

# Efecto *in vitro* del material particulado en células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con artritis reumatoide

Autor:

Daniel Felipe Galeano Sánchez

Trabajo de grado

Para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Asesora interna: Claudia Andrea Cruz Baquero Ph.D

Asesora externa: Heily Carolina Ramírez Santana Ph.D



Universidad del  
**Rosario**

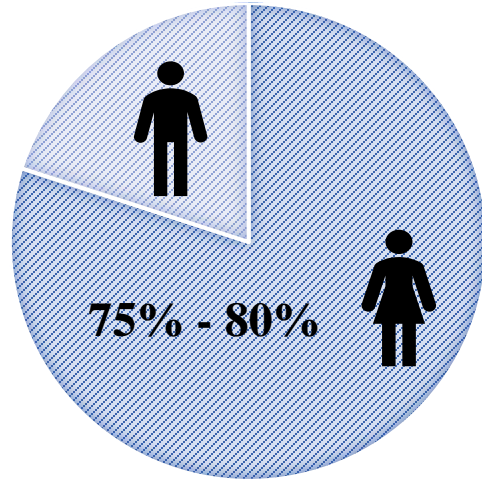


**CREA**

Centro de Estudio de  
Enfermedades Autoinmunes



# Enfermedades autoinmunes (EAI)



Incidencia 20/100,000 habitantes

Prevalencia 5%-7%

♀ > 2.7 ♂ de desarrollar EAI

## Colombia

	Enfermedad autoinmune	Prevalencia 100.000 pacientes
1	<u>Artritis reumatoide</u>	105
2	Psoriasis	41
3	Enfermedad de Graves	39

# Artritis reumatoide

## Genética



- \* *PADI4*
- \* *HLA-DRB1*

## Hormonas

Estrógenos

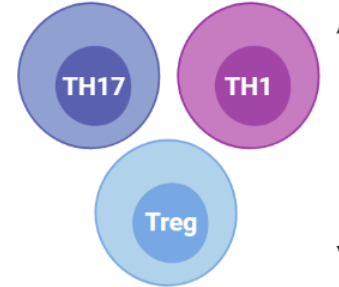
Prolactina

Testosterona

DHEA

## Rta. Celular

IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TNF, etc.



## Infecciones

- *P. mirabilis*
- *H. pylori*
- *P. gingivalis*
- EBV
- Parvovirus B19

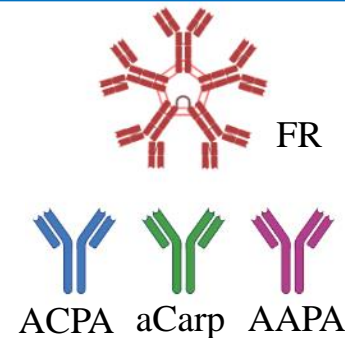
## Epigenética

- HM
- sirt1-sirt6
- BRD
- MH.
- MS (*p53, RAF1* y *vimentina*)

## Fenotipo

- **YORA**
- **LORA**
- **EAM**
- **EE**

## Autoanticuerpos



## Exposición

- Polvo de sílice
- Aceites minerales
- Humo de cigarrillo
- ↓ Sol DVD
- **Material particulado**

# Material particulado

Partículas microscópicas sólidas y/o líquidas

Permanece suspendido en el aire

## Diámetro aerodinámico

- Indicador del tamaño de la partícula / diámetro de una partícula esférica de forma unitaria
- Tienen una infinidad de formas
- Permite determinar su transporte en el aire y en superficies

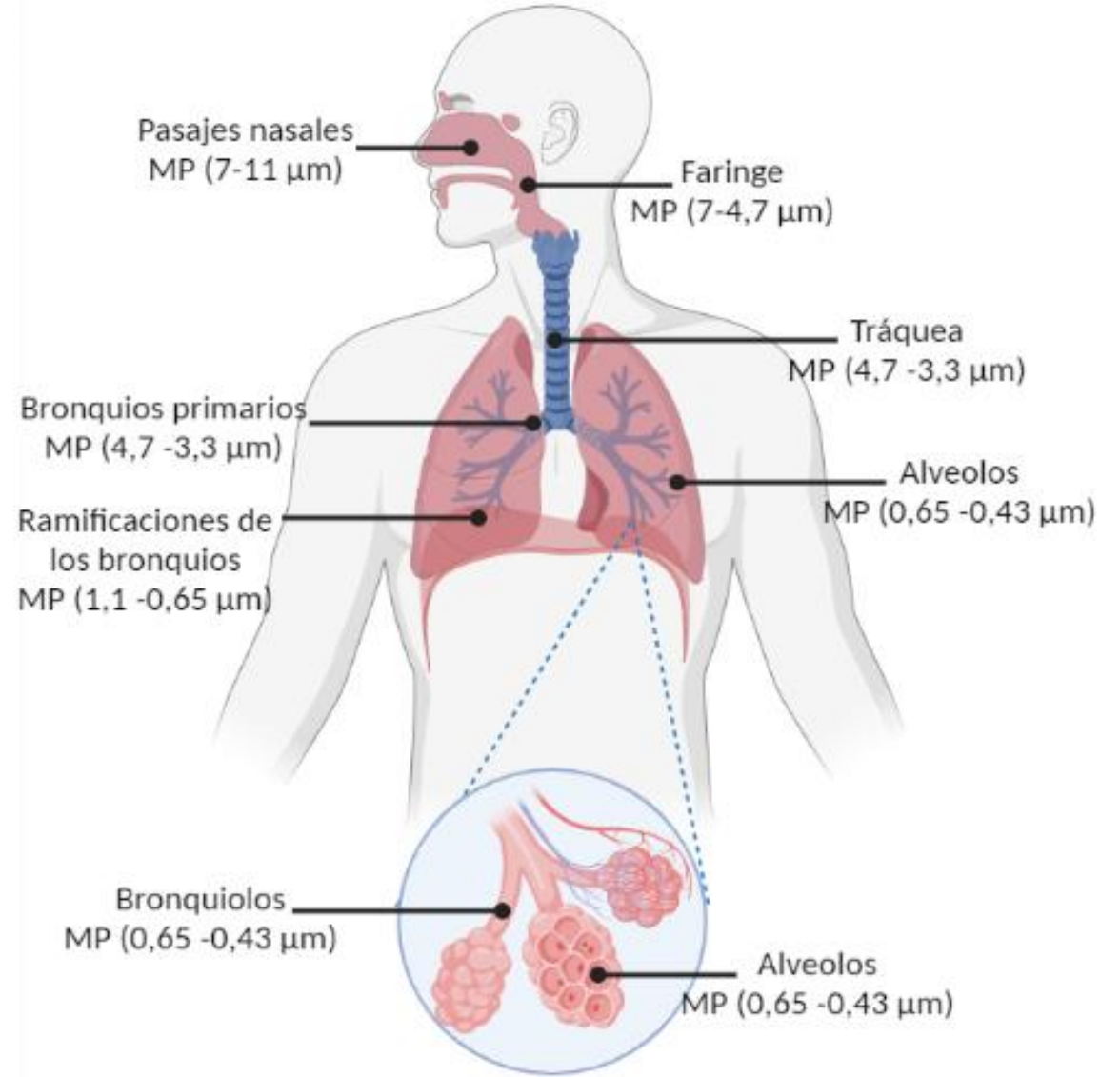
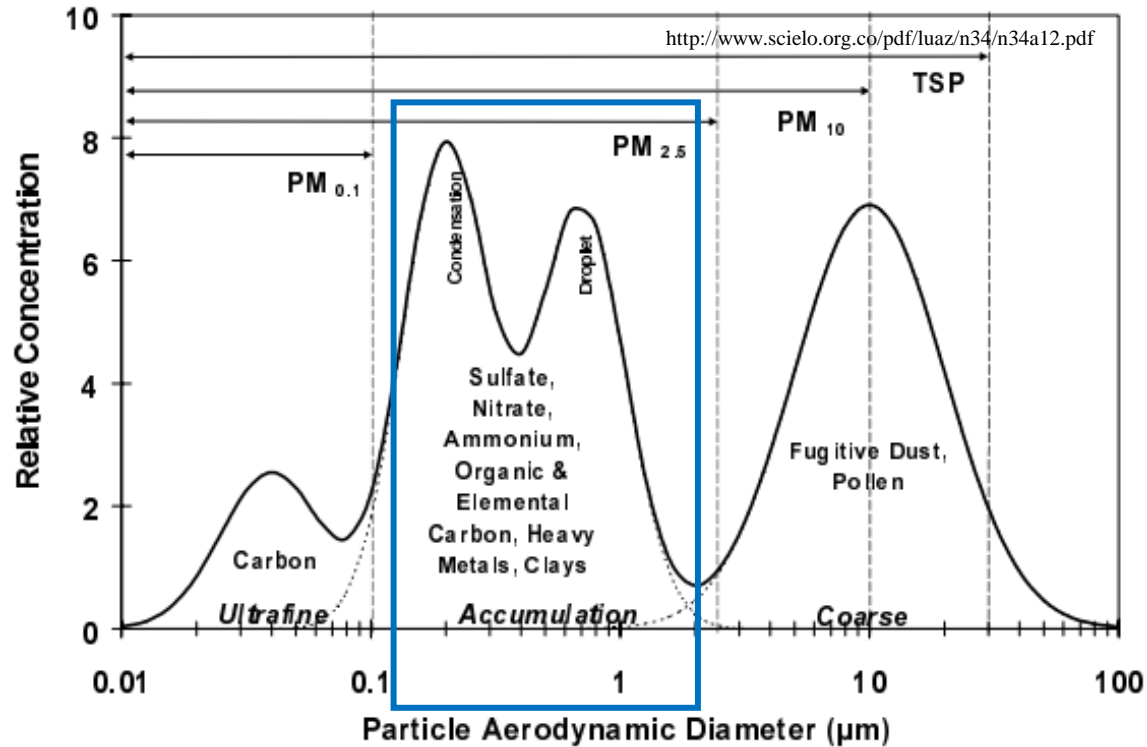
Partículas gruesas  
DA 2.5-10  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ )

Partículas finas  
DA 0.1-2.5  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2.5}$ )

Partículas ultrafinas  
DA  $<0.1 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{0.1}$ )



# Material particulado





## Influence of Personal Exposure to Particulate Air Pollution on Cardiovascular Physiology and Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Subjects With Diabetes

## ¿Impacto del material particulado en artritis reumatoide?

Inhalation Toxicology, 20:499–506, 2008  
Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.  
ISSN: 0895-8378 print / 1091-7691 online  
DOI: 10.1080/08958370701864797

## Systemic Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Activation in Clinically Healthy Children Exposed to Air Pollutants

L. Calderón-Garcidueñas

## Asociación entre la contaminación del aire, la inflamación sistémica y Artritis reumatoide.



Environmental Research

Volume 157, August 2017, Pages 60-63



## Industrial air emissions, and proximity to major industrial emitters, are associated with anti-citrullinated protein antibodies

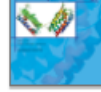
Sasha Bernatsky <sup>a, b, c, d, e</sup>, Audrey Smargiassi <sup>b, c</sup>, Lawrence Joseph <sup>a</sup>, Phillip Awadalla <sup>d</sup>, Ines Colmegna <sup>e</sup>, Marie Hudson <sup>a, f</sup>, Marvin J. Fritzler <sup>e</sup>



Qin-Yun Ma *et al.*, 2017

International Immunopharmacology

Volume 50, September 2017, Pages 139-145



Exposure to particulate matter 2.5 (PM2.5) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity

Qin-Yun Ma, Da-Yu Huang, Hui-Jun Zhang, Shaohua Wang, Xiao-Feng Chen

**LIMITANTE:** Faltan estudios de referencias estándar de material particulado en PBMCs de pacientes con artritis reumatoide



Sigaux *et al.*, 2019

Available online at

**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France

**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com/en](http://www.em-consulte.com/en)

Review

**Air pollution as a determinant of rheumatoid arthritis**

Johanna Sigaux<sup>a,b,c,\*</sup>, Jérôme Biton<sup>a,b</sup>, Emma André<sup>a,b,c</sup>, Luca Semerano<sup>a,b,c</sup>, Marie-Christophe Boissier<sup>a,b,c</sup>

**¿Material particulado- Artritis Reumatoide- Colombia?**

Weidong Wu *et al.*, 2020

Clinical reviews in allergy and immunology

**Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter**

Weidong Wu, PhD,<sup>a\*</sup> Yuefei Jin, MD,<sup>b\*</sup> and Chris Carlsen, MD, MPH<sup>c\*</sup> *Xinxiang and Zhengzhou, China, British Columbia, Canada*



National Institute of Standards & Technology

## Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1649b

Urban Dust

	Mass Fractions <sup>(a)</sup> (mg/kg)
4H-Cyclopenta[def]phenanthrene <sup>(b,c,d,e,f)</sup>	0.255 ± 0.023
Pyrene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	4.98 ± 0.14
1-Methylfluoranthene <sup>(b,c,e,g)</sup>	0.114 ± 0.015
3-Methylfluoranthene <sup>(b,c,e,g)</sup>	0.328 ± 0.031
1-Methylpyrene <sup>(b,c,c,g)</sup>	0.363 ± 0.005
Retene <sup>(b,c,c,g)</sup>	0.238 ± 0.011
Benzo[c]phenanthrene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	0.460 ± 0.013
Chrysene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	3.045 ± 0.028
Triphenylene <sup>(f,g)</sup>	1.324 ± 0.004
Benzo[b]fluoranthene <sup>(b,d,f)</sup>	6.18 ± 0.18
Benzo[j]fluoranthene <sup>(b,d,f)</sup>	1.725 ± 0.043
Benzo[k]fluoranthene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	1.702 ± 0.049
Benzo[e]pyrene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	2.974 ± 0.053
Perylene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	0.614 ± 0.011
Indeno[1,2,3-cd]pyrene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	2.89 ± 0.16
Dibenz[a,j]anthracene <sup>(b,c,e,f,g)</sup>	0.305 ± 0.027
Benzo[b]chrysene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	0.339 ± 0.043
Picene <sup>(b,c,d,e,f,g)</sup>	0.399 ± 0.022
Dibenzo[b,k]fluoranthene <sup>(b,c,e,f,g)</sup>	0.670 ± 0.053
Dibenzo[a,e]pyrene <sup>(b,c,c,f,g)</sup>	0.567 ± 0.025

