



Evaluación del efecto del material particulado (PM10) sobre la expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales A549 y células mononucleares de sangre periférica

Mariana Ramírez Ramírez
Danna Valentina Cano Granda

Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogas y Bioanalistas otorgado por la Universidad de Antioquia

Asesor

Juan Carlos Hernández López, Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología y Bioanálisis
Medellín, Antioquia, Colombia 2022

Evaluación del efecto del material particulado (PM10) sobre la expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales A549 y células mononucleares de sangre periférica

Evaluation of the effect of particulate matter (PM10) on the expression of adhesion molecules in A549 epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells

Mariana Ramírez Ramírez^{1,2,3}, Danna Valentina Cano Granda^{1,2,3}, Juan Carlos Hernández López^{2,3}

¹ Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia

² Grupo de investigación Inmunovirología, Universidad de Antioquia

³ Grupo de investigación Infettare, Universidad Cooperativa de Colombia

Tabla de contenido

1. Artículo trabajo de grado

1.1 Resumen

1.2 Abstract

1.3 Introducción

1.4 Materiales y métodos

1.5 Resultados

1.6 Discusión

1.7 Bibliografía

Evaluación del efecto del material particulado (PM10) sobre la expresión de moléculas de adhesión en células epiteliales A549 y células mononucleares de sangre periférica.

1.1 Resumen

El material particulado (PM) es un contaminante del aire, clasificado según su rango aerodinámico en PM10 (2.5-10 μm), PM2.5 (<2.5 μm) y partículas ultrafinas (<0.1 μm). Este ha sido asociado con el desarrollo de múltiples enfermedades respiratorias, como la EPOC, el asma y las infecciones respiratorias, incluyendo las causadas por virus. Además, a nivel molecular se han encontrado efectos inflamatorios, como el aumento de moléculas de adhesión que facilitan la migración transendotelial de leucocitos y disminución en aquellas encargadas del mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial. Las alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión pueden explicar los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo de enfermedades que han sido asociadas con la exposición al PM. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este estudio es evaluar el efecto del PM10 sobre la expresión de moléculas de adhesión como β -catenina en células epiteliales, e ICAM-1 y VCAM-1 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Para esto, se realizaron estímulos con diferentes concentraciones de PM10 en células epiteliales A549 y en PBMC, además, en estas últimas se realizó infección con *Rhinovirus*, y se evaluó la expresión de moléculas de adhesión por RT-qPCR. Los resultados indican que la expresión de β -catenina en células A549 y VCAM-1 en PBMC frente a diferentes estímulos con PM10 no se ve alterada significativamente. En contraste, la molécula ICAM-1 evidenció una disminución significativa de su expresión cuando las células fueron expuestas a PM10 y *Rhinovirus*.

En conclusión, el PM10 altera la expresión de ICAM-1 expuestas a *Rhinovirus* y a PM; sin embargo, parece no afectar la expresión de otras moléculas de adhesión como β -catenina y VCAM-1. Estos resultados contribuyen al entendimiento de los

mecanismos inducidos por la exposición al PM, que contribuyen a la susceptibilidad a infecciones por virus respiratorios.

Palabras clave

Material particulado, moléculas de adhesión, epitelio, endotelio, *Rhinovirus*

1.2 Abstract

Particulate matter (PM) is an air pollutant, which is classified according to its aerodynamic range into PM₁₀ (2.5-10 μm), PM_{2.5} (<2.5 μm), and ultrafine particles (<0.1 μm). It has been associated with development of multiple respiratory diseases, such as COPD, asthma, and respiratory infections, including those caused by viruses. In addition, at the molecular level, inflammatory effects have been found, among which is the increase in adhesion molecules that facilitate the transendothelial migration of leukocytes and a decrease in those responsible for maintaining the integrity of the epithelial barrier. Alterations in the expression of adhesion molecules may explain the molecular mechanisms underlying the development of diseases that have been associated with exposure to PM. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of PM₁₀ on the expression of adhesion molecules as β -catenin in epithelial cells, and ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). For this, stimuli with different concentrations of PM₁₀ were carried out in A549 epithelial cells and PBMC. In addition to infection with *Rhinovirus* was carried out in PBMC, and the expression of adhesion molecules was evaluated by Rt-qPCR. The results indicate that the expression of β -catenin in A549 cells and the VCAM-1 molecule in PBMC in response to different stimuli with PM₁₀ was not significantly altered. In contrast, the ICAM-1 molecule expression showed a significant decrease in cells exposed to PM₁₀ and *Rhinovirus*. In conclusion, PM₁₀ alters the expression of ICAM-1 exposed to *Rhinovirus* and PM; however, it does not appear to affect the expression of other adhesion molecules such as β -catenin and VCAM-1. These results contribute to the understanding the mechanisms induced by exposure to PM, which leads to respiratory virus infections.

1.3 Introducción

El material particulado (PM) es un contaminante del aire compuesto por gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas tanto sólidas como líquidas, el cual es clasificado según su rango aerodinámico en PM₁₀ (2.5-10 μm), PM_{2.5} (<2.5 μm) y partículas ultrafinas (<0.1 μm)¹. Dichas partículas causan una cantidad considerable de efectos nocivos en los diferentes sistemas que componen el cuerpo humano. A nivel de sistema respiratorio se puede observar un aumento en la inflamación², aumento en la susceptibilidad a infecciones respiratorias virales³, lesiones a nivel pulmonar⁴, aumento en la incidencia, exacerbación del asma⁵ e incluso generar complicaciones mayores como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)^{6,7}. Una vez estas partículas logran superar los alveolos pulmonares, estructuras que se componen de un epitelio conformado principalmente por neumocitos tipo I, y que son el principal sitio para la realización del intercambio gaseoso hacia el endotelio capilar⁸, el PM llega a la circulación, donde puede ocasionar entonces problemas en el sistema circulatorio tales como, infarto al miocardio, arritmias e insuficiencia cardíaca^{9,10}. Sin embargo, las repercusiones ante la exposición prolongada al material particulado no se limita únicamente a estos dos sistemas, sino que pueden ocasionar múltiples anomalías metabólicas¹¹, parto prematuro¹², aumento en la mortalidad de la población⁴, entre otros.

