



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**“Comparación de la respuesta inflamatoria a un extracto de
humo de marihuana en dos modelos de la barrera epitelial
alveolar *in vitro*”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. CARLOS DANIEL ORTIZ RAMÍREZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE TOXICOLOGÍA

Director de la Tesis: Dr. Arnulfo Albores Medina

Ciudad de México

OCTUBRE, 2023



Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la tutoría del Dr. Arnulfo Albores Medina.

Este trabajo fue apoyado económicamente por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) a través de la beca de maestría No. 800491 y PRODEP de la Secretaría de Educación Superior, Dirección de Educación Superior Universitaria. Secretaría de Educación Pública. PEF S247.



Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente al Universo, dios o madre de todo, que me permitió continuar mi vida hasta este punto y coincidir en los momentos adecuados con las personas correctas para llegar aquí.

A mi madre, por el desvelo de cada día y las bendiciones con las que me enviaba a la escuela, por ser mi ejemplo de fortaleza y perseverancia, por estar siempre brindando apoyo en cada paso de mi vida y formación, por las enseñanzas, por ser el pilar de la casa y no rendirse nunca.

A mi padre, por el apoyo a la distancia, por ser el ejemplo de esfuerzo y trabajo, por ser mi motivación de estudio y superación.

A Aura, porque sin su apoyo a la distancia no estaría dando este paso tan importante, por ser hermana y por ser amiga.

A todas mis amigas y amigos que he tenido la fortuna de conocer en todos los ámbitos académicos y no académicos en los que me he desenvuelto, por ser equipo, porque sin el apoyo brindado por ustedes no habría logrado esta meta.

Agradecimientos

Al Dr. Arnulfo Albores, director de tesis, por permitirme ser uno de sus asesorados y trabajar en su laboratorio durante este proyecto; por compartir su experiencia.

Al Dr. Gamaliel Aztatzi, asesor de tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindar su apoyo, por ser la guía de este proyecto y pilar fundamental en la realización del mismo; por sus consejos, por compartir su conocimiento y experiencia conmigo.

A la Dra. Silvia Cruz, asesora de tesis, por brindar su apoyo para la realización del trabajo, por compartir su conocimiento y ayudar a dar forma a este trabajo.

A la M. en C. Fanny Colchero y la M. en C. Elvira Gómez por la obtención y análisis del EHM utilizado en este trabajo.

A la QFB. Patricia Vázquez, técnico de laboratorio, por brindar apoyo a este proyecto con su trabajo y compañía. A las compañeras de laboratorio 6, por brindar apoyo al proyecto con comentarios y compañía. A la Dra. Irais Poblete, auxiliar de investigación.

Al laboratorio 26 del Departamento de Toxicología por brindar apoyo durante el desarrollo de algunas de las técnicas empleadas en este estudio.

Agradezco a Iliana, Andrea, Paul y Lilian, compañeros y amigos del departamento, por su apoyo y amistad en el transcurso de la maestría, porque sin las charlas y salidas habría colapsado este trabajo.

Al departamento de Toxicología del CINVESTAV, por aceptarme en su programa y brindarme la posibilidad de completar otra meta importante en mi vida.

A mi madre y padre, por su apoyo brindado a la distancia. A mi familia, por las enseñanzas y motivación. A la vida misma, por todas las coincidencias y mi existencia.

Resumen

La inhalación de humo de marihuana (HM) es la forma de su consumo más extendida, está asociada con síntomas de inflamación pulmonar. No obstante, se desconoce su impacto en la secreción de interleucinas (IL) y la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria del epitelio alveolar. El objetivo de este estudio fue analizar la alteración en los niveles de IL y la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria de modelos *in vitro* de la barrera epitelial alveolar expuestos a un extracto de HM (EHM). Se usaron dos modelos celulares, un monocultivo de células A549 y un co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de la línea celular THP-1. Se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo MTT y tinción de cristal violeta, los niveles de IL (antiinflamatorias y proinflamatorias) usando la tecnología Luminex® y la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria: arginasa y mieloperoxidasa, mediante ensayos colorimétricos. Los resultados mostraron que la exposición a concentraciones de EHM equivalentes a las de THC cuantificadas en fluidos biológicos humanos durante 24 h disminuyó la viabilidad del monocultivo y aumentó la secreción de IL-6, mientras que en el co-cultivo la misma exposición no afectó la viabilidad y aumentó los niveles de IL-1ra e IL-10, junto con el aumento de actividad de la arginasa y disminución de la actividad de mieloperoxidasa. De los resultados se concluye que los modelos investigados tienen una respuesta diferente al EHM y se sugiere un posible efecto protector antiinflamatorio de los macrófagos en la exposición al EHM. Al comparar los resultados entre ambos modelos se pone de manifiesto la relevancia de la participación del sistema inmune en la defensa de la barrera alveolar. Es conveniente analizar el posible mecanismo de protección de los macrófagos derivados de THP-1, que podría vincularse a la señalización de cannabinoides.

Abstract

Marijuana smoke (HM) consumption is the most common form of drug use and can cause symptoms of lung inflammation. However, how HM affects interleukins (IL) levels and inflammatory response enzymes activity in the alveolar region, remains unknown. This study aimed to analyze the modification of IL secretion and activity of inflammatory response enzymes of *in vitro* alveolar epithelial barrier models exposed to a HM extract (EHM). Two cell models were used, a monoculture with A549 cells and a co-culture with A549 cells and THP-1-derived macrophages. Cell viability was assessed using MTT assay and crystal violet staining, IL secreted levels were evaluated using Luminex[®] technology and the activity of arginase and myeloperoxidase was performed using colorimetric assays. The study showed that exposure to concentrations of EHM equivalent to THC concentrations found in human body fluids for 24 h decreased cell viability and increased IL-6 secretion in the monoculture, while the same exposure in the co-culture had no effect on cellular viability but increased IL-1ra and IL-10 secretion in the co-culture, along with increased arginase activity and reduced myeloperoxidase activity. With the results obtained it is concluded that both models had a different response to EHM and it is suggested a potential protective anti-inflammatory effect of THP-1-derived macrophages. Further research is needed to understand the possible protective mechanism which could be linked to cannabinoids signaling.

Índice de contenido

Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Resumen.....	vi
Abstract	vii
Índice de tablas	xi
Índice de figuras.....	xii
Abreviaturas	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Marihuana.....	1
1.1.1 Composición química	1
1.1.2 Consumo en México y el mundo	1
1.1.3 Humo de marihuana.....	4
1.2 Aparato respiratorio	6
1.2.1 Anatomía y fisiología del aparato respiratorio	6
1.3 Inflamación	8
1.3.1 Respuesta inflamatoria y resolución.....	8
1.3.2 Interleucinas.....	11
1.3.3 Inflamación en vías respiratorias.....	12
1.4 Antecedentes.....	14
1.5 Justificación	18
1.6 Hipótesis.....	18
1.7 Objetivos.....	18
1.7.1 Objetivo general	18

1.7.2 Objetivos específicos	19
2. Materiales y Métodos	20
2.1 Estrategia experimental	20
2.2 Reactivos	20
2.3 Cultivos celulares.....	21
2.3.1 Monocultivo A549.....	21
2.3.2 Co-cultivo A549-macrófagos derivados de THP-1	22
2.4 Tratamientos.....	23
2.5 Ensayo de viabilidad por MTT	24
2.5.1 Principio	24
2.5.2 Procedimiento	25
2.6 Ensayo de viabilidad por CVS	26
2.6.1 Principio	26
2.6.2 Procedimiento	26
2.7 Cuantificación de interleucinas vía ensayo multiplex de inmunofluorescencia Luminex®	27
2.7.1 Principio	27
2.7.2 Procedimiento	27
2.8 Ensayo de actividad enzimática de arginasa	28
2.8.1 Principio	28
2.8.2 Procedimiento	29
2.9 Ensayo de actividad enzimática de mieloperoxidasa.....	30
2.9.1 Principio	30
2.9.2 Procedimiento	31
2.10 Análisis estadístico	31

3. RESULTADOS	33
3.1 Respuesta de monocultivo a EHM.....	33
3.1.1 Viabilidad.....	33
3.1.2 Niveles de IL	34
3.2 Respuesta de co-cultivo a EHM.....	35
3.2.1 Viabilidad.....	35
3.2.2 Niveles de IL	35
3.3 Comparación de respuesta del monocultivo y co-cultivo a EHM	37
3.3.1 Niveles de IL	37
3.4 Actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en los modelos expuestos a EHM.....	40
3.4.1 Arginasa	40
3.4.2 Mieloperoxidasa	41
4. DISCUSIÓN	42
4.1 Modificación de la viabilidad en los modelos expuestos a EHM.....	42
4.2 Modificación de la secreción de IL en los modelos expuestos a EHM.....	44
4.3 Modificación de la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en los modelos expuestos a EHM.....	47
5. CONCLUSIONES.....	50
6. PERSPECTIVAS.....	51
7. REFERENCIAS.....	53
ANEXOS	63
Anexo 1. Obtención y análisis del Extracto de Humo de Marihuana	63
Anexo 2. Respuesta de co-cultivo a LPS, caracterización del co-cultivo.....	65
Anexo 3. Solución amortiguadora de fraccionamiento subcelular	69

Índice de tablas

Tabla 1. Concentraciones de THC en fluidos biológicos después de la inhalación de humo de marihuana.	3
Tabla 2. Comparación de compuestos detectados en humo de tabaco y marihuana	5
Tabla 3. Características de las interleucinas	12
Tabla 4. Concentraciones de THC en las concentraciones de EHM seleccionadas	23
Tabla 5. Compuestos identificados en el EHM por el tiempo de retención en el cromatograma y porcentaje de concordancia en la biblioteca de la NIST	64

Índice de figuras

Figura 1. Componentes estructurales del alveolo	7
Figura 2. Diagrama de flujo del estudio experimental	20
Figura 3. Reducción de MTT a formazán	25
Figura 4. Diagrama esquemático del ensayo de tinción de cristal violeta	26
Figura 5. Reacción catalizada por arginasa y formación de complejo colorido	29
Figura 6. Oxidación de TMB por mieloperoxidasa.....	31
Figura 7. Viabilidad celular de monocultivo expuesto a diferentes concentraciones de EHM por 24 h, ensayos MTT y CVS..	33
Figura 8. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas en el medio del monocultivo expuesto a EHM (1 µg/ml) por 24 h..	34
Figura 9. Viabilidad celular del co-cultivo expuesto a diferentes concentraciones de EHM por 24 h, ensayos MTT y CVS..	35
Figura 10. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas al medio del co-cultivo expuesto a EHM (1 µg/ml) por 24 h.....	36
Figura 11. Comparación de secreción de IL-6 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h.....	37
Figura 12. Comparación de secreción de IL-1ra en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h..	38
Figura 13. Comparación de secreción de IL-10 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h..	39
Figura 14. Comparación de secreción de IL-4 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h.....	39
Figura 15. Actividad de arginasa en mono- y co-cultivo expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h..	40
Figura 16. Actividad de la mieloperoxidasa en el co-cultivo expuesto a EHM (1 µg/ml) por 24 h	41
Figura 17. Viabilidad celular del co-cultivo expuesto a LPS (0.01 µg/ml) por 24 h, ensayos MTT y CVS..	65
Figura 18. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas en el medio del co-cultivo expuesto a LPS (0.01 µg/ml) por 24 h.....	66

Abreviaturas

CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
CBC	Cannabicromeno
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CBN	Cannabinol
CVS	Tinción de cristal violeta
EEM	Error estándar de la media
EHM	Extracto de humo de marihuana
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HM	Humo de marihuana
HT	Humo de tabaco
IL	Interleucinas
IL-10	Interleucina 10
IL-1ra	Antagonista del receptor de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolisacárido
min	Minutos

MPO	Mieloperoxidasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PPAR γ	Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma
THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
μ M	Micromolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Marihuana

1.1.1 Composición química

El término “marihuana” se refiere a las hojas secas, flores, tallos y semillas de la planta *Cannabis sativa* o *Cannabis indica* (NIDA, 2019). La marihuana contiene más de 421 compuestos químicos, de los cuales la sustancia psicoactiva más importante (que contribuye a su toxicidad) es el cannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC). La planta cuenta con más de 60 cannabinoides, aunque los de importancia fisiológica en la planta son: THC, Δ^8 -tetrahidrocannabinol, cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabicromeno (CBC) y cannabigerol (CBG), de los cuales no todos son psicotrópicos, ni cuentan con la misma afinidad por los receptores de cannabinoides en el organismo (Radwan *et al.*, 2021; Russo & Marcu, 2017; Sharma *et al.*, 2012).

Anteriormente, el término “cannabinoides” se utilizaba para denominar únicamente a compuestos provenientes de la *Cannabis* con una típica estructura C₂₁ y sus productos de transformación que tuvieran acción sobre los receptores de cannabinoides (CB1 y CB2, principalmente), en la actualidad se reconoce con este término a todos los compuestos incluyendo fitoquímicos, sintéticos y endógenos que pueden actuar como ligando sobre dichos receptores (Grotenhermen, 2003).

Además de los cannabinoides, la planta cuenta con terpenoides, monoterpenoides, sesquiterpenoides, alcaloides y flavonoides; las cantidades en las que estos compuestos están presentes dependen en gran medida de la genética de la planta, la estación del año en que se produjo, así como las condiciones en las que se cultivó y fue almacenada antes de su consumo (Grotenhermen, 2003; Russo & Marcu, 2017; Sharma *et al.*, 2012).

1.1.2 Consumo en México y el mundo

La marihuana es considerada la droga ilegal más consumida alrededor del mundo; ha sido usada con propósitos no médicos y en rituales, así como medicinales por casi 5,000 años (Rella, 2015; United Nations, 2023; UNODC, 2021). Para el año

2021 se estimó que 219 millones de personas en el mundo consumieron *Cannabis*, lo que representa un incremento de 10 millones respecto al año anterior (United Nations, 2021, 2023). De los informes sobre consumo de marihuana alrededor del mundo se observa una tendencia al incremento que, entre 2010 y 2020, fue de 23%. La prevalencia de consumo más alta (5.34%) entre grupos etarios, perteneció a los adolescentes de entre 15 y 16 años en 2021. Por su parte, Norteamérica fue en 2021 la subregión del mundo con mayor prevalencia de consumo de marihuana (United Nations, 2023).

En muchos países, el uso recreacional y medicinal de la marihuana es ilegal y en otros se está revisando la situación legal de su consumo (CONADIC, 2021; UNODC, 2021). En México, su uso medicinal es legal desde 2017 y el uso no médico está descriminalizado (CONADIC, 2021). La prevalencia en el consumo frecuente para el año 2016 era de 2.1% de la población total, en cuanto al consumo alguna vez en la vida era de 8.6% en el 2016. Se tiene el registro del incremento de ambas prevalencias de consumo entre 2011 y 2016 (CONADIC *et al.*, 2017). La prevalencia de consumo en México se encuentra como una de las más bajas a nivel mundial, aunque no se cuenta con información nacional reciente (CONADIC, 2021).

El consumo de marihuana es diverso, puede fumarse como cigarrillos enrollados llamados porros o *joints*, en pipa o en pipas de agua (*bongs*). También se fuma en *blunts*, que son cigarros de tabaco vaciados y vueltos a rellenar parcial o totalmente con marihuana; algunas personas usan vaporizadores. La marihuana también se puede mezclar con alimentos (alimentos cannábicos) o beberse en forma de infusión. A su vez, es popular el consumo de aceites, resinas, extractos y concentrados de THC o CBD (NIDA, 2019).

Entre tantas opciones, la manera de consumo no médico preferente es fumar porros o *blunts*. Esto obedece a que los consumidores manifiestan alcanzar efectos psicotrópicos más rápidamente y de mayor duración comparado con el consumo por ingesta y absorción cutánea de aceites, extractos o tinturas de marihuana, donde refieren un efecto más lento (Grotenhermen, 2003; Rella, 2015).

Esto se debe a que la combustión de la marihuana da lugar a la descarboxilación de algunos cannabinoides, como es el caso del ácido Δ^9 -tetrahidrocannabinólico que genera THC incrementando su concentración y biodisponibilidad en el organismo (Grotenhermen, 2003; Rella, 2015). Otra razón por la que los individuos refieren efectos más rápidos se debe a que la absorción y biodisponibilidad de THC cuando se consumen productos o alimentos cannábicos por ingesta es más lenta y menor que cuando se fuma la marihuana (Huestis, 2005). Teniendo esto en consideración, es entendible que muchos individuos que la consumen con fines medicinales, prefieren fumarla (Moir *et al.*, 2008).

Diferentes concentraciones de THC pueden encontrarse en el organismo después del consumo de marihuana por inhalación, en la Tabla 1 se encuentran algunas determinaciones de THC en diferentes fluidos corporales y a diferentes tiempos después de la inhalación del HM.

Tabla 1. Concentraciones de THC en fluidos biológicos después de la inhalación de humo de marihuana.

Autores	Muestra	Determinación THC (ng/ml)
Rotolo <i>et al.</i> , 2019	Lavado bronquioalveolar de paciente con enfermedad pulmonar, fumó cannabis catorce días previos	0.9
	Lavado bronquioalveolar de paciente con enfermedad pulmonar, fumó cannabis dos días previos	25.4
Meier <i>et al.</i> , 2018	Sangre de voluntario sin previo consumo, después de fumar un cigarrillo	2.7
	Sangre de fumador crónico después de fumar un cigarrillo	4.5
Pacifici <i>et al.</i> , 2020	Sangre de voluntarios sanos, después de fumar un cigarrillo de “cannabis ligera” (0.16% THC)	7.0
	Sangre, después de fumar cuatro cigarrillos de “cannabis ligera”	14.1
	Fluido oral, después de fumar cuatro cigarrillos de “cannabis ligera”	11.2
Chu <i>et al.</i> , 2021	Sangre de individuos muertos sospechosos de haber consumido cannabis toma al ingreso a la morgue	13.7

Aunque estos valores se acercan, en cierto grado, a la concentración a la que el epitelio respiratorio se expone al inhalar humo de marihuana, ésta podría ser mayor. Se considera que las vías respiratorias profundas se exponen a concentraciones de humo de marihuana hasta 10 veces superiores a las determinadas en el organismo (Bailey *et al.*, 2019).

1.1.3 Humo de marihuana

1.1.3.1 Composición química del humo de marihuana

Más de 2,000 compuestos son producidos durante la pirolisis de la marihuana, entre ellos se encuentran algunos carcinógenos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH, por sus siglas en inglés) (Graves *et al.*, 2020). Se ha determinado que, de manera cualitativa, las características físicas del material particulado del humo de marihuana (HM) son muy similares a las del humo de tabaco (HT), aunque hay algunas diferencias cuantitativas respecto a masa, tamaño de partículas y composición química; sin embargo, comparten compuestos (ver Tabla 2) que son producto de la combustión de material orgánico y varios de éstos representan riesgo a la salud (Graves *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2012).

