquima. *Universitas Médica*, 61(1). <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed61-1.epig>
- [11] Boisa, N., Elom, N., Dean, J. R., Deary, M. E., Bird, G., & Entwistle, J. A. (2014). Development and application of an inhalation bioaccessibility method (IBM) for lead in the PM10 size fraction of soil. *Environment International*, 70, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.021>
- [12] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018, November). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*; Wiley. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [13] Capcot. (2023). ¿Qué es la Concentración Inhibitoria Media (IC50) y como se calcula? Revisado el 06 de mayo 2023 en <https://www.capcot.com.mx/blogs/qu%C3%A9-es-la-concentraci%C3%B3n-inhibitoria-media-ic50-y-como-se-calcula>
- [14] Carnicer, M. J., Bernardini, S., Bellincampi, L., Noguera, N. I., Nuccetelli, M., Ammatuna, E., Breccia, M., Lo-Coco, F., & Federici, G. (2006). Role of γ -glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) gene expression as marker of drug sensitivity in acute myeloid leukemias. *Clinica Chimica Acta*, 365(1–2), 342–345. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.09.012>
- [15] Carvajal, C. C. (2019). Especies Reactivas Del Oxígeno: Formación, Funcion Y Estrés Oxidativo. *Revista Medicina Legal De Costa Rica*, 36(1).
- [16] Colombo, C., Monhemius, A. J., & Plant, J. A. (2008). Platinum, palladium and rhodium release from vehicle exhaust catalysts and road dust exposed to simulated lung fluids. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 722–730. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.011>
- [17] Da Freitas, L., Saenz, A. M., Ruiz, Á., & González, F. (2013). Dermatología Pediátrica Latinoamericana Queratinocitos y queratinización. *Dermatología Pediátrica Latinoamericana*, 11(1), 5–13.
- [18] Dean, J. R., Elom, N. I., & Entwistle, J. A. (2017). Use of simulated epithelial lung fluid in assessing the human health risk of Pb in urban street dust. *Science of the Total Environment*, 579, 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.085>
- [19] Debray García, Y. (2010). Evaluación de la Respuesta Inflamatoria y Daño Oxidante en Pumon de Ratas Expuestas a Partículas Atmosféricas

	(PM) de la Ciudad de México. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. [20] Ding, H., Chen, J., Qin, J., Chen, R., & Yi, Z. (2021). TGF-β-induced α-SMA expression is mediated by C/EBPβ acetylation in human alveolar epithelial cells. <i>Molecular Medicine</i>, 27(1). https://doi.org/10.1186/s10020-021-00283-6 [21] INECC. (2022). Dirección de Monitoreo atmosférico. Sistema Nacional de Información de la Calidad del Aire. Revisado el 22 de junio 2023 en https://sinaica.inecc.gob.mx/. [22] Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF-κB in development and progression of human cancer. In <i>Virchows Archiv</i> (Vol. 446, Issue 5, pp. 475–482). https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9 [23] Fainstein, K., & Fainstein, M. K. (2007). Nrf2: La Historia De Un Nuevo Factor De Transcripción Que Responde A Estrés Oxidativo (Vol. 26, Issue 1). [24] Gallardo, I. F. B., Camacho, M. E. I., Robles, L. I. V., Celis, A. C., & Partida, A. H. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. <i>Ciencias Clínicas</i>, 15(1), 2–8. https://doi.org/10.1016/J.CC.2015.06.002 [25] Insua, M. F. (2023, noviembre). Radicales libres, estrés oxidativo y ejercicio. <i>EFDeportes</i>. Revisado el 19 de mayo 2023 en https://efdeportes.com/efd66/oxid.htm. [26] Jaramillo Juárez, F., Rincon Sánchez, A. R., & Martínez Saldaña, M. C. (2012). Estrés Oxidativo y su impacto en la salud (Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ed.; 1st ed.). Textos Universitarios. [27] Jia, Y. Y., Wang, Q., & Liu, T. (2017). Toxicity Research of PM2.5 Compositions in Vitro. <i>International Journal of Environmental Research and Public Health</i>, 14(3). 68 https://doi.org/10.3390/IJERPH14030232 [28] Jiménez Salazar, J. E., González Núñez, L., Königsberg Fainstein, M., Gómez Quiroz, L. E., Zentella Dehesa, A., & Damián Matsumura, P. (2012). Estructura y función de las uniones en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama. <i>Educación Bioquímica</i> 31(2), 49–59. https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2012/reb122c.pdf [29] Jiménez, P. R. (2023). Evaluación de la dosis de un fármaco en células tumorales. Universidad Politécnica de Madrid. [30] Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. <i>American Journal of Physiology-Cell Physiology</i>, 295(4), C868. https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00283.2008 [31] Julien, C., Esperanza, P., Bruno, M., & Alleman, L. Y. (2011). Development of an in vitro method to estimate lung bioaccessibility of metals from atmospheric particles. <i>Journal of Environmental Monitoring</i>, 13(3), 621–630. https://doi.org/10.1039/c0em00439a [32] Kang, R., Livesey, K. M., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2011). HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. In <i>Autophagy</i> (Vol.