Dentro de los diferentes efectos ocasionados por la exposición al PM, se ha documentado que la citotoxicidad y la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) se incrementan significativamente, ocasionando además cambios en la expresión de moléculas de adhesión y la producción de citoquinas y quimioquinas¹³⁻¹⁵. Entre las moléculas de adhesión que se ven afectadas tras la exposición al PM, están moléculas que hacen parte de la barrera epitelial, algunas de estas moléculas son: ocludina, claudina 1 y proteína ZO, las cuales pertenecen a las uniones estrechas del epitelio¹⁶. Además, para la β -catenina, molécula que hace parte de las uniones adherentes y permite mantener la integridad de la barrera epitelial, también se ha reportado alteración en su expresión, en un modelo de

células epiteliales BEAS-2B; en las cuales se demostró una disminución de la expresión de β -catenina posterior a la exposición a PM. Estos resultados sugieren una alteración en la integridad de la barrera epitelial inducida por el PM, incrementando la permeabilidad y conllevando a una mayor susceptibilidad a lesiones pulmonares e infecciones ^{17,18}.

Por otro lado, en el endotelio también se observan alteraciones posterior a la exposición al PM 2.5. Entre las moléculas de adhesión endotelial que se ven alteradas por dicha exposición están la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)¹⁹, y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)²⁰, las cuales participan en la unión firme y en la migración transendotelial de leucocitos. ICAM-1 actúa además, como receptor de entrada de algunos virus, entre los cuales se encuentra *Rhinovirus* ^{21,22}. Un estudio demostró que el aumento de ICAM-1 favorecía el aumento de la carga viral de *Rhinovirus* en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) ²³, lo que concuerda con los múltiples estudios existentes en la literatura que relacionan la exposición al PM con el aumento de la susceptibilidad a infecciones respiratorias ²⁴⁻²⁶.

La OMS reconoce a la contaminación del aire como un factor de riesgo crítico para las enfermedades no transmisibles ²⁷. En el Área Metropolitana del Valle de Aburrá, en el año 2015 se calculó que el 12,3% (2.105) de las muertes eran atribuidas a la contaminación del aire urbano, lo que generó costos estimados en \$2,8 billones ²⁸. Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud declaró que en el año 2016 unas 15.681 muertes ocurridas en el país eran atribuibles a la calidad del aire ²⁹. En el Área Metropolitana de Valle de Aburrá los niveles de material particulado suspendidos en la atmósfera se han convertido en una alarma local, esto debido a que para determinadas épocas del año se han superado las concentraciones recomendadas por la OMS y las establecidas por la norma Colombiana ³⁰⁻³², lo que finalmente resulta en una gran cantidad de problemas en la salud de dicha población, representado a su vez un aumento en los gastos en el sistema de salud.

Es importante resaltar, que la mayoría de repercusiones que trae la exposición prologada al material particulado, han sido estudiadas principalmente para PM_{2,5}; sin embargo, es

necesario esclarecer el efecto que tiene el PM₁₀ presente en el Valle de Aburrá a nivel celular y molecular en células del tracto respiratorio y en células de la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que la exposición a este afecta la viabilidad celular de forma concentración- dependiente ³³ y que además existe una asociación entre la composición del PM₁₀ y los efectos tóxicos que este ocasiona ³⁴. Por lo anterior, es importante estudiar las concentraciones a las cuales el PM₁₀ presente en el Valle de Aburrá afecta la viabilidad celular en células A549 y en PBMC, con el fin de comprender a que concentración de exposición PM las células se empiezan a ver afectadas, y así poder analizar el efecto que tiene el PM sobre la expresión de ciertas moléculas de adhesión, lo que permitiría comprender el mecanismo por el cual el PM genera los diversos efectos adversos en la salud que han sido documentados por dicha exposición.

1.4 Materiales y métodos

Obtención del PM₁₀:

La muestra de PM₁₀ fue extraída de filtros de micro cuarzo que se encuentran ubicados en ocho estaciones de monitoreo del Valle de Aburrá. Estos filtros fueron cortados en fragmentos de aproximadamente 1cm² y llevados a un tubo cónico de 50 mL, en el cual fueron añadidos 40 mL de agua ultrapura estéril y fueron mezclados por inmersión. Seguido a esto, la muestra fue sometida a un proceso de sonicación a 37Hz por 2 horas y 15 minutos, el contenido soluble fue filtrado utilizando seis capas de gaza estéril y el volumen final obtenido fue sometido a congelación; posteriormente se realizó la liofilización y este fue pesado y almacenado en viales de 1.5 mL estériles a -20°C hasta su uso.

Producción stock viral:

Se cultivaron células HeLa en Medio Dulbecco`s Eagle Modificado (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) en botellas de cultivo, y bajo atmósfera controlada con 5% CO₂ y una temperatura de 37°C, hasta alcanzar aproximadamente 70% de confluencia celular. Posteriormente, se realizó la infección viral con 300 µL del stock viral *Rhinovirus* en 700µL DMEM suplementado con 2% de SFB. Luego de una hora de incubación en agitación, se completó el volumen de la botella de cultivo con DMEM suplementado al 2% de SFB y se incubó por 6 días. Luego, el medio presente en las botellas fue alicuotado y centrifugado a 500 g por 5min, se recuperó el sobrenadante y se prepararon alícuotas de 300µL en viales de 1,5µL para su conservación a -80°C hasta su uso.

Cultivo celular:

Las células A549 (Figura 1) fueron cultivadas en DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de SFB, en una atmósfera controlada con 5% CO₂ y una temperatura de 37°C.

a.

b.