Dentro de los compuestos que conforman el HM podemos encontrar bajos niveles de diversos metales, derivados del nitrógeno (amoníaco, óxidos de nitrógeno, cianuro de hidrógeno y aminas aromáticas), carbonilos (acetaldehído, acetona y acroleína), compuesto fenólicos, (fenol, catecol e hidroquinona), y PAH (naftaleno, antraceno y benzo(a)pireno), entre otros (Graves *et al.*, 2020; Moir *et al.*, 2008).

La composición química del HM dependerá en gran medida de la composición química de la planta y ésta a su vez depende de las condiciones en las que fue cultivada, por ejemplo, la fertilización con nitrogenados que puede elevar la cantidad de amoníaco y óxidos de nitrógeno (Moir *et al.*, 2008).

Tabla 2. Comparación de compuestos detectados en humo de tabaco y marihuana

Compuesto	Humo de tabaco	Humo de marihuana
Alquitran (mg/cig)	38.2 ± 2.2	37.4 ± 4.5
NO (µg/cig)	65.7 ± 8.9	296 ± 33
CO (mg/cig)	20.8 ± 1.9	13.4 ± 1.6
Nicotina (mg/cig)	2.44 ± 0.18	0.005 ± 0.011
Amoniaco (µg/cig)	35.5 ± 2.4	720 ± 84
Mercurio (ng/cig)	3.17 ± 0.32	<1.10
Cadmio (ng/cig)	145 ± 8	6.91 ± 1.34
Plomo (ng/cig)	21.1 ± 1.1	3.85 - 12.8
Arsénico (ng/cig)	5.49 ± 0.33	1.13 – 3.75
Piridina (µg/cig)	31.1 ± 1.7	34.6 ± 4.3
Benceno (µg/cig)	62.2 ± 3.5	58.3 ± 5.9
Tolueno (µg/cig)	103 ± 6	124 ± 15
3-aminobifenilo (ng/cig)	2.22 ± 0.18	9.15 ± 0.63
1-aminonaftaleno (ng/cig)	24.9 ± 2.6	84.4 ± 13.2
Formaldehído (µg/cig)	200 ± 28	25.1 ± 2.7
Acetaldehído (µg/cig)	872 ± 101	448 ± 44
Acetona (µg/cig)	454 ± 44	237 ± 23
Acroleína (µg/cig)	125 ± 13	54.3 ± 4.5
Hidroquinona (µg/cig)	153 ± 12	30.1 ± 2.9
Fenol (µg/cig)	137 ± 11	91.5 ± 10.5
Antraceno (ng/cig)	91.8 ± 5.4	70.9 ± 6.7
Benzo(a)pireno (ng/cig)	14.3 ± 1.2	8.67 ± 1.12

En la tabla se muestran parte de los resultados del estudio conducido por Moir *et al.*, (2008). Cig, cigarrillo.

1.1.3.2 Efectos en la salud asociados a la exposición al humo de marihuana

Ya que al inhalar HM los tejidos del aparato respiratorio representan la primera región de exposición, es el aparato principal donde se lleva a cabo la absorción de

los compuestos activos y en donde se esperan las primeras alteraciones; a pesar de ello, la información relacionada con los efectos del HM sobre las vías respiratorias es limitada y controversial, particularmente en lo referente a estudios epidemiológicos (Hancox & Sears, 2019; Owen *et al.*, 2014). La exposición a HM también afecta al sistema inmunológico perjudicando la inmunidad mediada por células, activación de macrófagos y la liberación de citocinas; al sistema neurológico causando cambios en el comportamiento y emocionales, deterioro del desempeño psicomotor; al sistema cardiovascular originando taquicardia e hipotensión postural; el sistema reproductivo se ha visto afectado por reducción en conteo de espermatozoides y alteración de la ovulación (Brents, 2016; Carvalho *et al.*, 2020; Owen *et al.*, 2014; Pacher *et al.*, 2018; Volkow *et al.*, 2014).

1.2 Aparato respiratorio

1.2.1 Anatomía y fisiología del aparato respiratorio

El aparato respiratorio se encarga del intercambio gaseoso que consiste en la captación de O₂ y la eliminación de CO₂; su disfunción altera la homeostasis, conduce a hipoxia o anoxia y acumulación de productos de desecho que, finalmente, pueden conducir a la muerte. El aparato respiratorio también participa en la regulación del pH sanguíneo, la presión arterial y el calor corporal. Tiene una amplia superficie de contacto entre el medio externo y los capilares sanguíneos. Este aparato se divide en zona de conducción y zona de respiración donde finalmente sucede dicho intercambio (Tortora & Derrickson, 2006).

Las vías respiratorias de conducción tienen una estructura bifurcada con prolongaciones sucesivas de vías que se duplican y disminuyen progresivamente en su diámetro interno. Estas divisiones aumentan el área superficial total del epitelio de las vías respiratorias y el diámetro transversal acumulativo de las mismas, causando un flujo de aire más lento o nulo en las vías distales. Esta disminución del flujo de aire favorece la colección de gases y partículas por difusión radial o sedimentación en las paredes de las vías, por difusión radial o sedimentación y, por lo tanto, aumenta la susceptibilidad al daño por la exposición a contaminantes ambientales (Leikauf, 2021).

La zona de intercambio gaseoso consiste en bronquiolos terminales, bronquiolos respiratorios, ductos alveolares, alveolos, vasos sanguíneos e intersticio pulmonar. La región alveolar es de interés para el estudio de los efectos producidos por gases, aerosoles y partículas. El epitelio alveolar se compone de células (neumocitos) tipo I y tipo II. Las primeras constituyen aproximadamente el 95% de la superficie alveolar formando con el endotelio y la membrana basal, una capa de tejido delgada ($0.2 \mu\text{m}$) que permite el intercambio gaseoso $\text{O}_2\text{-CO}_2$, ejemplificado en la Figura 1 (Barosova *et al.*, 2021; Leikauf, 2021).

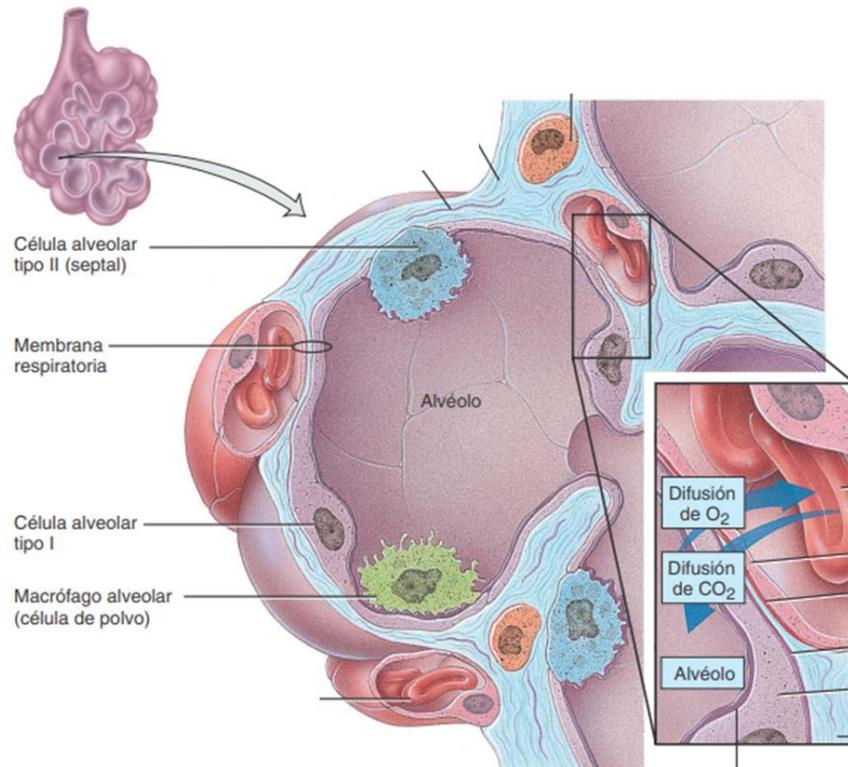


Figura 1. Componentes estructurales del alveolo

En la Figura se muestran de manera gráfica los tipos celulares que componen el alveolo. Modificado de Tortora & Derrickson (2006)

Los neumocitos tipo II son responsables de la producción del surfactante pulmonar, sustancia que permite que la región alveolar no colapse durante la ventilación y la protege inmunológicamente; además, esta estirpe celular participa activamente en la biotransformación de compuestos, pues contiene enzimas metabólicas de fase 1 y 2. Estos neumocitos también pueden dar origen a células tipo I cuando éstas sufren daño. Además de epitelio, en los alveolos se encuentran macrófagos

residentes que representan la primera línea de defensa inmunológica de este tejido y ejercen el papel de centinelas de daño por la presencia de agentes extraños en el epitelio (Leikauf, 2021).

1.3 Inflamación

1.3.1 Respuesta inflamatoria y resolución

La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa natural del organismo ante la presencia de estímulos dañinos como microorganismos patógenos, sustancias irritantes y células dañadas, para removerlos e iniciar un proceso curativo denominado resolución de la inflamación (Abbas *et al.*, 2018). La inflamación se clasifica en aguda y crónica, siendo la primera generalmente un proceso benéfico para el organismo que se desarrolla rápidamente, de minutos a horas, y puede mantenerse por algunos días. (Abbas *et al.*, 2018; Aghasafari *et al.*, 2019).

La inflamación crónica, por otra parte, deriva de una respuesta inflamatoria aguda y sucede cuando el estímulo no ha sido eliminado, el daño en tejido se ha extendido o hay una estimulación constante; las células inmunes en circulación amplifican la respuesta inflamatoria liberando moléculas proinflamatorias y pueden llegar a destruir tejido sano. En general, la mayoría de los mecanismos inflamatorios surgen por la activación de receptores que son sensibles a patrones moleculares asociados a daño a patógenos o asociados a daño celular (PAMPs y DAMPs, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Abbas *et al.*, 2018; Aghasafari *et al.*, 2019).

Entre los PAMPs se destaca el lipopolisacárido (LPS) que es el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. Es una de las moléculas inmunomoduladoras mejor estudiadas, reconocida y usada como un estímulo proinflamatorio, pues el reconocimiento de esta molécula ocasiona la expresión de citocinas proinflamatorias (Liu *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2008).

Por su parte de entre los DAMPs se encuentran el ATP, el DNA de doble cadena, el citocromo C, entre otras moléculas que únicamente son liberadas al espacio extracelular cuando las células han sufrido daño (Zindel & Kubes, 2020).

Los receptores sensibles a PAMPs y DAMPs están presentes principalmente en células del sistema inmunológico: macrófagos residentes de tejido, células dendríticas y mastocitos (centinelas de daño); sin embargo, otros tipos de células, por ejemplo, las endoteliales y algunas epiteliales que conforman las barreras físicas de defensa, también cuentan con algunos de estos receptores. Una vez activados, a través de transducción de señales, son activados diferentes factores de transcripción (como NF- κ B), que favorecen la expresión transcripcional de moduladores solubles de la respuesta inflamatoria, principalmente de citocinas proinflamatorias (Abbas *et al.*, 2018; Aghasafari *et al.*, 2019). Éstas tienen mayoritariamente acciones paracrinas y autocrinas, aunque bajo situaciones severas pueden producirse cantidades que permitan su entrada a la circulación y ejercer una acción endocrina (Abbas *et al.*, 2018; Aghasafari *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2011).

Al ser secretadas, las citocinas son reconocidas por sus receptores específicos ocasionando la generación de segundos mensajeros intracelulares que, mediante regulación transcripcional, influyen en diversos procesos como el reclutamiento de células, la secreción de proteínas, el incremento de actividad de enzimas de la respuesta inflamatoria, la dilatación vascular, la adhesión de leucocitos al revestimiento endotelial, así como el incremento en la permeabilidad de capilares y vénulas, todo formando el proceso inflamatorio (Abbas *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2011).

La activación de enzimas involucradas en la respuesta inflamatoria es un paso crucial en el inicio de este proceso, ya que muchas de éstas son necesarias para la síntesis de agentes nocivos para la eliminación de los estímulos dañinos y la síntesis o activación de quimioatrayentes que se necesitan *de novo* (Abbas *et al.*, 2018). Algunas de estas enzimas son ciclooxigenasas, óxido nítrico sintetasas (NOS), NADPH oxidasas y de manera particular, la mieloperoxidasa (MPO), en monocitos, macrófagos y neutrófilos. La MPO participa en la defensa del huésped al catalizar la formación de intermediarios reactivos de oxígeno, agentes halogenantes y nitrantes reactivos, incluyendo el ácido hipocloroso (HClO), que permiten a las

células principalmente para eliminar microorganismos patógenos y restos de tejido o células dañadas (Abbas *et al.*, 2018; Aratani, 2018; Feehan & Gilroy, 2019).

Debido a que durante la respuesta inflamatoria se causan daños en el tejido donde se lleva a cabo el proceso, es necesario que se inicie su resolución de manera óptima para apagar la inflamación. Este es un proceso activo y con una secuencia de eventos coordinados por diferentes mediadores que regulan acciones celulares necesarias para movilizar o eliminar células inflamatorias, inhibir la síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, iniciar el catabolismo de los mediadores inflamatorios que se encuentran en el sitio de infección o daño, así como generar precursores de reparación tisular, lo que al final permitirá restaurar la homeostasis del tejido (Abbas *et al.*, 2018; Feehan & Gilroy, 2019).

El proceso antiinflamatorio o la resolución inicia cuando el estímulo dañino ha sido eliminado, es necesario que éste inicie para evitar una respuesta inflamatoria exacerbada y prevenir el desarrollo de una enfermedad crónica (Feehan & Gilroy, 2019). Durante el proceso de resolución también es necesaria la activación de enzimas (diferentes a las que participan en el proceso proinflamatorio) para la síntesis de mediadores antiinflamatorios (Panigrahy *et al.*, 2021).

Dentro de las enzimas que participan en este proceso podemos encontrar a diferentes lipooxigenasas que producen moduladores lipídicos y a la arginasa que, al metabolizar la arginina, produce ornitina que es un precursor de la producción de poliaminas (esenciales en la regulación de la proliferación celular y diferenciación) y prolina (un constituyente de la colágeno, que participa en el proceso de cicatrización), Además, la activación de la arginasa representa la inhibición de su contraparte inflamatoria (la NOS) por competir por el mismo sustrato (Panigrahy *et al.*, 2021; Rodriguez *et al.*, 2017).

Mientras que la respuesta inflamatoria aguda es rápida, su resolución tarda horas en iniciarse y días en llevarse a término, por lo que en pocas horas aún es posible observar daño tisular en caso de haberse iniciado un proceso inflamatorio (Abbas *et al.*, 2018; Feehan & Gilroy, 2019).

1.3.2 Interleucinas

Las citocinas son un grupo grande de mediadores proteicos que constituyen una red compleja, interconectada y flexible. Pueden ser producidas por todas las células nucleadas y son clasificadas generalmente de acuerdo con las células que las secretan, su función biológica, la homología en su secuencia o la similitud en sus receptores (Abbas *et al.*, 2018; Akdis *et al.*, 2011).

Entre las citocinas se encuentran las interleucinas (IL), que representan un grupo multifuncional de inmunomoduladores que recibieron su nombre porque al momento de su descubrimiento se determinó que participaban en el *cross-talk* o comunicación entre leucocitos; sin embargo, estas son secretadas por todas las células nucleadas y modulan diferentes acciones como la proliferación, diferenciación, crecimiento, supervivencia, activación e inhibición de funciones de las células inmunes (Akdis *et al.*, 2011; Fietta *et al.*, 2014; Musolino *et al.*, 2017).

Debido al rol crucial en la regulación de la inflamación y respuesta inmune, las IL son conocidas por estar involucradas en la patogénesis de enfermedades inflamatorias (Akdis *et al.*, 2011; Fietta *et al.*, 2014). Diferentes estímulos originan la producción y secreción de distintas IL. Comúnmente las IL se secretan en grupo junto a otras citocinas y dependiendo de la forma en que se combinan, pueden originar diferentes tipos de respuestas inflamatorias. Actualmente se conocen las funciones de la mayoría de las IL (Fietta *et al.*, 2014); dentro de la tabla 1 se destaca información sobre algunas interleucinas y su función.

Debido a su participación en ciertos procesos que pueden favorecer o suprimir la inflamación, es que las IL pueden clasificarse en pro- o antiinflamatorias y aunque su secreción no regula únicamente el proceso inflamatorio (como se describió anteriormente), en la práctica clínica se miden a las IL como marcadores de inflamación o para evaluar la progresión de procesos inflamatorios (Abbas *et al.*, 2018; Akdis *et al.*, 2011). Actualmente se considera que los mediadores de todas las respuestas inmunes, inflamatorias y de resolución (incluidas las IL), se secretan en un equilibrio dinámico (niveles basales) que permite que el sistema inmune esté

listo para responder ante los estímulos que identifique (Eberl, 2016; Jarczak & Nierhaus, 2022).

Tabla 3. Características de las interleucinas

Interleucina	Estructura y peso molecular	Funciones biológicas
Interleucinas proinflamatorias		
IL-1β	IL-1 α : heterodímero 17kd	Inducción de proteínas proinflamatorias y hematopoyesis Pirógeno endógeno Activación de enzimas proinflamatorias
	IL-1 β : heterodímero 17kd	
IL-6	Homodímero 19-26kd	Activación y reclutamiento de leucocitos. En hígado: síntesis de proteínas de fase aguda
IL-8	Homodímero 16kd	Quimioatrayente de neutrófilos, células NK, células, basófilos, eosinófilos. Angiogénesis, movilización de células hematopoyéticas
Interleucinas antiinflamatorias		
IL-1ra	Heterodímero 16.1-20kd	Antagonismo de IL-1 β , inhibición de la respuesta a IL-1 β
IL-4	Monómero 15kd	Inducción de la diferenciación a T _H 2, cambio de clase IgE, supresión del desarrollo de respuesta inflamatoria T _H 1
IL-10	Homodímero 18.6kd	Supresión de la respuesta inmune, inhibición de la activación de macrófagos y secreción de citocinas Activación de enzimas de la resolución

Fuente: (Abbas *et al.*, 2018; Akdis *et al.*, 2011; Aratani, 2018; Musolino *et al.*, 2017; Rodriguez *et al.*, 2017)

Dependiendo del estímulo, la respuesta del sistema inmune será distinta y los mediadores son secretados con un perfil diferente al basal, esto para permitir que el sistema ejecute las acciones necesarias para eliminar al estímulo dañino y/o proteger al tejido afectado (Eberl, 2016).

1.3.3 Inflamación en vías respiratorias

Un balance de mediadores inflamatorios permite la correcta función de los pulmones, la perturbación de este microambiente en el tejido pulmonar puede ocurrir por diferentes factores como la presencia de enfermedad, hábitos, estrés,

cambios estacionales y la contaminación en el ambiente por agentes químicos o biológicos (Aghasafari *et al.*, 2019; Flood-Garibay *et al.*, 2019). Esto puede originar dos escenarios distintos: el primero se caracteriza por inflamación y una hiperreactividad del sistema inmune de manera local. El asma, las reacciones alérgicas, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y la transformación celular son padecimientos que suceden a la inflamación cuando el equilibrio inicial no se recupera (Aghasafari *et al.*, 2019; Albright & Goldstein, 1996; Flood-Garibay *et al.*, 2019).