--	---

	7, Issue 8, pp. 904–906). Taylor and Francis Inc. https://doi.org/10.4161/auto.7.8.15704 [33] Kang, R., Zhang, Q., Zeh, H. J., Lotze, M. T., & Tang, D. (2013). HMGB1 in cancer: Good, bad, or both? <i>Clinical Cancer Research</i>, 19(15), 4046–4057. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0495 [34] Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. In <i>Free Radical Biology and Medicine</i> (Vol. 47, Issue 9, pp. 1304–1309). https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.035 [35] Kelland, K. (2013). Contaminación ambiental es una de las principales causas de cáncer: OMS. Reuters. Revisado el 23 de abril 2023 en https://www.reuters.com/article/world/contaminacin-ambiental-es-una-de-las-principales-causas-de-cncer-oms-idUSSIE99G02L/ [36] Kuburich, N. A., den Hollander, P., Pietz, J. T., & Mani, S. A. (2022). Vimentin and cytokeratin: Good alone, bad together. In <i>Seminars in Cancer Biology</i> (Vol. 86, pp. 816–826). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.12.006 [37] Kumar, A., Terakosolphan, W., Hassoun, M., Vandera, K. K., Novicky, A., Harvey, R., 69 [38] Royall, P. G., Bicer, E. M., Eriksson, J., Edwards, K., Valkenborg, D., Nelissen, I., Hassall, D., Mudway, I. S., & Forbes, B. (2017). A Biocompatible Synthetic Lung Fluid Based on Human Respiratory Tract Lining Fluid Composition. <i>Pharmaceutical Research</i>, 34(12), 2454–2465. https://doi.org/10.1007/s11095-017-2169-4 [39] Li, C., Shi, Q., Yan, Y., Kong, Y., Meng, Y., Wang, T., Zhang, X., Bao, H., & Li, Y. (2017). Recuperating Lung Decoction Attenuates the Oxidative Stress State of Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Inhibiting the MAPK/AP-1 Signal Pathway and Regulating γ-GCS. <i>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine</i>, 2017. https://doi.org/10.1155/2017/9264914 [40] Luo, X., Zhao, Z., Xie, J., Luo, J., Chen, Y., Li, H., & Jin, L. (2019). Pulmonary bioaccessibility of trace metals in PM2.5 from different megacities simulated by lung fluid extraction and DGT method. <i>Chemosphere</i>, 218, 915–921. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.079 [41] Martin, F. M., Bydlon, G., & Friedman, J. S. (2006). SOD2- Deficiency Sideroblastic Anemia and Red Blood Cell Oxidative Stress. <i>Antioxidants and Redox Signaling</i>, 8, 1217–1225. https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1217 [42] Martínez, S. A., Cancela, L. M., & Virgolini, M. B. (2011). El estrés oxidativo como mecanismo de acción del plomo. <i>Implicancias Terapéuticas. Acta Toxicológica Argentina</i>, 19(2), 61–79. http://www.scielo.org.ar/pdf/ata/v19n2/v19n2a02.pdf [43] Merck. (2023a). Lisis y Extracción de Proteínas. Sigma Aldrich. Revisado el 15 de junio 2023 en https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/protein-biology/lysis-
--	--

	and-protein extraction?srsltid=AfmBOoovgwx7OUP4kRxJAAJtB5hZpTRgFq_o67QWx0yDnmtV6d20EyoJ [44] Merck. (2023). Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT. Sigma Aldrich. Revisado el 15 de junio 2023 en https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt?srsltid=AfmBOoq6zPlk1WkvROov9SloheTof7QiTMr2kOWVQaDW3o43W0DA4uMS [45] Miguel, J., Sánchez, P., Rosa, D., Rivera, F., Ramón, J., & Ibáñez, M. (2021). Aproximaciones moleculares para la identificación de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas del cáncer de pulmón no microcítico: células madre tumorales, transición epitelial-70 mesenquimal y modelos de xenoinjertos derivados de pacientes. [46] Morante Hernández, M. (2005). Estudio del estrés oxidativo hepático en un modelo “in vivo” de deficiencia de vitamina E : papel de NF-κB en la regulación de los genes de la γ-glutamylcisteína sintetasa y genes implicados en el control del ciclo