

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTOS BIOLÓGICOS INDUCIDOS POR
AEROPARTÍCULAS (PM₁₀) DE TRES DIFERENTES
ZONAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA:

M. EN C. BM. ERNESTO ALFARO MORENO

TUTOR:

DR. ALVARO RÓMAN ASORNIO VARGAS

MÉXICO, D.F. 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA

A Rodrigo, Arturo y Patricio. Por ser el gran motor para seguir adelante en este camino.

A Patricia. Por ser el soporte para llegar hasta este lugar y por ser el faro para seguir en la dirección adecuada.

A mis padres. Siempre por el mismo motivo, me enseñaron a nunca dejar de trabajar.

A Eduardo, María de Lourdes, José Luis y Sandra, que con su presencia y partida imprimieron en mí de diferentes maneras, el deseo de seguir en este camino.

A TODOS LOS MAESTROS DEL PASADO, DEL PRESENTE Y DE SIEMPRE

Autonoma de la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e imprimir el
contenido de mi trabajo académico.
NOMBRE: *Ernesto Alfaro Moreno*
FECHA: *12 de Agosto de 2007*
FIRMA: *[Firma manuscrita]*

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la M en C Yesennia Sánchez Pérez por su valiosa colaboración. A la Dra. Claudia M. García Cuellar por su apoyo en los momentos difíciles y su asistencia técnica en todo momento. Al Dr. Jorge Reyes Esparza por su soporte técnico en el uso del citómetro de flujo.

Al British Council, la Royal Society of London y a la Academia Mexicana de Ciencias por su apoyo para realizar estancias de trabajo en el Laboratory of Molecular Oncology de la Universidad de Nottingham. Al Dr. J. Clifford Murray por todo su apoyo para la realización del proyecto de activación de células endoteliales. A los doctores Stewart Martin y Maarten Tas y a Wynne Ward por todo su apoyo durante las estancias en la ciudad de Nottingham.

Al Dr. Antonio Enciso por sus valiosas colaboraciones durante el proceso de desarrollo de esta tesis.

Al Instituto Nacional de Cancerología y de forma particular a los doctores Alejandro Mohar Betancourt y Alfonso Dueñas por el apoyo prestado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Sergio Ponce de León quien con su valiosa ayuda nos sacó siempre de los problemas con la estadística. A la Dra. Irma Rosas Pérez, que siempre es un gran apoyo para poder salir adelante en estos tortuosos caminos.

Como siempre, a mi amigo, guía y maestro, el Dr. Alvaro Osornio Vargas, simplemente gracias.

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología SSA y en el Laboratory of Molecular Oncology de la Universidad de Nottingham, bajo la dirección del Dr. Alvaro Román Osornio Vargas.

La realización de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por medio de la beca de doctorado (número de registro 87862; 1997-2000), de la Fundación Telmex por medio de la beca de estudios (número de registro 3090002666; 1997-2000), y por los apoyos del British Council (noviembre-diciembre de 1997, septiembre-octubre 1998) y de la Royal Society of London y la Academia Mexicana de Ciencias (mayo-agosto 1999) para realizar estancias en la Universidad de Nottingham, así como el apoyo de CONSERVA-1999 del Gobierno del D.F.

INDICE

	Página
1) Abreviaturas	5
2) Resumen	6
3) Abstract	8
4) Introducción y objetivos	
a) Conceptos generales	9
b) Muerte celular y PM ₁₀	15
c) Daño al DNA inducido por PM ₁₀	18
d) Producción de citocinas y PM ₁₀	19
e) Activación de células endoteliales expuestas a PM ₁₀	20
f) Objetivos	21
5) Material y métodos	23
6) Resultados	
a) Concentración de elementos presentes en las PM ₁₀	32
b) Concentración de endotoxinas presentes en las PM ₁₀	33
c) Muerte celular	33
d) Daño al DNA producido por PM ₁₀ en cultivos celulares	40
e) Expresión de Citocinas en cultivos celulares expuestos a PM ₁₀	42
f) Expresión de Selectina-E en cultivos de células endoteliales expuestas a PM ₁₀	44
g) Correlación de efectos biológicos con la concentración de endotoxina y metales de transición determinados en las PM ₁₀	48
7) Discusión	52
a) Muerte celular y PM ₁₀	54
b) Daño al DNA inducido por PM ₁₀	57
c) Producción de citocinas y PM ₁₀	59
d) Activación de células endoteliales expuestas a PM ₁₀	61
e) Correlación de efectos biológicos con la concentración de componentes determinados en las PM ₁₀	65
8) Conclusiones	73
9) Bibliografía	75
10) Apéndices	
a) Artículo final	
b) Artículo de revisión sobre técnicas para detectar apoptosis	

ABREVIATURAS

Aeropartículas con diámetro aerodinámico promedio menor o igual a 10 μm	PM ₁₀
Aeropartículas con diámetro aerodinámico promedio menor o igual a 2.5 μm	PM _{2.5}
Aeropartículas	PMs
Factor de Necrosis Tumoral α	TNF α
Interleucina 1 β	IL-1 β
Interleucina 6	IL-6
Lipopolisacárido	LPS
Selectina-E	ELAM-1
Unidades de Endotoxina	EU

RESUMEN

La exposición a PM_{10} se asocia con incrementos en la morbilidad y la mortalidad en habitantes de ciudades contaminadas, aunque existe poca evidencia de los mecanismos involucrados y del papel que juega la composición de las partículas. En el presente estudio se evaluó la muerte celular [citotoxicidad (ensayo de cristal violeta), apoptosis (Tunel o ensayo de Anexina V)], daño al DNA (ensayo de cometas) producción de mediadores proinflamatorios ($TNF\alpha$, IL-6) (ELISA) así como la selectina-E (inmunofluorescencia y citometría de flujo), en células expuestas a PM_{10} colectadas en el Norte, Centro y Sur de la ciudad de México. Se analizó la correlación entre los efectos evaluados y la concentración de algunos componentes presentes en las partículas. Se utilizaron cultivos de células monocíticas, mesenquimatosas, epiteliales y endoteliales. Los efectos de muerte celular fueron evaluados en todos los tipos celulares. El daño al DNA se evaluó en células mesenquimatosas de ratón (Balb c 3T3). La expresión de $TNF\alpha$ e IL-6 se buscó en células monocíticas de ratón (J774A.1), mientras que la expresión de selectina-E se determinó en células endoteliales humanas. Se encontró que las PM_{10} de las tres zonas de la ciudad de México fueron capaces de inducir muerte celular. Las partículas del Norte indujeron una mayor proporción de muerte celular comparado con las otras dos regiones. Las PM_{10} del Norte y Centro indujeron mayores daños al DNA que las partículas del Sur. Las PM_{10} evaluadas indujeron la secreción de $TNF\alpha$ e IL-6 en células monocíticas. El efecto tuvo un comportamiento diferencial, siendo las partículas del Centro las más potentes inductoras de estos efectos. Las PM_{10} de las tres zonas fueron capaces de inducir la expresión de selectina-E. En este caso no se pudo demostrar un efecto diferencial. La citotoxicidad en células J774A.1 presentó una alta correlación con los niveles de metales de transición y

endotoxina presente en las partículas. Los efectos de las PM_{10} de la ciudad de México inducen efectos biológicos dependiendo de la zona en la que fueron recolectadas y esto puede deberse a diferencias en la mezcla de componentes, así como en la distribución de tamaños. Los datos indican que la composición debe de ser considerada en la evaluación de los efectos de las aeropartículas.

ABSTRACT

Exposure to PM₁₀ has been related to increases in morbidity and mortality in exposed populations. There is little evidence regarding the mechanisms involved and the role of PM₁₀ composition. Cell death [citotoxicity (crystal violet assay), apoptosis (TUNEL or Annexin V assay)], DNA damage (comet assay) production of inflammatory mediators (TNF α , IL-6) (ELISA) and E-Selectin (immunofluorescence and flow cytometry) on PM₁₀ exposed cells, were evaluated in the present study. The PM₁₀ were collected in three different zones of Mexico City (North, Center and South). Correlations of biological effects with some components of the particles were analyzed. Monocytic, mesenchymal, epithelial and endothelial cell cultures were used. Cell death was analyzed in all the cell types. DNA damage was evaluated in mesenchymal cells (Balb c 3T3). TNF α and IL-6 expression were evaluated in mice monocytic cells (J774A.1), and the expression of E-selectin was evaluated in human endothelial cells. PM₁₀ from the three zones were capable to induce cell death. Northern particles induced a stronger effect than the other two regions. PM₁₀ from North and South induced stronger DNA damage than Southern particles. TNF α and IL-6 were induced in monocytic cells exposed to PM₁₀ and Central particles induced the strongest effect. PM₁₀ from the three zones were capable of induce E-Selectin expression. In this case, no difference among zones was observed. The greatest correlation with transitional metals and endotoxin content was founded with the citotoxicity induced in J774A.1 cells. PM₁₀ from México City induce biological effects depending on the zone where the particles were collected. These differences could be explained due differences in components of the mixture and also to particle size distribution. Our data indicates that composition should be considered in evaluations of airborne particles.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación atmosférica por aeropartículas es un problema que afecta a las principales ciudades del mundo. Este tipo de contaminación se mide principalmente evaluando la masa ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) y el tamaño aerodinámico de las partículas. Esto se justifica debido a que el tamaño determina la capacidad de dichas partículas de penetrar en el tracto respiratorio de los individuos expuestos. De esta manera encontramos que las partículas se dividen en partículas suspendidas totales (PST), partículas con diámetros aerodinámicos promedio iguales o menores a $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}), a $2.5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2.5}$), o partículas finas y partículas ultrafinas (E'Aust *et al.* 2002). Dentro de estas partículas, las PM_{10} y las $\text{PM}_{2.5}$ han sido las que han recibido una mayor atención en cuanto al estudio de los efectos en la salud de las personas expuestas. En el presente trabajo se determinó el efecto biológico *in vitro* de PM_{10} , por lo que nos referiremos principalmente a los efectos de estas partículas.