En el segundo escenario se produce una inmunosupresión o inhibición de la respuesta inflamatoria; la no reactividad del sistema inmune en las vías respiratorias puede producir un aumento en la susceptibilidad del tejido a infecciones bacterianas y daño por contaminantes ambientales, así como también favorece los procesos de transformación celular (Albright & Goldstein, 1996; Flood-Garibay *et al.*, 2019).

1.4 Antecedentes

La exposición al HT es una de las principales causas de desarrollo o progresión de enfermedades crónicas asociadas a la inflamación o alteración de la respuesta inmunológica en vías respiratorias como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y cáncer de pulmón (Claire *et al.*, 2020). En diferentes estudios que emplean líneas celulares o cultivos primarios *in vitro*, contemplando monocultivos y co-cultivos, se ha descrito que el HT tiene la capacidad de aumentar la secreción de IL inflamatorias, así como de modificar los niveles y activación de proteínas relacionadas con la respuesta inmune (Holownia *et al.*, 2015, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Tomando en cuenta la similitud en la composición química del HT y el HM (Graves *et al.*, 2020; Moir *et al.*, 2008), es posible que los efectos tóxicos de ambos sean similares.

Por otra parte, la información epidemiológica relacionada con los efectos del HM sobre las vías respiratorias es limitada y controversial. Múltiples estudios indican que fumar marihuana puede inducir el desarrollo de síntomas inflamatorios en vías respiratorias, bronquitis crónica e incrementar la gravedad del asma. Aunque la evidencia de asociación de esta exposición con EPOC y el decremento de la función pulmonar es insuficiente, este tipo de asociaciones son difíciles de evaluar pues los usuarios consumen otros productos como el tabaco (Hancox & Sears, 2019; Owen *et al.*, 2014).

Debido a que los estudios epidemiológicos no son concluyentes, se opta por obtener información a partir de otro tipo de estudios. Una de estas estrategias es el empleo de los estudios *in vitro*, que permiten investigar mecanismos de daño y es por esto por lo que se utilizan para conocer la participación de cualquier xenobiótico en la iniciación y desarrollo de diferentes patologías. Entre las herramientas comúnmente utilizadas para la evaluación de mecanismos de daño producidos por humo, el uso de extractos o condensados de humo ofrece una alternativa (Rennard, 2004).

La composición química del humo en su estado original no es la misma que la de un extracto; sin embargo, las células *in vivo* únicamente están expuestas a compuestos del humo que son solubles y extraídos en los fluidos biológicos. Por

esto los estudios *in vitro* y aquellos que usan algún tipo de extracto de humo son herramientas útiles en la investigación de los efectos toxicológicos que resultan de la exposición al humo (Rennard, 2004).

En la literatura se cuenta con estudios *in vitro* que investigan los mecanismos de daño inducidos por la exposición a HM. En epitelio pulmonar murino se identificaron cambios en la expresión de genes relacionados con inflamación inducidos por la exposición a un condensado de HM en concentraciones 2.5-10 µg/ml por 6 h. Los efectos fueron más potentes que los inducidos por la exposición a un condensado de HT en concentraciones 25-90 µg/ml por 6 h (Maertens *et al.*, 2013). En células Calu-3 (derivadas de adenocarcinoma pulmonar humano) se determinó que la exposición a un 10% de un extracto de HM en medio de cultivo por 24 h, elevó significativamente la IL-8, además de modificar la expresión de otras citocinas (Huff *et al.*, 2020).

El HM puede alterar negativamente a las células inmunitarias, como es el caso de macrófagos alveolares de primates no humanos expuestos al humo de 1 cigarrillo de marihuana al día, 7 días a la semana por 1 año o al humo de 2 cigarrillos de marihuana por semana por 1 año que mostraron cambios morfológicos y alteraciones en la expresión de proteínas (Cabral *et al.*, 1991). También, los macrófagos alveolares de humanos fumadores de marihuana que consumían 27.2 ± 22.9 porros/semana, mostraron una disminución en la actividad antimicrobiana por disminución en la habilidad de producir óxido nítrico (Roth *et al.*, 2004). Huber *et al.*, (1975) demostraron que la exposición a diferentes concentraciones del HM (equivalentes a un rango de 44 a 176 µg/ml de THC) alteraron la actividad bactericida de macrófagos alveolares de ratas, al reducir su capacidad fagocítica.

En macrófagos peritoneales murinos *in vitro* se observó que el tratamiento con 0.01-1 µM de Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THCV) por 18 h reduce la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) e IL-1 β inducidas por LPS (Romano *et al.*, 2016); mientras que la exposición de fibroblastos a un extracto de HM (a concentraciones equivalentes a 0.18 y 0.45 µM de THC) por 24 h induce la expresión de COX-2 (Aloufi *et al.*, 2022).

En general se considera que los cannabinoides tienen acciones inmunomoduladoras y son dependientes de los receptores CB1 y CB2, ambos se expresan en el sistema inmune, aunque mayormente los CB2; dentro de sus acciones se ha determinado que el THC afecta la liberación de citocinas e incrementa la secreción de IL-1 (Owen *et al.*, 2014).

Los modelos para estudiar toxicidad en vías respiratorias son muy variados, entre estos destaca el uso de líneas celulares y particularmente el uso de la línea A549 proveniente de carcinoma pulmonar. Éstas son células que presentan características similares a las células epiteliales alveolares tipo II; las células A549 son comúnmente utilizadas para la evaluación de citotoxicidad, estrés oxidante y respuesta inflamatoria de la región alveolar (Roggen *et al.*, 2006).

Comúnmente la línea A549 ha sido utilizada como monocultivo para las diferentes evaluaciones; sin embargo, en la actualidad se considera que añadir otros tipos celulares al modelo puede representar con mejor aproximación las interacciones de xenobióticos en las vías respiratorias (Arezki *et al.*, 2021). Básicamente porque dicho tejido no está compuesto por un solo tipo celular. Por su parte, los co-cultivos intentan, combinando distintos tipos celulares, asemejar de manera más cercana las interacciones que ocurren en tejido *in vivo* (Arezki *et al.*, 2021).

Otro de los componentes de la región alveolar son los macrófagos. Específicamente para el estudio *in vitro* de este tipo de células, la línea celular THP-1 es ampliamente utilizada; las células THP-1 provienen de leucemia monocítica, presentan características de monocitos y pueden ser diferenciadas a macrófagos, por lo que son usadas en estudios para evaluar funciones, mecanismos y vías de señalización de monocitos y macrófagos (Chanput *et al.*, 2014).

Ambas líneas celulares (A549 y THP-1) ya han sido utilizadas previamente como modelo de co-cultivo con el propósito de aproximarse a la constitución de la región alveolar (Arezki *et al.*, 2021; Dekali *et al.*, 2013; Holownia *et al.*, 2015; Kasurinen *et al.*, 2018). Hasta ahora no se ha utilizado este modelo de co-cultivo en la evaluación *in vitro* de la respuesta inflamatoria de la región alveolar en exposiciones a HM. Por lo que en este estudio se plantea investigar la respuesta celular del co-cultivo y

compararla con la de un monocultivo de A549, evaluando la respuesta inflamatoria entre ellos, en específico su efecto sobre el perfil de interleucinas y la actividad de enzimas de la respuesta inflamatoria.

1.5 Justificación

La marihuana es una droga recreacional ampliamente consumida, su legalidad varía en diferentes países. Se consume principalmente fumándola, lo que produce compuestos que son dañinos a la salud. Los compuestos cannabinoides son de interés pues afectan al sistema inmunológico; sin embargo, estos efectos no han sido descritos a profundidad. La información epidemiológica no es concluyente respecto a la toxicidad del HM sobre el tejido respiratorio y la modificación de la respuesta inflamatoria. Por lo que se opta por estudios *in vitro*, entre ellos cultivos de células de la región alveolar. A su vez los extractos de HM, son considerados una buena herramienta, pues contienen constituyentes de dicho humo que afectan a las células.

Aún se desconocen muchos aspectos de la respuesta inflamatoria ocasionada en el tejido respiratorio por exposición al HM. Consecuentemente, es de interés evaluar el efecto de un EHM en dos modelos celulares: un monocultivo de células A549 y un co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1. Para ello, se propone evaluar la secreción de interleucinas participantes en procesos inflamatorios y también enzimas que participan en los procesos de inflamación y resolución, teniendo así un acercamiento a la modificación del perfil inflamatorio en la región alveolar desde dos modelos descritos en la literatura.

1.6 Hipótesis

La exposición a un extracto de humo de marihuana alterará los niveles de IL y la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en dos modelos celulares de la barrera epitelial alveolar.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Evaluar la modificación en los niveles de IL y la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en dos modelos de la barrera epitelial alveolar *in vitro* (monocultivo de células A549 y co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1) expuestos a un extracto de humo de marihuana.

1.7.2 Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad de las células de ambos modelos de estudio (monocultivo de células A549; co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1), expuestos a un extracto de humo de marihuana.
- Cuantificar las IL pro- (IL-1 β , IL-6) y antiinflamatorias (IL-1ra, IL-4 e IL10) secretadas en ambos modelos de estudio, expuestos a un extracto de humo de marihuana.
- Determinar la actividad de arginasa y mieloperoxidasa en ambos modelos de estudio expuestos a un extracto de humo de marihuana.

2. Materiales y Métodos

2.1 Estrategia experimental

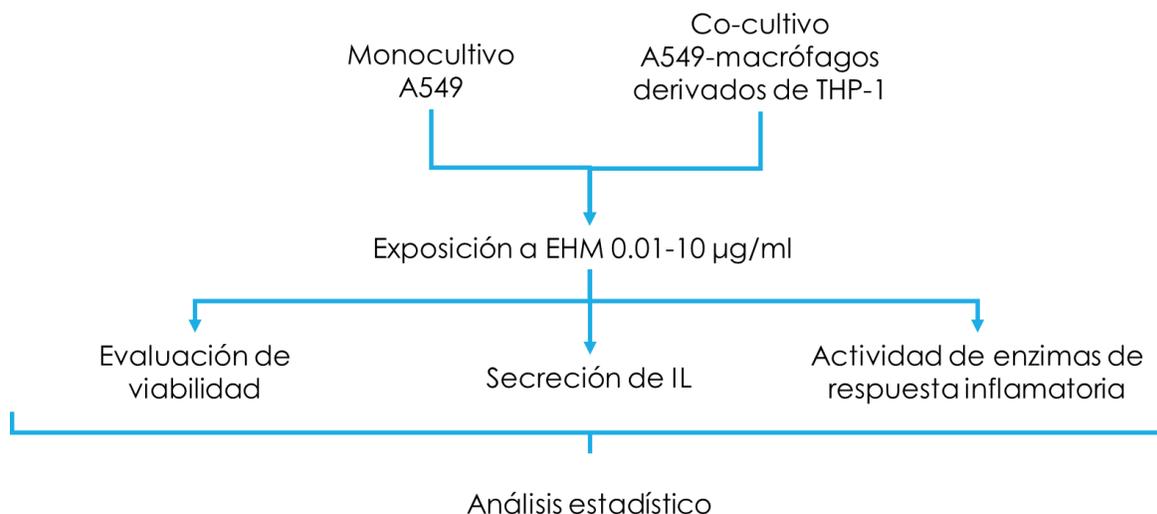


Figura 2. Diagrama de flujo del estudio experimental

Se partió de dos modelos experimentales *in vitro*: un monocultivo de células A549 y un co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1. Ambos fueron expuestos por separado a concentraciones de EHM en un rango de 0.01 a 10 µg/ml por 24 h para evaluar su viabilidad. Además, se evaluaron los niveles de IL secretadas en el medio de cultivo y la actividad de enzimas de la respuesta inflamatoria en ambos modelos expuestos a 1 µg/ml de EHM por 24 h. Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos como resultados. A continuación, se explica a detalle las metodologías que fueron seguidas para llevar a cabo dicha estrategia experimental.

2.2 Reactivos

El cloruro de sodio (NaCl) (S7653), el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido 2 etilenglicol-bis-(aminoetileter)tetraacético (EGTA) (E4378), el d, l-ditiotreitol (DDT) (D0632), el LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (L6529), el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (PMA) (P1585), el Nutrient Mixture F-12 Ham (medio de cultivo Ham's F12K) (N3520), el etanol absoluto (E7023), el dimetilsulfóxido (DMSO) (D4540), la D-(+)-glucosa (G8270), el 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)

y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (H1009) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich™ (Toluca, Edo. de México, México)

El fosfato dibásico de potasio anhidro (KH₂PO₄) (1.04873), el cloruro de potasio (KCl) (4936) y la sacarosa (7651) fueron adquiridos de Merck™ (Toluca, Edo. de México, México).

La penicilina/estreptomicina (Pen/Strep) 10,000 U/ml (15140122), el ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES) (11344-041) y la 0.25% tripsina/EDTA (25200056) fueron adquiridos de Gibco™ (Grand Island, Nueva York, Estados Unidos de América).

El suero Fetal Bovino (FBS) (S1400) fue adquirido de BioWest™ (Nuaille, Francia).

El kit Human Magentic Luminex® Assay Premixed Multiplex con número de lote L147540 fue adquirido de R&D Systems™ (McKinley Place NE, Minneapolis, Estados Unidos de América).

2.3 Cultivos celulares

La línea celular A549 muestra propiedades metabólicas y de transporte consistentes con aquellos del epitelio alveolar tipo II *in vivo*. Esta línea celular es ampliamente empleada para estudios citotóxicos, estrés oxidante y respuesta proinflamatoria con diferentes estímulos y bajo condiciones agudas las células A549 pueden producir y secretar diferentes citocinas (Barosova *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2021). Por otra parte, la línea celular THP-1 presenta características que la asemejan a linfocitos primarios, además de la habilidad de diferenciarse a macrófagos, lo que la convierte en un modelo razonable para este tipo de estudios (Chanput *et al.*, 2014).

2.3.1 Monocultivo A549

Para la evaluación de la respuesta del monocultivo de células A549 se utilizó dicha línea celular que se mantuvo en expansión en placas de cultivo p60 y p100 con el medio Ham's F12K suplementado con 10% FBS y 1% de Pen/Strep con condiciones de 37°C y 5% de CO₂ en un ambiente húmedo, realizando pases o cambios de

medio cada 3 o 4 días. Para los pases de A549 se utilizó una solución 0.25% tripsina/EDTA.

Brevemente, se lavaron con PBS los cultivos de A549, para después adicionar de 1 a 3 ml de Tripsina/EDTA e incubar a 37°C por 3 min para despegar las células de la placa de cultivo y realizar subcultivos para exponer o mantener en expansión.

Para la exposición, se sembraron las células A549 a una densidad de 78,948 células/cm² en cada pozo y se incubaron durante 24 h para permitir que formen una monocapa (Arezki *et al.*, 2021).

2.3.2 Co-cultivo A549-macrófagos derivados de THP-1

El co-cultivo de células A549 y macrófagos THP-1 ya se ha empleado anteriormente con el objetivo de predecir de mejor manera los efectos toxicológicos *in vivo* de distintos materiales a nivel alveolar, ya que el epitelio y macrófagos alveolares son los primeros blancos de contaminantes inhalados (Arezki *et al.*, 2021; Dekali *et al.*, 2013). El medio Ham's F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de Pen/Strep es adecuado para el crecimiento de las líneas celulares planteadas, con condiciones de 37°C y 5% de CO₂ en un ambiente húmedo. En el caso de línea THP-1 hay que adicionar D-(+)-glucosa y HEPES para alcanzar las concentraciones presentes en el medio RPMI 1640, que es el más adecuado para su crecimiento.

Las células fueron mantenidas en fase de expansión. La línea THP-1 en frascos T75 y T25 con el medio anteriormente planteado, realizando pases o cambios de medio cada 3 o 4 días según la confluencia del cultivo. Las células A549 se mantuvieron como se describió anteriormente en el monocultivo.

Para llevar a cabo el co-cultivo se siguió el procedimiento descrito por Arezki *et al.* (2021), con ligeras modificaciones; se sembraron células THP-1 a una densidad de 39,474 células/cm² y por 24 h se trataron con 5 ng/ml de PMA para su diferenciación a macrófagos, terminadas las 24 h se lavaron con PBS y se mantuvieron por 72 h con medio suplementado sin PMA con la finalidad de permitir el restablecimiento de la homeostasis después del estímulo proinflamatorio de PMA (Baxter *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2007). Por su parte se sembraron células A549 por 24 h permitiendo que

alcancen confluencia. Al término de las 72 h de reposo de las células THP-1, se sembraron células A549 en densidad 78,948 células/cm² sobre los macrófagos THP-1 y se incubaron durante 24 h para permitir que las células epiteliales formaran su monocapa.

Para los ensayos de viabilidad se realizaron cultivos en microplacas de 96 pozos para ser expuestas al EHM. Mientras que para los ensayos de cuantificación de IL y actividad enzimática de arginasa y mieloperoxidasa se realizaron cultivos en placas de 6 pozos. Para todas las evaluaciones se ajustó el número de células a sembrar tomando en consideración la densidad planteada y el área de superficie de cada pozo de cultivo.

2.4 Tratamientos

El EHM fue obtenido y analizado como se describe en el Anexo 1. A partir del EHM de composición conocida, se preparó una solución de concentración 10 mg EHM / ml etanol al 100% y a partir de ésta se realizó una dilución 1:10 utilizando medio Ham's F12 (suplementado FBS 1%/ antibióticos 1%) y DMSO 100%. De dicha dilución se obtuvo una solución de concentración 1 mg EHM / ml etanol 10%-DMSO 10%-Ham's F12.

Partiendo de la última solución se prepararon las distintas diluciones de trabajo a las concentraciones finales de tratamiento: 0.01, 0.1, 1 y 10 µg EHM /ml con medio Ham's F12 (suplementado con FBS 1%/antibióticos 1%).

Las concentraciones finales de THC en cada solución de tratamiento se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de THC en las concentraciones de EHM seleccionadas

Concentración EHM (µg/ml)	0.01	0.1	1.0	10.0
Concentración de THC (ng/ml)	0.0113	0.113	1.13	11.3

Las concentraciones de EHM seleccionadas contienen concentraciones de THC que, comparadas con aquellas encontradas en fluidos biológicos de fumadores de marihuana (ver Tabla 1), son entre similares y aún menores; por lo tanto, las concentraciones de EHM utilizadas en este estudio son toxicológicamente relevantes.

Para la evaluación de viabilidad MTT y tinción de cristal violeta (CVS), las células de monocultivo y co-cultivo se expusieron durante 24 h a un intervalo de concentraciones de EHM 0.01-10.0 µg/ml (Tabla 3); para los ensayos de cuantificación de IL y actividad enzimática de arginasa y mieloperoxidasa, se expusieron las células a una sola concentración de EHM 1.0 µg/ml durante 24 h después de tomar en consideración los resultados de viabilidad del monocultivo.