celular. Universitat de València, Servei de Publicacions. [47] NIH. (2023). Western Blot. National Human Genome Research Institute. Revisado el 16 de julio 2023 en https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot [48] Neria Hernández, A. A. (2020). Análisis de la composición elemental de partículas finas (PM2.5) mediante la técnica PIXE para inferir tendencias, identificar fuentes de emisión y su posible impacto al microclima de Tlalnepantla, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. [49] Nguyen, T., Nioi, P., & Pickett, C. B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. In Journal of Biological Chemistry (Vol. 284, Issue 20, pp. 13291–13295). https://doi.org/10.1074/jbc.R900010200 [50] NOM-025-SSA1-2021(2021). Revisado el 02 de mayo 2023 en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5633855&fecha=27/10/2021#gsc.tab=0 [51] NOM-025-SSA1-2014 (2014). Revisado el 02 de mayo 2023 en https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5357042&fecha=20/08/2014# [52] OMS. (2016). Calidad del aire. https://www.paho.org/es/temas/calidad-aire [53] OMS. (2022). Calidad del aire ambiente (exterior) y salud. Revisado el 12 de mayo 2023 en https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health [54] Orozco Ibarra, M., & Pedraza Chaverri, J. (2010). Hemo oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. Arch Neurocién, 47–55.
--	---

	[55] Pérez-Perez, L. M., Toro Sánchez, C. L. Del, Sánchez Chavez, E., González Vega, R. I., Reyes Díaz, A., Borboa Flores, J., Soto Parra, J. M., Flores-Cordova, M. A., Pérez- Perez, L. M., Toro Sánchez, C. L. Del, Sánchez Chavez, E., González Vega, R. I., Reyes Díaz, A., Borboa Flores, J., Soto Parra, J. M., & Flores-Cordova, M. A. (2020). Bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de diferentes variedades de frijol 71 (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) en México, mediante un sistema gastrointestinal in vitro. <i>Biotecnia</i>, 22(1), 117–125. https://doi.org/10.18633/BIOTECNIA.V22I1.1159 [56] Poblano Bata, J. (2018). Caracterización de la materia orgánica extraída de PM2.5 y su efecto citotóxico en la línea celular de epitelio alveolar humano A549. [57] Rahman, I., & Macnee, W. (1999). invited review Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. In <i>Lung Cell. Mol. Physiol</i> (Vol. 21). http://www.ajplung.org [58] Raucci, A., Palumbo, R., & Bianchi, M. E. (2007). HMGB1: A signal of necrosis. In <i>Autoimmunity</i> (Vol. 40, Issue 4, pp. 285–289). https://doi.org/10.1080/08916930701356978 [59] Rodríguez Méndez, E. E. (2020). Variación temporal y espacial de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y especies carbonáceas en partículas atmosféricas de las ciudades de Cuernavaca y Cuautla [Universidad Autónoma Metropolitana]. http://hdl.handle.net/11191/7179 [60] Rodríguez-Cotto, R. I., Ortiz-Martínez, M. G., & Jiménez-Vélez, B. D. (2015). Organic extracts from African dust storms stimulate oxidative stress and induce inflammatory responses in human lung cells through Nrf2 but not NF-κB. <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i>, 39(2), 845–856. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.015 [61] Roldán, N. (2016, June 17). Dime dónde vives y te diré si es la zona con más contaminación del Valle de México. <i>Animal político</i>. Revisado el 24 de agosto 2023 en https://www.animalpolitico.com/sociedad/dime-donde-vives-y-te-dire-si-es-la-zona-mas-contaminada-del-valle-de-mexico [62] Sacchetti, M., Macchi, I., Tiezzi, A., La Cava, M., Massaro-Giordano, G., & Lambiase, A. (2016). Pathophysiology of corneal dystrophies: from cellular genetic alteration to clinical findings. <i>Journal of Cellular Physiology</i>, 231(2), 261-269. [63] Secretaría de Salud. (2017). 144. Tabaquismo, principal causa de cáncer de pulmón Secretaría de Salud Gobierno gob.mx. https://www.gob.mx/salud/prensa/144- tabaquismo-principal-causa-de-cancer-de-pulmon?idiom=es-MX [64] Secretaría del Medio Ambiente de la Ciudad de México. (2024). Calidad del aire en la Ciudad de México, Informe 2021. [65] Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. In <i>Redox Biology</i> (Vol. 4, pp.180–183). Elsevier B.V. 72 https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002