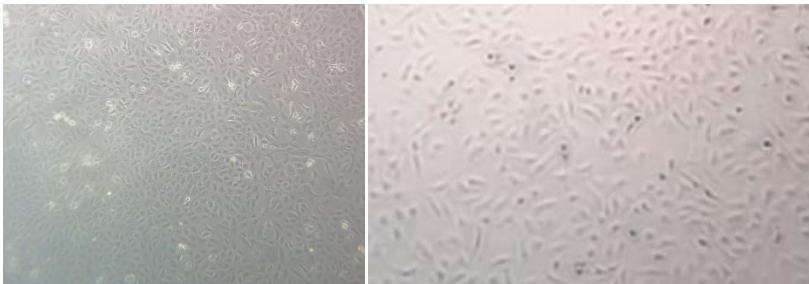


Figura 1: Células A549 en frasco de cultivo visualizadas en microscopio invertido, bajo un aumento de 10X (a) y 40X (b).

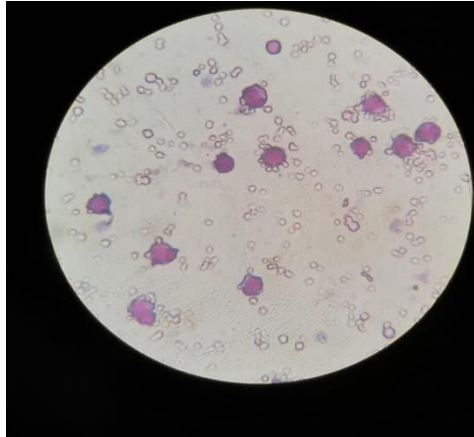
Aislamiento de PBMC:

Para la obtención de PBMC, se realizó el proceso de venopunción recolectando la sangre en tubos vacutainer con EDTA. Luego se diluyó la sangre con PBS en una relación 1:2 y se llevó a cabo la separación por gradiente de densidad con ficoll histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Merck,). Para esto, se añadió 3 ml del reactivo y 9 ml de la dilución de sangre en un tubo de 15 ml, y se llevó a centrifugación, para posteriormente extraer la fracción que corresponde a los PBMC. Una vez se obtuvo la fracción celular, se realizaron tres lavados con PBS, centrifugando entre cada uno de los lavados realizados. Finalmente, se obtuvo el botón celular, se resuspendió en un 1ml de RPMI y se realizó el respectivo conteo celular para su posterior siembra. En la figura 2, se observan imágenes de células mononucleares de sangre periférica obtenidos en el aislamiento con ficoll.

2a.



2b.



2c:



Figura 2: Coloración Wright para PBMC obtenidos por Ficoll, vistos en microscopio de luz en el objetivo de 40X (a y b). PBMC sembrados en platos de 24 pozos observados bajo microscopio de luz 10X (c).

Ensayo de viabilidad:

Para evaluar el efecto del PM10 sobre la viabilidad de las células A549, se realizaron ensayos de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Para ello, se cultivaron las células en platos de 96 pozos de fondo plano con una densidad celular de aproximadamente 40000 células/pozo en 100 μ L de DMEM y con un periodo de incubación de 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con 10, 50, 100 o 200 μ g/mL de PM10, (o tritón X-100 al 20% como control de muerte celular) por 24 horas. Seguido a esto, se eliminó el sobrenadante de los pozos y se realizaron dos lavados con 200 μ L de PBS, posteriormente, se adicionaron 100 μ L de DMEM sin suplementar y 30 μ L de MTT y se incubó a 37°C por 2 horas protegido de la luz. Pasado este tiempo se procedió a centrifugar el plato a 2500 rpm por 10 minutos, se retiraron 80 μ L del sobrenadante, y luego fueron añadidos 130 μ L de DMSO, y consiguiente a esto, el plato fue sometido a agitación por 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm en un espectrofotómetro. Cada condición fue realizada por triplicado y un número total de 6 ensayos.

Para evaluar la viabilidad de PBMC infectados con *Rhinovirus* se realizó siguiendo el mismo procedimiento anterior. Se utilizó una densidad celular de 200000 células/pozo y estímulos con *Rhinovirus* al 0,2 y al 2% y como control de muerte celular se usó tritón al 20%. El efecto de la viabilidad celular posterior a la exposición al PM ya ha sido observado en los resultados previos de la línea (datos sin publicar), por lo cual no fue necesario volver a analizarlo.

Estandarización RT-qPCR:

Para la estandarización de las PCR de los genes de interés, se realizó un gradiente de temperatura para determinar al *annealing* de los primers. En un principio se planteó evaluar 5 moléculas de adhesión, β -catenina, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y E-cadherina, sin embargo, se tuvo problemas con la estandarización de las moléculas E-selectina y E-cadherina que no se muestran en el presente artículo. El proceso de estandarización se puede evidenciar en el material complementario.

Evaluación de la expresión de las moléculas de adhesión en cultivos celulares:

Para la cuantificación de la expresión del mRNA β -catenina en células A549, estas fueron cultivadas en placas de 6 pozos a una densidad de 600000 células/pozo en 2 ml de DMEM suplementado con 5 % de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina durante 24 horas. Posteriormente, se realizó cambio de medio suplementado con 2,5% de SFB y se estimularon con PM10 a una concentración de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó en una atmósfera de 5% CO₂, a una temperatura de 37°C, por otras 24 horas.

Por otra parte, el cultivo de PBMC para la medición de las moléculas ICAM-1 y VCAM-1, se realizó en placas de 24 pozos a una densidad de 500000 células/pozo en 500 μL de RPMI (Gibco, USA) suplementado con 5% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina por 24 horas. Consiguiente a dicha incubación, las células fueron estimuladas con los siguientes tratamientos: PM10 a una concentración 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, infección con *Rhinovirus* al 0,2% y al 2%, y la combinación del tratamiento con PM10 junto a las respectivas dosis de *Rhinovirus* mencionadas anteriormente.

Es importante resaltar que las concentraciones de *Rhinovirus* utilizadas son proporcionales a lo evaluado anteriormente en la viabilidad celular.