<i>trans</i> -Chlordane (γ-Chlordane) <sup>(a,b)</sup>	51.9	±	9.0
<i>trans</i> -Nonachlor <sup>(a,b)</sup>	33.7	±	6.1
4,4'-DDE <sup>(c,d)</sup>	50.7	±	0.4
4,4'-DDD <sup>(c,d)</sup>	37.7	±	3.1

3-Nitrophenanthrene	21.8	±	1.2
9-Nitrophenanthrene	1.77	±	0.07
2-Nitrofluoranthene	304	±	25
3-Nitrofluoranthene	4.67	±	0.35
1-Nitropyrene	74.8	±	1.9
2-Nitropyrene	10.9	±	0.1
7-Nitrobenz[a]anthracene	24.4	±	0.4
6-Nitrochrysene	3.60	±	0.21

PCB 49	(2,2',4,5'-Tetrachlorobiphenyl) <sup>(b,c)</sup>	9.1	±	1.7
PCB 52	(2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl) <sup>(b,c)</sup>	24.3	±	6.1
PCB 101	(2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl) <sup>(b,c,d)</sup>	56.4	±	5.2
PCB 105	(2,3,3',4,4'-Pentachlorobiphenyl) <sup>(b,c,d)</sup>	10.0	±	1.0
PCB 110	(2,3,3',4',6-Pentachlorobiphenyl) <sup>(b,c)</sup>	33.7	±	5.0
PCB 149	(2,2',3,4',5',6-Hexachlorobiphenyl) <sup>(b,d)</sup>	79.4	±	3.2
PCB 151	(2,2',3,5,5',6-Hexachlorobiphenyl) <sup>(c,d)</sup>	33.4	±	3.6
PCB 153	(2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl) <sup>(b,d)</sup>	76.6	±	0.4
PCB 163	(2,3,3',4',5,6-Hexachlorobiphenyl) <sup>(c,d)</sup>	22.2	±	0.3
PCB 183	(2,2',3,4,4',5',6-Heptachlorobiphenyl) <sup>(c,d)</sup>	17.2	±	1.5
PCB 187	(2,2',3,4',5,5',6-Heptachlorobiphenyl) <sup>(b,c,d)</sup>	39.3	±	2.8
PCB 194	(2,2',3,3',4,4',5,5'-Octachlorobiphenyl) <sup>(c,d)</sup>	28.5	±	2.8
PCB 206	(2,2',3,3',4,4',5,5',6-Nonachlorobiphenyl) <sup>(c,d)</sup>	17.0	±	2.1

Cadmium <sup>(a)</sup>	26.10	±	0.28
Lead <sup>(a)</sup>	12864	±	62
Mercury <sup>(b)</sup>	1.80	±	0.04

- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)
- Nitro HAP
- Congéneres de bifenilos policlorados (PCB)
- Plaguicidas clorados
- Constituyentes inorgánicos Atm



# Casos y controles

Este estudio se realizó dentro de las normas éticas y acorde a la declaración de Helsinki

## Dx previo de AR

Criterios de clasificación de EULAR/ACR del 2010.

Dx inicial antes de empezar el tto. indicado para su enfermedad.

## Controles

**Criterios de exclusión**  
(<18, E, L, PAI, ID y TP)

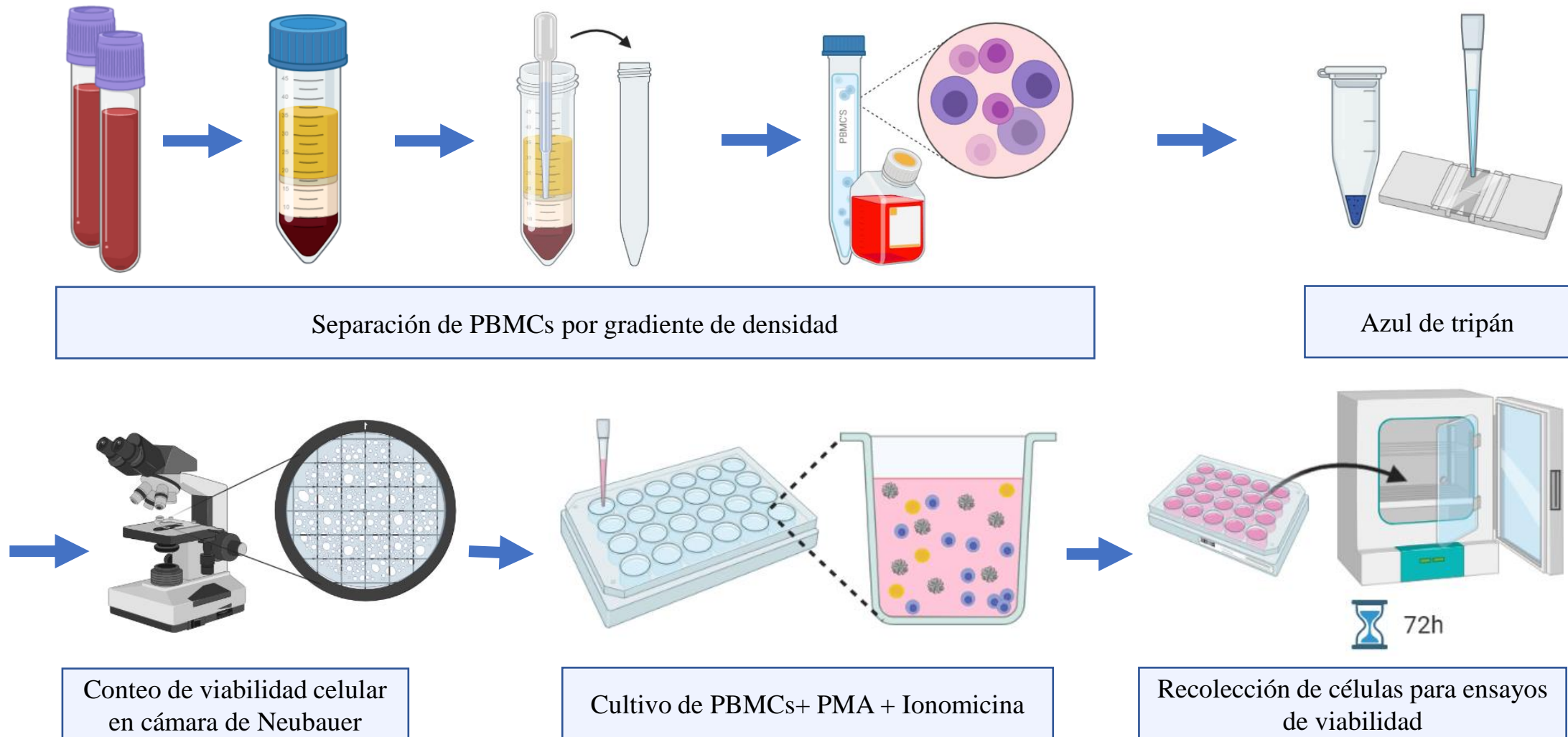
**Criterios de inclusión**  
(>18 y CI Dx AR)

Estudio clínico y serológico (perfil 25 Auto-Acs) para confirmar que los casos no presentan PAI latente y los controles no tuvieran EAI.

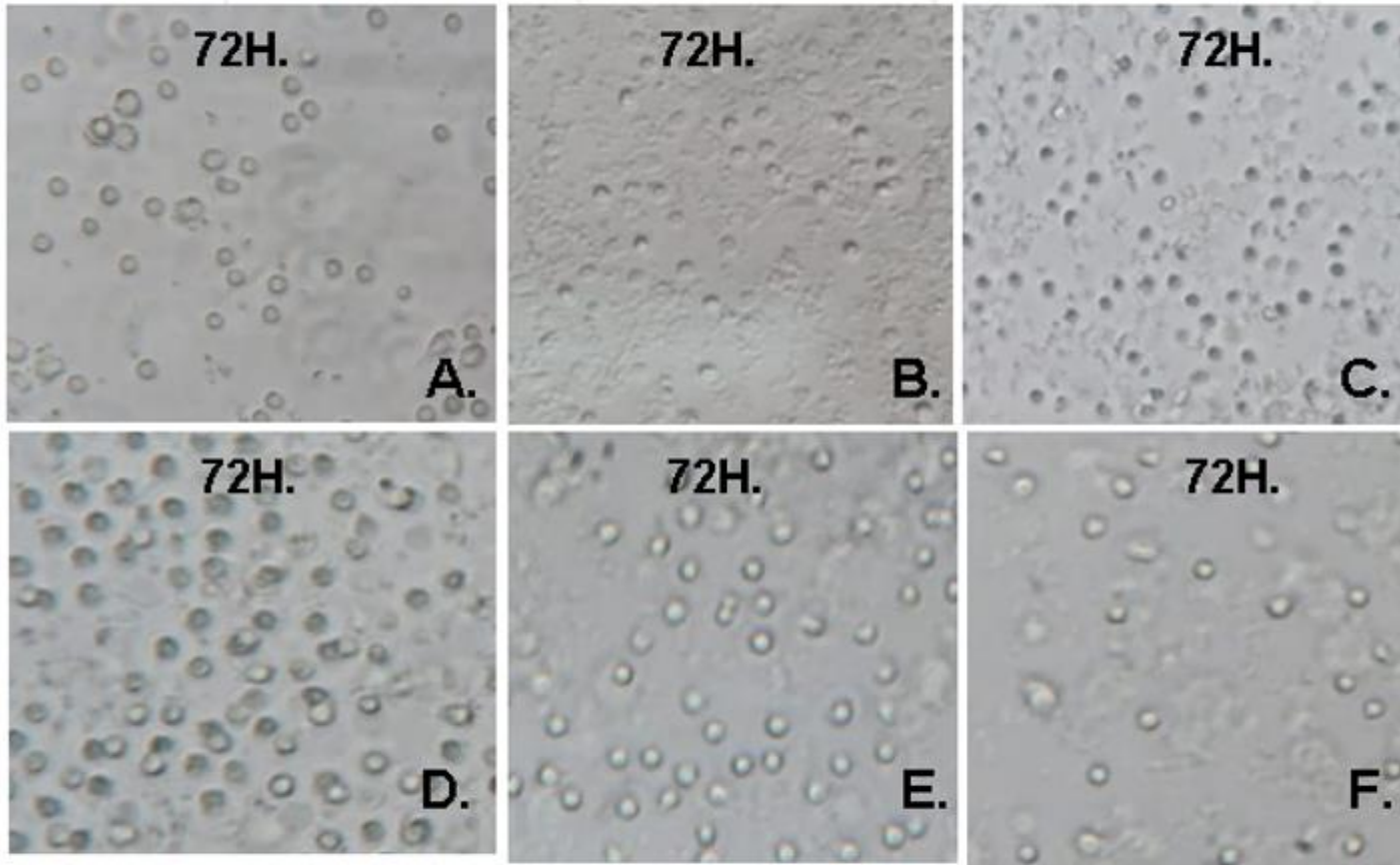
De esta forma para los ensayos *in vitro* el tamaño de muestra de cada grupo correspondió a **2 individuos**.

## Objetivo general:

**Analizar los efectos y las alteraciones biológicas producidas por el material particulado sobre PBMCs de pacientes con artritis reumatoide (AR).**



# Estimulación *in vitro* de PBMCs con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) + Ionomicina de controles

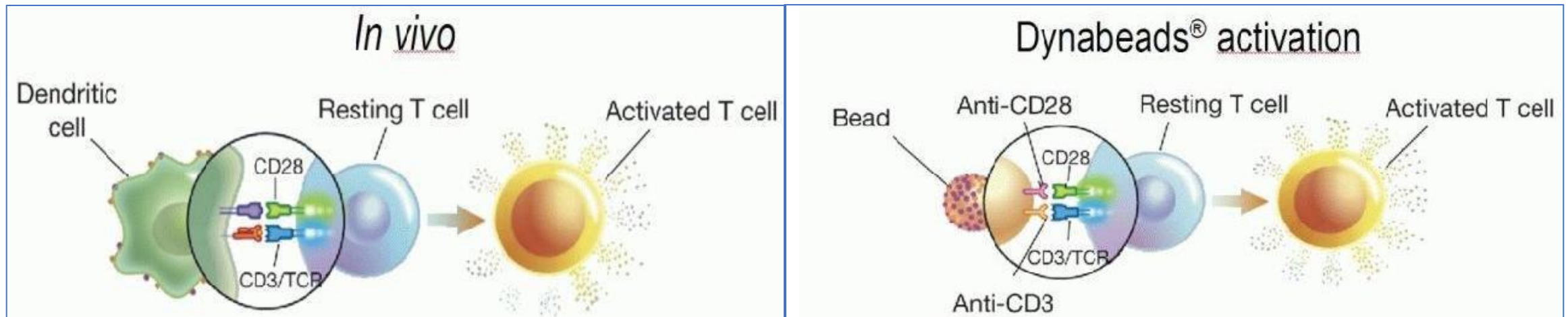
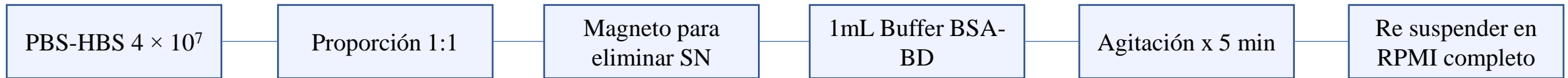


	Ensayo exclusión A.T (72h)
<b>A.</b>	$5.45 \times 10^5$ células
<b>B.</b>	$5.25 \times 10^5$ células
<b>C.</b>	$5.6 \times 10^5$ células
<b>D.</b>	$5.61 \times 10^5$ células
<b>E.</b>	$5.1 \times 10^5$ células
<b>F.</b>	$2.1 \times 10^5$ células

No había activación ni proliferación celular y el PMA+ Ionomicina estaba disminuyendo la viabilidad de los PBMCs

**A.** SE **B.** 25ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **C.** 50 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **D.** 100 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **E.** 200 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **F.** 500 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina.