La estimulación con LPS ha mostrado ser eficiente para la liberación de IL proinflamatorias en células A549, mientras en macrófagos derivados de THP-1 permite su activación clásica, por lo que pueden usarse como un control de la respuesta proinflamatoria en este modelo celular (Arezki *et al.*, 2021). Las células del co-cultivo fueron expuestas a 0.01 µg/ml de LPS para caracterizar su respuesta y evaluar así la modificación en la secreción de IL. Dicha concentración ha mostrado ser suficiente para observar un efecto inflamatorio en el modelo de co-cultivo (Arezki *et al.*, 2021).

La caracterización de la respuesta inflamatoria del co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1 al estímulo conocido LPS, sirvió para validar el uso del modelo propuesto. Los resultados se encuentran descritos en el Anexo 2 de este trabajo. Brevemente, el modelo de co-cultivo mostró una respuesta congruente con la reportada en la literatura con la exposición a LPS.

2.5 Ensayo de viabilidad por MTT

2.5.1 Principio

El ensayo de MTT consiste en una prueba colorimétrica de proliferación y supervivencia celular que se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en cristales insolubles de 5-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan (formazán) de color azul por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de células viables a 37°C. Las células no viables o que están próximas a morir, presentan disfunción metabólica y no les es posible reducir el MTT. El aumento o disminución de los cristales de formazán en el cultivo están relacionados con la actividad mitocondrial de las células puestas a prueba, por lo que la cantidad de células viables se puede detectar cuantificando la concentración de formazán en el cultivo, a través de la medición de densidad óptica una vez solubilizados los cristales de formazán (Kamiloglu *et al.*, 2020).

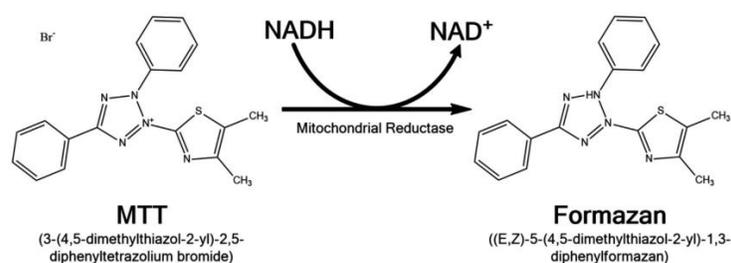


Figura 3. Reducción de MTT a formazán

En la Figura se observa de manera esquemática la reducción de MTT catalizada por una reductasa mitocondrial y la coenzima NADH, Se forma Formazán que es insoluble en el medio. Tomado de Kamiloglu *et al.*, (2020)

2.5.2 Procedimiento

Se sembraron el monocultivo y co-cultivo y expusieron a EHM en concentraciones en el rango de 0.01-10 µg/ml, bajo las condiciones descritas anteriormente. Como control de muerte celular se utilizó H₂O₂ a una concentración 100 µM por el mismo tiempo de exposición que con EHM; 2 h antes de concluir la exposición se añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml) al medio de cada pozo y al concluir el tiempo de exposición se retiró el medio y se agregaron 100 µl de DMSO para solubilizar los cristales de formazán formados, la placa se mantuvo en agitación por 20 min.

Una vez solubilizados los cristales se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm utilizando un lector de microplacas Tecan® M200 Infinite y se determinó el porcentaje de viabilidad tomando como 100% de viabilidad la absorbancia de células no tratadas con EHM (control).

2.6 Ensayo de viabilidad por CVS

2.6.1 Principio

La prueba de tinción de cristal violeta (CVS) es utilizada para la cuantificación de células vivas, se basa en la capacidad de adherencia de las células vivas, al teñir el cultivo con CVS sólo se retiene en aquellas células que permanecen adheridas en el cultivo después de lavarse. Las células muertas pierden la habilidad de adherirse, resultando en una disminución de la cantidad de CVS en el cultivo. El colorante es extraído de las células utilizando un disolvente, para su medición espectrofotométrica (Kamiloglu *et al.*, 2020).



Figura 4. Diagrama esquemático del ensayo de tinción de cristal violeta

En la Figura se muestra un diagrama de la metodología seguida para llevar a cabo el ensayo de viabilidad por CVS. Modificado de Feoktistova *et al.*, (2016)

2.6.2 Procedimiento

Se procedió a realizar el sembrado de células y tratamiento como se describió anteriormente, una vez terminado el tratamiento de EHM o H_2O_2 , se retiró el medio y lavó la placa con PBS y se eliminó el excedente, este paso se repitió 3 veces. Terminados los lavados se fijaron las células adicionando a los pozos 100 μ l de paraformaldehído al 4%, durante 20 min en agitación. Posteriormente se retiró el paraformaldehído y se añadieron 50 μ l de CVS a cada pozo y la placa se incubó a temperatura ambiente por 20 min en agitación, se removió el CVS no unido al lavar la placa 4 veces con PBS y se dejó secar al aire por completo (16-24 h). Una vez seco, se añadieron 200 μ l de ácido acético a cada pozo y se incubó por 20 min a temperatura ambiente en agitación, finalmente se realizó la lectura de absorbancia

a 570 nm con un lector de microplaca Tecan® M200 Infinite y se determinó el porcentaje de viabilidad tomando como 100% de viabilidad la absorbancia de células con vehículo.

2.7 Cuantificación de interleucinas vía ensayo multiplex de inmunofluorescencia Luminex®

2.7.1 Principio

Anticuerpos específicos para los analitos de interés están recubriendo la superficie de micropartículas magnéticas con fluoróforos integrados en proporciones establecidas para la región única de cada micropartícula. Los anticuerpos inmovilizados se unen a los analitos de interés y después de lavar sustancias no unidas, se utilizan anticuerpos biotinilados específicos para los analitos de interés y un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina que se une a los anticuerpos biotinilados. Un lavado elimina cualquier remanente de los conjugados sin unirse. Dos diodos emisores de luz (LED) espectralmente distintos iluminan las micropartículas, un LED excita el colorante en cada micropartícula para identificar la región y el segundo LED excita la ficoeritrina para medir la cantidad de analito único a la micropartícula. La muestra de cada pozo es capturada con una cámara con dispositivo de carga acoplada que tiene un conjunto de filtros para diferenciar los niveles de excitación (R&D Systems, 2021).

2.7.2 Procedimiento

Para este ensayo se utilizó el kit Human Magentic Luminex® Assay Premixed Multiplex, el cual permite la cuantificación de las interleucinas IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10.

Al terminar el tiempo de exposición, se recolectó el medio sobrenadante de los cultivos y se centrifugó a 16,000 x g durante 4 min, después se realizó una dilución 1:2 utilizando el diluyente calibrador proporcionado en el kit. Se prepararon todos los reactivos y estándares tal como se describe en la información del kit. Se añadieron 50 μ l de muestra o estándar por pozo en microplaca de 96, por inmersión se suspendieron las micropartículas y enseguida se añadieron 50 μ l de éstas a cada

pozo de la microplaca, fue cubierta con sellador de aluminio y se mantuvo en agitación suave (800 ± 50 rpm) por toda la noche en refrigeración. Terminando la incubación se utilizó un dispositivo magnético para realizar al menos 3 lavados de los pozos utilizando buffer de lavado proporcionado en el kit. Después, se añadieron 50 μ l de anticuerpos biotinilados (proporcionados en el kit) a cada pozo y se incubó por 1 h en agitación suave y a temperatura ambiente, se repitieron los lavados.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se añadieron 50 μ l del complejo estreptavidina-ficoeritrina a los pozos y se incubó por 30 min en las condiciones anteriores, se realizaron lavados y finalmente se resuspendieron las micropartículas usando 100 μ l de buffer de lavado y agitando por 2 min. La placa se leyó dentro de los primeros 90 min de finalizado el procedimiento utilizando un analizador Luminex[®] MAGPIX[®]. En las especificaciones de lectura se seleccionó la región de cada micropartícula según lo especifica el kit, 50 cuentas por región, información sobre cada muestra y el tipo de dilución que se efectuó se colectó la mediana de la intensidad de fluorescencia.

A partir de la información el equipo cuantificó las interleucinas blanco utilizando una curva logística de 5 parámetros.

2.8 Ensayo de actividad enzimática de arginasa

2.8.1 Principio

La enzima arginasa cataliza la conversión de L-arginina a L-ornitina y urea, por lo que el ensayo se basa en la determinación de la tasa de formación de urea a partir de L-arginina. Para esto se prepara una curva estándar de concentraciones crecientes de urea, que sirve para interpolar los valores obtenidos de la reacción enzimática. La urea es medida colorimétricamente aprovechando la capacidad de

formar un complejo colorido cuando reacciona con 1-fenil-1,2-propanodiona-2-oxima (ISPF) y calor (Corraliza *et al.*, 1994; Schimke, 1970).

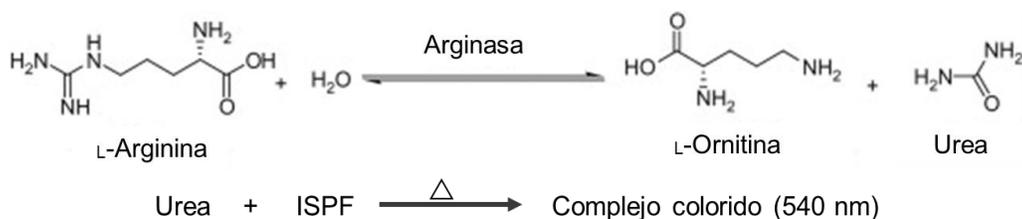


Figura 5. Reacción catalizada por arginasa y formación de complejo colorido

En la Figura se muestra la hidrólisis de L-arginina catalizada por la enzima arginasa en presencia de agua, formando L-ornitina y urea. Se muestra también la ecuación propuesta de la reacción entre urea e ISPF en presencia de calor. Modificado de Dzoyem *et al.*, (2014)

2.8.2 Procedimiento

Finalizado el tratamiento las células en placa del monocultivo o co-cultivo fueron levantadas y lisadas utilizando un *scraper* y 350 μ l de la solución amortiguadora de fraccionamiento subcelular (composición descrita en Anexo 3), el lisado celular fue pasado a través de una jeringa de insulina (31Ga) por 10 veces en un tubo Eppendorf y se centrifugó el pellet nuclear a 720 Xg por 5 min a 4°C. En el sobrenadante se encuentra la fracción citosólica, mitocondrias y membranas celulares, éste fue recolectado para evaluar la actividad enzimática. Este método de fraccionamiento subcelular fue reportado por Patten, (2018).

Se realizó una cuantificación de la cantidad proteica en cada sobrenadante por el método de Lowry. El procedimiento de ensayo de actividad de arginasa fue seguido como está planteado en Corraliza *et al.*, 1994 y adaptado a microplaca. Las muestras citosólicas fueron diluidas en una relación 1:2 utilizando PBS y para activar la enzima se calentaron las muestras en tubos Eppendorf por 10 min a 50°C, de estos se tomó 50 μ l de cada uno y se colocó uno a uno en pocillos de microplaca, a cada pozo se le adicionaron 50 μ l de L-arginina 0.5M pH 9.7. La placa se incubó durante 1 h a 37°C, al finalizar la incubación se preparó una curva estándar de urea en los pocillos de la placa. Las concentraciones de urea fueron desde 0 hasta 0.15 μ g/ μ l.

A cada pozo se añadieron 140 μ l de una mezcla de ácidos (H_2SO_4 , H_3PO_4 y H_2O 1:3:7 v/v) para detener la reacción enzimática y 10 μ l de ISPF (al 9% en etanol absoluto). La microplaca se calentó por 45 min a 100°C y se dejó enfriar por 10 min protegida de la luz. Al finalizar el tiempo de enfriamiento se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas Tecan® Infinite M200. Para calcular la concentración de urea en las muestras se construyó la curva estándar a partir de las lecturas de absorbancia de las diluciones del estándar de urea y se obtuvo la ecuación de la recta mediante regresión lineal.

A partir de la ecuación se interpolaron los valores de absorbancia de cada muestra para conocer la concentración de urea. Al final este resultado fue ajustado utilizando el valor de concentración de proteína obtenido anteriormente. Y finalmente para reportar resultados se normalizaron respecto al control, siendo el valor de 100% de actividad el determinado en las muestras de los cultivos que no fueron expuestos a EHM.

2.9 Ensayo de actividad enzimática de mieloperoxidasa

2.9.1 Principio

La mieloperoxidasa actúa como catalizador en la producción de ácido hipocloroso (HClO), a partir de iones cloruro (Cl^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El ensayo utiliza TMB como un sustrato cromogénico. La MPO cataliza la oxidación de TMB con la presencia de H_2O_2 . Así formando el producto TMB oxidado que es colorido y puede ser cuantificado al medir la absorbancia (Andrews & Krinsky, 1982; Suzuki *et al.*, 1983).

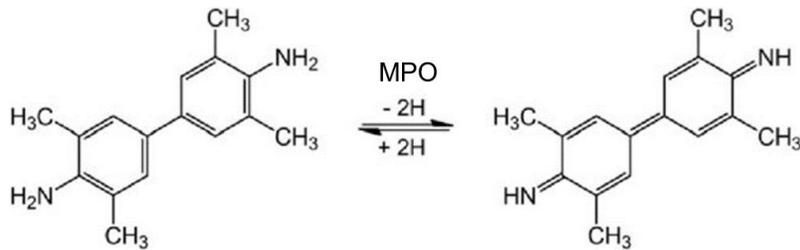


Figura 6. Oxidación de TMB por mieloperoxidasa

En la Figura se muestra la oxidación de TMB catalizada por la MPO, donde el TMB pierde 2 H lo que origina en su estructura un sistema de dobles enlaces conjugados Modificado de Nurjayadi *et al.*, (2016)

2.9.2 Procedimiento

Se siguió el cultivo, exposición y lisado de células de co-cultivo como se explica en el procedimiento de arginasa. El método utilizado es una modificación de *Suzuki et al.*, (1983). A partir de la fracción citosólica recuperada se tomaron 10 μ l de cada muestra o agua destilada y se pusieron en pozos de una microplaca. A cada pozo se agregó 90 μ l de una mezcla compuesto de 84 μ l de H₂O₂ 0.3 mM, 210 μ l de TMB 1.6 mM y 1706 μ l de PBS 0.1 M pH: 5.4. Una vez agregada la mezcla, se protegió la placa de la luz y se agitó 20 s, 3 veces. Después se incubó a 37°C por 3 min protegida de la luz.

Terminado el tiempo de incubación se leyó la placa en un lector de microplacas Tecan Infinite M200 a una longitud de onda de 590 nm. Se realizaron medidas por duplicado de cada muestra o blanco, de los valores obtenido se hizo un promedio de cada muestra y se le restó la absorbancia del blanco. La actividad de mieloperoxidasa se expresó de la siguiente manera:

$$\frac{(\text{Promedio de absorbancia de cada muestra})(200)}{3} = \text{Actividad enzimática}$$

El resultado obtenido fue normalizado respecto al control, dándole el valor de 100% de actividad a la muestra del co-cultivo que no fue tratado con EHM.

2.10 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los datos y todos resultaron tener una distribución normal. Para el análisis estadístico de los resultados de

viabilidad se utilizó la prueba ANOVA de una vía y una prueba post test de Dunnet que permite comparar múltiples grupos con el control y establecer cuales presentan diferencias estadísticamente significativas.

Para establecer una diferencia significativa entre dos grupos (control y expuesto) en los resultados de secreción de interleucinas medidas por el ensayo Luminex® se utilizó una prueba *t* de Student no pareada de una cola.

Por su parte en la comparación de múltiples grupos (monocultivos control y expuesto vs co-cultivos control y expuesto) se utilizó una prueba ANOVA de una vía y una prueba post test de Bonferroni que permite establecer diferencias significativas por la comparación de pares de grupos seleccionados para su comparación.

Para el análisis de resultados de la actividad enzimática de arginasa y mieloperoxidasa, se utilizó una prueba *t* de Student no pareada de una cola para establecer una diferencia significativa entre dos grupos (control y expuesto).

3. RESULTADOS

3.1 Respuesta de monocultivo a EHM

3.1.1 Viabilidad

En primera instancia, se evaluó si la exposición a EHM tiene la capacidad de afectar la viabilidad del monocultivo.

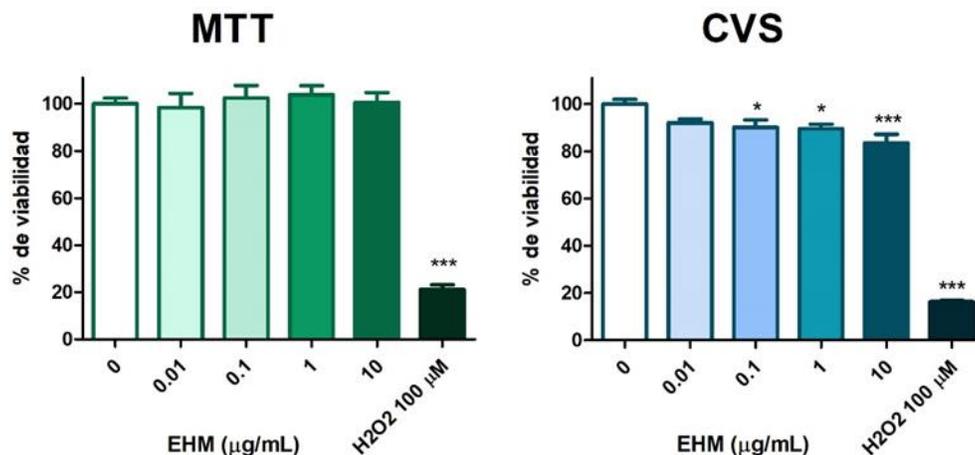


Figura 7. Viabilidad celular de monocultivo expuesto a diferentes concentraciones de EHM por 24 h, ensayos MTT y CVS.

Se presenta gráfica de datos expresados como media \pm EEM; triplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico de cada gráfica mediante ANOVA de una vía [MTT, $F(5,48) = 59.55$; $P < 0.0001$; CVS, $F(5,48) = 169.4$; $P < 0.0001$] y análisis post test de Dunnett; * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$.

En la figura 7 se presentan los resultados de la evaluación de la viabilidad celular del monocultivo después de la exposición a EHM por 24 h. Se observó que con la técnica MTT no se observa ninguna modificación en la viabilidad con ninguna de las concentraciones de EHM utilizadas y el control de muerte (H_2O_2 100 μM) si logró afectar la viabilidad celular del monocultivo de manera significativa. Por otro lado, los resultados de la técnica CVS mostraron que la exposición a las concentraciones 0.1, 1 y 10 $\mu g/ml$ de EHM disminuyó significativamente la viabilidad celular, al igual que el control de muerte utilizado. Los resultados respecto a los efectos sobre viabilidad de A549 expuestos a EHM difieren entre las técnicas utilizadas.

3.1.2 Niveles de IL

Se cuantificaron las concentraciones de IL pro- y antiinflamatorias en el medio del monocultivo expuesto a EHM por 24 h. En la Figura 8 panel A se observan los niveles de secreción de las IL proinflamatorias.