La variación diaria gravimétrica de aeropartículas contaminantes atmosféricas en zonas urbanas ha sido asociada con incrementos en la morbilidad y mortalidad de la población expuesta (Beeson *et al.* 1998, Borja-Aburto *et al.* 1997, Castillejos *et al.* 2000, Mar *et al.* 2000, Nel *et al.* 2001, Pope *et al.* 1999, Pope y Dockery 1992, Romieu *et al.* 1998, Samet *et al.* 2000, Schwartz 1994) y estos incrementos han sido principalmente asociados a eventos cardiopulmonares (Pope *et al.* 1999, Peters *et al.* 1997), aunque existe evidencia de que este tipo de exposición a partículas se puede relacionar con padecimientos crónicos tales como el asma y el cáncer pulmonar (Nel *et al.* 2001, Romieu *et al.* 1998, Beeson *et al.* 1998).

Los incrementos en los riesgos a la salud se presentan incluso cuando las concentraciones atmosféricas de las partículas se encuentran a niveles por debajo de los estándares de calidad aceptados (Borja-Aburto *et al.* 1997, Borja-Aburto *et al.* 1998,

Castillejos *et al.* 2000). Las asociaciones epidemiológicas con la mortalidad son más significativas cuando las partículas presentan un diámetro aerodinámico menor. Por ejemplo, el incremento en el riesgo de muerte en la ciudad de México en relación a la exposición a PST es de un 5.8% por cada incremento en $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de partículas en la atmósfera (Borja-Aburto *et al.* 1997), mientras que las PM_{10} o $\text{PM}_{2.5}$ se asocian con incrementos de 1.83% o 1.48 % en el riesgo a morir por cada incremento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de las partículas (Borja-Aburto *et al.* 1998, Castillejos *et al.* 2000). Efectos similares han sido descritos por estudios epidemiológicos en distintas ciudades del mundo a pesar de diferencias importantes en factores geográficos, climáticos, o antropológicos (Levy *et al.* 1999).

Considerando que las PMs representan mezclas complejas, y que algunos de los componentes presentes en ellas han sido caracterizados como tóxicos, se puede inferir que la composición de las partículas podría jugar un papel importante en la toxicidad relativa de partículas inhaladas. Existe hasta el momento poca información que nos permita definir el papel que juega la composición de las partículas en la exacerbación y/o desarrollo de enfermedades pulmonares tales como asma, bronquitis crónica y cáncer pulmonar, entre otras. La evidencia que se ha venido colectando en los últimos años sugiere que diferentes componentes presentes en la contaminación atmosférica por PMs podrían jugar un papel importante en la promoción y perpetuación de respuestas inflamatorias o carcinogénicas. Por ejemplo, se sabe que metales tales como vanadio, níquel, y plomo se pueden encontrar presentes en muestras de PM_{10} (Miranda *et al.* 1992, Bonner *et al.* 1998, Osornio-Vargas *et al.* 2003). Se sabe que estos metales se asocian con procesos pro-inflamatorios y cáncer (Bonner *et al.* 2000, Prieditis y Adamson 2002, National Toxicology Program 2002, Cheng *et al.* 2003, Silbergeld 2003). Estos mismos elementos han sido identificados como mediadores de los efectos tóxicos de cenizas (fly ash) generadas durante la combustión de carbón o

aceite mineral (Dreher *et al.* 1997). Por otro lado, los componentes de tipo orgánico y biológico podrían jugar un papel central en la inducción de inflamación. Tal es el caso del lipopolisacárido (LPS), el cual es un componente de la membrana externa de las bacterias gram negativas. El LPS ha sido considerado como un factor fundamental en la exacerbación y desarrollo de asma (Rosas *et al.* 1994, Schwartz 2001). Los hidrocarburos presentes en las partículas, provenientes de la combustión de desechos de diesel, se han asociado con incrementos en la concentración de IgE en individuos retados por vía nasal (Saxon y Díaz-Sánchez 2000). Se sabe que las IgE son mediadores de la respuesta alérgica pulmonar. Debido a lo anteriormente señalado, se puede suponer que tanto los componentes orgánicos como los inorgánicos son mediadores de la toxicidad inducida por PMs. En el caso de la ciudad de México se sabe que existen variaciones en las concentraciones tanto de metales como de endotoxinas, dependiendo de la zona en la que las partículas hayan sido colectadas. Previamente se ha reportado que algunos metales de transición, así como la endotoxina, son componentes importantes de las PM₁₀ de la ciudad de México (Bonner *et al.* 1998, Osornio-Vargas *et al.* 2003).

Debido a la gran variedad de efectos que han sido relacionados con la exposición a partículas urbanas, es importante considerar cuales son las posibles vías que sigue una partícula luego de depositarse en el tracto respiratorio para desencadenar diferentes efectos. Una partícula al depositarse en el tracto respiratorio puede entrar en contacto directo con macrófagos o bien con células epiteliales. Si entra en contacto con macrófagos, estos pueden fagocitar la partícula para eliminarla, pero la partícula es capaz de activar al macrófago induciendo la expresión de factores proinflamatorios, tales como el TNF α , IL-1 β , IL-6 o IL-8 (Becker *et al.* 1996, Moon y Becker 1999, Ning *et al.* 2000) entre otros. Estos factores pueden inducir diferentes respuestas que van desde el reclutamiento de más

macrófagos, el desencadenamiento de hiperreactividad pulmonar, hasta la activación del endotelio vascular y su posible efecto cardiovascular (Donaldson *et al.* 2000, Saxon y Díaz-Sánchez 2000, Lambert *et al.* 1988). El macrófago que fagocita a la partícula también podría morir, y si esta muerte es por necrosis se puede favorecer el efecto proinflamatorio (Haslett 1999). Si la partícula entra en contacto con una célula epitelial puede provocar muerte celular, lo que podría inducir cambios en el tejido. Dependiendo del tipo de muerte celular que se presente, será la clase de efecto observado. Por ejemplo, si tenemos muerte celular por apoptosis, esto podría desencadenar en procesos de remodelación del tejido pulmonar (Uhal 2002), mientras que si tenemos principalmente muerte celular por necrosis, esto favorecerá procesos proinflamatorios. Incluso si las partículas son capaces de cruzar el epitelio y entrar en contacto con el tejido conjuntivo, es factible que se active la respuesta de fibroblastos que podrían desencadenar procesos de remodelación del tejido e incluso fibrosis. Otra posibilidad es que las partículas dañen al DNA (Li 1995, Villalobos *et al.* 1995) lo cual aunado a la posible secreción de factores inmunosupresores (Alfaro *et al.* 2003) por parte de las células epiteliales genere un ambiente favorable para el desarrollo de cáncer pulmonar. Por otra parte, si las partículas son capaces de alcanzar el endotelio vascular (Nemmar *et al.* 2002a, Nemmar *et al.* 2002b), es posible que estas induzcan la activación de la células endoteliales, lo cual puede provocar el reclutamiento de células inflamatorias por medio de la expresión de moléculas de adhesión tales como la selectina-E. También es posible que la activación del endotelio vascular provoque un desequilibrio de la expresión del factor tisular y la trombomodulina. Esto puede desencadenar en la formación de coágulos que provoquen daños vasculares. Otra posibilidad es que las partículas lleguen hasta la circulación, lo que puede provocar que dichas partículas alcancen órganos distantes y generando efectos en éstos. Ejemplo de ello podría ser que las partículas lleguen al corazón

y sean capaces de provocar arritmias, o bien que alcancen un órgano tan distante como el hígado provocando la síntesis de proteínas y en consecuencia un aumento en la viscosidad de la sangre y el esfuerzo cardíaco (Peters *et al.* 1997). (Figura 1)