# Mitógenos Ac monoclonal (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell expansion and activation)



<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11161D>

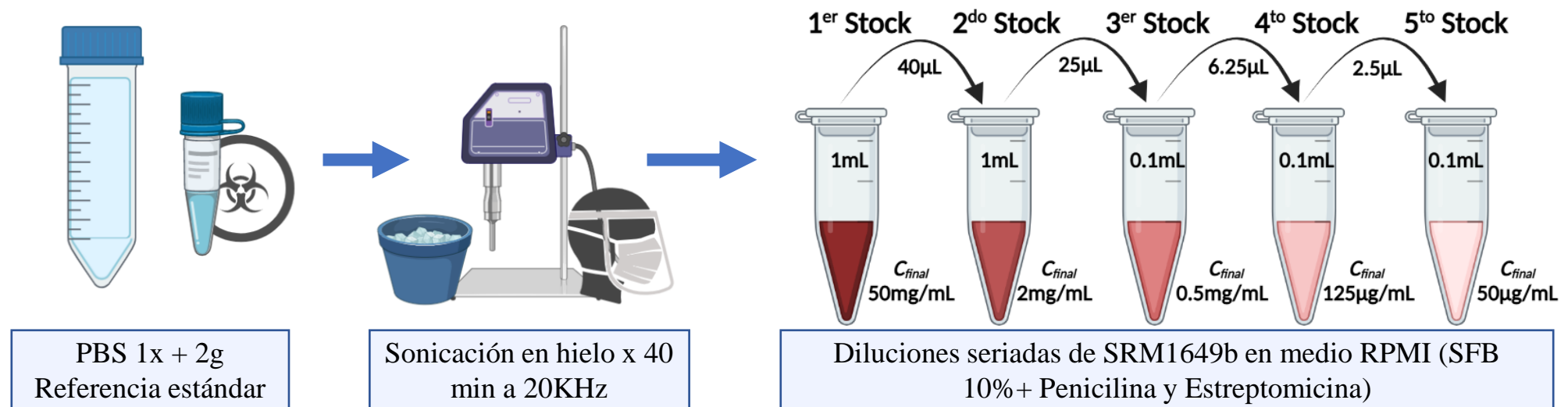
Células activadas que retienen una función similar a la *in vivo*

## Objetivos específicos:

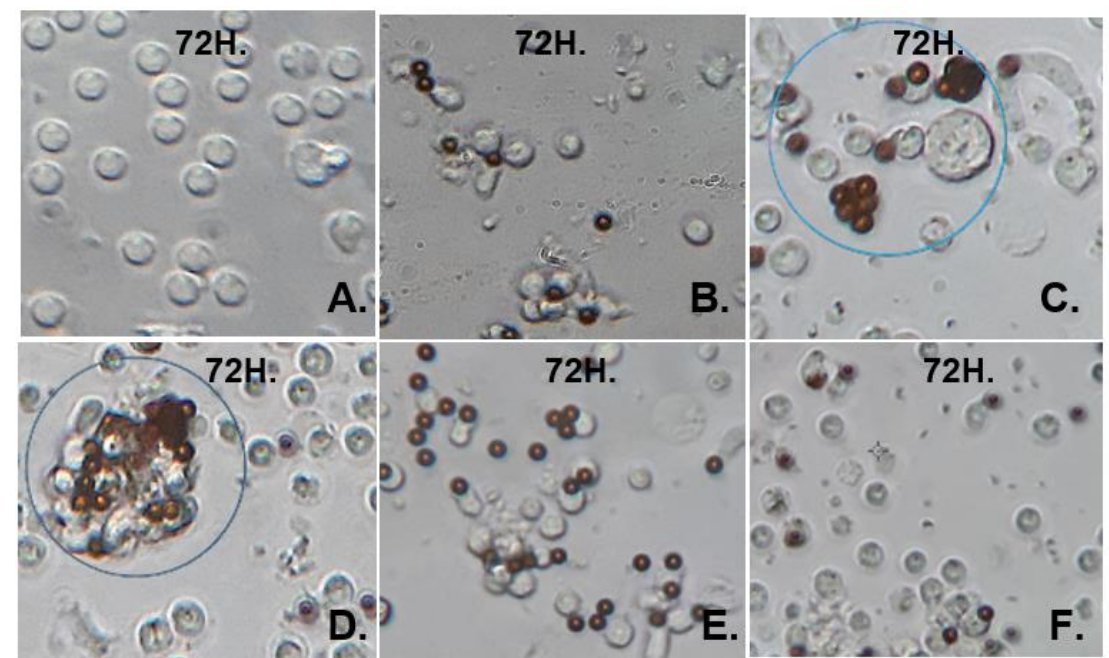
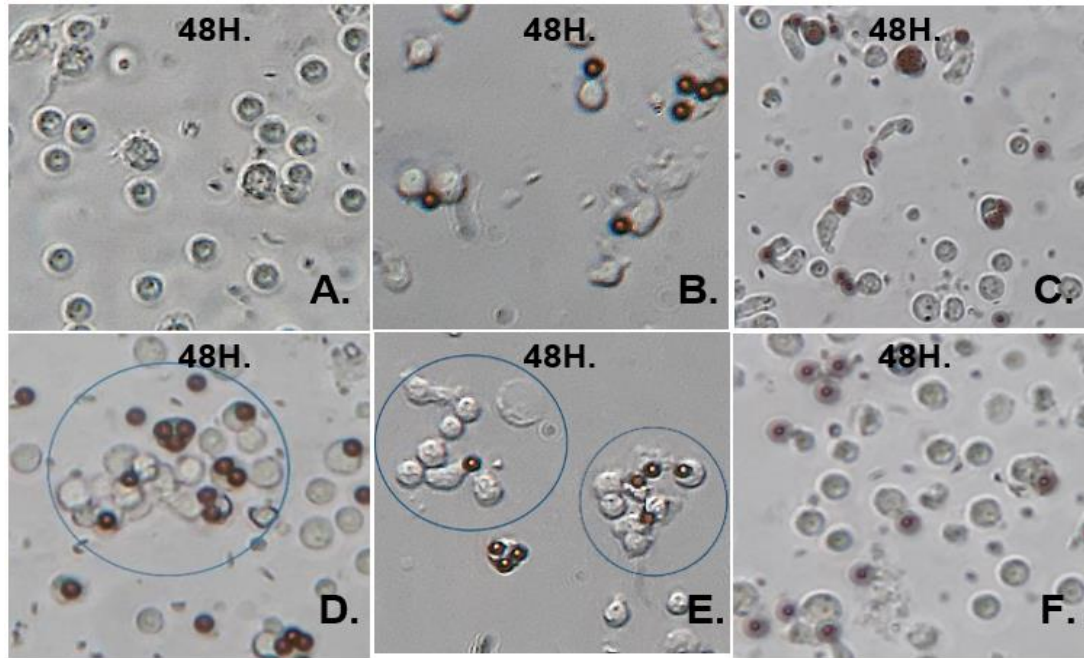
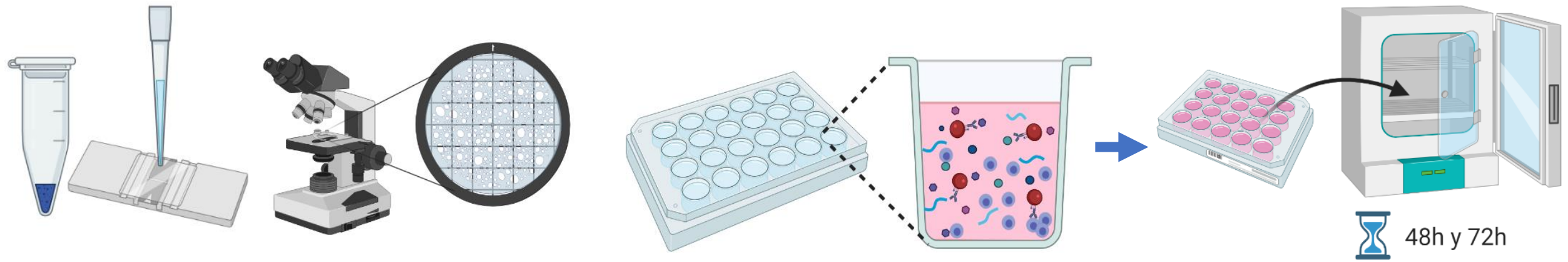
### 1. Estudiar el efecto del material particulado en la viabilidad de las células de pacientes con artritis reumatoide

## Preparación Urban dust NIST SRM 1649b / Estimulación *in vitro* mitógeno junto con el contaminante SRM1649b controles

La literatura menciona que para cultivos celulares la referencia SRM1649b se debe usar a concentraciones entre 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$



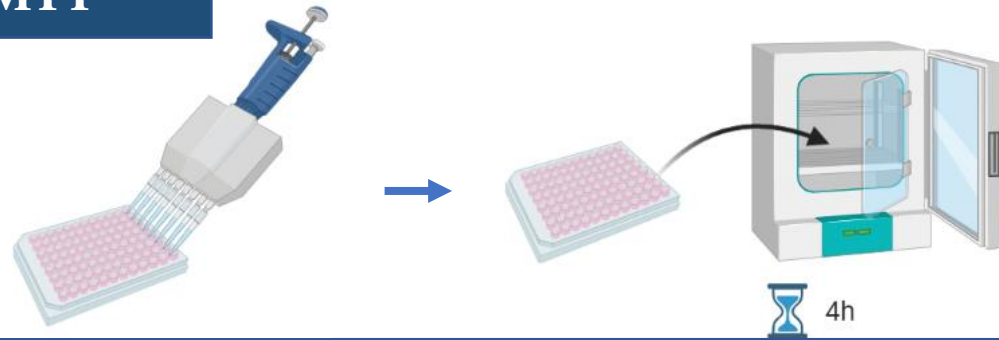




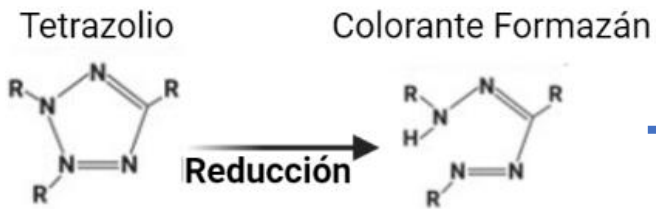
**A.** SE **B.** CD3/CD28 **C.** CD3/CD28 y SRM1649B 50 µg/mL **D.** CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL **E.** CD3/CD28 y SRM1649B 2.5 µg/mL **F.** CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL.

# Ensayo de citotoxicidad y viabilidad a concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante

## MTT



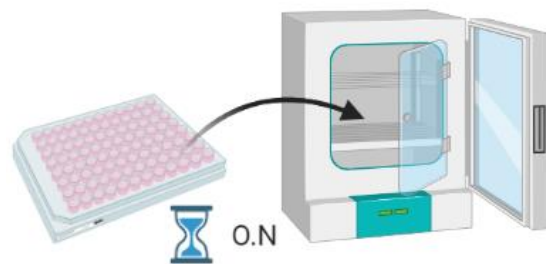
10µL MTT (0.5mg/mL) e incubación para ejercer reacción



Reacción colorimétrica



Solución solubilizadora.