La exposición a EHM de monocultivos de A549 no modifica la secreción de IL-1 β , mientras que sí incrementa significativamente la secreción de IL-6 después de una exposición de 24 h, comparado con los niveles basales de secreción.

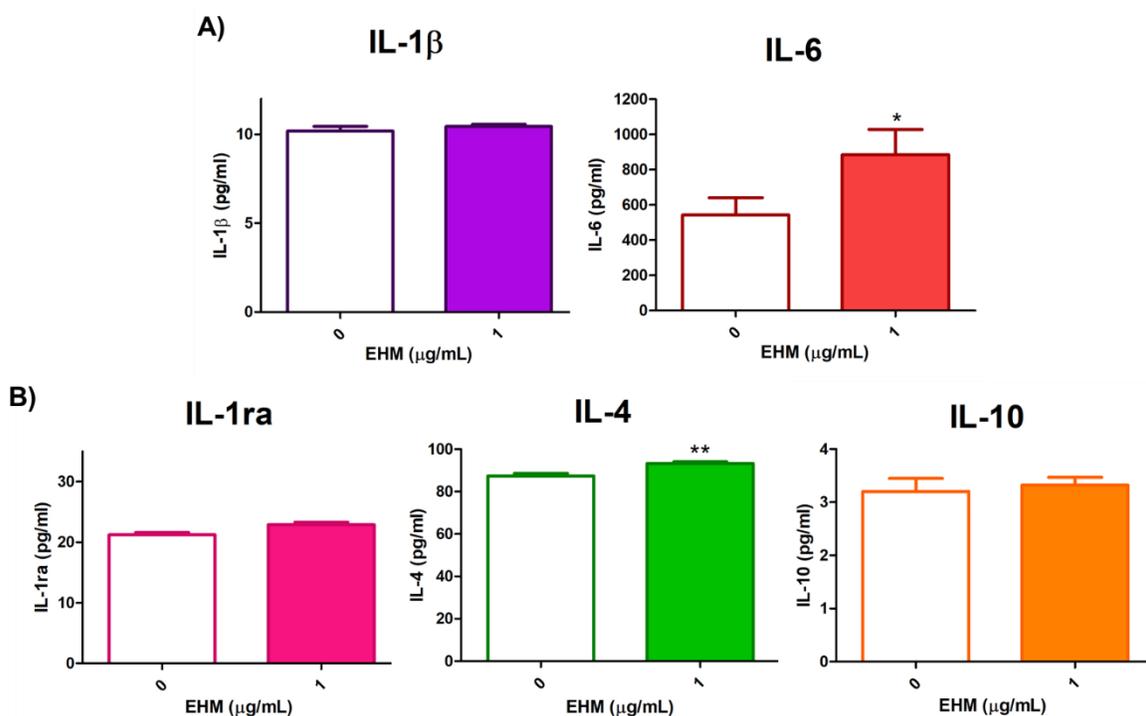


Figura 8. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas en el medio del monocultivo expuesto a EHM (1 μ g/ml) por 24 h.

Se presentan gráficas de datos expresados como media \pm EEM de duplicados de tres experimentos independientes. A) IL proinflamatorias; B) IL antiinflamatorias. Análisis estadístico de cada interleucina mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; * p <0.05, ** p <0.01.

En el panel B de la Figura 8 se observa que la exposición a EHM no modifica los niveles de IL-1ra e IL-10 secretados en el monocultivo. Por otro lado, la secreción de IL-4 tiene un ligero incremento significativo en su secreción en el monocultivo expuesto a EHM por 24 h.

3.2 Respuesta de co-cultivo a EHM

Posteriormente se realizó la exposición del co-cultivo a EHM para evaluar su respuesta celular.

3.2.1 Viabilidad

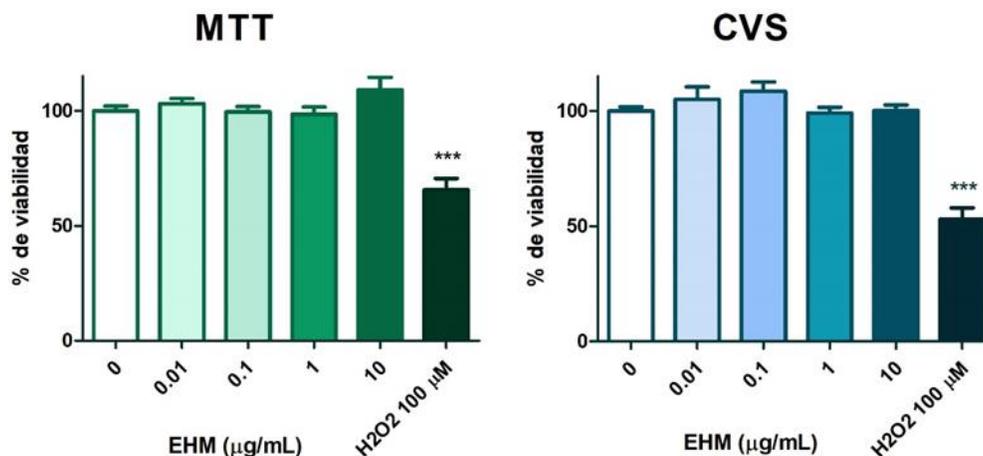


Figura 9. Viabilidad celular del co-cultivo expuesto a diferentes concentraciones de EHM por 24 h, ensayos MTT y CVS.

Se presentan gráficas de datos expresados como media \pm EEM; triplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía [MTT, $F(5,65) = 17.97$; $P < 0.0001$; CVS, $F(5,48) = 29.95$; $P < 0.0001$] y análisis post test de Dunnett; *** $p < 0.001$.

En la Figura 9 se presentan las viabilidades por dos métodos, se observó que ninguna de las concentraciones de EHM utilizadas afectó la viabilidad del co-cultivo. Por otra parte, bajo las mismas condiciones, un insulto con H₂O₂ si fue capaz de causar una disminución en la viabilidad del co-cultivo de hasta aproximadamente el 50%. Estos resultados difieren de los observados en el monocultivo.

3.2.2 Niveles de IL

También fueron analizadas las concentraciones de IL pro- y antiinflamatorias secretadas después de la exposición a EHM en el co-cultivo, obteniendo los siguientes resultados.

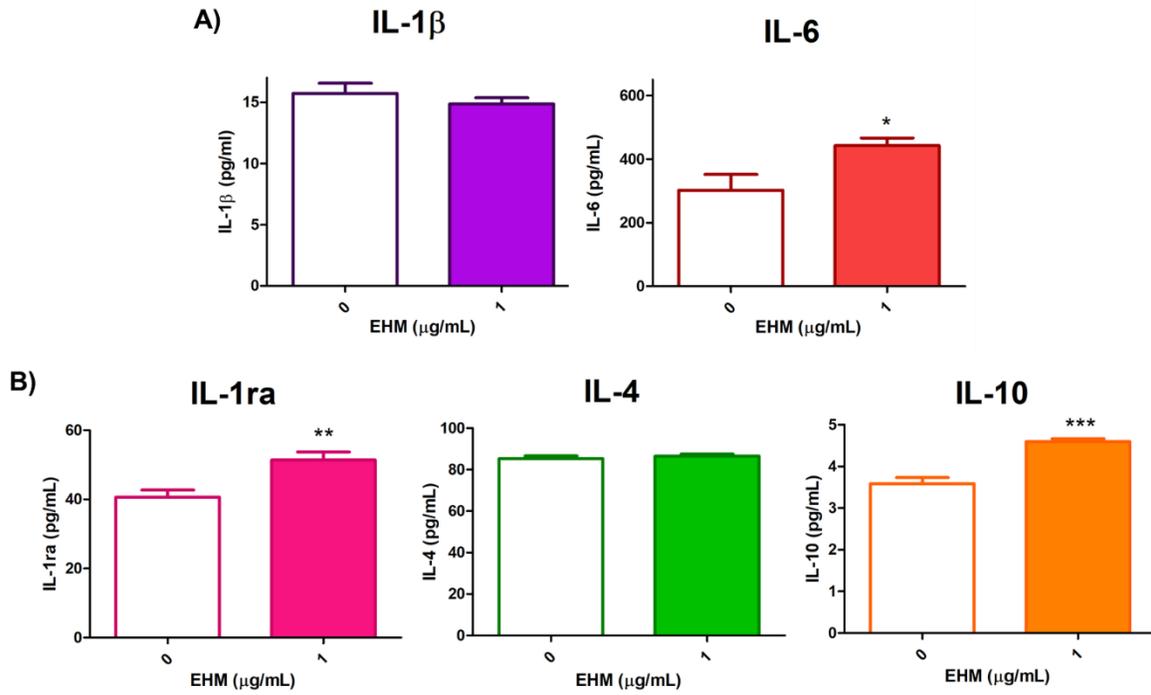


Figura 10. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas al medio del co-cultivo expuesto a EHM (1 μ g/ml) por 24 h.

Se presentan gráficas de datos expresados como media \pm EEM de duplicados de tres experimentos independientes. A) IL proinflamatorias; B) IL antiinflamatorias. Análisis estadístico de cada interleucina mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

El EHM modificó la secreción de las IL después de 24 h de exposición; en la Figura 10 panel A se presenta cómo fue alterada la secreción de IL proinflamatorias en el medio. La IL-6 tuvo un incremento significativo en su secreción después de la exposición a EHM. Por otra parte, la IL-1 β no se modificó.

En el panel B de la Figura 10 se observa que la exposición al EHM aumentó la secreción de IL-1ra y de IL-10. Mientras que la secreción de IL-4 se mantuvo sin modificación.

3.3 Comparación de respuesta del monocultivo y co-cultivo a EHM

3.3.1 Niveles de IL

Con la finalidad de mostrar la diferencia en la respuesta del perfil de secreción observado en ambos modelos después de la exposición a EHM por 24 h, se compararon las IL que modificaron su secreción tras la exposición a EHM.

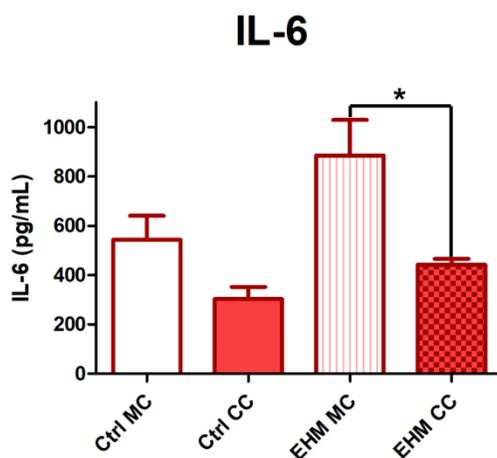


Figura 11. Comparación de secreción de IL-6 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h.

Se presenta gráfica con datos expresados como media \pm EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía [$F(3,20) = 7.436$; $P = 0.0016$] y prueba post test de Bonferroni; $*p < 0.05$.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la secreción de IL-6 en el medio del monocultivo A549 y co-cultivo A549-macrófagos derivados de THP-1 después de la exposición a EHM 1 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h.

Después, la comparar los niveles de IL-6 secretada en ambos modelos, se observa que el monocultivo tiene una mayor secreción de IL-6 que el co-cultivo cuando se exponen al mismo estímulo y esta diferencia es estadísticamente significativa.

Los resultados de la secreción de IL-1ra en monocultivo y co-cultivo se comparan en la Figura 12; la secreción basal de IL-1ra en el monocultivo se encuentra por debajo de la secreción cuantificada en el co-cultivo, esta diferencia es

estadísticamente significativa y nos indica que incluso sin estimulaciones externas la secreción de IL-1ra en el co-cultivo es mayor.

Cuando el monocultivo es expuesto a EHM por 24 h, la secreción de IL-1ra no se modifica, esto es diferente al resultado de exponer al co-cultivo a EHM donde si se ve un incremento en la secreción de esta IL. Al comparar la secreción de IL-1ra en ambos modelos expuestos se encontró que es significativamente mayor en el co-cultivo.

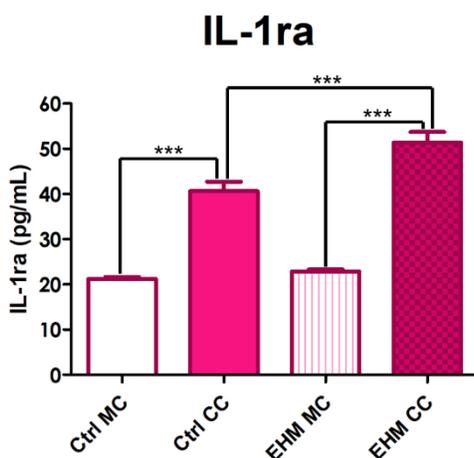


Figura 12. Comparación de secreción de IL-1ra en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h.

Se presenta gráfica con datos expresados como media ± EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía [$F(3,20) = 82.50$; $P < 0.0001$] y prueba post test de Bonferroni; $***p < 0.001$.

En la Figura 14 puede observarse la comparación de los niveles de secreción de IL-4 en ambos modelos; se observa que entre los niveles basales de secreción de ambos modelos no hay diferencias y después de la exposición a EHM tampoco. Únicamente se manifiesta una diferencia en la secreción del monocultivo tras la exposición a EHM, previamente observada.

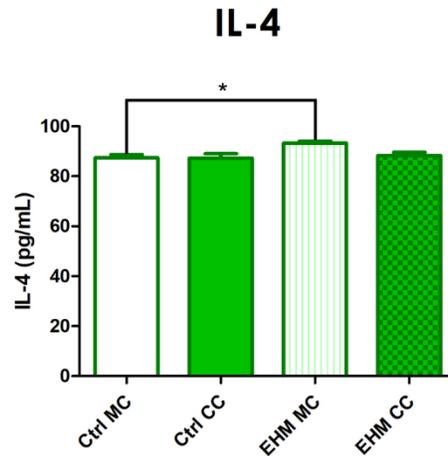


Figura 14. Comparación de secreción de IL-4 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h.

Se presenta gráfica con datos expresados como media ± EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía [$F(3,24) = 3.721$; $P = 0.0250$] y prueba post test de Bonferroni; $*p < 0.05$.

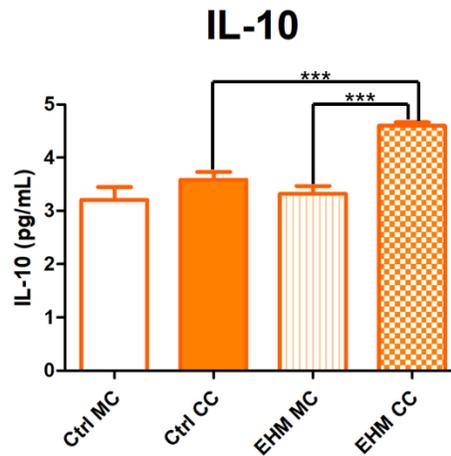


Figura 13. Comparación de secreción de IL-10 en monocultivo (MC) y co-cultivo (CC) expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h.

Se presenta gráfica con datos expresados como media ± EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía [$F(3,20) = 15.23$; $P = < 0.0001$] y prueba post test de Bonferroni; $***p < 0.001$.

Por otro lado, en la Figura 13 se comparan los resultados de la secreción de IL-10 en el monocultivo y co-cultivo expuestos a EHM por 24 h. La secreción basal de IL-10 en el monocultivo es similar a la que se determinó en el co-cultivo. Cuando el monocultivo es expuesto a EHM se observa que no hay modificación en su

secreción de IL-10, caso contrario del co-cultivo donde si vemos un incremento significativo en su secreción después de la exposición. El EHM aumenta la secreción de IL-10 en el co-cultivo, pero no en el monocultivo.

3.4 Actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en los modelos expuestos a EHM

Se evaluó el efecto de las enzimas de la respuesta inflamatoria provocada por la exposición aguda a EHM en los modelos ensayados y se comparó con los resultados de los niveles de IL descrito anteriormente.

3.4.1 Arginasa

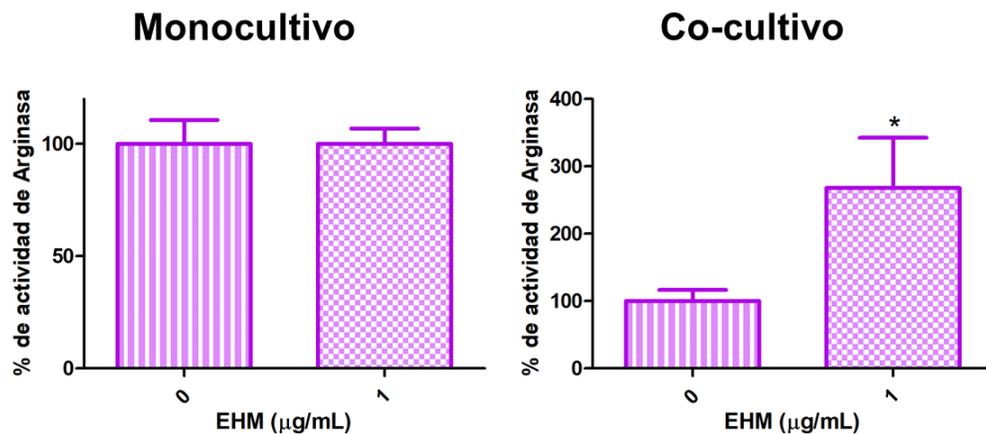


Figura 15. Actividad de arginasa en mono- y co-cultivo expuestos a EHM (1 µg/ml) por 24 h. Se presentan gráfica con datos normalizados respecto al control expresados como media ± EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; sin diferencias estadísticamente significativas.

La exposición del monocultivo a EHM (1 µg/ml) por 24 h no modificó la actividad de la arginasa comparado con la actividad del monocultivo control como se observa en la Fig. 15. En la misma Figura se observa que la misma exposición sí incrementó significativamente la actividad de arginasa en el co-cultivo.

3.4.2 Mieloperoxidasa

Además de arginasa se analizó la actividad de mieloperoxidasa en el co-cultivo, pues este modelo tiene células de estirpe mieloide que cuentan con la presencia y actividad de esta enzima proinflamatoria, a diferencia del modelo de monocultivo que sólo tiene la presencia de células epiteliales.

En la Figura 16 se muestran los resultados de la actividad de mieloperoxidasa en el co-cultivo después de la exposición a EHM (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h, se observa que la exposición disminuyó la actividad de esta enzima de manera estadísticamente significativa, comparada con la actividad basal (co-cultivo sin estimulaciones externas).