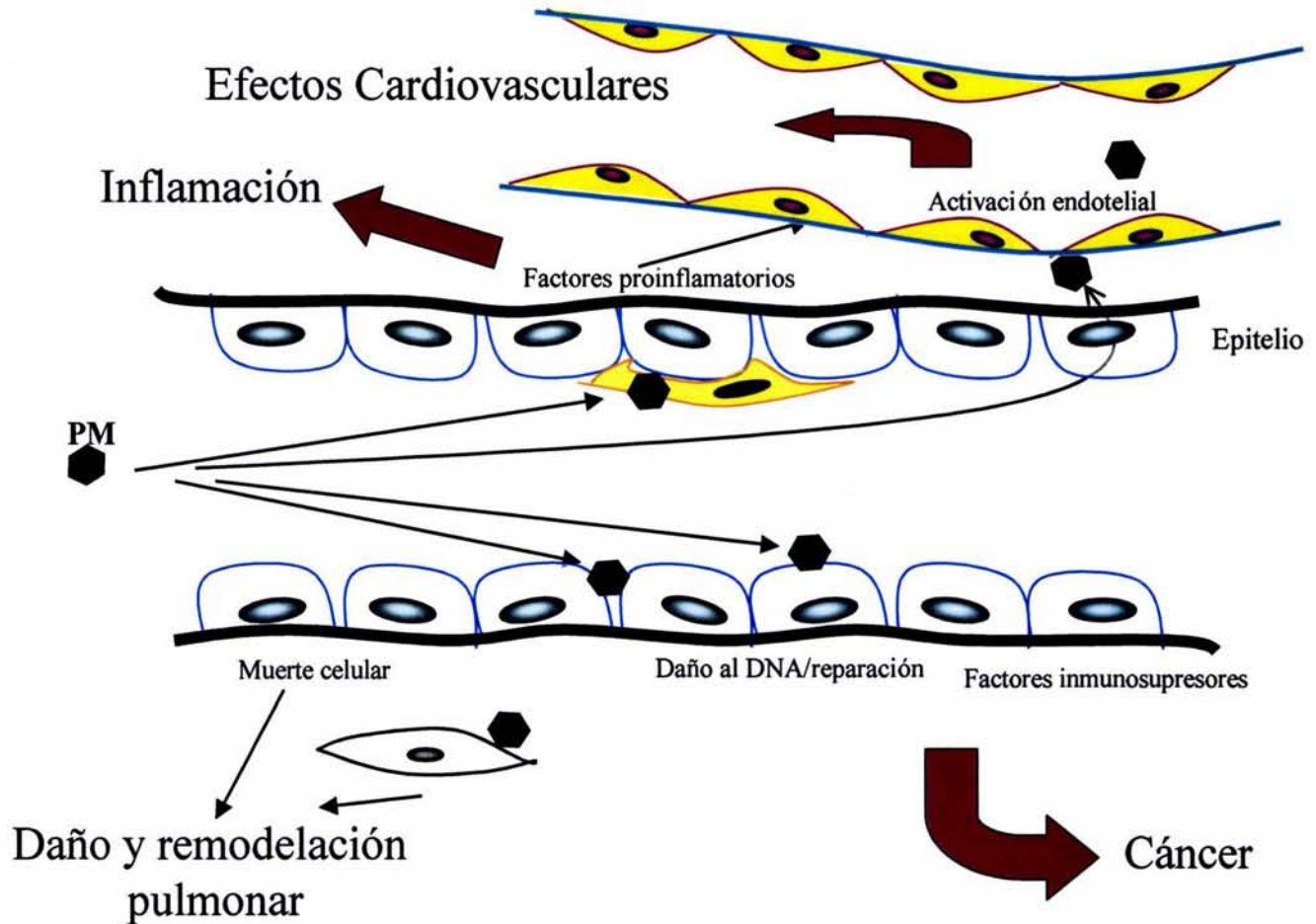


Figura 1: Representación teórica de los posibles efectos de las PM₁₀ al ser inhaladas. Las partículas al depositarse en el tracto respiratorio pueden provocar daños al entrar en contacto con las células epiteliales o macrófagos, ya sea por inducir muerte celular, o daños al DNA, así como por activar a las células para que expresen factores proinflamatorios o inmunosupresores. Las partículas también podrían llegar hasta el tejido conectivo, entrar en contacto con el endotelio vascular o incluso introducirse a la circulación.

Los efectos anteriormente analizados podrían ser provocados por la interacción de las partículas con las diferentes estirpes celulares, pero existe la posibilidad de que componentes de las partículas que sean capaces de difundir en los tejidos provoquen estos efectos (Dreher *et al.* 1997, Prieditis y Adamson 2002). Esto podría ocurrir por que el

componente se difunde a través de la célula en contacto con la partícula, o bien porque los componentes se difunden por los tejidos alcanzando células distantes de la partícula (Figura 2)

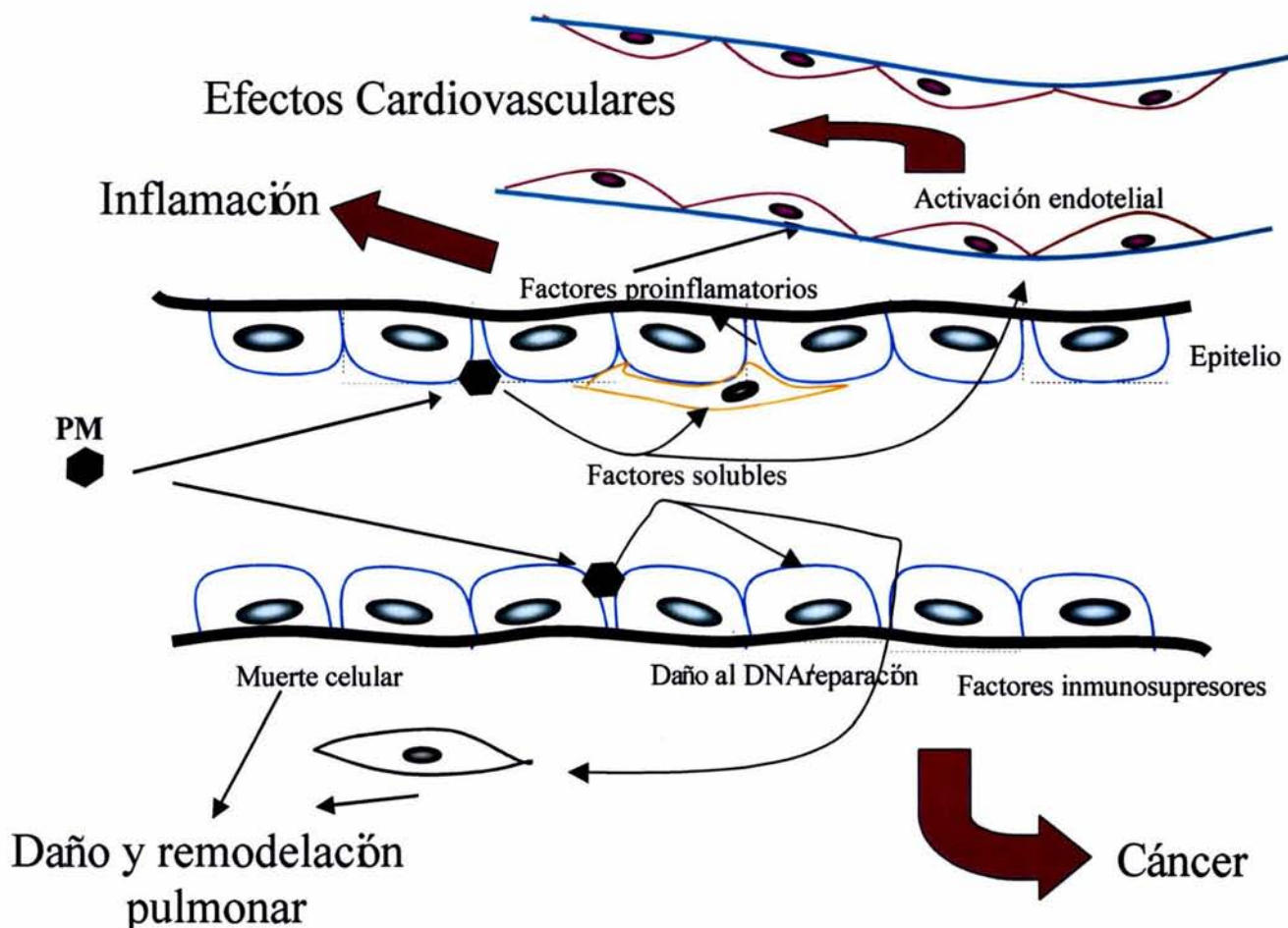


Figura 2: El daño provocado por las PM_{10} también ha sido relacionado con los componentes que pueden difundir a través de los tejidos. Se sabe que algunos componentes pueden difundir sin necesidad de que las partículas entren en contacto directo con las células para tener un efecto. Debido a esto, el modelo de daño inducido por las PM_{10} podría asociarse tanto a la partícula completa como a sus componentes solubles, o incluso a los insolubles.

Debido a la gran diversidad de efectos biológicos asociados con la exposición a partículas urbanas, es necesario realizar evaluaciones de efectos biológicos a diferentes niveles, con el objeto de establecer posibles mecanismos de acción. En el presente estudio se planteó la evaluación *in vitro* de muerte celular, daño al DNA, efecto proinflamatorio y

activación de células endoteliales. La evaluación de estos efectos se realizó con el objetivo de identificar eventos finales que pudieran ser relacionados con posibles mecanismos de daño inducidos por las partículas urbanas. Debido a esto es necesario revisar brevemente los conceptos relacionados con los efectos finales evaluados.