Extracción RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real:

Para la extracción del RNA total de las células A549 se utilizó el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) y para los PBMC se utilizó el kit One Step RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA). Por su parte, para la síntesis del cDNA tanto de las células A549 como de las PBMC se utilizó el kit iScript™ cDNA Synthesis (Biorad, USA) y se llevó a una concentración de 200 µg/mL. Finalmente, la medición de las moléculas β -catenina, ICAM-1 y VCAM-1 se realizó mediante una RT-qPCR utilizando SYBR Green Mastermix (Thermo Scientific, USA) y los siguientes primers:

Tabla 1. Primers para la determinación de las moléculas de adhesión

Molécula de adhesión	Secuencia del primer	Temperatura <i>annealing</i>	Tamaño del amplicon
β -catenina (Forward)	5'-AAA ATG GCA GTG CGT TTA G-3'	56°C	100pb
β -catenina (Reverse)	5'-TTT GAA GGC AGT CTG TCG TA-3'		
ICAM-1 (Forward)	5'-ATG CCC AGA CAT CTG TGT CC-3'	59°C	112pb
ICAM-1 (Reverse)	5'-GGG GTC TCT ATG CCC AAC AA-3'		
VCAM-1 (Forward)	5'-TCA GAT TGG AGA CTC AGT CAT GT-3'	59°C	109pb
VCAM-1 (Reverse)	5'-ACT CCT CAC CTT CCC GCT C-3'		

Análisis estadístico

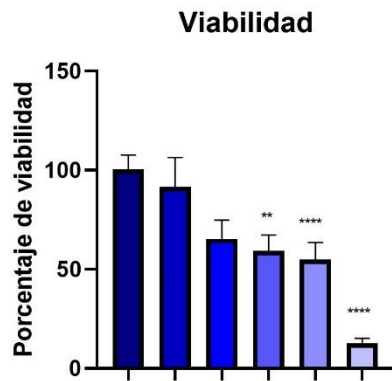
Los datos se representaron y analizaron usando el software Prism 8.0 (Graph Pad Software, CA). Todos los resultados representan al menos cinco experimentos independientes. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro–Wilk. El análisis estadístico fue realizado con pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney), debido a la distribución no paramétrica de los datos. La prueba de comparación múltiple de Dunn`s se utilizó como prueba posterior para comparar muestras dentro del conjunto de datos, considerando un valor de $P < 0,05$ como significativo.

1.5 Resultados

Efecto en la viabilidad celular del PM10 en células A549 y PBMC

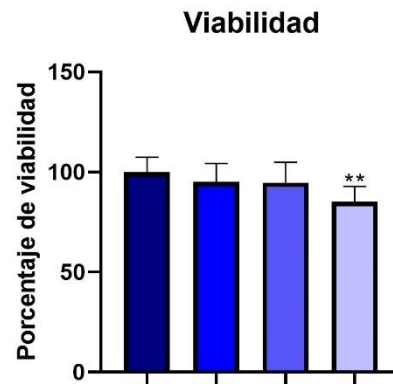
La viabilidad de células A549 expuestas a PM10, fue evaluada utilizando el método de reducción de MTT. Las células A549 fueron expuestas a PM10 en diferentes concentraciones por 24 horas, para lo cual se obtuvo una disminución significativa de la viabilidad a partir de 100 $\mu\text{g/ml}$ comparado con el control positivo (triton 20%), evidenciándose que a mayor concentración de PM, menor fue la viabilidad (Fig 3a). Además, la viabilidad celular fue evaluada en PBMC infectados por el *Rhinovirus* por medio de la prueba de MTT, para el cual no se observó una muerte celular estadísticamente significativa (Fig 3b)

a.



PM10: 10ug/mL	-	+	-	-	-	-
PM10: 50ug/mL	-	-	+	-	-	-
PM10: 100ug/mL	-	-	-	+	-	-
PM10: 200ug/mL	-	-	-	-	+	-
Triton 20%	-	-	-	-	-	+

b.

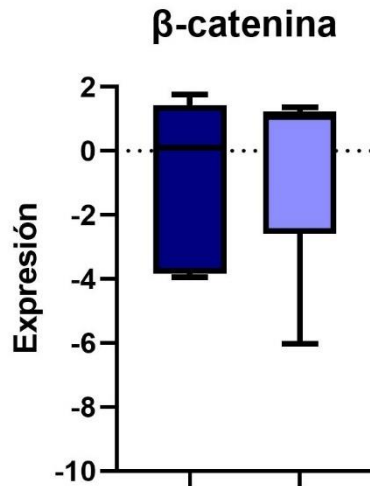


0,4 μL de RV	-	+	-	-
4 μL de RV	-	-	+	-
Tritón 20%	-	-	-	+

Figura 3: Viabilidad en células A549 expuestas a diferentes concentraciones de PM10 (n=7)(a) y viabilidad en PBMC expuestas a *Rhinovirus* (n=6) (b). El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba Kruskal Wallis.

Expresión de β -catenina por exposición a PM10 en células A549

La cuantificación de la expresión de mRNA de β -catenina mediante RT-qPCR en células A549 expuestas a concentraciones de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PM10 no mostró un cambio estadísticamente significativo (Fig 4).



PM10: 10ug/mL	+	-
PM10: 50ug/mL	-	+

Figura 4: Expresión de β -catenina en células A549 estimuladas con PM10 a 10 μ g/mL y a 50 μ g/mL. El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba U de Mann-Whitney, n= 6.

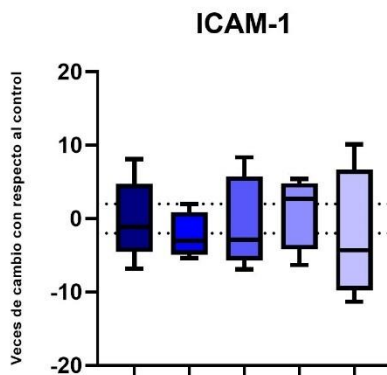
Cambios en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por PM10 y *Rhinovirus* en PBMC

La cuantificación de la expresión de mRNA de ICAM-1 y VCAM-1 en PBMC fue evaluada luego de realizar estímulos con PM10 a una concentración de 50 μ g/ml y posteriormente expuestos a *Rhinovirus* (0,2% y 2%).