--	---

	[66] Sul, O. J., & Ra, S. W. (2021). Quercetin prevents Ips-induced oxidative stress and inflammation by modulating nox2/ros/nf-kb in lung epithelial cells. <i>Molecules</i>, 26(22). https://doi.org/10.3390/molecules26226949 [67] Troncoso, D., Madariaga Ithzayana, Aldana, S., Herreño, A., Chaparro, V., Molina, M., Rey, L., Ramírez, A., Montoya, C., Valderrama, A., Cañas, A., & Rojas, A. (2017). Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. <i>Universitas Médica</i>, 58(4). https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm [68] Turner, M. C., Krewski, D., Pope, C. A., Chen, Y., Gapstur, S. M., & Thun, M. J. (2011). Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. <i>American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine</i>, 184(12), 1374–1381. https://doi.org/10.1164/rccm.201106-1011OC [69] Valdés, K., & Valdés, M. (2022). Determinación de la concentración de proteínas por un método colorimétrico: Método de Lowry. Revisado el 12 de julio 2023 en https://www.studocu.com/latam/document/universidad-autonoma-de-chiriqui/quimica-clinica-ii/metodo-de-lowry-determinacion-de-la-concentracion-de-proteinas-por-un-metodo-colorimetrico/40650680 [70] Valle-Hernández, B. L., Mugica-Álvarez, V., Salinas-Talavera, E., Amador-Muñoz, O., Murillo-Tovar, M. A., Villalobos-Pietrini, R., & De Vizcaya-Ruíz, A. (2010). Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern Mexico City. <i>Science of the Total Environment</i>, 408(22), 5429–5438. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.065 [71] Vizcarra Valdés, J. B. (2016). Expresión de alcohol deshidrogenasa 1 beta y su efecto sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer pulmonar A549. Universidad Autónoma de Nuevo León. [72] Wang, J., Zohar, R., & McCulloch, C. A. (2006). Multiple roles of α-smooth muscle actin in mechanotransduction. In <i>Experimental Cell Research</i> (Vol. 312, Issue 3, pp. 205– 214). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.11.004 [73] Wang, Y., Zhong, Y., Hou, T., Liao, J., Zhang, C., Sun, C., & Wang, G. (2019). PM2.5 induces EMT and promotes CSC properties by activating Notch pathway in vivo and vitro. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>, 178, 159–167. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.086 [74] Wang, Y., Zhong, Y., Zhang, C., Liao, J., & Wang, G. (2020). PM2.5 downregulates MicroRNA-139-5p and induces EMT in Bronchiolar Epithelium Cells by targeting Notch1. <i>Journal of Cancer</i>, 11(19), 5758–5767. https://doi.org/10.7150/jca.46976 [76] WordPress. (2008). TP2: Extracción y cuantificación de proteínas. https://ibcmunq.wordpress.com/wp-content/uploads/2008/05/tp2.pdf
--	--

	[77] Yu, Y., Tang, D., & Kang, R. (2015). Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. <i>Frontiers in Physiology</i>, 6(MAR). https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00093 [78] Zamora, J. D. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. <i>Revista Chilena de Nutrición</i>, 34. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46934102 [79] Zuñiga Eulogio, M. D. (2019). Efecto crónico del cadmio sobre marcadores de transición epitelio-mesenquimal en células de epitelio mamario no tumoral. Universidad Autónoma de Guerrero.
--	---