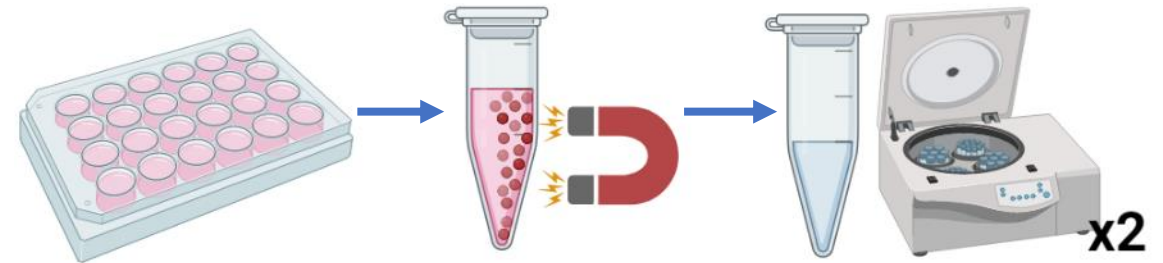


Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>



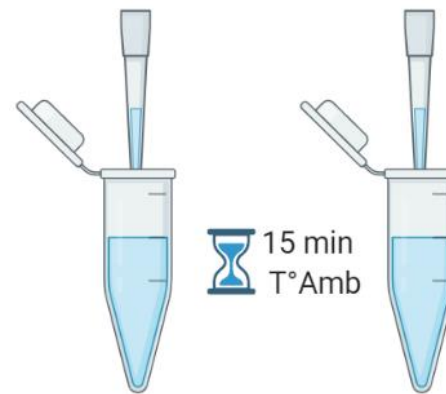
L 595nm y C 655nm

## Anexina/ 7AAD

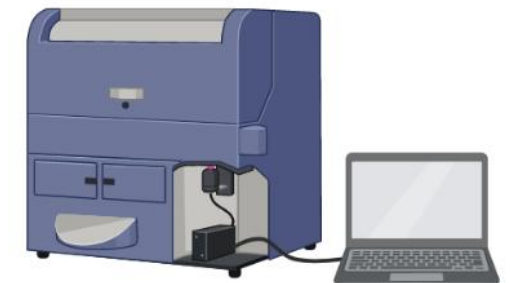


Eliminación de perlas

Lavado con PBS 1X y Centrifugar



50µL B. bind. A.+ 5µL Anex + 5µL 7AAD+ 100µL sln FACS flow

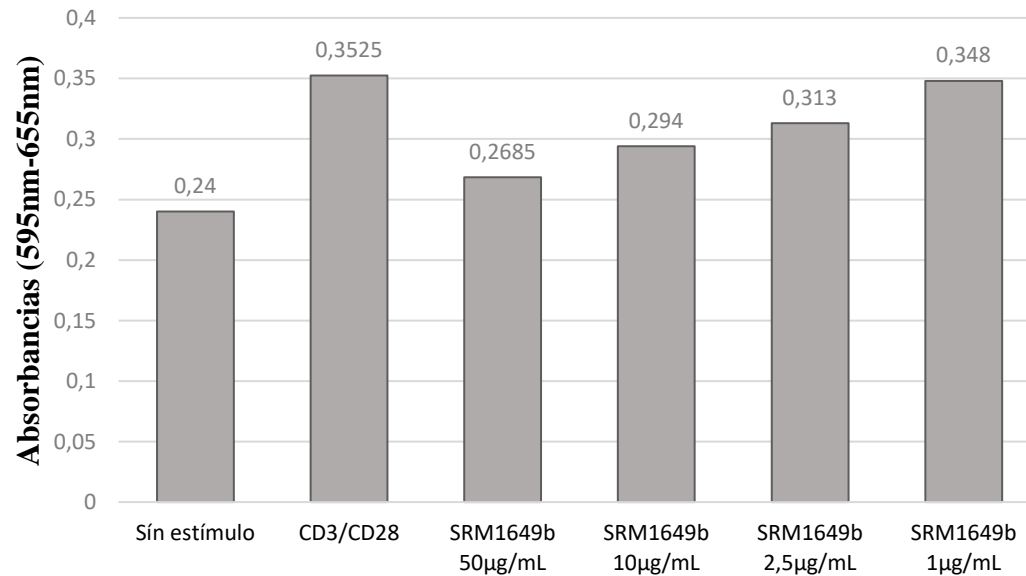


Lectura en FASCantoII, BD Biosystems

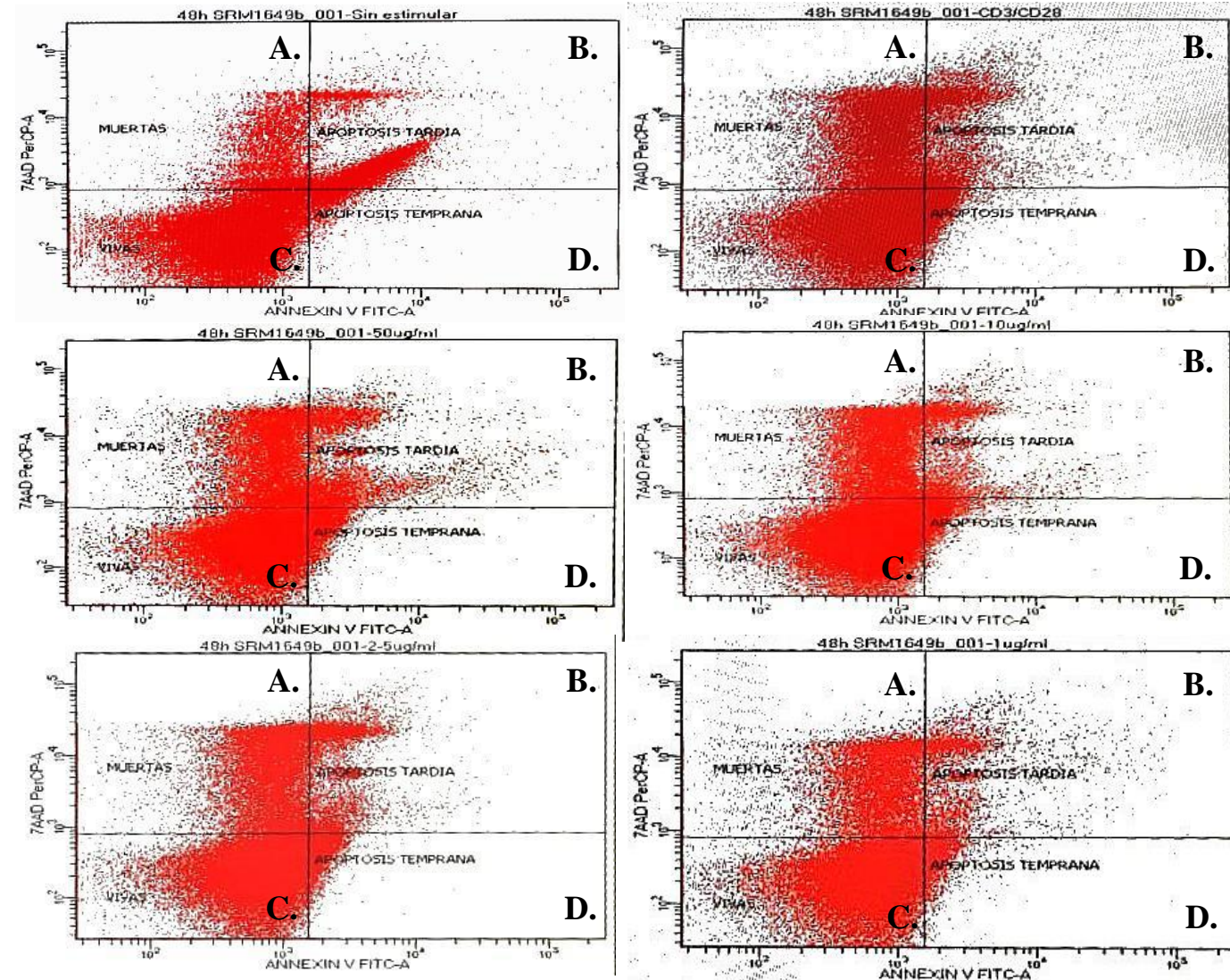


# Ensayo de citotoxicidad con MTT y viabilidad (Anexina/7AAD) a concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante

Ensayo de Citotoxicidad

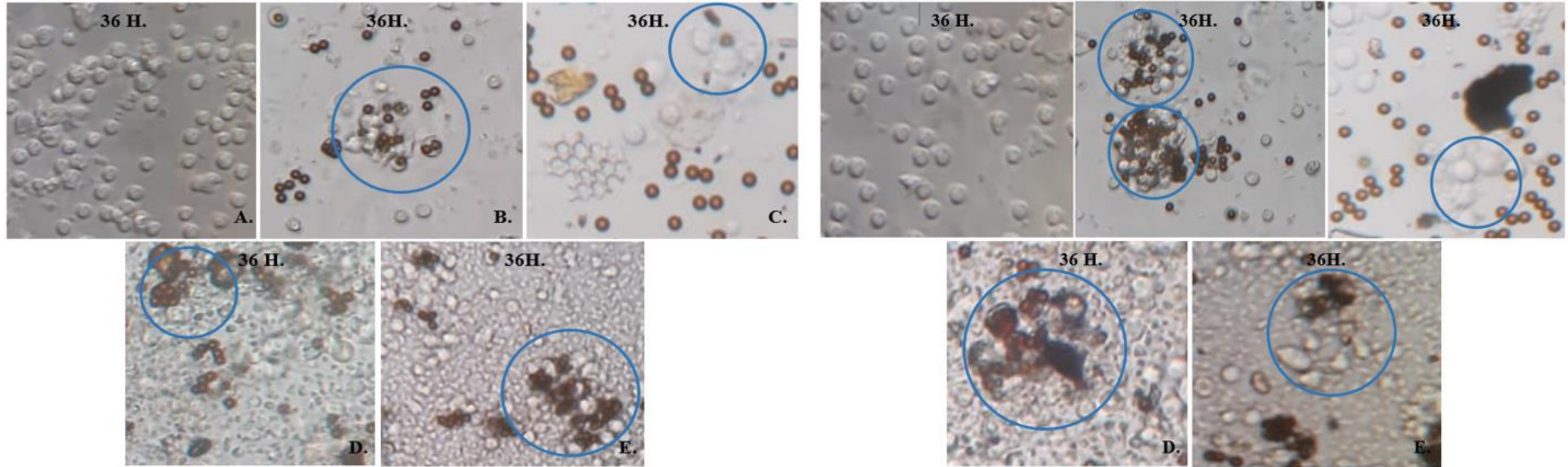


Absorbancias ensayo MTT con sus respectivas correcciones como lo sugirió el KIT



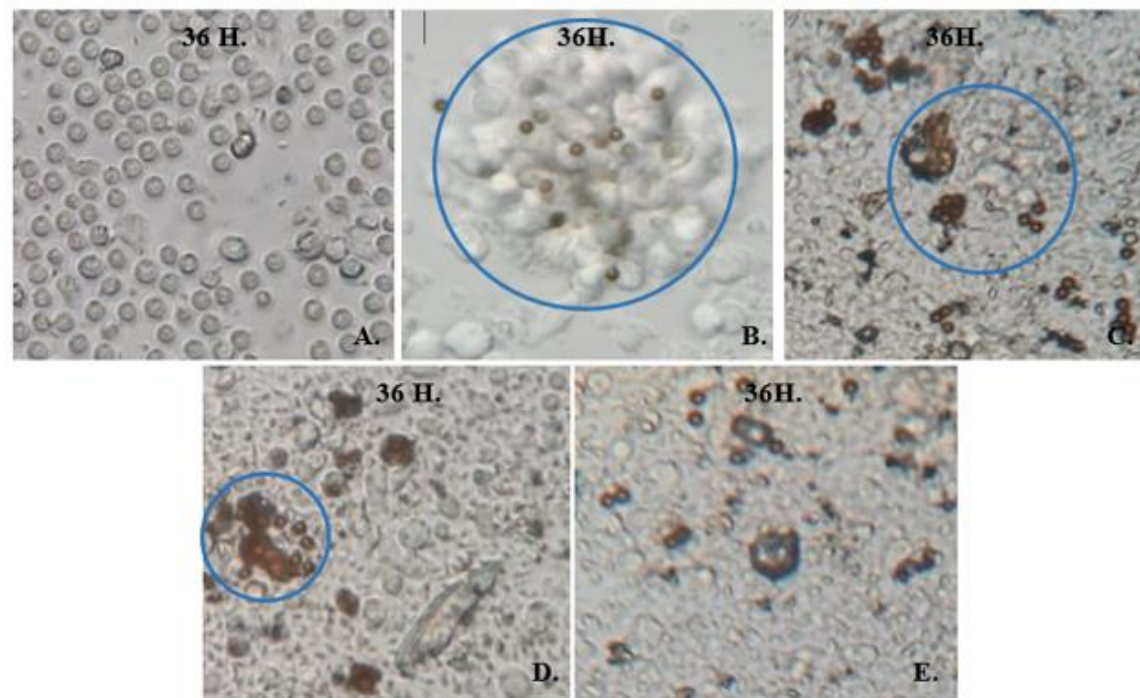
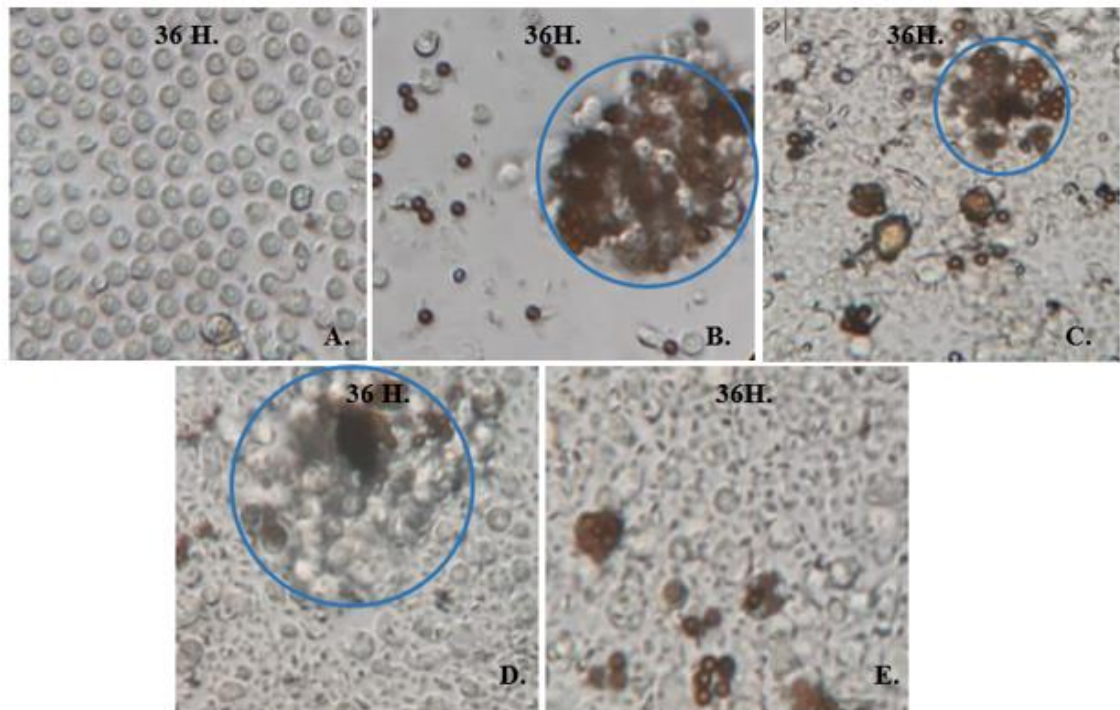
Citometría de flujo A. Células muertas B. Células en apoptosis tardía C. Células vivas D. Células en apoptosis temprana

# Ensayo de viabilidad a concentraciones de 100µg/mL, 10µg/m y 1 µg/mL del contaminante en casos y controles



**Casos con artritis reumatoide.** A. SE B. CD3/CD28 C. CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL D. CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL E. CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL. Imagen izquierda primer caso AR, imagen derecha segundo caso AR. Los círculos representan la activación de linfocitos





**Controles** A. SE B. CD3/CD28 C. CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL D. CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL E. CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL. Imagen izquierda primer control, imagen derecha segundo control. Los círculos representan la activación de linfocitos

2 x10 <sup>6</sup> células	Ensayo exclusión A.T (36h) a 100 µg/mL
1 caso AR	1.97 x10 <sup>6</sup> células
2 caso AR	2 x10 <sup>6</sup> células
1 Control	1.94 x10 <sup>6</sup> células
2 Control	2.05 x10 <sup>6</sup> células



## Objetivos específicos:

2. Identificar las alteraciones producidas por el material particulado en la síntesis de citoquinas pro y anti-inflamatorias en células de pacientes con artritis reumatoide.

IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , MCP-1, CCL5/RANTES, TNF

Respuesta adaptativa e Inflamación

IL-5, IL-8/CXCL8, GM-CSF, G-CSF e IFN- $\alpha$

Rta. Innata ( Incluye Granulocitos)

IL-6 y IL-9

Rta. Humoral (LB y Acs)

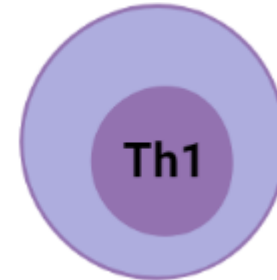
IL-10

Respuesta anti-inflamatoria

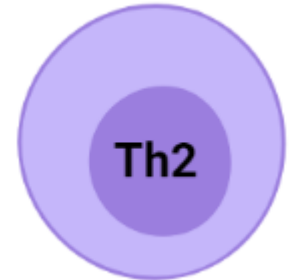
IL-17A, IL-6 y TNF- $\alpha$



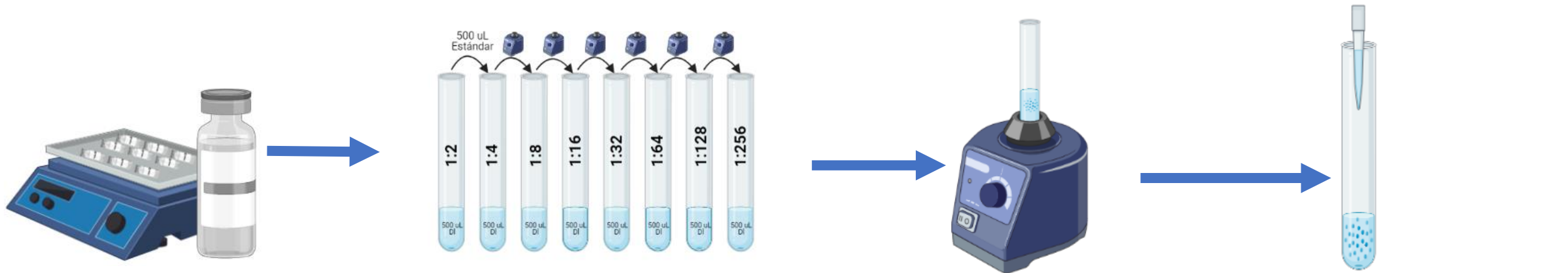
IFN- $\gamma$



IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13



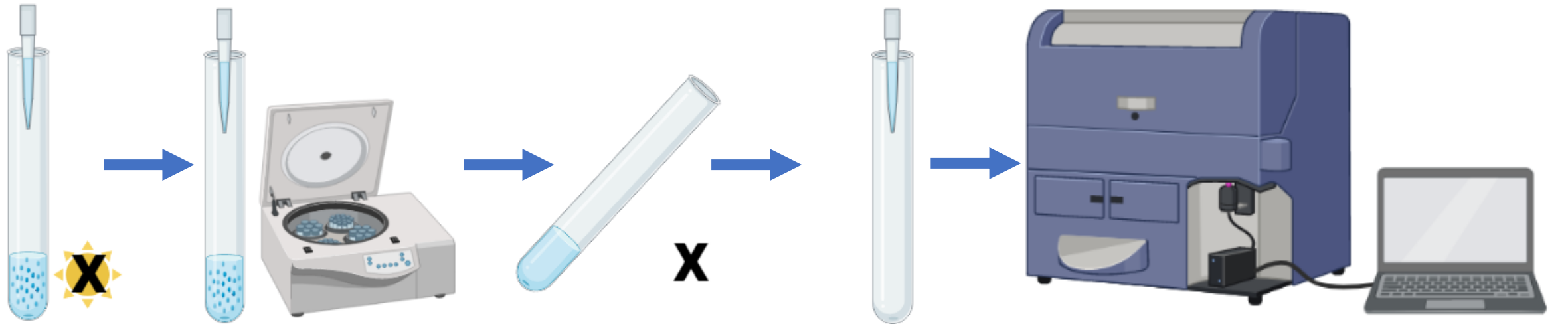
# Determinación de citoquinas por *Cytometric Bead Array* (CBA)



Reconstitución estándar

Se agregó el DE, dils. Seriadas del estándar. Concentración aproximada de la citoquina en cada dilución

Agitación 10-15seg beads, se agregaron 50µL beads captura+ 50µL S. cult. x 1h a T° amb



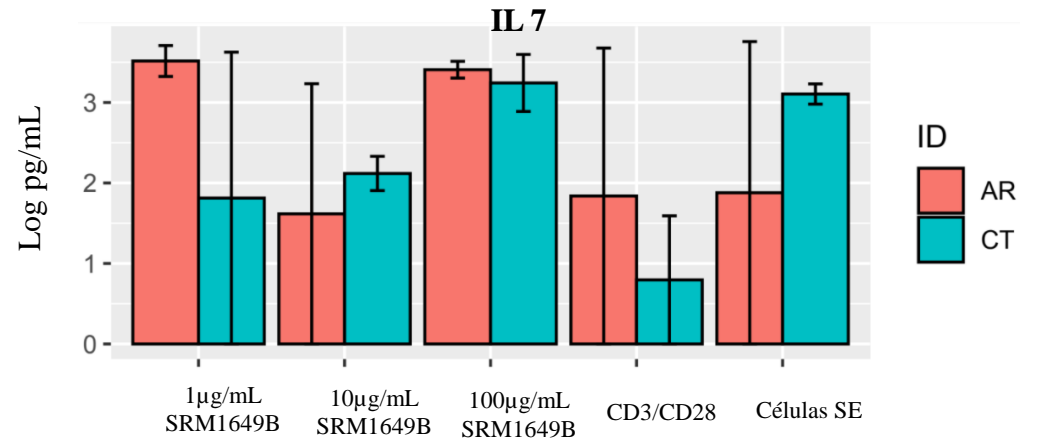
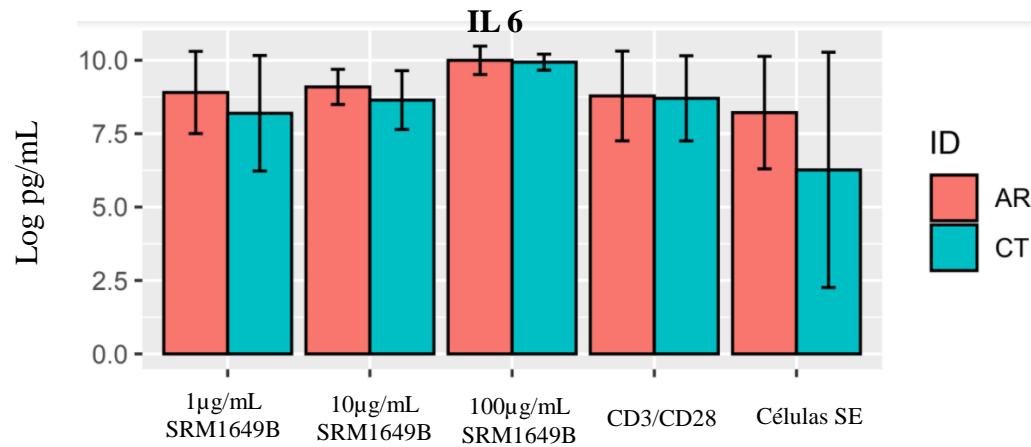
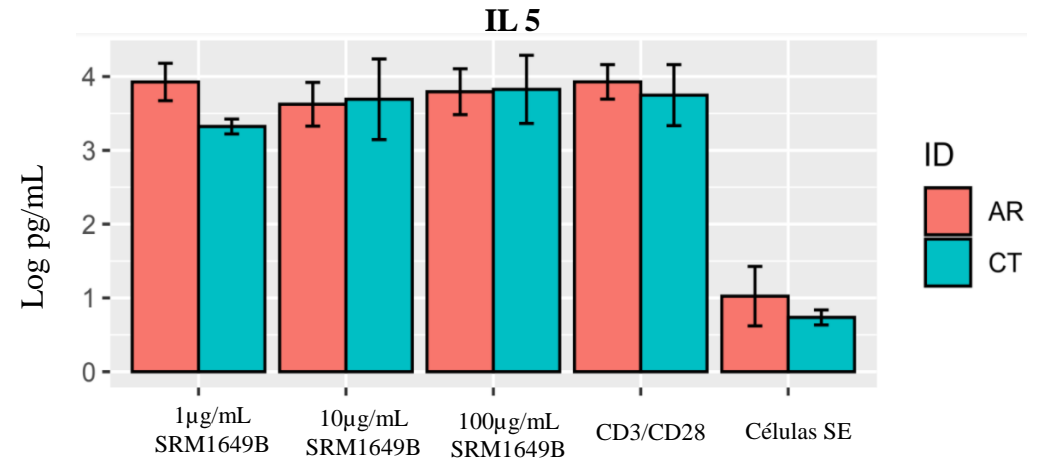
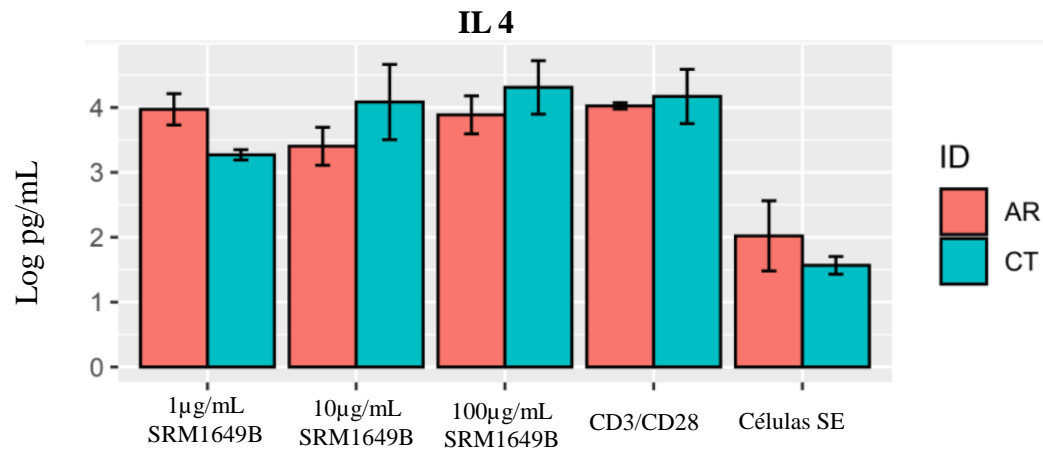
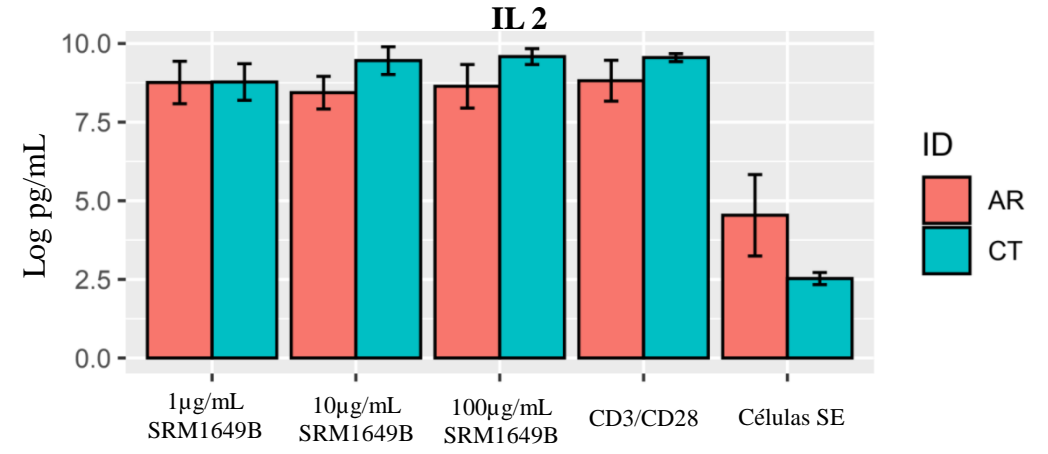
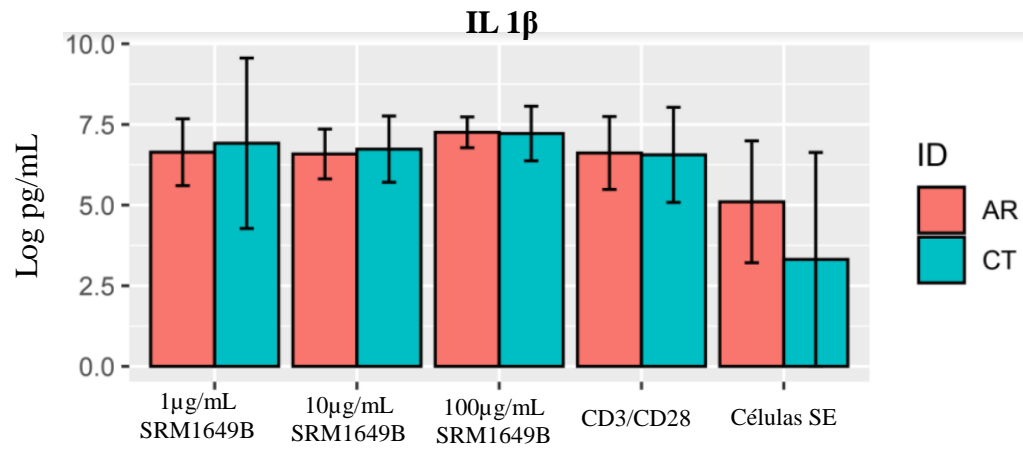
R. Det Ck, Incubó 2h a 4°C