Para la molécula ICAM-1 se observó una disminución en la expresión del mRNA frente las siguientes condiciones: i) estímulo viral al 0,2% y ii) PM10 + virus 2%, con respecto al control (Fig 5a).

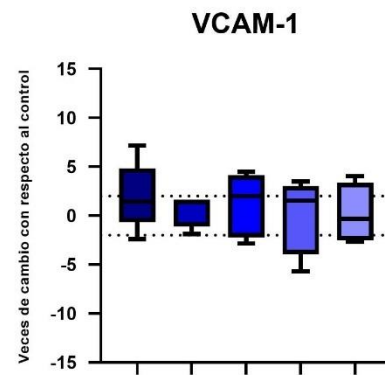
Por su parte, la cuantificación en la expresión de VCAM-1 reveló un incremento en las células que fueron tratadas con PM10 a una concentración de 50 μ g/ml, sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo (Fig 5b).

a.



PM10: 50ug/mL	+	-	-	+	+
0,2 % RV	-	+	-	+	-
2% de RV	-	-	+	-	+

b.



PM10: 50ug/mL	+	-	-	+	+
0,2% de RV	-	+	-	+	-
2% de RV	-	-	+	-	+

Figura 5: Expresión de ICAM-1 (a) y VCAM-1 (b) en PBMC, en células infectadas con *Rhinovirus* y expuestas a PM10. El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba Kruskal Wallis, n= 5.

1.6 Discusión

El estudio del material particulado, incluyendo PM10 y PM 2.5 ha adquirido relevancia en los últimos años debido a que en las grandes ciudades los niveles de contaminación han ido en aumento. La OMS estima que nueve de cada diez personas respira aire contaminado²⁷, esta problemática se ha asociado con hospitalizaciones³⁵ y muertes prematuras³⁰.

En la literatura se relata que la exposición al PM genera un aumento de factores mediadores de la inflamación, tales como la PCR, citoquinas proinflamatorias y moléculas involucradas en la trans migración leucocitaria como lo son ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina³⁶. Cabe destacar que la mayoría de estudios en la actualidad, son estudios realizados con PM2.5, debido a que por su tamaño, pueden llegar a los bronquiolos terminales y entrar a los alvéolos. Por otro lado, el PM10 por su

tamaño se queda albergado en los pulmones y la exposición a este se ha asociado con enfermedades como el EPOC y el asma³⁷⁻³⁹. Por lo anterior, es importante direccionar los estudios hacia los efectos que puede tener la exposición al PM10 a nivel celular y molecular, que abarca principalmente la inducción de un perfil inflamatorio basado en la expresión de marcadores como IL-1 β , TNF- α , COX-2, iNOS⁴⁰, además se ha resaltado el incremento en el reclutamiento y adhesión de monocitos al endotelio debido al incremento de moléculas de adhesión como E-selectina e ICAM-1⁴¹

En el presente estudio se evidenció que el PM10 recolectado en el Valle de Aburrá tiene un efecto en la viabilidad de las células del epitelio respiratorio (A549), disminución que se evidencia de manera dependiente de la concentración, lo que podría significar un daño a nivel pulmonar⁴² y que a su vez podría estar ocasionando una predisposición a diversas patologías. Se ha reportado previamente una disminución en la viabilidad de células A549, expuestas al PM10 desde concentraciones de 10 $\mu\text{g/ml}$ ⁴³. En nuestro estudio encontramos que a concentraciones de PM10 de 100 $\mu\text{g/ml}$ la disminución de la viabilidad de las células A549 empieza a ser estadísticamente significativa, lo que puede ser explicado desde la composición del mismo PM, para el cual se ha reportado que los efectos citotóxicos pueden variar de acuerdo a las características químicas y orgánicas presentes en este⁴⁴.

Teniendo en cuenta las concentraciones a las cuales el PM10 no indujo cambios significativos en la viabilidad celular, en el presente estudio se evaluó en células A549 el efecto del PM10 (50 $\mu\text{g/ml}$) en la expresión de β -catenina, para la cual no se evidenció cambio. Esto es importante, debido a que esta molécula participa en el proceso de adherencia célula-célula⁴⁵, y podría indicar que la integridad de la barrera epitelial no está siendo afectada frente a estímulos con PM10; sin embargo, es de resaltar que en la literatura se ha reportado que frente a estímulos con PM2.5 la expresión de esta molécula sí se ve gradualmente afectada de acuerdo al tiempo de exposición¹⁸, por lo que sería pertinente evaluar en próximos estudios si el PM10

también puede generar este cambio en la expresión dependiente de tiempo de exposición.

La exposición al PM también puede aumentar la susceptibilidad a infecciones virales, por lo cual, en el presente estudio también se evaluó el efecto de la exposición de PM10 sobre la expresión de moléculas ICAM-1 y VCAM-1 en PBMC y el efecto de la exposición a *Rhinovirus*. Los *Rhinovirus* son causantes del resfriado común, sin embargo también se han asociado con enfermedades como el asma y la neumonía⁴⁶. Aunque estos virus infectan principalmente células epiteliales, se ha observado que tiene la capacidad de infectar PBMC²³. Estudiar el efecto que tiene la exposición a PM y al *Rhinovirus*, podría dilucidar los procesos inflamatorios que se desencadenan y que pueden estar implicados en el desarrollo de patologías del tracto respiratorio. Por otro lado, se ha encontrado en pacientes con EPOC, que posterior a la exposición a combustible de biomasa, (por ejemplo leña para cocinar) se evidencia un daño genómico en células sanguíneas⁴⁸. Por lo cual, el estudio en estas células, resulta clave para el entendimiento de enfermedades inflamatorias, por consiguiente, en este estudio se decidió evaluar en estas células, la expresión de moléculas que participan en la transmigración leucocitaria a los tejidos. ICAM-1 es una glicoproteína transmembranal perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que facilita la transmigración de leucocitos por el endotelio y además es conocida por ser el receptor de entrada para los *Rhinovirus* pertenecientes al grupo mayor. Esta molécula puede ser expresada por varios tipos celulares y su activación puede deberse a diferentes estímulos inflamatorios pero también puede deberse a estrés físico y químico^{49,50}. En estudios previos, se ha reportado el incremento en la adhesión de monocitos (U937) a células endoteliales (HUVEC) por su exposición tanto a PM10 como a PM2.5, esto debido a un aumento en la expresión de moléculas como P-selectina, ICAM-1 y PCAM, en donde se evidencio que a menor concentración de PM, la expresión de este tipo de moléculas es mayor⁴¹. En contraste, en esta investigación se observó que la infección de PBMC con *Rhinovirus* 0,2% y bajo estímulos combinados de PM10 (50 ug/ml) + *Rhinovirus* 2%, la expresión de ICAM-1 fue regulada negativamente. En la literatura