Muerte celular y PM₁₀

La muerte celular es un proceso biológico que ha sido ampliamente descrito y que tiene una función importante tanto en procesos fisiológicos como patológicos. La muerte celular se ha definido con base en el mecanismo que la célula sigue para morir. Dentro de los caminos de muerte celular descritos encontramos la oncosis y la apoptosis. La oncosis es un proceso en el que la célula muere debido a fallas en las bombas iónicas de la membrana plasmática y generalmente se asocia con isquemia y posiblemente con agentes que interfieren con la generación de ATP e incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, así como la degradación inespecífica del DNA (Manjo y Joris 1995, Ma *et al.* 2001). La muerte celular por apoptosis se ha definido como un proceso dinámico, en el cual participan mecanismos precisos que siguen vías de transducción, activación de proteínas y expresión de genes específicos, así como la degradación internucleosomal del DNA (Manjo y Joris 1995). En general, se puede decir que la muerte celular por oncosis es un proceso más rápido que la muerte por apoptosis. Ambos tipos de muerte celular culminan en lo que se conoce como necrosis celular, que son los procesos de degradación celular que ocurren una vez que la célula pierde las funciones que mantienen la integridad de la membrana (Karahashi y Amano 1998, Leppo 2003, Manjo y Joris 1995). En el caso de la apoptosis, la necrosis recibe el nombre de necrosis secundaria (Haslett 1999). Sin embargo, cuando se habla de muerte celular en general se tiende a utilizar el término de necrosis como el proceso de muerte que no es apoptosis (Yaglom *et al.* 2003). Debido a que la muerte celular por

oncosis desemboca en necrosis en un tiempo relativamente más corto que la apoptosis, es que se ha adoptado esta terminología. Con el afán de ser consistentes con estos criterios de amplio uso, nos referiremos a muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Dentro de los diferentes efectos biológicos descritos para las partículas contaminantes atmosféricas, se ha propuesto que son capaces de producir muerte celular. Dicha muerte celular se ha descrito como citotoxicidad y apoptosis (Moon y Becker 1999, Holian *et al.* 1998, Obot *et al.* 2002). Sin embargo al hablar de citotoxicidad no se define si dicha citotoxicidad se relaciona con muerte por oncosis o por apoptosis.

Es importante conocer el tipo de muerte celular que una partícula contaminante es capaz de inducir, ya que esto nos da un indicio de cual es el tipo de mecanismo que se lleva a cabo a nivel celular. Si nosotros encontramos que la muerte celular se encuentra asociada principalmente con procesos de necrosis, esto nos indica que las partículas son capaces de provocar alteraciones ya sea a nivel metabólico o físico que provoquen que la célula muera (Manjo y Joris 1995). Este tipo de efectos podrían ser la inhibición de enzimas por la presencia de metales (Hasinoff *et al.* 2003, Scheline *et al.* 2000), o alteraciones en la simetría de la membrana por la presencia de fibras (Brody *et al.* 1983) entre otros. Por otra parte, si encontramos que la muerte celular se da principalmente por apoptosis, esto podría deberse a que las partículas están provocando daño al DNA (Villalobos *et al.* 1995, García-Cuellar *et al.* 2002), a que se secreta algún factor que induzca la muerte celular, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (Moon y Becker 1999, Osornio-Vargas *et al.* 2003), o a efectos a nivel mitocondrial, entre otros (Evan y Littlewood 1998).

El tipo de muerte celular también va a tener importancia desde el punto de vista del efecto final que la partícula va a tener sobre las células. Si por una parte tenemos muerte celular por apoptosis, es posible que esta muerte celular sirva como un mecanismo de

control que evite daños mayores. De este modo, si las partículas son capaces de producir alteraciones al DNA o secreción de factores inflamatorios, y provocan muerte por apoptosis, el daño generado se encontrará controlado evitando que tanto las alteraciones en el material genético se perpetúe o que el proceso inflamatorio se exacerbe. La muerte celular que desemboca rápidamente en necrosis es un factor que favorece procesos inflamatorios.

Los procesos de muerte celular inducidos por partículas contaminantes atmosféricas se encuentran descritos parcialmente y en algunos estudios se han reportado efectos citotóxicos (Moon y Becker 1999) y en otros se han mostrado efectos de muerte celular por apoptosis (Holian *et al.* 1998, Obot *et al.* 2002). Desafortunadamente en los estudios en los que se reporta el efecto citotóxico de las partículas, no se especifica si esta citotoxicidad se relaciona con muerte por necrosis o por apoptosis. Se sabe que las partículas del tipo de las PM₁₀ contienen hidrocarburos, metales de transición, lipopolisacáridos, componentes del suelo, pólenes, bacterias, etc. (Miranda *et al.* 1992, Salazar *et al.* 1993, Rosas *et al.* 1998, Romieu *et al.* 1999 Bonner *et al.* 1998). La presencia de estos componentes ha sido asociada tanto a muerte por necrosis como a muerte por apoptosis. Sin embargo, al estar trabajando con una mezcla tan compleja como lo son las PM₁₀, podemos estar enfrentando efectos sinérgicos o antagónicos.

En el presente estudio se determinó la capacidad de las PM₁₀ provenientes de tres zonas de la ciudad de México para inducir muerte celular en una línea de monocitos de ratón (J774A.1) y en una línea de células epiteliales de pulmón humano (A549). Para esto se evaluaron la citotoxicidad y la presencia de apoptosis y necrosis. Primero se realizaron determinaciones de viabilidad en cultivos celulares a diferentes tiempos siguiendo una curva concentración-respuesta. Posteriormente se realizaron evaluaciones de muerte celular por apoptosis en el punto en el que se observaron las máximas diferencias en viabilidad por

medio del ensayo de TUNEL. Finalmente se hicieron evaluaciones en un curso temporal de la proporción de muerte celular por necrosis y apoptosis siguiendo el ensayo de unión de anexina-V para determinar la presencia de necrosis y de apoptosis.

Daño al DNA inducido por PM₁₀

Existe evidencia epidemiológica de que las partículas contaminantes atmosféricas se encuentran asociadas a un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar (Beeson *et al.* 1998, Pope *et al.* 2002). Los daños a nivel genético y epigenético han sido propuestos como posibles mecanismos de daño por las partículas (Li *et al.* 1996, García-Cuellar *et al.* 2002, Gilmour *et al.* 2002). Existe evidencia experimental que señala que las PMs son capaces de provocar cambios conformacionales en plásmidos (Li *et al.* 1996), degradación de DNA desnudo (García-Cuellar *et al.* 2002), y cambios en la expresión de algunos genes como consecuencia de alteraciones epigenéticas (Gilmour *et al.* 2002). Sin embargo, estas alteraciones al DNA pueden desembocar en la activación de la expresión de genes de reparación, o la muerte celular.

Poco se sabe del daño al DNA que producen las partículas en células expuestas y si este daño al DNA desemboca en muerte celular. Para analizar este punto, en el presente estudio se evaluó la presencia de daño al DNA por medio del ensayo de electroforesis celular, conocido como ensayo de cometas (Singh *et al.* 1988). Para esto se decidió trabajar con tiempos de exposición en los cuales hemos observado que las células alcanzan niveles de muerte celular relacionadas con la fuente de procedencia de las partículas y utilizamos concentraciones de PMs consideradas subletales, (Alfaro-Moreno 1999). Se sabe que la electroforesis celular realizada en células apoptóticas puede generar "cometas" (Godard *et al.* 1999, Comet Assay Interest Group 2003), por lo que es necesario evaluar si este tipo de muerte celular está presente en las condiciones en las que se evaluó el efecto genotóxico.

Para esto se determinó la proporción de células apoptóticas utilizando el ensayo de TUNEL bajo las mismas condiciones de cultivo en las que se detectó el daño al DNA.

Producción de citocinas y PM₁₀

Las alteraciones relacionadas con PM₁₀ tales como el asma y efectos cardiopulmonares (Levy *et al.* 1999, Donaldson *et al.* 2000) podrían estar relacionadas con efectos mediados por moléculas proinflamatorias. Dentro de la respuesta proinflamatoria, existen diversas moléculas que participan, ya sea como una respuesta primaria, o bien como una respuesta de tipo secundaria. Dentro de las moléculas que se relacionan principalmente con una respuesta primaria encontramos al TNF α que es una molécula capaz de provocar la activación de diferentes estirpes celulares relacionadas con los procesos inflamatorios, tales como los macrófagos y las células endoteliales. Por otra parte, la interleucina 6 (IL-6) es una molécula proinflamatoria de respuesta secundaria a la presencia de TNF α . Sin embargo se sabe que la IL-6 también puede producirse de forma independiente de la presencia de TNF α indicando que en este caso se sigue un mecanismo de activación independiente de TNF α .

La producción de TNF α e IL-6 ha sido previamente reportada como una respuesta de células monocíticas expuestas a aeropartículas y su relación con el contenido de endotoxina en las partículas (Moon y Becker 1999). En el caso de las partículas de la ciudad de México se ha descrito que partículas provenientes de diferentes zonas de la ciudad presentan diferentes capacidades de inducir la expresión del receptor alfa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas en miofibroblastos de rata, así como de la interleucina 1 β , en macrófagos de pulmón de rata expuesto *in vitro*. Se ha observado que la expresión de estas moléculas correlaciona con la concentración tanto de metales como de endotoxinas. En este

estudio se evaluó si las partículas de diferentes zonas de la ciudad de México son capaces de inducir la expresión de TNF α e IL-6 en células monocíticas de ratón. Se buscó una asociación entre los niveles de expresión con diferencias en la composición, así como con la concentración de endotoxina.