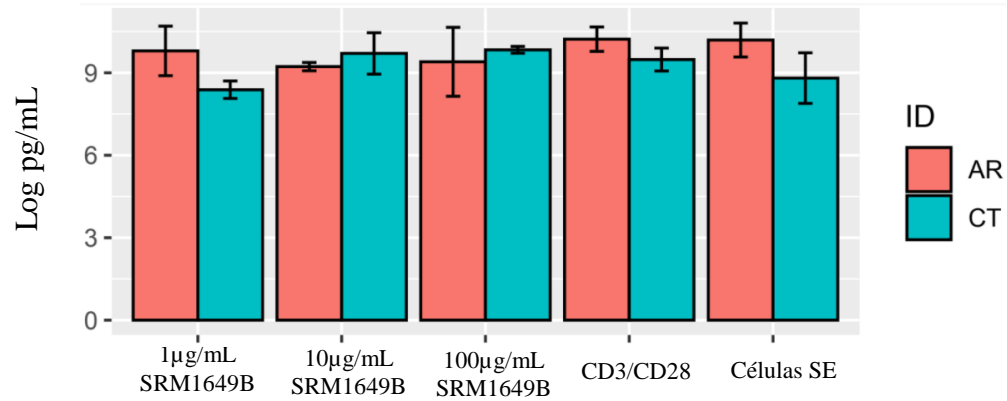
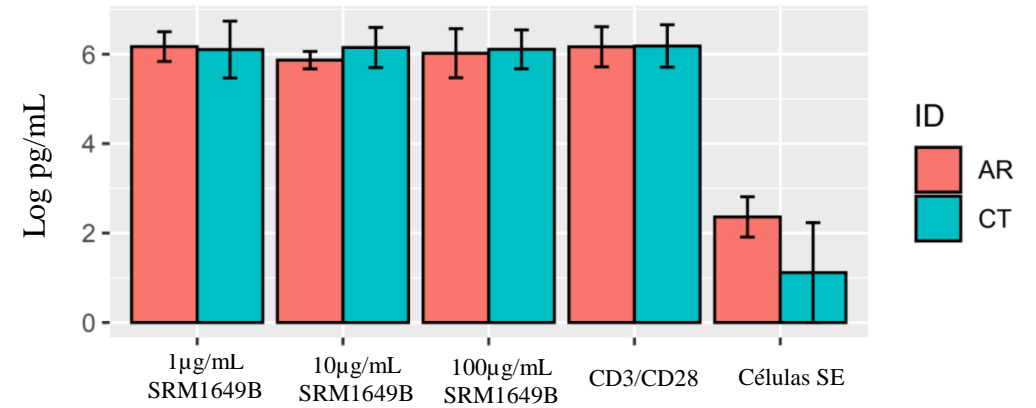
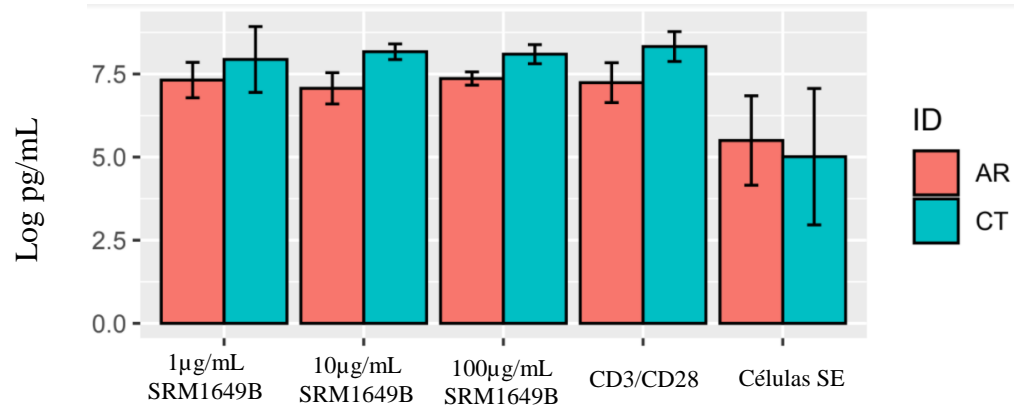
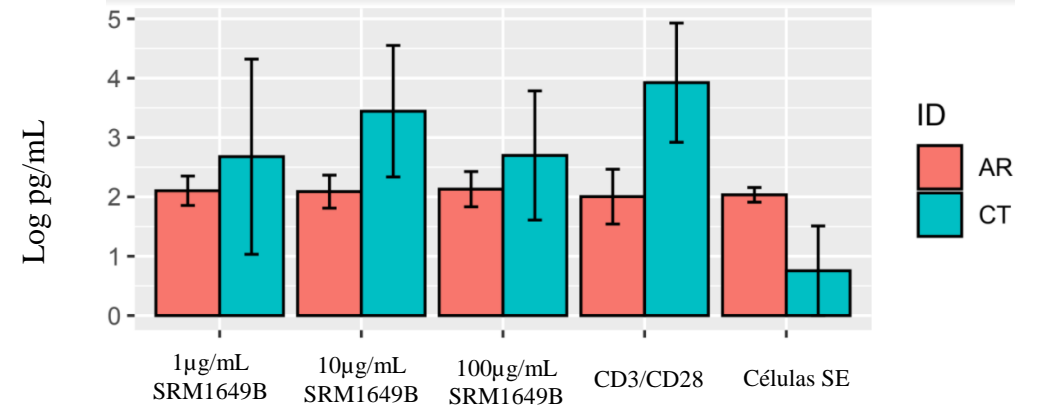
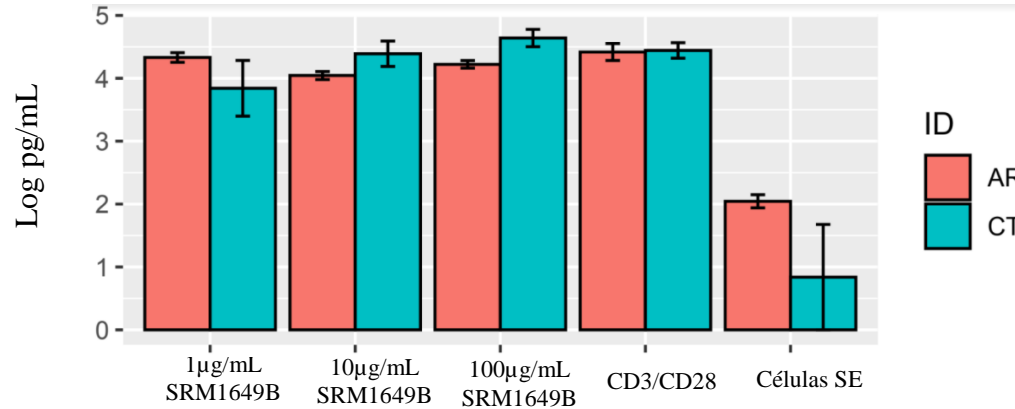
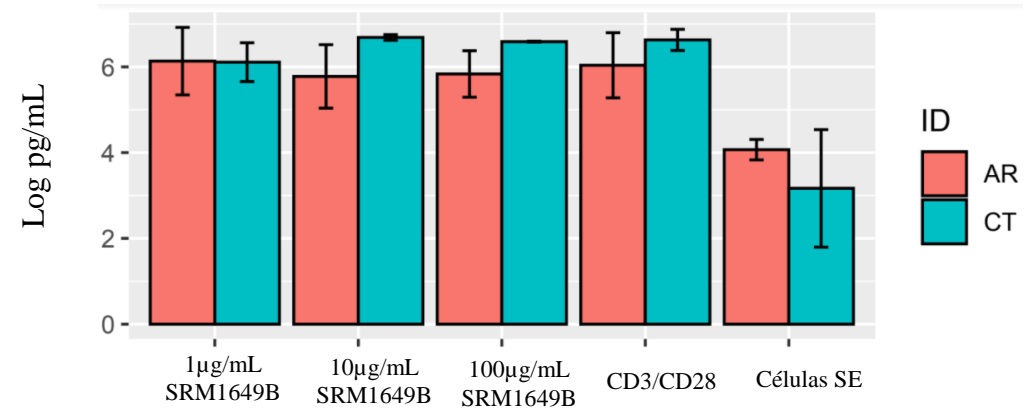
1mL W.B y se centrifugó 200g x5' a 4°C

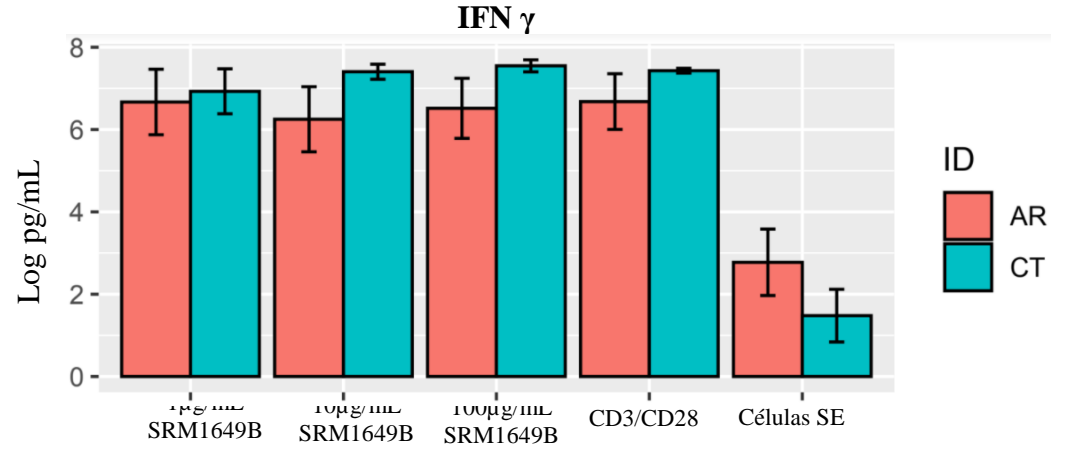
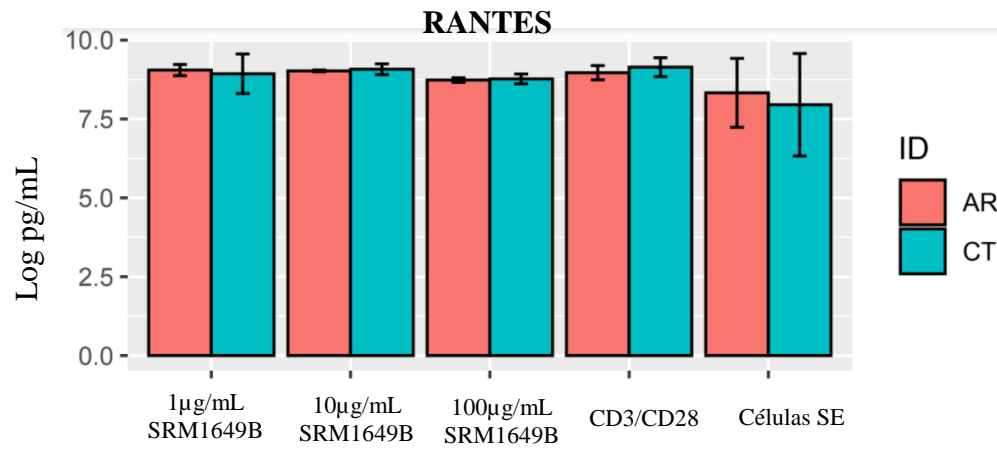
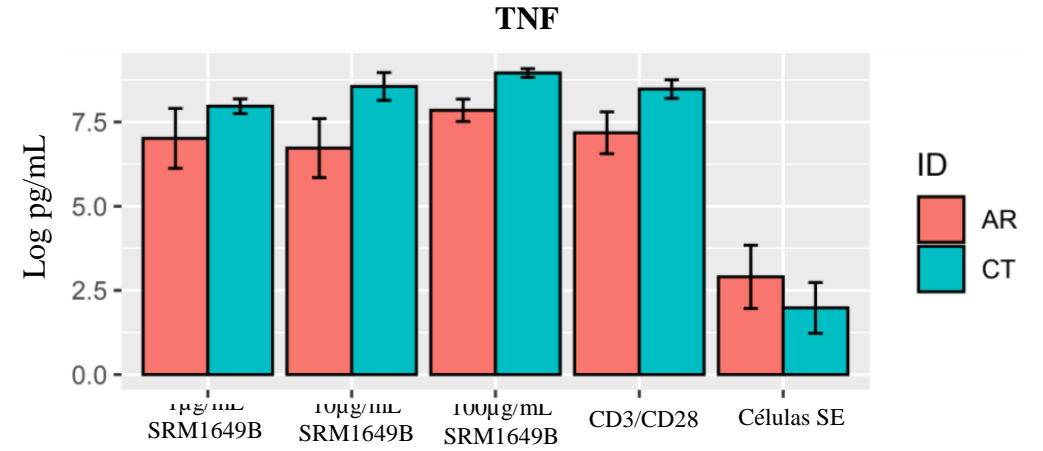
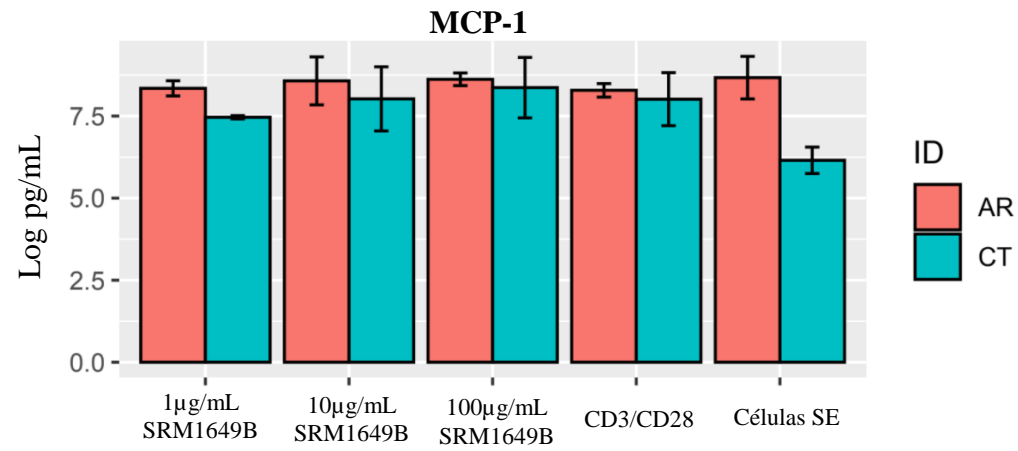
Descartó sobrenadante