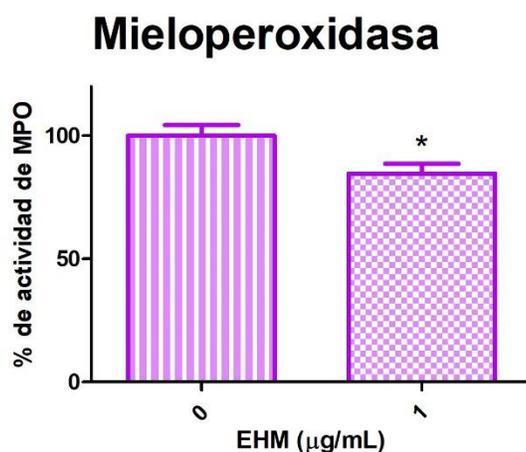


Figura 16. Actividad de la mieloperoxidasa en el co-cultivo expuesto a EHM (1 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h Se presenta gráfica con datos normalizados respecto al control expresados como media \pm EEM; duplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; * $p < 0.05$

4. DISCUSIÓN

4.1 Modificación de la viabilidad en los modelos expuestos a EHM

La viabilidad de células A549 en monocultivo se evaluó usando las técnicas de MTT y CVS; los resultados con CVS mostraron que a partir de 0.1 mg/ml de EHM se observa una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad de hasta 10%, comparada con su control. Estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura ya que la activación de CB1 y CB2 mediante el uso de agonistas en células A549 tiene efectos citotóxicos observados como baja en la viabilidad, disminución en su proliferación e incremento de apoptosis (Hu *et al.*, 2023; Preet *et al.*, 2011; Vidinsky *et al.*, 2012). Esto se puede asociar con la presencia de fitocannabinoides en el EHM (Tabla 2) que potencialmente pueden ligarse a esos receptores y provocar la disminución en la viabilidad, como se observó en el monocultivo.

Los resultados de viabilidad difirieron entre MTT y CVS ya que las técnicas están basadas en diferentes principios. Estas diferencias son esperadas, pues la técnica MTT estima la viabilidad celular a partir de una determinación de la capacidad de reducir MTT por la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Kamiloglu *et al.*, 2020); sin embargo, en la literatura se reporta que esta reducción no sólo sucede por la actividad enzimática mitocondrial, sino también por compuestos presentes en el medio (Stepanenko & Dmitrenko, 2015).

Se han descrito sub- o sobrestimaciones de la viabilidad celular utilizando esta técnica y comparando con otras técnicas que estiman la viabilidad de manera directa como el conteo de células, tinciones simples o análisis por citometría de flujo (Stepanenko & Dmitrenko, 2015).

Se ha observado que extractos de plantas pueden tener actividad reductora intrínseca y de esta manera contribuir a la reducción de MTT, afectando la estimación de la viabilidad (Bruggisser *et al.*, 2002; Stepanenko & Dmitrenko, 2015). El EHM es, finalmente, un extracto de planta y según el análisis de su composición (Tabla 3) en éste se encuentran los fitocannabinoides THC y CBG, además del sesquiterpeno guaiol, todos ellos con propiedades antioxidantes (Di

Giacomo *et al.*, 2020; Russo & Marcu, 2017). Es posible que la presencia de estos compuestos en el medio de cultivo incrementó la reducción de MTT, ocasionando una sobrestimación de la viabilidad, por lo que los resultados obtenidos pueden ser diferentes a los generados utilizando otras técnicas como CVS.

La viabilidad de las células A549 y macrófagos derivados de THP-1 en co-cultivo también fue evaluada usando las técnicas MTT y CVS, en los resultados no se observa ninguna modificación de la viabilidad con ninguna concentración. Comparando estos resultados con los del monocultivo se puede inferir una función protectora de la presencia de los macrófagos derivados de THP-1.

Un efecto protector se observa también al evaluar la respuesta a H₂O₂, ya que disminuyó más la viabilidad en el monocultivo (80%, aproximadamente), comparado con la del co-cultivo (50%, aproximadamente). Esta diferencia sugiere que los macrófagos derivados de THP-1 disminuyeron la acción citotóxica del H₂O₂ sobre las células A549.

Funciones protectoras de estas células han sido descritas por otros autores en modelos de co-cultivo y en respuesta a diferentes estímulos, estos son comparables con nuestro estudio. Jantzen *et al.*, (2012) y Kasurinen *et al.*, (2018) demostraron que la presencia de macrófagos derivados de THP-1 protege a las células A549 en co-cultivos expuestos a partículas de diesel y de combustión de madera, contra la generación de especies reactivas de oxígeno y el daño causado por oxidación, además de evitar una disminución en su proliferación.

Por su parte, Holownia *et al.*, (2015) mostraron que en la exposición a un extracto de HT, la presencia de las células THP-1 otorgaba un efecto protector a las células A549 reduciendo la citotoxicidad observada en monocultivo y restaurando parcialmente la proliferación de estas células.

El mecanismo de protección de las células THP-1 en los modelos sigue siendo motivo de estudio, aunque algunos autores refieren que los macrófagos en co-cultivo con células A549 tienen la habilidad de secuestrar iones de hierro del medio y de esta manera disminuir las reacciones oxidantes impulsadas por hierro, en

consecuencia los niveles de especies reactivas oxidantes y de esta forma disminuyen sus efecto deletéreos (Persson *et al.*, 2013)

Los resultados de viabilidad al exponer el co-cultivo a EHM, muestran que éste no es sensible a las concentraciones de EHM que tienen relevancia toxicológica. Estos resultados difirieron de los de otros autores que señalan que el modelo de co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1 tiene una elevada sensibilidad a diferentes estímulos como bacterias, nanopartículas y material particulado < 2.5 µm, comparado con monocultivos de A549 (Arezki *et al.*, 2021; Loret *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020). Sin embargo, en dichos estudios, los macrófagos derivados de THP-1 son expuestos sin un tiempo de reposo después de llevar a cabo el proceso de diferenciación con PMA en altas concentraciones (10-300 ng/ml).

Este tipo de metodologías podrían generar un sesgo en la respuesta de estas células ya que se ha descrito que al realizar la diferenciación con altas concentraciones de PMA o sin tiempo de reposo, mantienen una elevada expresión de genes relacionados con la inflamación por al menos 48 h, por lo que producen una respuesta inflamatoria exacerbada a estímulos inflamatorios débiles y es menos probable que respondan a estímulos antiinflamatorios débiles (Baxter *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2007).

La diferencia en el método de diferenciación de los monocitos pudo propiciar que los autores anteriormente mencionados obtuvieran un modelo con elevada sensibilidad a los estímulos que probaron, mientras que en nuestro estudio al utilizar el método de diferenciación estandarizado (descrito en la sección 2.3.2) se previó una respuesta exacerbada.

4.2 Modificación de la secreción de IL en los modelos expuestos a EHM

Los resultados muestran que la exposición de las células A549 en monocultivo a EHM incrementó la secreción de IL-6 e IL-4 (63 y 7%, respectivamente); por su parte, en el co-cultivo expuesto a EHM se observó una elevación de la secreción de IL-6, IL-1ra e IL-10 (46, 26 y 28% respectivamente), sin modificación en la secreción de otras IL. Esto indica que ambos modelos tienen una respuesta diferente al EHM.

El cultivo de A549 tiene una respuesta inflamatoria mientras que la del co-cultivo es antiinflamatoria. Dicha diferencia sugiere que la presencia de los macrófagos derivados de THP-1 modifica cualitativamente la respuesta inflamatoria. Es conveniente analizar si las células en el co-cultivo tienen algún tipo de comunicación que al final lleve a modificar el perfil de IL secretadas, ya que la comunicación entre estas células ha sido descrita por otros autores (Ardain *et al.*, 2020; Beckmann *et al.*, 2020; Bissonnette *et al.*, 2020).

Con base en una búsqueda bibliográfica, no se han utilizado los modelos utilizados en el presente trabajo para la evaluación de la respuesta inflamatoria en respuesta a la exposición a un extracto o al HM. Sin embargo, el modelo de co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1 ha sido usado en otros estudios para evaluar la respuesta inflamatoria de nanopartículas, en los cuales refieren que la respuesta del modelo depende del material utilizado (Arezki *et al.*, 2021; Dekali *et al.*, 2013; Hufnagel *et al.*, 2021; Loret *et al.*, 2016).

Algunos autores refieren que la respuesta inflamatoria es más diversa en el co-cultivo que en el monocultivo ya que se involucran más moduladores inflamatorios que los determinados en un monocultivo, esto debido a la presencia de células de la respuesta inmune (macrófagos derivados de THP-1) que los aportan (Jantzen *et al.*, 2012). Además, la presencia de los macrófagos en la región alveolar *in vivo* es crucial para mantener la homeostasis del sistema inmune, pues son éstas células las que producen, en mayor medida, las citocinas antiinflamatorias (Ardain *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2017) y existe una comunicación bilateral entre células epiteliales y macrófagos para mantener dicha homeostasis (Ardain *et al.*, 2020; Bissonnette *et al.*, 2020).

En estado basal o sin estímulos, el microambiente alveolar está regulado por las células presentes en él para evitar una activación inflamatoria innecesaria, sin suprimir la capacidad de responder un estímulo dañino. Sin embargo, la respuesta inflamatoria a cualquier estímulo debe ser lo menos exacerbada posible, pues es vital mantener esta región no inflamada para que pueda continuar con sus funciones (Ardain *et al.*, 2020; Bissonnette *et al.*, 2020).

Así pues, la respuesta inflamatoria observada en el monocultivo de células A549 podría ser la observada en individuos con deficiencias inmunológicas por falta o disfunción de macrófagos. Por ejemplo se ha observado que la exposición al humo de cigarro puede ocasionar una depleción de macrófagos alveolares (Fleischmann *et al.*, 2023); además, el alcoholismo puede ocasionar deficiencia inmune en la región alveolar por causar disfunción de macrófagos (Mehta *et al.*, 2013).

En la comparación de los perfiles de secreción de IL entre los modelos estudiados, se observó que el co-cultivo secretó más IL antiinflamatorias (IL-1ra e IL-10) que el monocultivo (11- y 7-veces más, respectivamente) al exponerse a EHM y en particular se observó una secreción basal de IL-1ra más elevada en el co-cultivo, ya que fue el doble del monocultivo.

En este estudio, las células THP-1 fueron tratadas con PMA antes de someterse a la siembra en co-cultivo con las células A549. En la literatura se señala que los monocitos y macrófagos son una fuente importante de IL-1ra y en específico las células THP-1 elevan su secreción tras la estimulación con PMA (K. Hu *et al.*, 2013; C. A. Meier *et al.*, 2002). Tomando esto consideración, la estimulación con PMA pudo originar los niveles basales elevados de IL-1ra que observamos en el co-cultivo.

La elevación de IL-1ra en el co-cultivo expuesto a EHM puede explicarse ya que la estimulación con PMA también ocasiona una mayor expresión del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ) en las células THP-1 (K. Hu *et al.*, 2013; C. A. Meier *et al.*, 2002). Dentro de las moléculas identificadas como agonistas de PPAR γ se encuentran varios fitocannabinoides: THC, CBD y CBG (Nachnani *et al.*, 2021; Sunda & Arowolo, 2020). La activación de PPAR γ con fitocannabinoides genera una respuesta antiinflamatoria, incluida una mayor secreción de IL-1ra (K. Hu *et al.*, 2013; C. A. Meier *et al.*, 2002; Rodríguez Mesa *et al.*, 2021; Sunda & Arowolo, 2020).

Por lo anterior, es razonable suponer que la elevación en la secreción de IL-1ra en el co-cultivo expuesto a EHM se debe a la señalización de PPAR γ por los

fitocannabinoides agonistas (THC y CBG) presentes en el EHM; sin embargo, esta hipótesis requiere corroboración experimental.

La elevación de IL-10 en el co-cultivo expuesto a EHM puede deberse a una señalización de los receptores CB1 por los fitocannabinoides presentes en el EHM, ya que estos receptores modulan la inflamación (Russo & Marcu, 2017). Y se ha observado en ratones que la señalización con THC de CB1 en células monocíticas eleva la secreción de IL-10 en estas células (Joffre *et al.*, 2020).

En un estudio donde se realizó una exposición similar a la realizada en el presente, Anil *et al.*, (2021) reportaron que la exposición a un extracto metanólico de *Cannabis sativa* originaba una respuesta antiinflamatoria en células A549 y una proinflamatoria en macrófagos derivados de KG-1 (células humanas derivadas de leucemia mielógena aguda, fenotipo mieloblástico). La diferencia entre los resultados de este trabajo y el nuestro puede explicarse por la diferente composición química de los extractos utilizados (en su estudio reportan que se compone casi en totalidad de CBD y sin presencia de THC, contrario al EHM empleado en este estudio que no tiene CBD). Otro punto a considerar son las células utilizadas para obtener macrófagos, ya que en la literatura se describe que las células KG-1 no son tan adecuadas para evaluar la respuesta de macrófagos (Auwerx, 1991; Skopek *et al.*, 2023).

4.3 Modificación de la actividad de enzimas de respuesta inflamatoria en los modelos expuestos a EHM

La exposición a EHM no modificó la actividad de arginasa en el monocultivo, respecto a su actividad basal, aun cuando sí se modifica la secreción de dos IL en este modelo. Ha sido descrito que en las células A549, esta actividad enzimática no se modifica con estimulaciones proinflamatorias como el uso de citocinas TNF α , IL-1 β e IFN γ . Pero si se aumenta la actividad de esta enzima con estimulaciones antiinflamatorias (Jiang & George, 2011). Esto puede sugerir que el resultado observado de la actividad de esta enzima en las células A549 expuestas a EHM es de una estimulación proinflamatoria.

La actividad enzimática analizada en el co-cultivo expuesto a EHM muestra un perfil antiinflamatorio por el aumento significativo del 167% de la actividad de arginasa y la disminución significativa del 15.3% de la actividad de mieloperoxidasa, comparado con su actividad basal. Esto coincide con el perfil antiinflamatorio observado en la secreción de IL en este mismo modelo expuesto a EHM.

El aumento en expresión y actividad de arginasa es debido a la señalización de mediadores antiinflamatorios, la IL-10 constituye uno de los mediadores que activa a esta enzima (Rodríguez *et al.*, 2017). Por otro lado la inducción de la actividad y expresión de mieloperoxidasa es contrarrestada por la señalización de mediadores antiinflamatorios como IL-10 e IL-1ra (Mulligan *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2001). Con base en esto, puede inferirse que la modificación de la respuesta en la actividad enzimática analizada es producto de la señalización de las IL con secreción aumentada tras la exposición al EHM en el co-cultivo (IL-10 e IL-1ra).

El resultado de un perfil antiinflamatorio en el co-cultivo no es del todo favorable cuando se extrapola a lo que puede suceder *in vivo* el aumento en la actividad de arginasa representaría una actividad pro-fibrótica aumentada que no es favorable (Jiang & George, 2011; Rodríguez *et al.*, 2017). La fibrosis pulmonar tiene un origen en la región alveolar y es causante de diferentes afecciones pulmonares crónicas cuyo resultado es la falla respiratoria (Meyer, 2017; Parimon *et al.*, 2020). Además, la fibrosis pulmonar se ha asociado a fumar marihuana (Phan *et al.*, 2005).

Por otro lado, la disminución en la actividad de enzimas de defensa inflamatoria como la mieloperoxidasa *in vivo* puede resultar en una elevada susceptibilidad a padecer infecciones oportunistas, elevado daño pulmonar por dichas infecciones y una mala regulación de la inflamación generando una respuesta exacerbada y sin control (Aratani *et al.*, 2002, 2006; Kremserova *et al.*, 2016).

En diferentes estudios se ha demostrado que la morfología, capacidad bactericida y otras funciones efectoras de macrófagos alveolares se ven disminuidas con la exposición al HM de manera crónica (Cabral *et al.*, 1991; Roth *et al.*, 2004); estos efectos corresponden a una reacción antiinflamatoria o supresión inmune de los macrófagos como la que se observó en nuestro estudio.

Con esta información y los hallazgos en el co-cultivo expuesto a EHM en este estudio, se puede inferir que en caso de que un perfil antiinflamatorio fuera mantenido en la región alveolar tras una exposición crónica a HM, los individuos enfrentarían afecciones relacionadas con la inmunosupresión y remodelación tisular a nivel pulmonar.

Sin embargo, hay que tener en consideración que las exposiciones del mono- y co-cultivo fueron únicas y no representan de ninguna manera una exposición crónica a la que habitualmente están expuestos los consumidores de marihuana de uso no médico (United Nations, 2021). Además, la composición del EHM utilizado, difiere de la composición química y física del humo de marihuana (Graves *et al.*, 2020).

Los efectos del EHM causados sobre el co-cultivo son una aproximación a los eventos que se suceden *in vivo* tras el consumo de marihuana por inhalación, pero no representan en su totalidad las afecciones causadas en la región alveolar por este consumo. Se desconoce si la exposición repetida a este EHM sobre el co-cultivo puede cambiar la respuesta inflamatoria o si es mantenida, esto es trabajo para una futura investigación.

5. CONCLUSIONES

Los modelos evaluados: monocultivo de células A549 y co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1 respondieron de manera diferente a la exposición a 0.01-10 µg/ml de EHM por 24 h.

- La exposición a EHM por 24 h fue citotóxica para el monocultivo desde 0.1 µg/ml, pero no fue citotóxica para el co-cultivo a ninguna concentración evaluada. La exposición a H₂O₂ 100 µM fue más citotóxica para las células A549 en monocultivo, comparada con el co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1.
- Los niveles de IL en el medio fueron diferentes en el monocultivo y el co-cultivo expuestos a 1 µg/ml de EHM por 24 h. El perfil de IL mostrado por el monocultivo parece ser proinflamatorio, como lo muestra la elevación de la IL-6, mientras que el perfil en el co-cultivo parece ser antiinflamatorio pues aumenta la secreción de IL-1ra e IL-10.
- La actividad enzimática de arginasa en el monocultivo de células A549 expuesto a 1 µg/ml de EHM por 24 h corresponde a una estimulación proinflamatoria, por su parte la actividad de arginasa y mieloperoxidasa en el co-cultivo de células A549 y macrófagos derivados de THP-1 bajo la misma exposición corresponden a una estimulación antiinflamatoria y concuerda con los niveles de IL antiinflamatorias secretadas por este modelo.
- Teniendo en consideración los resultados obtenidos se sugiere que la presencia a de los macrófagos derivados de THP-1 tiene un efecto protector antiinflamatorio en el modelo de barrera epitelial de células A549 expuesto a EHM.

6. PERSPECTIVAS

Es relevante evaluar la participación de los receptores PPAR γ y CB1 en el mecanismo del posible efecto protector de los macrófagos derivados de THP-1. Así como la participación de los receptores CB1 y CB2 en el mecanismo de muerte del EHM sobre las células A549 cuando se encuentran en monocultivo y si es que está mediado por los fitocannabinoides presentes en éste. De la misma forma evaluar la participación de otros receptores que pueden ser activados por cannabinoides (como TRPV1, GPR55 y GPR119) en la respuesta inflamatoria de ambas líneas celulares, puede completar la información ya reportada en la literatura sobre estos y si es que participan de alguna forma en la respuesta observada con la exposición a EHM.