se ha reportado que bajo una infección con *Rhinovirus*, cuando hay pre estímulos de IFN- γ combinado con IL-1 β , TNF- α , e IL-8 se puede disminuir la expresión de dicha molécula⁵¹. Además, este tipo de citoquinas también pueden incrementarse por la exposición al PM2.5⁵²⁻⁵⁴, siendo producidas principalmente por monocitos y macrófagos⁵⁵. Por otra parte, se ha demostrado que tras la exposición a PM10 por 24 horas incrementa la expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)⁵⁶, este factor es una citoquina inducible, en la estimulación funcional de los granulocitos y fagocitos mononucleares maduros, esta puede ser producida por células mononucleares como linfocitos⁵⁷. En nuestro trabajo la expresión de ARNm se midió tras una incubación de 72 horas, por lo cual es posible que este factor haya cambiado el perfil de las células monocíticas que aislamos en sangre periférica y eso se haya visto reflejado en los resultados obtenidos, sobre la regulación negativa de ICAM-1, para el cual, otra posible explicación sería la liberación y el incremento de los niveles de Óxido nítrico (NO) molécula que es secretada por células como los macrófagos⁵⁸ y la cual se ha reportado que puede ocasionar la disminución de expresión de ICAM-1⁵⁹. La exposición a PM2.5 puede ocasionar la producción de NO⁶⁰, que a su vez, se ve incrementado en las infecciones virales, incluyendo la infección por *Rhinovirus*⁶¹. Este análisis condujo a realizar un experimento con el fin de cuantificar el óxido nítrico, el resultado de dicho experimento se muestra en el material complementario. El resultado obtenido no está dentro de los resultados esperados, debido a que no se observa un aumento de este compuesto en las células tratadas con PM ni infectadas con *Rhinovirus*, cabe resaltar que este experimento fue limitado, debido a que por aspectos relacionados con el tiempo, solo se pudo hacer un único ensayo, en el cual se incluyeron dos individuos entre los que se observó mucha variabilidad en la producción de NO, por lo que se deben realizar más experimentos con el fin de corroborar estos datos.

VCAM-1 es una glicoproteína inducible por citoquinas, la cual se expresa principalmente en endotelio⁶²; sin embargo, puede estar presente en células del sistema inmune incluyendo macrófagos. Esta molécula cumple con la función de

facilitar la transmigración leucocitaria al endotelio⁶³. En la literatura se ha reportado inducción de esta molécula en el endotelio, para la cual se ha reportado inducción tanto por citoquinas inflamatorias como por PM⁴¹. En este estudio se quiso evaluar si la exposición al PM inducía la expresión de VCAM-1 en PBMC infectados con *Rhinovirus* tras la exposición a PM10. Evidenciamos un cambio en la expresión en las células que solo fueron expuestas a PM10 (50 ug/ml), sin embargo, este cambio no fue significativo, adicionalmente, no se obtuvo ningún cambio significativo en la expresión de esta molécula en ninguna condición evaluada.

En conclusión, en este estudio se encontró que el PM10 afecta la viabilidad de células del epitelio respiratorio (A549). Además, la expresión de la molécula β -catenina en A549 no fue modulada en las concentraciones evaluadas (10 μ g/mL y 50 μ g/mL). No se evidenciaron cambios en la expresión de la molécula VCAM-1 en PBMC expuestas al PM o *Rhinovirus*. Por otra parte, observamos una disminución de la molécula ICAM-1 bajo las condiciones de infección viral al 0,2% y PM 10 (50 μ g/ml) + *Rhinovirus* 2%.

Entre las limitaciones de este estudio, se encuentra la imposibilidad de la titulación del virus debido a inconvenientes en las células en donde se dio la amplificación de este, por lo que en este estudio la dosis viral se establece de manera temporal en unidades de volumen tomados de una alícuota madre, la cual fue obtenida posterior al proceso de amplificación viral y pendiente de titulación. Además, la imposibilidad de amplificar por medio de qRT-PCR moléculas de adhesión como E-cadherina y E-selectina, para las cuales se han reportado alteraciones por la exposición al PM, no permitió comprender en su totalidad como el PM10 del Valle de Aburra afecta la expresión de otras moléculas de adhesión, tanto las implicadas en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y como aquellas que facilitan la transmigración leucocitaria. Por otra parte, otra limitación encontrada fue la escasez de información y conocimiento del estado de maduración de los monocitos a macrófagos por la exposición al PM10, esclarecer este aspecto permitiría entender y estudiar con mayor claridad los mecanismos moleculares que pueden estar generando alteraciones tras dicha exposición. A pesar de estas limitaciones, este estudio

permite dilucidar como el PM10 afecta las células del epitelio y de la inmunidad, demostrando que el PM10 genera afectaciones a nivel de viabilidad celular, lo cual podría significar un riesgo en la salud pública de los habitantes. Adicionalmente, estos resultados permiten orientar a la comunidad científica del Valle de Aburrá sobre los futuros estudios que se podrían realizar con el fin de dar entendimiento sobre los mecanismos con que el PM genera alteraciones que se ven reflejados en problemas de salud pública.