1mL W.B para resuspender beads

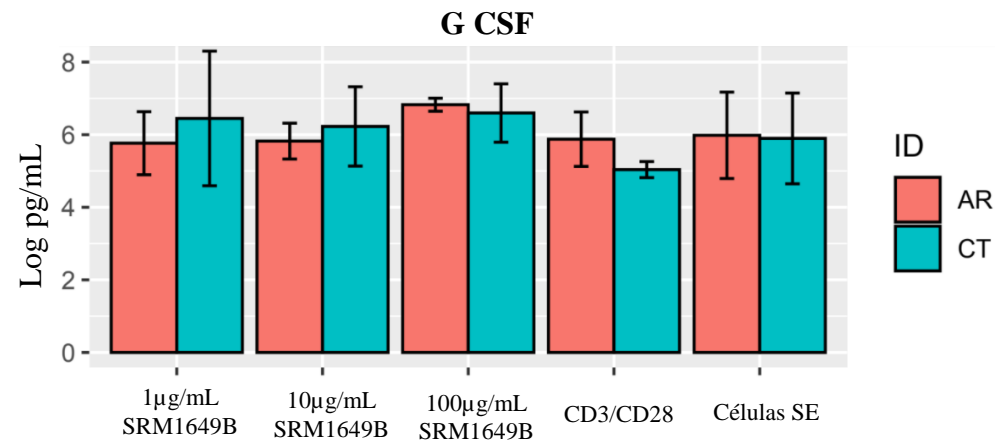
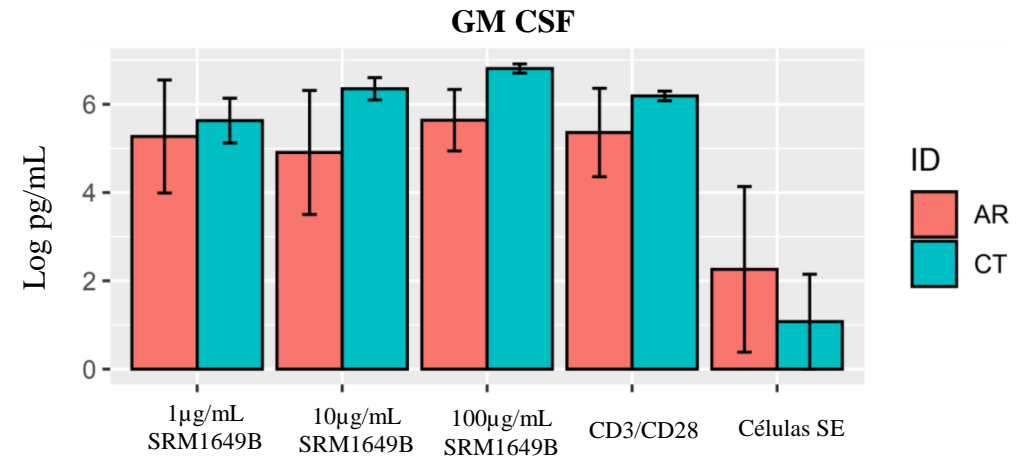
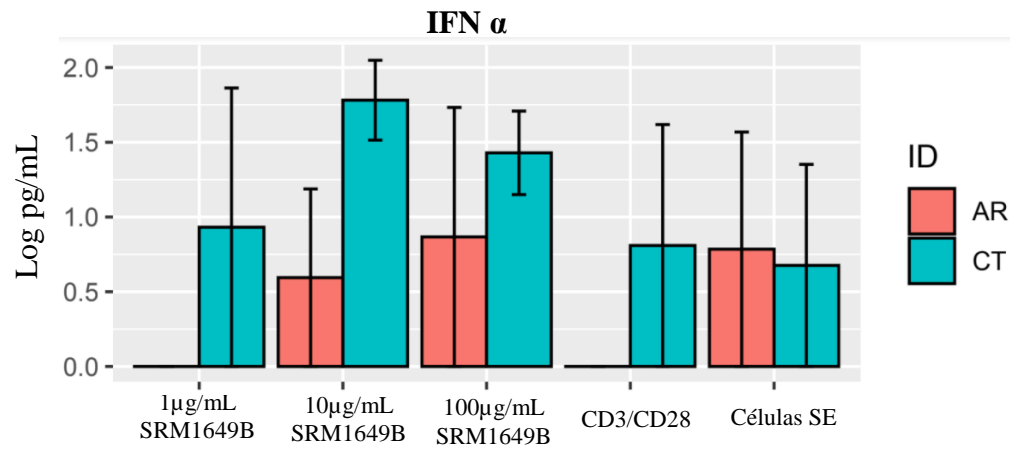
Determinación de citoquinas en FASCantoII, BD Biosystems



**IL 8****IL 9****IL 10****IL12P70****IL 13****IL 17A**

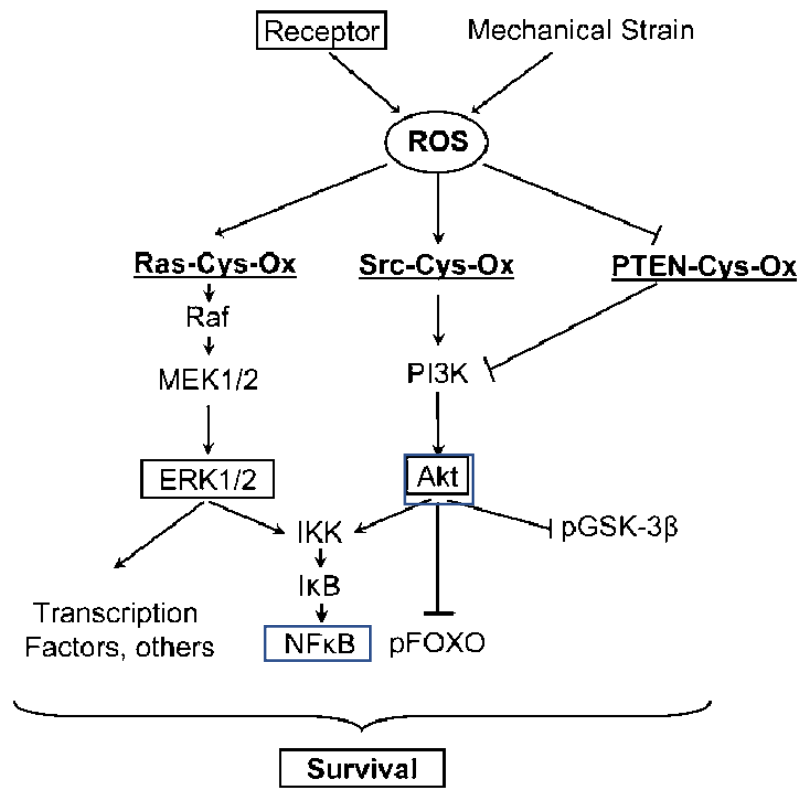
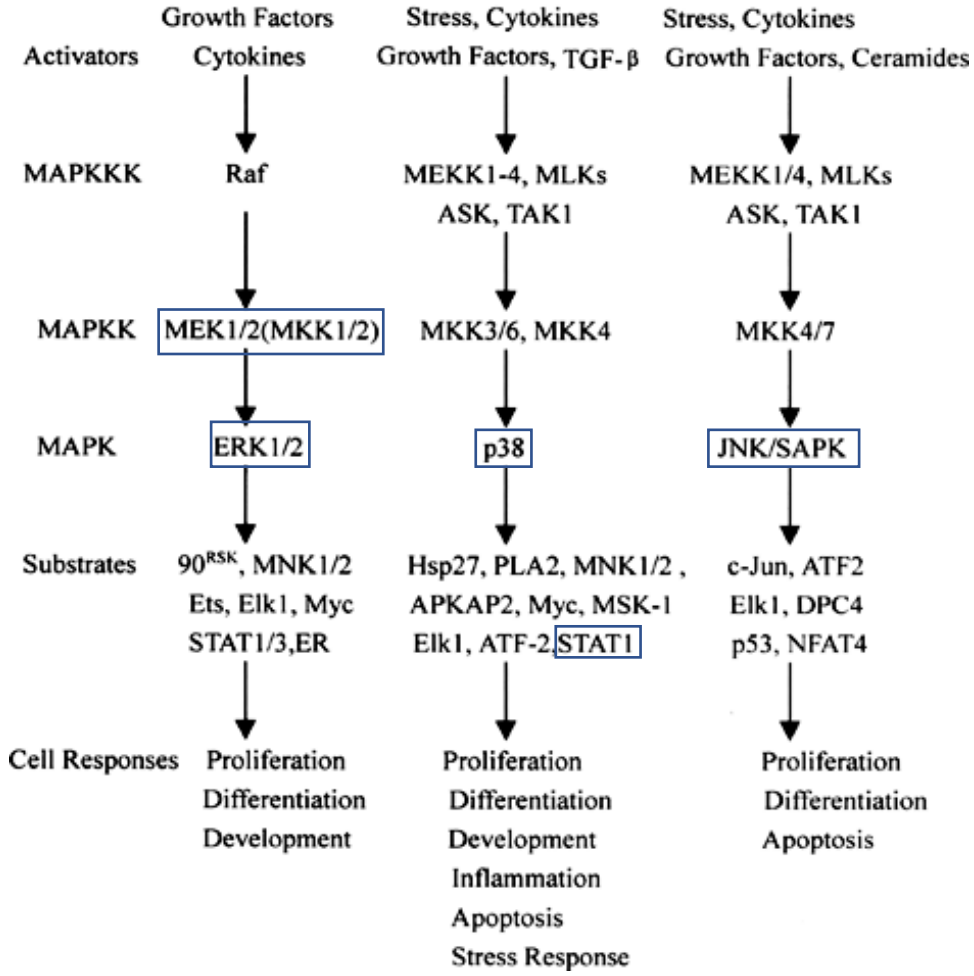






# Objetivos específicos:

## 3. Determinar el efecto del material particulado sobre las vías de señalización en células provenientes de pacientes con artritis reumatoide



Cascada de activación a partir de la fosforilación de residuos aminoácidos de proteínas periféricas e integrales presentes en todas las células nucleadas\*\*\*

ZHANG, W., LIU, H. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Res 12, 9–18 (2002).  
 Kuster, Gabriela & Häuselmann, Stéphanie & Rosc-Schlüter, Berit & Lorenz, Vera & Pfister, Otmar. (2010). Reactive Oxygen/Nitrogen Species and the Myocardial Cell Homeostasis: An Ambiguous Relationship. Antioxidants & redox signaling. 13. 1899-910. 10.1089/ars.2010.3464.