A su vez es de importancia investigar la posible comunicación entre los dos tipos celulares presentes en el co-cultivo y si el perfil de IL depende de dicha comunicación. La secreción de mediadores solubles o liberados al medio (citocinas y vesículas extracelulares) puede evaluarse utilizando cajas de cultivo con insertos que evitan el contacto físico entre células, pero permiten que compartan medio. O exponiendo a las células A549 al medio de cultivo de los macrófagos derivados de THP-1 expuestos al EHM y viceversa.

La evaluación de comunicación por contacto físico mediante uniones gap podría realizarse mediante inmunocitoquímica con agentes fluorescentes o con microscopía electrónica para evidenciar la presencia de uniones gap intercelulares entre ambos tipos celulares.

Es conveniente evaluar la exposición repetida a EHM en el modelo de co-cultivo para determinar la evolución de los efectos encontrados con una exposición aguda.

Se sugiere que evaluar la actividad de las NOS y los niveles de citocinas (IL-13, TGF β), así como la cuantificación de IL-8, ayudaría complementar la información que ya se obtuvo sobre la respuesta pro- y antiinflamatoria en ambos modelos evaluados.

Se fortalecería la información encontrada en este estudio si se evalúa la respuesta del modelo de co-cultivo a la exposición al humo de marihuana en su estado natural y no como extracto líquido, con la finalidad de evidenciar diferencias en la respuesta de los modelos.

Los resultados de esos estudios futuros se integrarían a los obtenidos en este estudio obteniendo así un panorama más consolidado de la participación de cada estirpe celular, así como en conjunto durante la exposición al HM, lo que complementará a los estudios epidemiológicos con los que se cuenta actualmente.

7. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology* (9th ed.). Elsevier Inc.
- Aghasafari, P., George, U., & Pidaparti, R. (2019). A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation Research*, 68(1), 59–74. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., & Akdis, C. A. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 701-721.e70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Albright, J. F., & Goldstein, R. A. (1996). Airborne pollutants and the immune system. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 114(2), 232–238. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(96\)70173-0](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(96)70173-0)
- Aloufi, N., Namkung, Y., Traboulsi, H., Wilson, E. T., Laporte, S. A., Kaplan, B. L. F., Ross, M. K., Nair, P., Eidelman, D. H., & Baglole, C. J. (2022). Standardized Cannabis Smoke Extract Induces Inflammation in Human Lung Fibroblasts. *Frontiers in Pharmacology*, 13(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.852029>
- Andersson, J., Björk, L., Dinarello, C. A., Towbin, H., & Andersson, U. (1992). Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *European Journal of Immunology*, 22(10), 2617–2623. <https://doi.org/10.1002/eji.1830221022>
- Andrews, P. C., & Krinsky, N. I. (1982). Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. *Analytical Biochemistry*, 127(2), 346–350. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90185-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90185-3)
- Aratani, Y. (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 640(January), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Ishida-Okawara, A., Suzuki, K., Maeda, N., & Koyama, H. (2006). Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(9), 1291–1299. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46620-0>
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N., & Koyama, H. (2002). Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 40(6), 557–563. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.6.557.563>
- Ardain, A., Marakalala, M. J., & Leslie, A. (2020). Tissue-resident innate immunity in the lung. *Immunology*, 159(3), 245–256. <https://doi.org/10.1111/imm.13143>
- Arend, W. P. (2002). The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13(4–5), 323–340. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00020-5)
- Arezki, Y., Cornacchia, J., Rapp, M., Lebeau, L., Pons, F., & Ronzani, C. (2021). A co-

- culture model of the human respiratory tract to discriminate the toxicological profile of cationic nanoparticles according to their surface charge density. *Toxics*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/toxics9090210>
- Auwerx, J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 47(1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/BF02041244>
- Bailey, K. L., Wyatt, T. A., Katafiasz, D. M., Taylor, K. W., Heires, A. J., Sisson, J. H., Romberger, D. J., & Burnham, E. L. (2019). Alcohol and cannabis use alter pulmonary innate immunity. *Alcohol*, 80, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.11.002>
- Barosova, H., Meldrum, K., Karakocak, B. B., Balog, S., Doak, S. H., Petri-Fink, A., Clift, M. J. D., & Rothen-Rutishauser, B. (2021). Inter-laboratory variability of A549 epithelial cells grown under submerged and air-liquid interface conditions. *Toxicology in Vitro*, 75, 105178. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105178>
- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, 478(December 2019), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Beckmann, A., Grissmer, A., Meier, C., & Tschernig, T. (2020). Intercellular communication between alveolar epithelial cells and macrophages. *Annals of Anatomy*, 227, 151417. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151417>
- Bissonnette, E. Y., Lauzon-Joset, J. F., Debley, J. S., & Ziegler, S. F. (2020). Cross-Talk Between Alveolar Macrophages and Lung Epithelial Cells is Essential to Maintain Lung Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 11(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583042>
- Brents, L. K. (2016). Marijuana, the endocannabinoid system and the female reproductive system. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(2), 175–191.
- Bruggisser, R., Von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W., & Tullberg-Reinert, H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(5), 445–448. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32073>
- Cabral, G. A., Stinnett, A. L., Bailey, J., Ali, S. F., Paule, M. G., Scallet, A. C., & Slikker, W. (1991). Chronic marijuana smoke alters alveolar macrophage morphology and protein expression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 40(3), 643–649. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90376-D](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90376-D)
- Carvalho, R. K., Andersen, M. L., & Mazaro-Costa, R. (2020). The effects of cannabidiol on male reproductive system: A literature review. *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 132–150. <https://doi.org/10.1002/jat.3831>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Cheng, W., Lu, J., Wang, B., Sun, L., Zhu, B., Zhou, F., & Ding, Z. (2021). Inhibition of inflammation-induced injury and cell migration by coelonin and militarine in PM2.5-exposed human lung alveolar epithelial A549 cells. *European Journal of*

Pharmacology, 896(January). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173931>

- Chu, M., Rago, M. Di, Mantiniaks, D., Glowacki, L., Woodford, N. W., Gerostamoulos, D., & Drummer, O. H. (2021). Time-Dependent Changes in THC Concentrations in Deceased Persons. *Journal of Analytical Toxicology*, 45(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa052>
- Claire, S. S., Gouda, H., Schotte, K., Fayokun, R., Fu, D., Varghese, C., & Prasad, V. M. (2020). Lung health, tobacco, and related products: Gaps, challenges, new threats, and suggested research. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 318(5), L1004–L1007. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00101.2020>
- CONADIC. (2021). Informe sobre la Situación de la Salud Mental y el Consumo de Sustancias Psicoactivas en México. *Informe*, 63. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/648021/INFORME_PAIS_2021.pdf
- CONADIC, INSP, SSA, & Instituto Nacional de Psiquiatría, R. de la F. M. (2017). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Drogas*. Secretaría de Salud. <https://www.gob.mx/salud%7Cconadic/acciones-y-programas/encuesta-nacional-de-consumo-de-drogas-alcohol-y-tabaco-encodat-2016-2017-136758>
- Corraliza, I. M., Campo, M. L., Soler, G., & Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *Journal of Immunological Methods*, 174(1–2), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2)
- Dekali, S., Divetain, A., Kortulewski, T., Vanbaelinghem, J., Gamez, C., Rogerieux, F., Lacroix, G., & Rat, P. (2013). Cell cooperation and role of the P2X7 receptor in pulmonary inflammation induced by nanoparticles. *Nanotoxicology*, 7(8), 1302–1314. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.735269>
- Di Giacomo, V., Chiavaroli, A., Recinella, L., Orlando, G., Cataldi, A., Rapino, M., Di Valerio, V., Ronci, M., Leone, S., Brunetti, L., Menghini, L., Zengin, G., Gunes, A., Abdallah, H. H., & Ferrante, C. (2020). Antioxidant and neuroprotective effects induced by cannabidiol and cannabigerol in rat CTX-TNA2 astrocytes and isolated cortexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103575>
- Dzoyem, J. P., Kuete, V., & Eloff, J. N. (2014). 23 Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa : Significance , Principle of Methods , Data Interpretation , and Use in Plant Screenings. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00023-6>
- Eberl, G. (2016). Immunity by equilibrium. *Nature Reviews Immunology*, 16(8), 524–532. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.75>
- Feehan, K. T., & Gilroy, D. W. (2019). Is Resolution the End of Inflammation? *Trends in Molecular Medicine*, 25(3), 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.01.006>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fietta, P., Costa, E., & Delsante, G. (2014). Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part I: ILs from IL-1 to IL-19. *Theoretical Biology Forum*, 107(1–2), 13–45.

- Fleischmann, M., Jarnicki, A. G., Brown, A. S., Yang, C., Anderson, G. P., Garbi, N., Hartland, E. L., van Driel, I. R., & Ng, G. Z. (2023). Cigarette smoke depletes alveolar macrophages and delays clearance of *Legionella pneumophila*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 324(3), L373–L384. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00268.2022>
- Flood-Garibay, J., Pérez-Cortés, E., & Méndez, M. (2019). Respiratory immune system and consequences due to particulate matter in air pollution. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 57(3), 170–180. <https://www.researchgate.net/publication/338922545>
- Granowitz, E. V., Poutsika, D. D., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Dinarello, C. A., Santos, A. A., & Wilmore, D. W. (1991). Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *The Lancet*, 338(8780), 1423–1424. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92725-H](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)92725-H)
- Graves, B. M., Johnson, T. J., Nishida, R. T., Dias, R. P., Savareear, B., Harynuk, J. J., Kazemimanesh, M., Olfert, J. S., & Boies, A. M. (2020). Comprehensive characterization of mainstream marijuana and tobacco smoke. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63120-6>
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>
- Hancox, R. J., & Sears, M. R. (2019). The impact of marijuana smoking on lung function. *European Respiratory Journal*, 54(6), 7–9. <https://doi.org/10.1183/13993003.02065-2019>
- Holownia, A., Wielgat, P., Kwolek, A., Jackowski, K., & Braszko, J. J. (2015). Crosstalk between co-cultured a549 cells and thp1 cells exposed to cigarette smoke. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 858, 47–55. https://doi.org/10.1007/5584_2015_112
- Holownia, A., Wielgat, P., Rysiak, E., & Braszko, J. J. (2016). Intracellular and extracellular cytokines in A549 cells and THP1 cells exposed to cigarette smoke. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 910, 39–45. https://doi.org/10.1007/5584_2016_214
- Hu, K., Yang, Y., Tu, Q., Luo, Y., & Ma, R. (2013). Alpinetin inhibits LPS-induced inflammatory mediator response by activating PPAR- γ in THP-1-derived macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 721(1–3), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.049>
- Hu, Y., Zhao, Z., Liu, Y. T., Xu, Z. C., Li, J. Y., Yang, Z. Y., Rui-Wang, Yang, Y. Q., Zhang, J. H., Qiu, S. Y., He, T., Wu, Y. Y., & Liu, S. (2023). N-linoleyltyrosine resisted the growth of non-small cell lung cancer cells via the regulation of CB1 and CB2 involvement of PI3K and ERK pathways. *Frontiers in Pharmacology*, 14(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1164367>
- Huber, G. L., Simmons, G. A., McCarthy, C. R., Cutting, M. B., Laguarda, R., & Pereira, W. (1975). Depressant effect of marijuana smoke on antibactericidal activity of pulmonary alveolar macrophages. *Chest*, 68(6), 769–773. <https://doi.org/10.1378/chest.68.6.769>
- Huestis, M. A. (2005). Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handbook of Experimental*

Pharmacology, 168, 657–690. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_23

- Huff, R. D., Aguiar, J. A., Tse, W., Stämpfli, M. R., McConkey, B. J., Doxey, A. C., & Hirota, J. A. (2020). Effect of long-acting β -agonists/glucocorticoids on human airway epithelial cell cytokine, transcriptomic and oxidative stress responses to cannabis smoke. *ERJ Open Research*, 6(1), 00265–02019. <https://doi.org/10.1183/23120541.00265-2019>
- Hufnagel, M., Neuberger, R., Wall, J., Link, M., Friesen, A., & Hartwig, A. (2021). Impact of differentiated macrophage-like cells on the transcriptional toxicity profile of cuo nanoparticles in co-cultured lung epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22095044>
- International Organization for Standardization. (2012). *Routine analytical cigarette-smoking machine — Definitions and standard conditions (ISO 3308:2012)*.
- Jantzen, K., Roursgaard, M., Desler, C., Loft, S., Rasmussen, L. J., & Møller, P. (2012). Oxidative damage to DNA by diesel exhaust particle exposure in co-cultures of human lung epithelial cells and macrophages. *Mutagenesis*, 27(6), 693–701. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges035>
- Jarczak, D., & Nierhaus, A. (2022). *Cytokine Storm — Definition, Causes, and Implications*. 1–30.
- Jiang, J., & George, S. C. (2011). TGF- β 2 reduces nitric oxide synthase mRNA through a ROCK-dependent pathway in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(3), 361–367. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00464.2010>
- Joffre, J., Yeh, C.-C., Wong, E., Thete, M., Xu, F., Zlatanova, I., Lloyd, E., Kobzik, L., Legrand, M., & Hellman, J. (2020). Activation of CB1R Promotes Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Secretion by Monocytic Myeloid-Derived Suppressive Cells and Reduces Acute Inflammation and Organ Injury. *The Journal of Immunology*, 204(12), 3339–3350. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000213>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kasurinen, S., Happonen, M. S., Rönkkö, T. J., Orasche, J., Jokiniemi, J., Kortelainen, M., Tissari, J., Zimmermann, R., Hirvonen, M. R., & Jalava, P. I. (2018). Differences between co-cultures and monocultures in testing the toxicity of particulate matter derived from log wood and pellet combustion. *PLoS ONE*, 13(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192453>
- Kremserova, S., Perecko, T., Soucek, K., Klinke, A., Baldus, S., Eiserich, J. P., & Kubala, L. (2016). Lung Neutrophilia in Myeloperoxidase Deficient Mice during the Course of Acute Pulmonary Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5219056>
- Leikauf, G. D. (2021). Toxic Responses of the Respiratory System. In C. D. Klaassen & J. B. Watkins (Eds.), *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology* (4th ed.). McGraw-Hill Education.
- Liu, X., Yin, S., Chen, Y., Wu, Y., Zheng, W., Dong, H., Bai, Y., Qin, Y., Li, J., Feng, S., & Zhao, P. (2018). LPS-induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- κ B, STAT3 or AP-1 activation. *Molecular*

Medicine Reports, 17(4), 5484–5491. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8542>

- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Loret, T., Peyret, E., Dubreuil, M., Aguerre-Chariol, O., Bressot, C., le Bihan, O., Amodeo, T., Trouiller, B., Braun, A., Egles, C., & Lacroix, G. (2016). Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions. *Particle and Fibre Toxicology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12989-016-0171-3>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Maertens, R. M., White, P. A., Williams, A., & Yauk, C. L. (2013). A global toxicogenomic analysis investigating the mechanistic differences between tobacco and marijuana smoke condensates in vitro. *Toxicology*, 308, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.03.008>
- Mehta, A. J., Yeligar, S. M., Elon, L., Brown, L. A., & Guidot, D. M. (2013). Alcoholism causes alveolar macrophage zinc deficiency and immune dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 716–723. <https://doi.org/10.1164/rccm.201301-0061OC>
- Meier, C. A., Chicheportiche, R., Juge-Aubry, C. E., Dreyer, M. G., & Dayer, J. M. (2002). Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Cytokine*, 18(6), 320–328. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1945>
- Meier, U., Dussy, F., Scheurer, E., Mercer-Chalmers-Bender, K., & Hangartner, S. (2018). Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. *Forensic Science International*, 291, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.009>
- Meyer, K. C. (2017). Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 11(5), 343–359. <https://doi.org/10.1080/17476348.2017.1312346>
- Moir, D., Rickert, W. S., Levasseur, G., Larose, Y., Maertens, R., White, P., & Desjardins, S. (2008). A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions. *Chemical Research in Toxicology*, 21(2), 494–502. <https://doi.org/10.1021/tx700275p>
- Mulligan, M. S., Jones, M. L., Vaporciyan, A. A., Howard, M. C., & Ward, P. A. (1993). Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 151(10), 5666–5674.
- Musolino, C., Allegra, A., Innao, V., Allegra, A. G., Pioggia, G., & Gangemi, S. (2017). *Review Article Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium , Proliferative and Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma. 2017.* <https://doi.org/10.1155/2017/1852517>
- Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2021). The pharmacological case for cannabigerol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 376(2),

204–212. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.000340>

- NIDA. (2019). El Cannabis (marihuana) - DrugFacts. *National Institute on Drug Abuse, 2019*, 16. <https://nida.nih.gov/es/publicaciones/drugfacts/el-canabis-marihuana>
- Nurjayadi, M., Apriyani, D., Hasan, U., Santoso, I., Kurniadewi, F., Kartika, I. R., Agustini, K., Puspasari, F., Natalia, D., & Mangunwardoyo, W. (2016). *Immunogenicity and Specificity of Anti recombinant Protein Fim-C- Salmonella typhimurium Antibody as a Model to Develop Typhoid Vaccine Immunogenicity and Specificity of Anti recombinant Protein Fim- C- Salmonella typhimurium Antibody as a Model to Develo*. December. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2016.01.037>
- Oliveira, C. M. B. de, Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260–265. <https://doi.org/10.1590/s0034-70942011000200014>
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01084>
- Owen, K. P., Sutter, M. E., & Albertson, T. E. (2014). Marijuana: Respiratory tract effects. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 46(1), 65–81. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8374-y>
- Pacher, P., Steffens, S., Haskó, G., Schindler, T. H., & Kunos, G. (2018). Cardiovascular effects of marijuana and synthetic cannabinoids: the good, the bad, and the ugly. *Nature Reviews Cardiology*, 15(3), 151–166. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.130>
- Pacifici, R., Pichini, S., Pellegrini, M., Rotolo, M. C., Giorgetti, R., Tagliabracci, A., Busardò, F. P., & Huestis, M. A. (2020). THC and CBD concentrations in blood, oral fluid and urine following a single and repeated administration of “light cannabis.” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(5), 682–689. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0119>
- Panigrahy, D., Gilligan, M. M., Serhan, C. N., & Kashfi, K. (2021). Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacology and Therapeutics*, 227. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107879>
- Parimon, T., Yao, C., Stripp, B. R., Noble, P. W., & Chen, P. (2020). Alveolar epithelial type II cells as drivers of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072269>
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C., & Kim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*, 56(1), 45–50. <https://doi.org/10.1007/s00011-007-6115-5>
- Patten, D. R. (2018). *Subcellular fractionation protocol*. 888, 1–2.
- Persson, H. L., Vainikka, L. K., Eriksson, I., & Wennerström, U. (2013). TNF- α -stimulated macrophages protect A549 lung cells against iron and oxidation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65(1–2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.06.004>
- Phan, T. D., Lau, K. K. P., & Li, X. (2005). Lung bullae and pulmonary fibrosis associated with marijuana smoking. *Australasian Radiology*, 49(5), 411–414. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1673.2005.01472.x>