Activación de células endoteliales expuestas a PM₁₀

Los efectos cardiovasculares son una de las principales causas de visitas a salas de emergencias e incrementos en mortandad durante eventos de altas concentraciones de partículas (Le Tertre *et al.* 2002, Levy *et al.* 1999). Se conoce poco sobre los procesos por los cuales se incrementan los eventos cardiovasculares. Los efectos cardiovasculares podrían estar relacionados con activación del endotelio vascular (Hirano *et al.* 2003), o incluso efectos provocados por partículas o componentes de éstas que alcanzaran órganos distantes, como puede ser el caso de metales de transición que se han relacionado con inducción de arritmias cardíacas (Campen *et al.* 2001, Campen *et al.* 2002). Existen estudios experimentales que han probado que las partículas inhaladas son capaces de alcanzar la circulación, por lo que la activación del endotelio vascular podría deberse a una interacción directa de las partículas con la célula endotelial (Nemmar *et al.* 2002^a). La activación del endotelio vascular se puede manifestar de diferentes formas. Una de ellas sería si las células endoteliales expresan moléculas de adhesión que favorezcan el reclutamiento de leucocitos (Mathieu y El-Battari 2003) lo cual tiene repercusión en la hemodinámica. Otra posibilidad es que la célula endotelial al ser activada modifique la expresión de moléculas que participan del control de la coagulación (Combes *et al.* 1999), o incluso en la expresión de moléculas que tienen función de moduladoras de los procesos proinflamatorios, como el polipéptido de activación endotelial-monocítico (EMAP-II) (Tas y Murray 1996).

Debido a la posibilidad que tienen tanto componentes solubles como las partículas completas para interactuar con las células endoteliales, en el presente estudio se evaluó el efecto de las PM₁₀ completas, de extractos hidrosolubles, de la fracción insoluble (Dreher *et al.* 1997) y de PM₁₀ pretratadas con polimixina-B para inhibir el efecto de las endotoxinas presentes en las PM₁₀ (Ning *et al.* 2000, Jiménez *et al.* 2000, Becker *et al.* 2002). Como modelo de estudio se utilizaron células endoteliales (células humanas endoteliales de cordón umbilical, HUVEC) y se escogió a la Selectina-E como marcador de activación celular. La selectina-E es una molécula de adhesión que tiene como función el reclutar células monocíticas, por lo tanto es considerada como una molécula proinflamatoria. La expresión de selectina-E fue detectada por inmunofluorescencia y por citometría de flujo. Se utilizaron PM₁₀ provenientes de tres diferentes zonas de la ciudad de México.

OBJETIVOS

El presente estudio tiene por objetivo evaluar PM₁₀ colectadas en tres zonas diferentes de la ciudad de México (Norte, Centro y Sur, figura 3) en diferentes tipos celulares, con el propósito de evaluar el potencial de desencadenar una variedad de efectos tóxicos (muerte celular y daño al DNA) y proinflamatorios (secreción de citocinas y activación de células endoteliales) en cultivos celulares. También se buscó una correlación entre los efectos evaluados y el contenido de algunos de los componentes de las partículas.

Sitios de muestreo: La zona Norte de la ciudad de México tiene una fuerte actividad industrial asociada, así como tráfico pesado, mientras que las PM₁₀ del centro se asocian con actividad residencial y comercial con tráfico mixto entre vehículos de carga y automóviles, y las PM₁₀ del Sur se asocian a una zona residencial con tráfico de automóviles (Vega *et al.* 2002). Emisiones de vehículos automotores, incluyendo hidrocarburos provenientes del

diesel contribuyen de forma importante en la formación de PM_{10} en las tres zonas muestreadas (Chow *et al.* 2002). En el presente estudio se comparó el potencial tóxico y proinflamatorio de muestras de PM_{10} de tres zonas de la ciudad de México y su relación con la composición de la mezcla de partículas de cada zona.

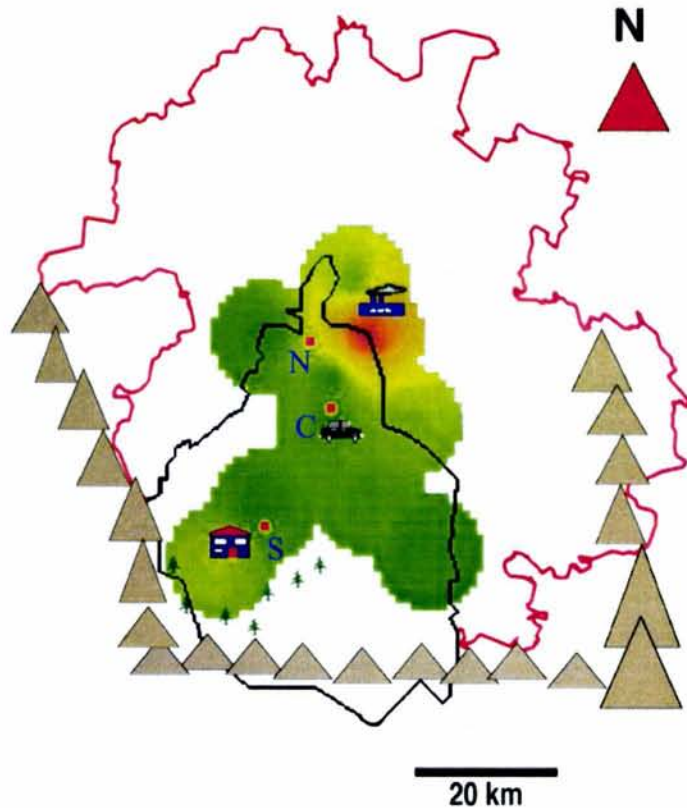


Figura 3: Ubicación de la ciudad de México en que se muestran las zonas donde se colectaron las PM_{10} utilizadas en el presente estudio (Norte = Delegación Gustavo A. Madero; Centro = La Merced; Sur = Ciudad Universitaria). Las marcas de color rojo, amarillo o verde indican la cantidad relativa de partículas presentes en la atmósfera. El color rojo indica una elevada concentración de PM_{10} y el color verde indica niveles bajos de PM_{10} . Como se puede ver, la región del Norte es la más rica en PM_{10} .

MATERIAL Y METODOS

Muestreo y recuperación de las PM₁₀

Durante 1991 se colectaron PM₁₀ con un colector PM₁₀ de grandes volúmenes (Sierra Andersen/GMW Model 12000 VFC HVPM10 sampler). El muestreador se mantuvo trabajando a un flujo de 1.13 m³/min, durante 24 horas. Se utilizaron filtros de fibra de vidrio para coleccionar las partículas. Los muestreos se realizaron 4 días por semana durante todo el año (Bonner *et al.* 1998). Las muestras fueron coleccionadas en el Instituto Mexicano del Petróleo (Norte), en la Merced (Centro) y en la Ciudad Universitaria (Sur). Se tomó un filtro por cada semana de muestreo. Los filtros se sonicaron en seco durante 60 minutos. Posteriormente se recuperaron las partículas utilizando un pincel suave y recuperando las partículas en un vaso de precipitados estéril y libre de endotoxinas (Bonner *et al.* 1998). Las partículas de cada zona fueron mezcladas y almacenadas hasta su utilización en un vial de vidrio estéril y libre de endotoxina.

Determinación de metales en las PM₁₀

Extractos acuosos e hidrolizados (HCl 1M) de PM₁₀ fueron analizados por medio de espectrometría de emisión de plasma (Plasma 40; Perkin-Elmer). El instrumento fue calibrado utilizando una curva de cinco puntos preparada a partir de soluciones de elementos patrón puros (Aldrich). Para evaluar el desempeño del equipo fueron utilizadas soluciones patrón antes y después de las determinaciones realizadas a las muestras. La precisión de las mediciones se mantuvo dentro de un 4 % para los metales de transición y 10 % para el plomo. Los elementos evaluados fueron Fe, Ni, V, Zn, Cu y Pb (Bonner *et al.* 1998). Los resultados se expresaron en µg de metal por mg de partícula. De cada uno de los metales se

calculó el porcentaje que fue soluble en agua. Se calculó la concentración total de cada metal presente en las partículas en picomoles por microgramo de partícula, utilizando la masa determinada y el peso atómico de cada elemento.

Determinación de los niveles de endotoxinas

Se determinaron los niveles de endotoxina en las partículas por medio del ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* utilizando un kit comercial y siguiendo las especificaciones del productor (Bio-Whittaker Inc.) (Bonner *et al.* 1998). Las partículas fueron sonicadas en un amortiguador (0.05 M de fosfato de sodio, y 0.1% de trietilenamina, a un pH de 7.5), durante 60 minutos a 20°C. Las concentraciones de endotoxina se expresaron como Unidades de Endotoxina por mg de partículas (EU/mg).

Preparación de las partículas para exponer células

Se pesó al menos 1 mg de partículas las cuales fueron esterilizadas en autoclave inmediatamente antes de cada experimento. Una vez estériles, se prepararon suspensiones de PM₁₀ en medio de cultivo a concentraciones de 1 mg/mL minutos antes de exponer las células. De estas suspensiones se tomaron las alícuotas necesarias para alcanzar la concentración final deseada.

Muerte celular inducida por PM₁₀

Exposición a PM₁₀:

a) Ensayos de citotoxicidad (Kueng *et al.* 1989):

Células monocíticas de ratón (J774A.1) o epiteliales de pulmón humano (A549) fueron sembradas en cajas de 96 pozos a una densidad inicial de 15,000 células/cm². Las células

se dejaron adherir durante toda la noche. Las células fueron expuestas a concentraciones de 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de las partículas de las tres zonas de la ciudad de México en condiciones de proliferación celular. Las células se dejaron expuestas a dichas partículas durante 12, 24, 48 y 72 horas. Al término de la exposición las células fueron lavadas con PBS y fijadas con formol neutro al 5%. Después de eliminar el formol neutro, las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta (Sigma) al 0.1% durante 20 minutos. El exceso de cristal violeta fue lavado. El colorante adherido a las células fue solubilizado con una solución de ácido acético al 33% y las placas fueron leídas en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm. El porcentaje de viabilidad se determinó con base en la viabilidad observada en las células que no fueron expuestas a partículas, considerando estas últimas como el 100 % de viabilidad.