Referencias bibliograficas

1. Hinds WC. Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles. J Aerosol Sci. 1999;
2. Young Kyung S, Hwan Jeong S. Particulate-Matter Related Respiratory Diseases.
3. Ciencewicki J, Jaspers I. Air pollution and respiratory viral infection. Inhalation Toxicology. 2007.
4. Clancy L, Goodman P, Sinclair H, Dockery DW. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: An intervention study. Lancet. 2002;
5. Brunekreef B, Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. European Respiratory Journal. 2005.
6. Liu S, Zhou Y, Liu S, Chen X, Zou W, Zhao D, et al. Association between exposure to ambient particulate matter and chronic obstructive pulmonary disease: Results from a cross-sectional study in China. Thorax. 2017;
7. Sint T, Donohue JF, Ghio AJ. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Inhal Toxicol. 2008;
8. Fortoul van der Goes TI, López Valdez N. Histología y biología celular. 2017.
9. Du Y, Xu X, Chu M, Guo Y, Wang J. Air particulate matter and cardiovascular

disease: the epidemiological, biomedical and clinical evidence. *J Thorac Dis* [Internet]. 2016 Jan;8(1):E8–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26904258>

10. Hayes RB, Lim C, Zhang Y, Cromar K, Shao Y, Reynolds HR, et al. PM2.5 air pollution and cause-specific cardiovascular disease mortality. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2020 Feb 1;49(1):25–35. Available from: <https://academic.oup.com/ije/article/49/1/25/5529269>
11. Feng S, Gao D, Liao F, Zhou F, Wang X. The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016.
12. Li X, Huang S, Jiao A, Yang X, Yun J, Wang Y, et al. Association between ambient fine particulate matter and preterm birth or term low birth weight: An updated systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2017.
13. Mazzoli-Rocha F, Fernandes S, Einicker-Lamas M, Zin WA. *OCLU. Cell Biology and Toxicology*. 2010.
14. Radan M, Dianat M, Badavi M, Mard SA, Bayati V, Goudarzi G. Gallic acid protects particulate matter (PM10) triggers cardiac oxidative stress and inflammation causing heart adverse events in rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2019;
15. Gualtieri M, Longhin E, Mattioli M, Mantecca P, Tinaglia V, Mangano E, et al. Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5. *Toxicol Lett*. 2012;
16. Zhao R, Guo Z, Zhang R, Deng C, Xu J, Dong W, et al. Nasal epithelial barrier disruption by particulate matter $\leq 2.5 \mu\text{m}$ via tight junction protein degradation. *J Appl Toxicol*. 2018;
17. La célula. 3. Membrana celular. *COMPLEJOS de UNIÓN* [Internet]. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/3-complejos.php>

18. Raudoniute J, Stasiulaitiene I, Kulvinskiene I, Bagdonas E, Garbaras A, Krugly E, et al. Pro-inflammatory effects of extracted urban fine particulate matter on human bronchial epithelial cells BEAS-2B. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2018 Nov 17;25(32):32277–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3167-8>
19. Liu C-W, Lee T-L, Chen Y-C, Liang C-J, Wang S-H, Lue J-H, et al. PM2.5-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF- κ B-dependent pathway. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 2018 Dec 12;15(1):4. Available from: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-018-0240-x>
20. Cui A, Xiang M, Xu M, Lu P, Wang S, Zou Y, et al. VCAM-1-mediated neutrophil infiltration exacerbates ambient fine particle-induced lung injury. *Toxicol Lett* [Internet]. 2019 Mar;302:60–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427418320472>
21. Mantoyani A, Dejana E. Endothelium. In: *Encyclopedia of Immunology*. 1998.
22. Xing L, Casasnovas JM, Cheng RH. Structural Analysis of Human Rhinovirus Complexed with ICAM-1 Reveals the Dynamics of Receptor-Mediated Virus Uncoating. *J Virol*. 2003 Jun;77(11):6101–7.
23. Zhou X, Zhu L, Lizarraga R, Chen Y. Human airway epithelial cells direct significant rhinovirus replication in monocytic cells by enhancing ICAM1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;
24. Zhang WC, Wang YG, Zhu ZF, Wu FQ, Peng YD, Chen ZY, et al. Regulatory T cells protect fine particulate matter-induced inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells. *Mediators Inflamm*. 2014;
25. Yang L, Li C, Tang X. The Impact of PM2.5 on the Host Defense of Respiratory

System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020.

26. Jedrychowski WA, Perera FP, Spengler JD, Mroz E, Stigter L, Flak E, et al. Intrauterine exposure to fine particulate matter as a risk factor for increased susceptibility to acute broncho-pulmonary infections in early childhood. *Int J Hyg Environ Health*. 2013;
27. Nueve de cada diez personas de todo el mundo respiran aire contaminado [Internet]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/02-05-2018-9-out-of-10-people-worldwide-breathe-polluted-air-but-more-countries-are-taking-action>
28. Los costos en la salud asociados a la degradación ambiental en Colombia ascienden a \$20,7 billones [Internet]. Available from: <https://www.dnp.gov.co/Paginas/Los-costos-en-la-salud-asociados-a-la-degradación-ambiental-en-Colombia-ascienden-a-%2420,7-billones-.aspx>
29. CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA Y SUS EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LOS HABITANTES DEL VALLE DE ABURRÁ 2008-2015 [Internet]. Available from: https://www.metropol.gov.co/ambiental/calidad-del-aire/Biblioteca-aire/Re-analisis/ContaminacionAtmosferica_y_sus_Efectos_en_la_Salud-AMVA_2019.pdf
30. Calidad del aire y salud [Internet]. Available from: [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)
31. Análisis del medio ambiente en Medellín [Internet]. Available from: https://www.medellincomovamos.org/medio-ambiente/#_ftn1
32. MINISTERIO DE AMBIENTE VY, TERRITORIAL D. RESOLUCIÓN NÚMERO (610). 2010.
33. Hwang L, Ko I, Jin J, Kim S, Kim C, Hwang J, et al. Attenuation effect of

polydeoxyribonucleotide on inflammatory cytokines and apoptotic factors induced by particulate matter (PM10) damage in human bronchial cells. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2021 Feb 28;35(2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbt.22635>