# Lisis celular, SDS-PAGE y Western Blot en células de controles



Centrifugó



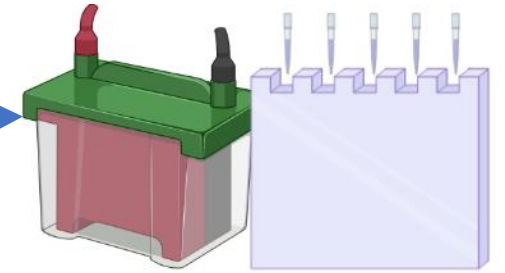
Buffer Lisis + Inhib. y se incubó en hielo



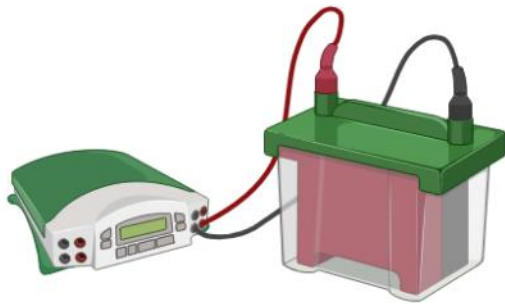
Centrifugó y se preparó la Mx (S.B+B.M+L.C)



Termobloque 100°C x 7 min y spin



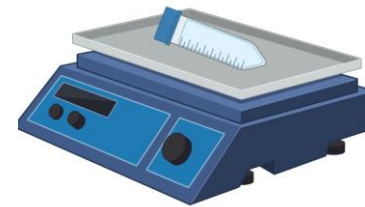
Se pusieron Mx + P.M en G.P al 10%



Corrido SDS-PAGE a 80V-120V



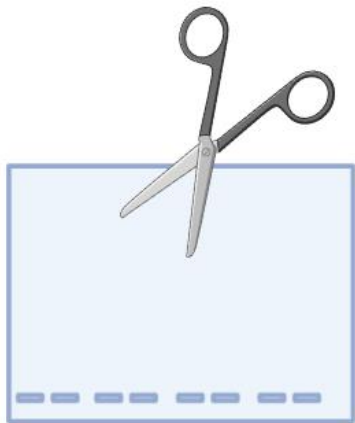
Transferencia membrana PVDF 70 min x 35V



Membrana en sln de bloqueo 2h (BSA/Milk)



Tinción del Gel con azul de comassie



Cortó membrana PVDF



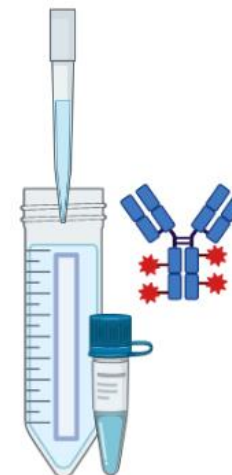
Ac 1rio en solución de bloqueo



Agitación O.N 4°C



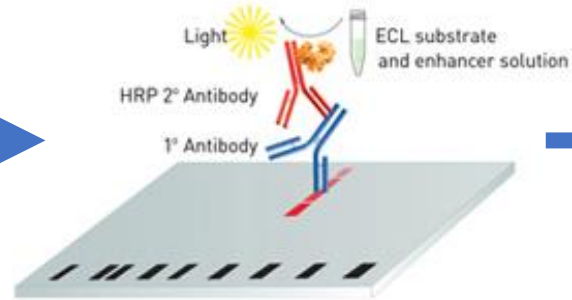
Lavado TBS-T en agitación



Ac 2rio en solución de bloqueo x 2h



Lavado TBS-T y agitación



Kit ECL (Peroxidasas+Luminol)



Digit blot scanner



Lectura membranas en Software Image Studio Digits 5.0



# Estandarización de proteínas totales/basales participantes en vías de señalización

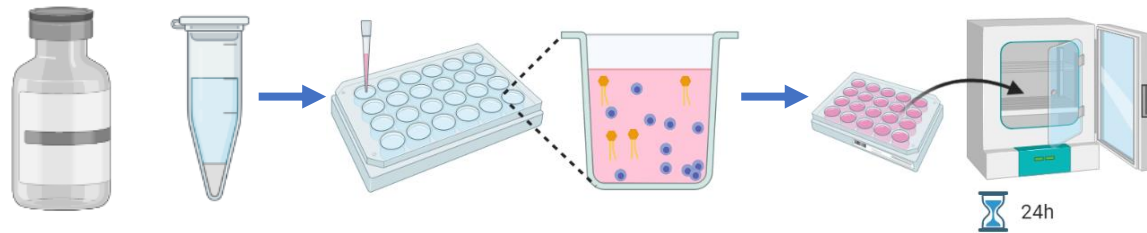
Anticuerpo	Dilución	Peso Molecular (kda)	Bloqueo	Anticuerpo Secundario
Beta Actina #A3853	1/3000	42	Leche	Anti- Mouse
AKT (Pan) (C67E7) Rabbit #4691	1/1000	60	BSA	Anti- Rabbit
p38 MAPK (D13E1) Rabbit #8690	1/1000	40	BSA	Anti- Rabbit
NF-κB p65 (D14E12) Rabbit #8242	1/1000	65	BSA	Anti- Rabbit
JNK1 (2C6) Mouse #3708	1/1000	46	BSA	Anti- Mouse
Stat1 (9H2) Mouse #9176	1/1000	84-91	Leche	Anti- Mouse
(sc-436) MEK-1/2 Antibody (12-B)	1/500	46	Leche	Anti- Rabbit
ERK 2 Anticuerpo (C-14): sc-154	1/500	42	Leche	Anti- Rabbit

Beta actina  
 AKT  
 p38 MAPK  
 NF-κB p65  
 MEK-1/2  
 ERK 2



# Activar vías de señalización a través de Ag/PAMP's y Ac monoclonal

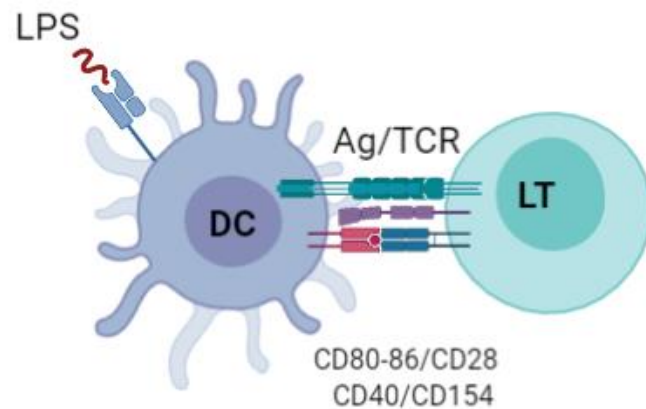
## Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* L4524



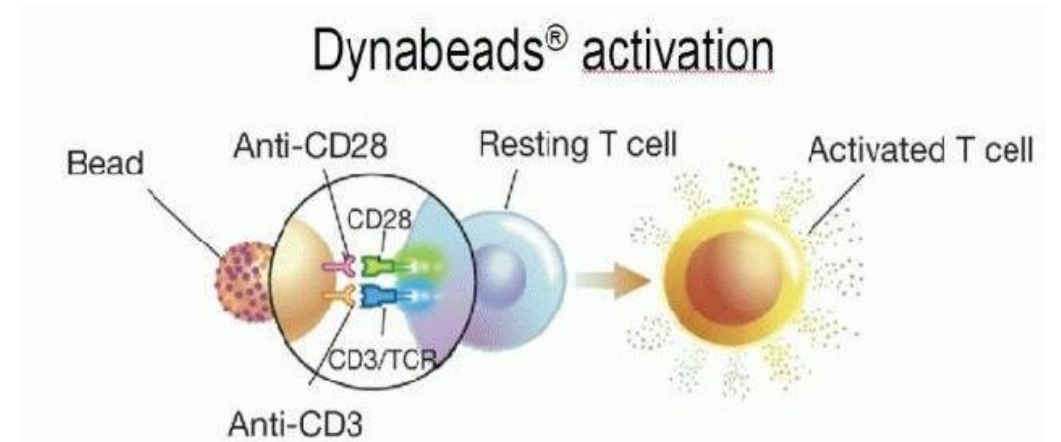
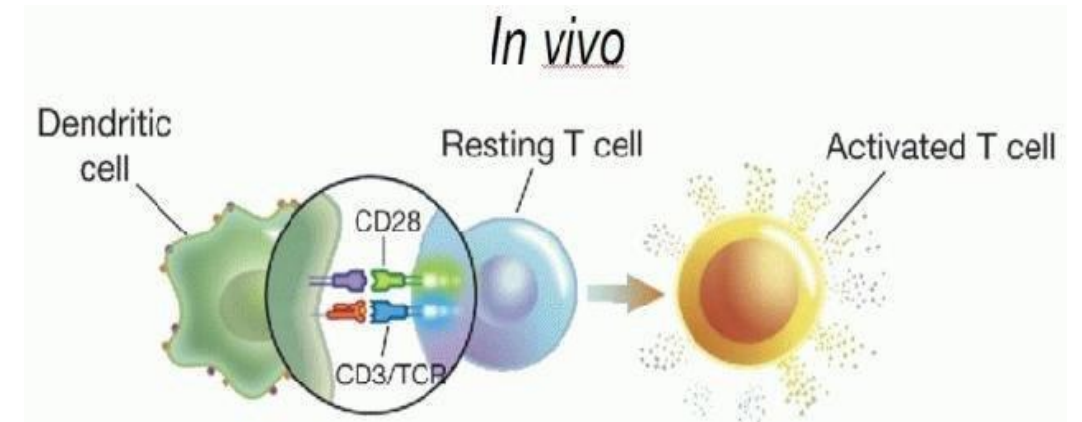
Re suspender  
LPS en PBS

Cultivo PBMCs +  
LPS

Recolección para  
lisis celular

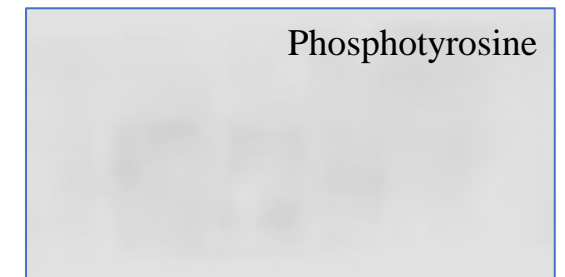
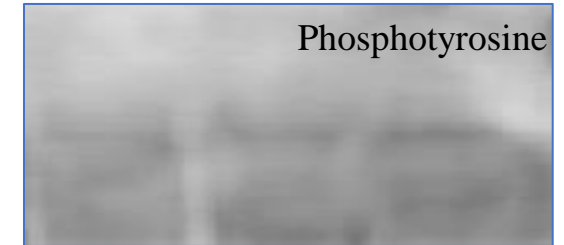


## Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell expansion and activation,



# Estimulación *in vitro* de PBMCs con Lipopolisacáridos y Dynabeads TM Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell de controles

Anticuerpo	Dilución	Peso Molecular (kda)	Bloqueo	Anticuerpo Secundario
Anti-phosphotyrosine Antibody, clone 4G10 ZooMAb® Mouse Monoclonal	1/500	80	BSA	Anti- Mouse
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) Rabbit #4060	1/1000	60	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211	1/1000	43	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (E1Z1T) Mouse #13346	1/1000	65	BSA	Anti-Mouse
Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) Rabbit #9167	1/1000	84-91	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit #4668	1/1000	46	BSA	Anti- Rabbit
p-MEK-1/2 Anticuerpo (Ser 218/Ser 222): sc-7995	1/500	47	Leche	Anti- Goat
p-ERK Anticuerpo (E-4): sc-7383	1/500	43	Leche	Anti- Mouse



# Conclusiones

- La referencia estándar SRM1649b no afecta la viabilidad y la citotoxicidad de las células mononucleares de sangre periférica en casos y controles a concentraciones de un rango entre 1 µg/mL a 100 µg/mL .
- No hay relación significativa entre el aumento de citoquinas pro o anti-inflamatorias asociado a la exposición de determinadas concentraciones (1 µg/mL a 100 µg/mL ) de la referencia estándar SRM1649B en casos y controles.

## **Importancia del proyecto e impacto**

Esta investigación es un estudio piloto de un proyecto de Minciencias que permite identificar si algunos contaminantes ambientales tales como el material particulado en el caso de la contaminación atmosférica son factores de susceptibilidad para desarrollar autoinmunidad o si exacerban la enfermedad en el caso de personas que ya tienen alguna EAI de base.



# Perspectivas

- Realizar ensayos de viabilidad, citotoxicidad y producción de citoquinas con concentraciones más elevadas de la referencia estándar de material particulado SRM1649B tanto en casos de AR como en controles
- Utilizar otras referencias estándar del material particulado y comparar la variación de los resultados con la referencia SRM1649B.
- Aumentar el tamaño de las cohortes para realizar análisis estadísticos con los resultados obtenidos en cada ensayo.
- Evaluar los efectos del MP en otras enfermedades autoinmunes tanto sistémicas como órgano-específicas.

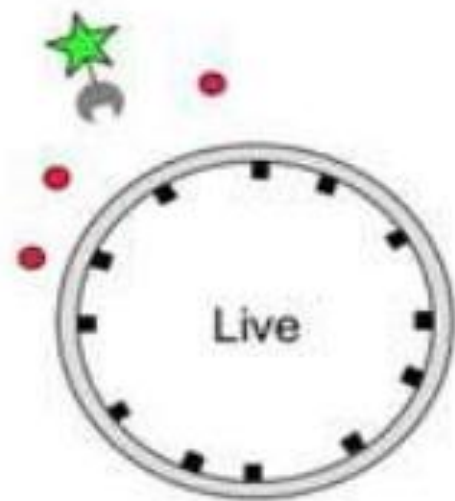
# Agradecimientos





- Principalmente a Dios, a mis padres y hermano por darme la oportunidad y apoyo de estudiar y seguir avanzando en el transcurso de mi vida profesional y académica.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por la academia de formación que brinda a cada uno de los estudiantes y genera grandes pilares del conocimiento, no sólo en el área de la salud sino en los valores que se requieren para ser un profesional íntegro en la sociedad.
- A las doctoras Carolina Ramírez, Diana Monsalve y Yeny Acosta por despertar en mí la devoción y el interés hacia la inmunología y todo su campo de investigación, además de ser grandes ejemplos de inspiración, ya que sus valores y conocimientos son inconmensurables.
- Al Centro de Estudios de Enfermedades Autoinmunes (CREA) por ser el lugar que me acogió, proporcionándome lo necesario para el desarrollo de este proyecto. A todas las personas que hacen parte del CREA por ofrecerme su apoyo y entrega en diferentes conceptos.
- A mis compañeros y amigos que estuvieron allí con palabras y vibras positivas que prometían un logro más en mi vida personal y profesional

*“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”*

**—Marie Curie**

***¡Gracias!***



-  = Plasma membrane
-  = Phosphatidyl serine
-  = PI or 7AAD
-  = AnnexinV-FITC