Para determinar el tipo de muerte celular se utilizaron los métodos de TUNEL (Roche Mannheim, Germany) y Anexina V (Roche Mannheim, Germany). Primero se determinó si en el momento en el que observamos una mayor disminución en la viabilidad se encuentran células apoptóticas por medio del ensayo de TUNEL. Posteriormente, se realizó una curva de tiempo para determinar la proporción de células que mueren por necrosis y apoptosis utilizando el ensayo de Anexina V.

b) Detección de apoptosis por el método de TUNEL (Gorczyca *et al.* 1993):

Células J774A.1 o A549 fueron sembradas en cajas de 6 pozos para cultivo celular a una densidad de 15,000 células por cm^2 y se dejaron adherir toda la noche. Después de cambiar el medio las células fueron expuestas a la máxima concentración evaluada en los ensayos de citotoxicidad que fue 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de tres zonas de la ciudad de México durante 72 horas. Al término de la exposición las células fueron lavadas con PBS estéril, se

cosecharon y fijaron para ser procesadas para la detección de extremos 3' libre de DNA por el método de TUNEL fluoresceinado. La detección del DNA marcado se realizó por medio de un citómetro de flujo. Se contaron 10,000 eventos y se determinó el porcentaje del incremento en la fluorescencia con respecto a los cultivos testigo.

c) Detección de muerte celular (apoptosis y necrosis) por el método de anexina V (Vermes *et al.* 1995):

Células J774A.1 o A549 fueron sembradas en laminillas de ocho pozos para cultivo celular a una densidad de 15,000 células por cm^2 y se dejaron adherir toda la noche. Después de cambiar el medio las células fueron expuestas a concentraciones de 20, 40 y 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de tres zonas de la ciudad de México durante periodos de 2, 4, 8, 24 y 48 horas. Al término de la exposición las células fueron lavadas con PBS estéril y se agregó anexina V fluoresceinada y ioduro de propidio. En un microscopio de fluorescencia se contaron 10 campos al azar por pozo y se determinó el número de células totales así como el número de células positivas únicamente a anexina V (células apoptóticas) así como aquellas que fueron positivas para anexina V y ioduro de propidio (células necróticas). Se calculó el incremento en el porcentaje de células que presentaron muerte celular por apoptosis y se calculó la proporción de apoptosis/necrosis presente en los diferentes cultivos.

Determinación de daño al DNA inducido por PM_{10} (Ensayo de cometas) (Singh *et al.* 1988)

Se sembraron 20,000 células mesenquimatosas de ratón (Balb C 3T3) por pozo en cajas de 24 pozos. Las células fueron expuestas a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de las diferentes regiones. Después de 72 horas de exposición, las células fueron cosechadas y después de lavarlas en solución salina de fosfatos, las células fueron resuspendidas en una solución amortiguadora de Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4

(amortiguador de corrida). Una alícuota con 10,000 células fue mezclada con una solución de agarosa de bajo punto de fusión hasta alcanzar una concentración del 1% de agarosa. Esta suspensión se colocó en una cama de agarosa previamente solidificada y se dejó gelificar. Las muestras fueron digeridas (Tris 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2M, Tritón X 100 1 %, pH 10) por 30 minutos y después se colocó en solución de desenrollamiento (NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) por 5 minutos. Posteriormente se corrió una electroforesis durante 30 minutos a 50 volts. Las muestras fueron teñidas con bromuro de etidio (10 µg/mL). Se analizaron 30 cometas por laminilla. A cada cometa se le determinó su longitud total. Las longitudes de los cometas fueron organizadas con base en los parámetros de mediana, percentiles 25 y 75, máximo y mínimo.

Efectos proinflamatorios inducidos por PM₁₀

Detección de la secreción de TNF α e IL-6

Se utilizaron cultivos confluentes de células monocíticas (J774A.1). Se sembraron cajas de 24 pozos y se dejaron proliferar las células hasta alcanzar confluencia. Una vez confluentes los cultivos fueron lavados con medio libre de suero y expuestos a concentraciones crecientes de PM₁₀ (20, 40 y 80 µg/cm²). Después de 24 horas de exposición los sobrenadantes fueron colectados y centrifugados a 14,000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes fueron congelados a -70°C hasta su utilización. Cultivos expuestos al vehículo en el que fueron suspendidas las partículas se utilizados como testigo negativo y células expuestas a 10 µg/mL de endotoxina de *E. coli* 055:B5 (Sigma) como testigo positivo.

Una vez colectados todos los sobrenadantes, fueron descongelados y la concentración de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 se determinó por medio del ensayo de ELISA utilizando una placa comercial y siguiendo las especificaciones del fabricante (R&D Systems). Se determinó la concentración de las citocinas y se calculó el porcentaje de incremento en la secreción de proteína en relación a los testigos negativos.

Expresión de Selectina-E en células endoteliales humanas expuestas a PM_{10}

-Obtención de las células endoteliales de cordón umbilical de humano (HUVEC) (Jaffe *et al.* 1973):

Se obtuvieron cordones umbilicales de los cuales se procesó la vena del cordón. La vena del cordón umbilical se digirió con una solución de colagenasa (Sigma) 0.05% en medio RPMI (Gibco) y se incubó por 40 min a 37°C . Los cordones fueron lavados con medio RPMI adicionado con suero fetal de bovino (SFB) (Harlan) y estos lavados se colectaron. Las células se centrifugaron y lavaron con PBS. Después del último lavado las células se resuspendieron en medio de cultivo para células HUVEC (Medio 199 (Gibco) 40 %, mezcla de nutrientes F12(Sigma) 40 %, HEPES (Sigma) 1 M, NaHCO_3 (Sigma) 200 mM, L-glutamina (Sigma) 2 mM, bFGF (Prepro Tech) 50 ng/ml, EGF (Prepro Tech) 20 ng/ml, Heparina (Sigma) 3000 unidades, agua desionizada estéril 20 %) y se crecieron hasta alcanzar confluencia en cajas preparadas con gelatina (Sigma) al 0.2%. Los cultivos confluentes fueron cosechados (EDTA (Sigma) 10 mM, tripsina (Gibco) 0.05%) y se transfirieron las células a las cajas necesarias para cada experimento.

-Microscopía de fluorescencia:

Se sembraron células HUVEC en laminillas con cámaras de 8 pozos (20,000 células por pozo) (Nunc) y se dejaron adherir toda la noche. Al día siguiente se removió el medio de

cultivo, se agregó medio fresco y se expusieron las células a 0, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} , así como un testigo positivo expuesto a $\text{TNF}\alpha$ (R&D systems) (10 ng/mL). Después de 6 horas de exposición las células se lavaron con PBS a 4°C y se fijaron con metanol a -20°C por 10 minutos. Las células se secaron al aire y se rehidrataron con PBS. La muestra se bloqueó con una solución de suero fetal de cabra al 20% y se incubó por 20 minutos. Después de lavar con PBS se incubó con el anticuerpo anti-selectina-E (R&D systems) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante una hora a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS se agregó un anticuerpo secundario marcado con FITC (Sigma) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las laminillas fueron evaluadas por medio de microscopia de fluorescencia (Olympus). Zonas representativas de las imágenes observadas fueron fotografiadas utilizando un objetivo de veinte aumentos.

-Citometría de flujo:

Para el análisis por citometría de flujo se prepararon tres diferentes condiciones de las PM_{10} : partículas totales, fracción soluble e insoluble, y partículas totales adicionadas con polimixina-B (Sigma) para bloquear a la endotoxina presente. La obtención de la fracción soluble e insoluble de las PM_{10} se obtuvo por resuspensión de las partículas en medio de cultivo para células HUVEC. Después de 10 minutos de mantener a las partículas en suspensión se centrifugó a 3,000 X g durante 10 minutos. Se consideró que el sobrenadante contenía la fracción soluble, mientras que el botón contenía la fracción insoluble (Dreher *et al.* 1997). El botón fue nuevamente resuspendido en el volumen original de medio. Para bloquear la endotoxina las partículas fueron suspendidas en medio de cultivo para células HUVEC y se les adicionó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polimixina-B (Sigma) (Ning *et al.* 2000, Jiménez *et al.* 2000, Becker *et al.* 2002).

La concentración final a la que se expusieron las células fue de $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} y se utilizó un cultivo expuesto solamente al medio de cultivo como testigo negativo. Después de 6 horas de exposición las células fueron cosechadas con una solución de PBS-EDTA 10 mM. Las células se resuspendieron en una solución de PBS-suero fetal de cabra (Sigma) (20 %) por 20 minutos a 4°C . Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en $200 \mu\text{L}$ de PBS con anticuerpo anti selectina-E (R&D Systems) ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubó por 1 hora a 4°C . Para cada grupo de células se procesó un tubo al que no se adicionó anticuerpo anti selectina-E, como testigo interno de la técnica. Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en $200 \mu\text{L}$ de PBS con anticuerpo anti IgG murino marcado con FITC (Sigma). Las células se incubaron por 30 minutos a 4°C en la oscuridad, se lavaron con PBS y se resuspendieron en paraformaldehído al 4 % en PBS. Los tubos se guardaron en la oscuridad a 4°C hasta la mañana siguiente para su análisis.