- Preet, A., Qamri, Z., Nasser, M. W., Prasad, A., Shilo, K., Zou, X., Groopman, J. E., & Ganju, R. K. (2011). Cannabinoid receptors, CB1 and CB2, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis. *Cancer Prevention Research*, 4(1), 65–75. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0181>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & Elsohly, M. A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Rella, J. G. (2015). Recreational cannabis use: Pleasures and pitfalls. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 82(11), 765–772. <https://doi.org/10.3949/ccjm.82a.14073>
- Rennard, S. I. (2004). Cigarette Smoke in Research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31(5), 479–480. <https://doi.org/10.1165/rcmb.F284>
- Rodríguez Mesa, X. M., Moreno Vergara, A. F., Contreras Bolaños, L. A., Guevara Moriones, N., Mejiá Piñeros, A. L., & Santander González, S. P. (2021). Therapeutic Prospects of Cannabinoids in the Immunomodulation of Prevalent Autoimmune Diseases. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(3), 196–210. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0183>
- Rodriguez, P. C., Ochoa, A. C., & Al-Khami, A. A. (2017). Arginine metabolism in myeloid cells shapes innate and adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093>
- Roggen, E. L., Soni, N. K., & Verheyen, G. R. (2006). Respiratory immunotoxicity: An in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*, 20(8), 1249–1264. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.03.009>
- Romano, B., Pagano, E., Orlando, P., Capasso, R., Cascio, M. G., Pertwee, R., Marzo, V. Di, Izzo, A. A., & Borrelli, F. (2016). Pure Δ^9 -tetrahydrocannabivarin and a Cannabis sativa extract with high content in Δ^9 -tetrahydrocannabivarin inhibit nitrite production in murine peritoneal macrophages. *Pharmacological Research*, 113, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.045>
- Roth, M. D., Whittaker, K., Salehi, K., Tashkin, D. P., & Baldwin, G. C. (2004). Mechanisms for impaired effector function in alveolar macrophages from marijuana and cocaine smokers. *Journal of Neuroimmunology*, 147(1–2), 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2003.10.017>
- Rotolo, M. C., Pellegrini, M., Martucci, P., Giacobbe, R., De Palma, A., Pacifici, R., Pichini, S., Busardò, F. P., & Bisconti, M. (2019). Cannabinoids determination in bronchoalveolar lavages of cannabis smokers with lung disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 57(4), 498–503. <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-0426>
- Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>
- Schimke, R. T. (1970). Arginase (Rat Liver). *Methods in Enzymology*, 17, 313–317. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)17203-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)17203-5)
- Sharma, P., Murthy, P., & Bharath, M. M. S. (2012). Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: Clinical implications. *Iranian Journal of Psychiatry*, 7(4), 149–156.
- Skopek, R., Palusińska, M., Kaczor-Keller, K., Pingwara, R., Papierniak-Wyglądała, A.,

- Schenk, T., Lewicki, S., Zelent, A., & Szymański, Ł. (2023). Choosing the Right Cell Line for Acute Myeloid Leukemia (AML) Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/ijms24065377>
- Stepanenko, A. A., & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
- Sunda, F., & Arowolo, A. (2020). A molecular basis for the anti-inflammatory and anti-fibrosis properties of cannabidiol. *FASEB Journal*, 34(11), 14083–14092. <https://doi.org/10.1096/fj.202000975R>
- Suzuki, K., Murtuza, B., Smolenski, R. T., Sammut, I. A., Suzuki, N., Kaneda, Y., & Yacoub, M. H. (2001). Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Circulation*, 104(SUPPL. 1), 308–313. <https://doi.org/10.1161/hc37t1.094871>
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., & Fujikura, T. (1983). Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*, 132(2), 345–352. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90019-2)
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2006). El Aparato Respiratorio. In *Principios de Anatomía y Fisiología* (13th ed.). Editorial Médica Panamericana.
- United Nations. (2021). Global Overview : Drug Demand. In *World Drug Report 2021*.
- United Nations. (2023). *EXECUTIVE SUMMARY WORLD DRUG REPORT 2023*.
- UNODC. (2021). *Drug Market Trends : Cannabis*. https://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_4.pdfhttps://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_3.pdfhttps://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_4.pdfhttps://www.unodc.org/res/wdr2021/field/WDR21_Booklet_3.pdf
- Vidinsky, B., Gál, P., Pilátová, M., Vidová, Z., Solár, P., Varinská, L., Ivanová, L., & Mojžiš, J. (2012). Anti-proliferative and anti-angiogenic effects of CB2R agonist (JWH-133) in non-small lung cancer cells (A549) and human umbilical vein endothelial cells: An in vitro investigation. *Folia Biologica (Czech Republic)*, 58(2), 75–80.
- Volkow, N. D., Baler, R. D., Compton, W. M., & Weiss, S. R. B. (2014). Adverse Health Effects of Marijuana Use. *New England Journal of Medicine*, 370(23), 2219–2227. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1402309>
- Wang, G., Zhang, X., Liu, X., & Zheng, J. (2020). Co-culture of human alveolar epithelial (A549) and macrophage (THP-1) cells to study the potential toxicity of ambient PM2.5: a comparison of growth under ALI and submerged conditions. *Toxicology Research*, 9(5), 636–651. <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAA072>
- Yu, X., Buttgerit, A., Lelios, I., Utz, S. G., Cansever, D., Becher, B., & Greter, M. (2017). The Cytokine TGF- β Promotes the Development and Homeostasis of Alveolar Macrophages. *Immunity*, 47(5), 903–912.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.007>
- Zhang, M. Y., Jiang, Y. X., Yang, Y. C., Liu, J. Y., Huo, C., Ji, X. L., & Qu, Y. Q. (2021). Cigarette smoke extract induces pyroptosis in human bronchial epithelial cells through

the ROS/NLRP3/caspase-1 pathway. *Life Sciences*, 269, 119090.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119090>

Zindel, J., & Kubes, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 493–518.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>

ANEXOS

Anexo 1. Obtención y análisis del Extracto de Humo de Marihuana

En el laboratorio 6 (Metabolismo de Xenobióticos) del Departamento de Toxicología (CINVESTAV) por el trabajo de la M. en C. Fanny Colchero y la M. en C. Elvira Gómez, se obtuvo un extracto de humo de marihuana (EHM) usando un equipo de combustión.

Brevemente, se quemaron 100 cigarrillos elaborados en laboratorio a partir de las hojas secas de *Cannabis sativa* spp., de la combustión se consiguió un condensado en una matriz de fibra de vidrio con carbón activado. Se obtuvo un primer extracto del condensado de humo usando clorometano (CH_2Cl_2) y se llevó a sequedad con flujo de N_2 ; posteriormente el condensado se recuperó usando etanol.

El procedimiento se realizó siguiendo los lineamientos descritos por la norma ISO 3308:2012 Routine Analytical cigarette-smoking machine-definitions and standard conditions (International Organization for Standardization, 2012).

Este extracto fue analizado en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Claurus 680) acoplado a un espectrómetro de masas (Perkin Elmer, Claurus 600 T), en donde se determinaron los compuestos listados en la Tabla 5.

Con base en este análisis se observa que el EHM obtenido tiene una mayor presencia de cannabinoides y una baja presencia de PAH. Además de su identificación cualitativa, se cuantificó la cantidad THC en el extracto obteniendo 86 ng de THC/ μl de EHM.

Tabla 5. Compuestos identificados en el EHM por el tiempo de retención en el cromatograma y porcentaje de concordancia en la biblioteca de la NIST

Tiempo de retención (min)	Compuesto	%
18.21	Naftaleno	96
19.07	Nonacosano	96
19.61	Bencilo	95
19.86	Guaiol	99
22.25	Fiteno 2	93
25.51	Ácido metil hexadecanoico	93
36.48	Cannabigerol	93
37.39	Bencil butil ftalato	95
38.52	Cannabicromeno	93
38.83	Δ 9-THC	97
38.96	Δ 8-THC	99
39.36	Cannabinol	97

Tomado de Gómez-Guerrero *et al.*, 2022 (datos no publicados)

Anexo 2. Respuesta de co-cultivo a LPS, caracterización del co-cultivo

Para caracterizar la respuesta del co-cultivo ante un estímulo de inflamación externo se utilizó un estímulo de LPS 0.01 $\mu\text{g/ml}$. Se evaluó la viabilidad y la secreción de IL con la finalidad de garantizar que el modelo responde a un estímulo inflamatorio y que dicha respuesta es medible.

Viabilidad

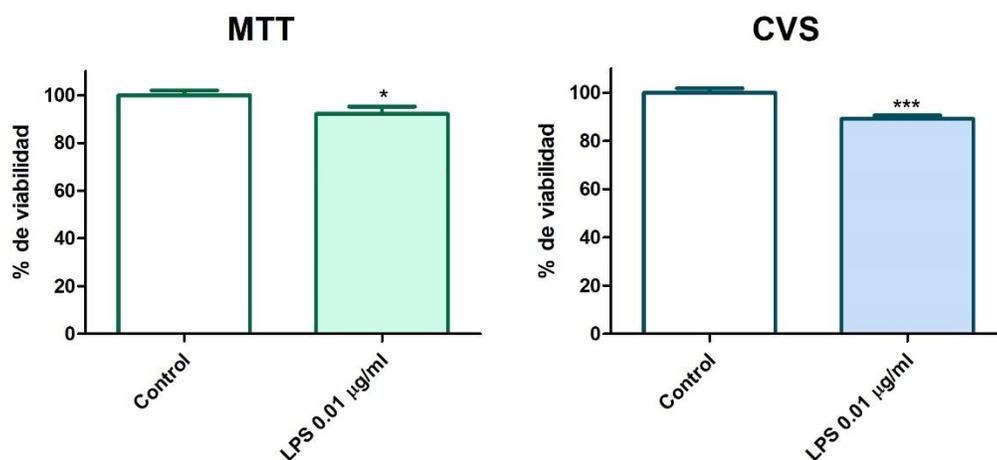


Figura 17. Viabilidad celular del co-cultivo expuesto a LPS (0.01 $\mu\text{g/ml}$) por 24 h, ensayos MTT y CVS.

Se presentan las gráficas de con datos expresados como media \pm EEM; triplicados de tres experimentos independientes. Análisis estadístico mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

En la Figura 17 se presentan los resultados de viabilidad después de la exposición del co-cultivo a LPS, utilizando dos técnicas distintas (MTT y CVS). Ambos ensayos mostraron que la exposición a un estímulo inflamatorio externo, como LPS en concentración 0.01 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h, disminuye significativamente la viabilidad en un 10%.

Niveles de IL

El mismo estímulo inflamatorio de LPS en concentración 0.01 $\mu\text{g/ml}$ por 24 h modificó la secreción de IL en el modelo de co-cultivo. En la Figura 17 panel A se presenta la modificación en la secreción de las IL proinflamatorias analizadas, tanto la IL-1 β , como la IL-6 muestran una tendencia de aumento después de la exposición

a LPS; sin embargo, sólo la IL-1 β tuvo un aumento estadísticamente significativo después de dicho estímulo.

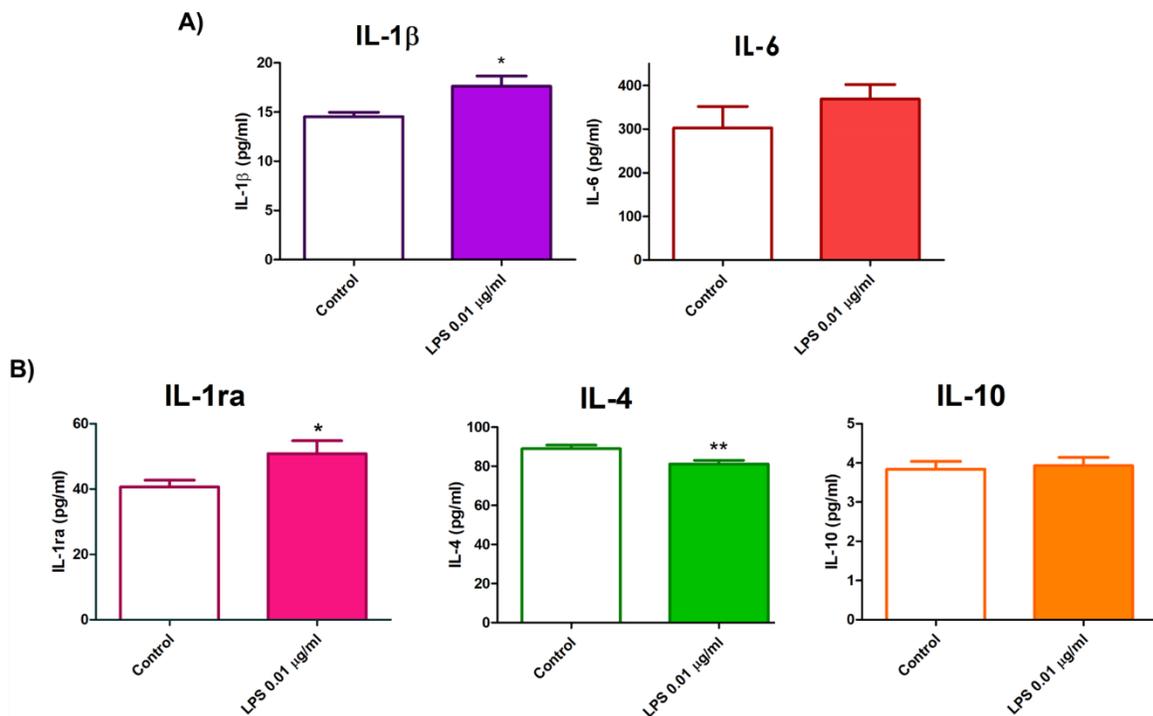


Figura 18. Interleucinas pro- y antiinflamatorias secretadas en el medio del co-cultivo expuesto a LPS (0.01 μ g/ml) por 24 h.

Se presentan gráficas de datos expresados como media \pm EEM de duplicados de tres experimentos independientes. A) IL proinflamatorias; B) IL antiinflamatorias. Análisis estadístico de cada interleucina mediante prueba *t* de Student no pareada de una cola; * p <0.05 * p <0.001.

En cuanto a las IL antiinflamatorias analizadas, en la Figura 17 panel B se observan los cambios en su secreción después del estímulo con LPS. La IL-4 tuvo una disminución en su secreción estadísticamente significativa, mientras que la secreción de IL-1ra tuvo un incremento estadísticamente significativo. Por su parte la IL-10 se mantuvo sin modificaciones significativas en su secreción después del estímulo inflamatorio de LPS.

Los resultados de control de respuesta a LPS (0.01 μ g/ml) en el modelo de co-cultivo mostraron un perfil de IL inclinado a una respuesta proinflamatoria dada por el incremento significativo en la secreción de IL-1 β (21%), el ligero incremento de IL-6 (22%), así como la disminución significativa en secreción de IL-4 (-8.8%). Resultado

proinflamatorio que concuerda con los obtenidos en modelos similares por otros autores (Arezki *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2018).

Además de elevar la secreción de IL-1 β , el LPS (0.01 μ g/ml) incrementó la de IL-1ra (25%). En diferentes estudios se ha observado que el LPS induce la expresión y secreción de IL-1 β y IL-1ra, por lo que está considerado como un inductor de la expresión de ambas IL en células inmunes (Andersson *et al.*, 1992; Arend, 2002).

También se ha descrito que 2 h después de una inyección de LPS en humanos se produce una elevación plasmática de IL-1 α e IL-1 β y en horas subsecuentes se elevan los niveles de IL-1ra en plasma, los cuales son mayores que los de IL-1 α e IL-1 β , lo que muestra un proceso de protección contra una respuesta inflamatoria exacerbada (Granowitz *et al.*, 1991). Esto puede explicar las concentraciones de IL-1ra 2.9 veces mayores a las de IL-1 β observadas en el co-cultivo después de la exposición a LPS.

La IL-4 ocasiona la activación alternativa de macrófagos, también llamada polarización M2a, fenotipo antiinflamatorio y curativo (Abbas *et al.*, 2018; Baxter *et al.*, 2020). Por el lado contrario el LPS activa de manera clásica a los macrófagos originando un fenotipo M1 proinflamatorio (Abbas *et al.*, 2018; Baxter *et al.*, 2020). Ambos fenotipos son contrarios y mutuamente excluyentes, es decir, cuando se activan los macrófagos se disminuye la secreción de aquellas IL pertenecientes a otro fenotipo (Orecchioni *et al.*, 2019). La reducción en la secreción de IL-4 observada en el sobrenadante del co-cultivo después de la exposición a LPS puede explicarse por dicho fenómeno de polarización.

La disminución de la viabilidad en el co-cultivo después de la exposición a LPS puede relacionarse también con un proceso de inflamación, ya que la respuesta inflamatoria causa daño en el tejido donde es iniciada (Abbas *et al.*, 2018; Feehan & Gilroy, 2019). Además, una de las formas de secreción de IL-1 β se produce cuando las células mueren por piroptosis. Esta muerte celular es dependiente de caspasa-1 al igual que la escisión necesaria para pasar de pro-IL-1 β a IL-1 β funcional (Lopez-Castejon & Brough, 2011) lo que también puede explicar la disminución de la viabilidad observada en los resultados de nuestro estudio.

Los resultados del co-cultivo expuesto a LPS muestran que el modelo tiene la capacidad de responder de forma esperada a la exposición a un agente inmunomodulador conocido como LPS. Además, tiene la capacidad de responder de manera específica a estímulos diferentes, pues se observa que los resultados de modificación de los niveles de IL secretados por la exposición a EHM es totalmente diferente al originado de la exposición a LPS.

Anexo 3. Solución amortiguadora de fraccionamiento subcelular

Reactivos y su concentración final en la solución

Sacarosa 250 mM

HEPES 20 mM

KCl 10 mM

MgCl₂ 1.5 mM

EDTA 1 mM

EGTA 1mM

DTT 1 mM

SIGMAFAST™ Protease Inhibitor

Preparación

Para preparar 50 ml de la solución amortiguadora se pesaron 4.28 g de sacarosa, 0.0373 g de KCl y se disolvieron en 25 ml de agua destilada. Posteriormente a esta solución se añadió 1 ml de HEPES 1 M (pH 7.4), 75 µl de MgCl₂ 1 M, 100 µl de EDTA 0.5 M y 100 µl de EGTA 0.5 M. Se llevó al volumen final con agua destilada y se refrigeró.

Al momento de usar la solución amortiguadora a cada 10 ml de la misma se le añadieron 10 µl de DTT 1 M y 10 µl del SIGMAFAST™ Protease Inhibitor 10X. Se mantuvo en hielo durante su uso.

La solución es parte del protocolo de fraccionamiento subcelular descrito por Patten, (2018) para abcam®.

El jurado designado por la Comisión Académica del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis:

“Comparación de la respuesta inflamatoria a un extracto de humo de marihuana en dos modelos de la barrera epitelial alveolar *in vitro*”

Que presenta el Q.F.B. Carlos Daniel Ortiz Ramírez para su examen final para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la Especialidad de Toxicología, el día 27 de octubre del año 2023.

Dr. Arnulfo Albores Medina

Director de Tesis

Dr. Octavio Gamaliel Aztatzi Aguilar

Asesor Interno

Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo

Asesora Externa