34. Van Den Heuvel R, Den Hond E, Govarts E, Colles A, Koppen G, Staelens J, et al. Identification of PM 10 characteristics involved in cellular responses in human bronchial epithelial cells (Beas-2B). *Environ Res* [Internet]. 2016 Aug;149:48–56. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935116301530>
35. Wei Y, Wang Y, Di Q, Choirat C, Wang Y, Koutrakis P, et al. Short term exposure to fine particulate matter and hospital admission risks and costs in the Medicare population: time stratified, case crossover study. *BMJ* [Internet]. 2019 Nov 27;l6258. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.l6258>
36. Shkirkova K, Lamorie-Foote K, Connor M, Patel A, Barisano G, Baertsch H, et al. Effects of ambient particulate matter on vascular tissue: a review. *J Toxicol Environ Heal Part B* [Internet]. 2020 Oct 2;23(7):319–50. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10937404.2020.1822971>
37. Inhalable Particulate Matter and Health (PM2.5 and PM10).
38. Li D, Li Y, Li G, Zhang Y, Li J, Chen H. Fluorescent reconstitution on deposition of PM 2.5 in lung and extrapulmonary organs. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2019 Feb 12;116(7):2488–93. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1818134116>
39. Canova C, Dunster C, Kelly FJ, Minelli C, Shah PL, Caneja C, et al. PM10-induced Hospital Admissions for Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Epidemiology* [Internet]. 2012 Jul;23(4):607–15. Available from: <https://journals.lww.com/00001648-201207000-00013>

40. Guo L, Zhu N, Guo Z, Li G, Chen C, Sang N, et al. Particulate matter (PM10) exposure induces endothelial dysfunction and inflammation in rat brain. *J Hazard Mater* [Internet]. 2012 Apr;213–214:28–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389412000659>
41. Montiel-Dávalos A, Alfaro-Moreno E, López-Marure R. PM 2.5 and PM 10 Induce the Expression of Adhesion Molecules and the Adhesion of Monocytic Cells to Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Inhal Toxicol* [Internet]. 2007 Jan 20;19(sup1):91–8. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08958370701495212>
42. Shi Y, Zhao T, Yang X, Sun B, Li Y, Duan J, et al. PM2.5-induced alteration of DNA methylation and RNA-transcription are associated with inflammatory response and lung injury. *Sci Total Environ*. 2019;
43. Yi S, Zhang F, Qu F, Ding W. Water-insoluble fraction of airborne particulate matter (PM 10) induces oxidative stress in human lung epithelial A549 cells. *Environ Toxicol* [Internet]. 2014 Feb;29(2):226–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/tox.21750>
44. Goudarzi G, Shirmardi M, Naimabadi A, Ghadiri A, Sajedifar J. Chemical and organic characteristics of PM2.5 particles and their in-vitro cytotoxic effects on lung cells: The Middle East dust storms in Ahvaz, Iran. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019 Mar;655:434–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004896971834508X>
45. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J* [Internet]. 2012 Jun 13;31(12):2714–36. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2012.150>
46. Drysdale SB, Mejias A, Ramilo O. Rhinovirus – not just the common cold. *J Infect* [Internet]. 2017 Jun;74:S41–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445317301901>

47. He D, Yang CX, Sahin B, Singh A, Shannon CP, Oliveria J-P, et al. Whole blood vs PBMC: compartmental differences in gene expression profiling exemplified in asthma. *Allergy, Asthma Clin Immunol* [Internet]. 2019 Dec 21;15(1):67. Available from: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-019-0382-x>
48. Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S. Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med* [Internet]. 2006 Jul;100(7):1270–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0954611105004348>
49. van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* [Internet]. 1996 Jan;74(1):13–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00202069>
50. Basnet S, Palmenberg AC, Gern JE. Rhinoviruses and Their Receptors. *Chest* [Internet]. 2019 May;155(5):1018–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012369219300030>
51. SETHI SK, BIANCO A, ALLEN JT, KNIGHT RA, SPITERI MA. Interferon-gamma (IFN- γ) down-regulates the rhinovirus-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human airway epithelial cells. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1997 Dec;110(3):362–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2249.1997.4221440.x>
52. Ma Q-Y, Huang D-Y, Zhang H-J, Wang S, Chen X-F. Exposure to particulate matter 2.5 (PM_{2.5}) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2017 Sep;50:139–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576917302412>
53. Tsai D-H, Amyai N, Marques-Vidal P, Wang J-L, Riediker M, Mooser V, et al. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult

population. Part Fibre Toxicol [Internet]. 2012 Dec 6;9(1):24. Available from: <https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-9-24>

54. Silbajoris R, Osornio-Vargas AR, Simmons SO, Reed W, Bromberg PA, Dailey LA, et al. Ambient Particulate Matter Induces Interleukin-8 Expression through an Alternative NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) Mechanism in Human Airway Epithelial Cells. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2011 Oct;119(10):1379–83. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1103594>
55. CARRASCO OTERO L. CITOQUINAS: DE FIELES ALIADAS A TEMIBLES ENEMIGAS.
56. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Vincent R VES. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. 2001;
57. Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2010 Dec 10;4(6):723–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/egh.10.73>
58. León-Regal M, Alvarado-Borges A, De-Armas-García J, Miranda-Alvarado L, Varens-Cedeño J, Cuesta-del-Sol J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Rev Finlay*. 2015;
59. Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Barnett, Jr. CC. Nitric Oxide Reduces Endothelial Expression of Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1. *J Surg Res* [Internet]. 1996 Jun;63(1):328–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002248049690270X>
60. Nam H. The role of nitric oxide in the particulate matter (PM_{2.5})-induced NF κ B activation in lung epithelial cells. *Toxicol Lett* [Internet]. 2004 Mar 14;148(1–2):95–102. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427403004697>

61. Proud D. Nitric oxide and the common cold. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2005 Feb;5(1):37–42. Available from: <http://journals.lww.com/00130832-200502000-00008>
62. Kong D-H, Kim Y, Kim M, Jang J, Lee S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Apr 2;19(4):1057. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/4/1057>
63. Macías Abraham C. Moléculas de adhesión. Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter*. 2006;