La población celular fue seleccionada en el citómetro de flujo (Becton Dickinson Scan Flow) con base a su tamaño y granularidad. Se determinó la intensidad de la fluorescencia presente en 10,000 células. Se determinó el incremento de la fluorescencia en relación con los testigos internos, calculando el número de veces que se incrementó la expresión. Los datos se organizaron como promedio y desviación estándar.

Análisis estadístico:

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces y los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Los resultados de los cometas se presentaron como mediana, máximo y mínimo, percentiles 25 y 75 y valores extremos. La citotoxicidad, los cursos temporales de necrosis-apoptosis, los cometas y la producción de citocinas se evaluaron con una análisis de varianza de dos vías, y la apoptosis y la selectina-E se evaluó con un análisis de varianza de una vía. Los análisis se realizaron con el

programa STATA para Windows (Versión 6.0, 1999) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0.05.

Correlación de efectos biológicos con la concentración de endotoxina y metales de transición determinados en las PM₁₀

Los niveles de los efectos inducidos por PM₁₀ fueron organizados y analizados en relación a la concentración de endotoxinas y de metales, expresadas en EU/cm² y pmol/cm² respectivamente a las diferentes concentraciones utilizadas. Para esto se realizó primero una transformación de los datos de concentración de metales a su log₍₁₀₎ debido a que todos los datos mostraban asimetría con un sesgo considerable a la derecha. Una vez transformados los datos se realizó una correlación lineal de Pearson para determinar el valor de “r” para cada uno de los elementos y los efectos evaluados. Posteriormente se analizó si existía colinearidad entre los elementos analizados. Con base en esto se establecieron dos modelos, uno de los cuales incluyó Ni, Zn y Pb (modelo 1) y otro que incluyó Cu, Fe y Endotoxina (modelo 2). Estos modelos fueron analizados por medio de regresión múltiple. El análisis multivariado nos permitió establecer los valores de p (significancia estadística) para aquellos componentes que no presentaron colinearidad. Por medio de un análisis de “regresión a pasos” se estableció que elementos explican la correlación encontrada. Los valores de p se consideraron significativos cuando fueron menores a 0.05.

RESULTADOS

Concentración de elementos presentes en las PM₁₀

En todas las muestras se encontró la presencia de Cu, Fe, Ni, V, Zn y Pb. Se observó un gradiente en la concentración de estos metales relacionado con la zona, siendo mayor la concentración en las partículas del Norte, seguidas por las del Centro y con una concentración menor, las del Sur, excepto el Ni, que presentó un gradiente inverso (Cuadro 1). Los elementos que se observaron en mayor concentración fueron Fe, Zn y Pb.

Cuadro 1

Concentración* de Cu, Fe, Ni, V, Zn y Pb en PM₁₀ de la ciudad de México.

Partícula	Cu	Fe	Ni	V	Zn	Pb
Norte	0.836 (18.8) [13.15]	4.001 (1.7) [71.64]	0.222 (0.0) [3.78]	0.390 (49.0) [7.65]	6.975 (60.5) [106.68]	2.904 (6.4) [14.01]
Centro	0.351 (8.3) [5.52]	3.998 (1.2) [71.58]	0.273 (0.0) [4.65]	0.333 (29.7) [6.53]	1.905 (30.6) [29.13]	2.526 (1.7) [12.19]
Sur	0.136 (0.0) [2.13]	3.806 (1.4) [68.15]	0.353 (0.0) [6.01]	0.230 (31.7) [4.51]	0.793 (12.1) [12.12]	1.106 (8.0) [5.33]

*La concentración está expresada en microgramos por miligramo de partícula. El número entre paréntesis indica el porcentaje del metal que es soluble en agua. El número entre corchetes indica la concentración en picomoles por microgramo de partículas totales.

Concentración de endotoxinas presentes en las PM₁₀

Las concentración de endotoxinas fue mayor en las partículas del Norte (17.8 EU/mg) que en las del Centro y Sur (10.8 y 11.3 EU/mg), respectivamente (Cuadro 2)

Cuadro 2
Concentración de endotoxina presente en PM₁₀ de la ciudad de México.

PM ₁₀	Conc. * Promedio (Rango)
Norte	17.8 (15.3-20.6)
Centro	11.3 (4.1-18.4)
Sur	10.8 (5.3-16.3)

*La concentración está expresada en EU por miligramo de partículas.

Muerte Celular

a) Ensayos de citotoxicidad:

Las partículas de la ciudad de México indujeron una disminución en la viabilidad de los cultivos de células monocíticas (J774A.1) pero no indujeron cambios en los cultivos de células epiteliales (A549). Estas variaciones en la viabilidad se hacen evidentes a partir de 48 horas de exposición. En el caso de las células J774A.1, las disminuciones en la viabilidad fueron dependientes de la concentración y las partículas del Norte indujeron una caída más importante en la viabilidad (Figura 4). Los decrementos en la viabilidad se presenta de forma mas pronunciada después de 72 horas de exposición (Figura 4A).

En el caso de las células A549, los cambios en la viabilidad no fueron estadísticamente significativas y no se apreciaron diferencias estadísticas entre las partículas provenientes de las diferentes zonas (Figura 5).

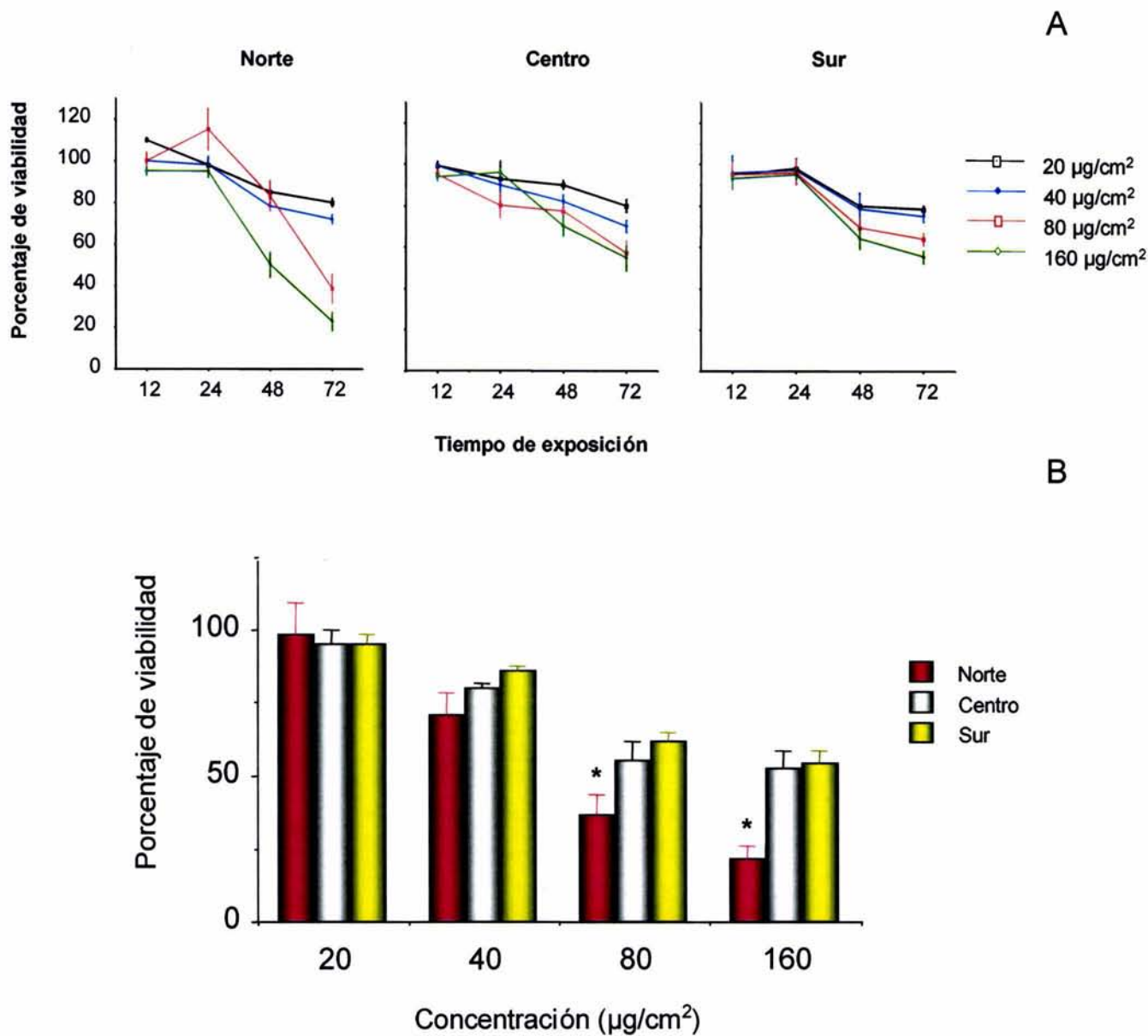


Figura 4: Variaciones en la viabilidad de células J774A.1 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. A) Curso temporal de 12 a 72 horas de exposición. B) Comparación del efecto de las partículas de las tres zonas después de 72 horas de exposición. Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes zonas.

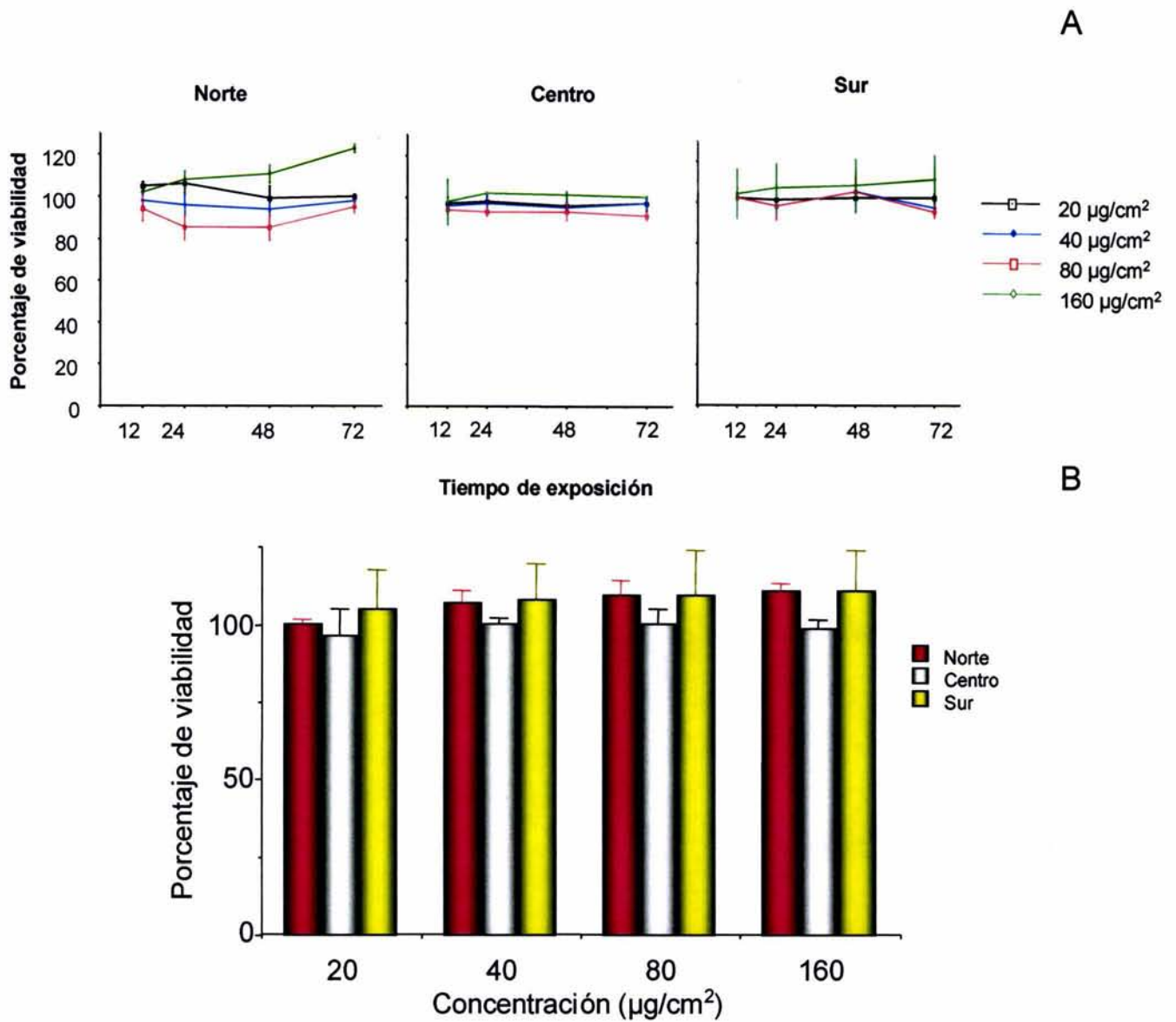


Figura 5: Variaciones en la viabilidad de células A549 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. A) Curso temporal de 12 a 72 horas de exposición. B) Comparación del efecto de las partículas de las tres zonas después de 72 horas de exposición. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Detección de apoptosis por el método de TUNEL:

La presencia de muerte celular por apoptosis después de 72 horas de exposición muestra que dependiendo de la estirpe celular se tienen respuestas diferentes. En el caso de las células J774A.1 se observa un incremento en la fluorescencia de alrededor del 15 %, siendo el efecto similar con todas las partículas evaluadas (Figura 6).

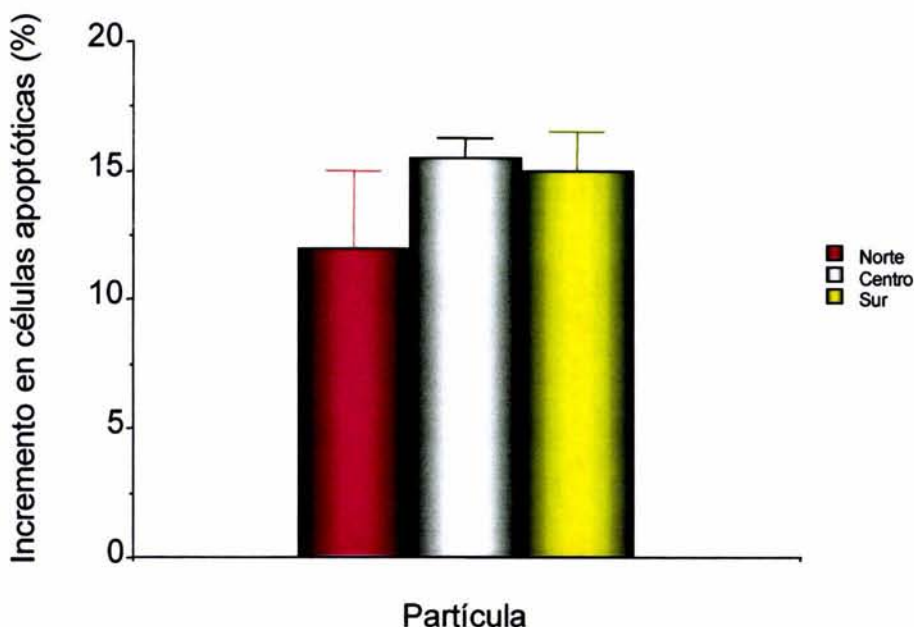


Figura 6: Porcentaje de células J774A.1 positivas para el marcaje de TUNEL después de 72 horas de exposición. Las partículas de las tres zonas fueron capaces de inducir un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de células que presentan extremos 3' libres de DNA. No se observó diferencias estadísticas entre las partículas evaluadas. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

En el caso de las células A549 se observaron disminuciones en la viabilidad menores al 15 % y presentaron un efecto diferencial, siendo mas importante con las partículas del Norte, menos con las partículas del Centro y aún menor con las partículas del Sur (figura 7).

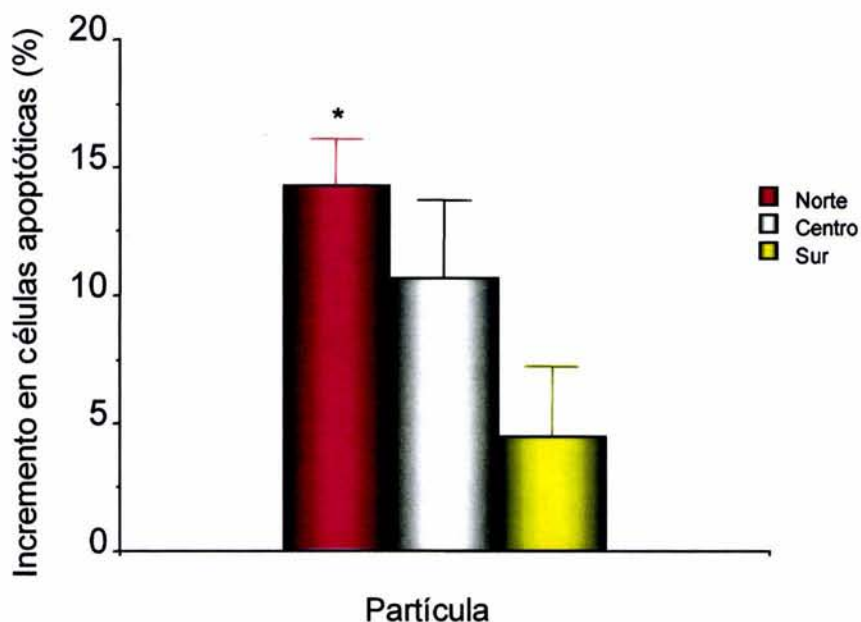


Figura 7: Porcentaje de células A549 positivas para el marcaje de TUNEL después de 72 horas de exposición. Las partículas de las tres zonas fueron capaces de inducir un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de células que presentan extremos 3' libres de DNA en comparación al testigo negativo. Las partículas del Norte indujeron un efecto mas potente que las del Centro y Sur ($p < 0.05$). Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas.

b) Detección de muerte celular (apoptosis y necrosis) por el método de anexina V:

A todos lo tiempos evaluados, las partículas del Norte indujeron mayores porcentajes de muerte celular (Figuras 8 y 9). Las partículas del Norte presentaron una tendencia a inducir efectos mayores que las partículas del Centro y Sur. El efecto máximo de muerte celular se observa en los cultivos de J774A.1, después de 8 horas de exposición a partículas del Norte (Figura 8).

Porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células J774 A.1 expuestas a PM10 de la ciudad de México

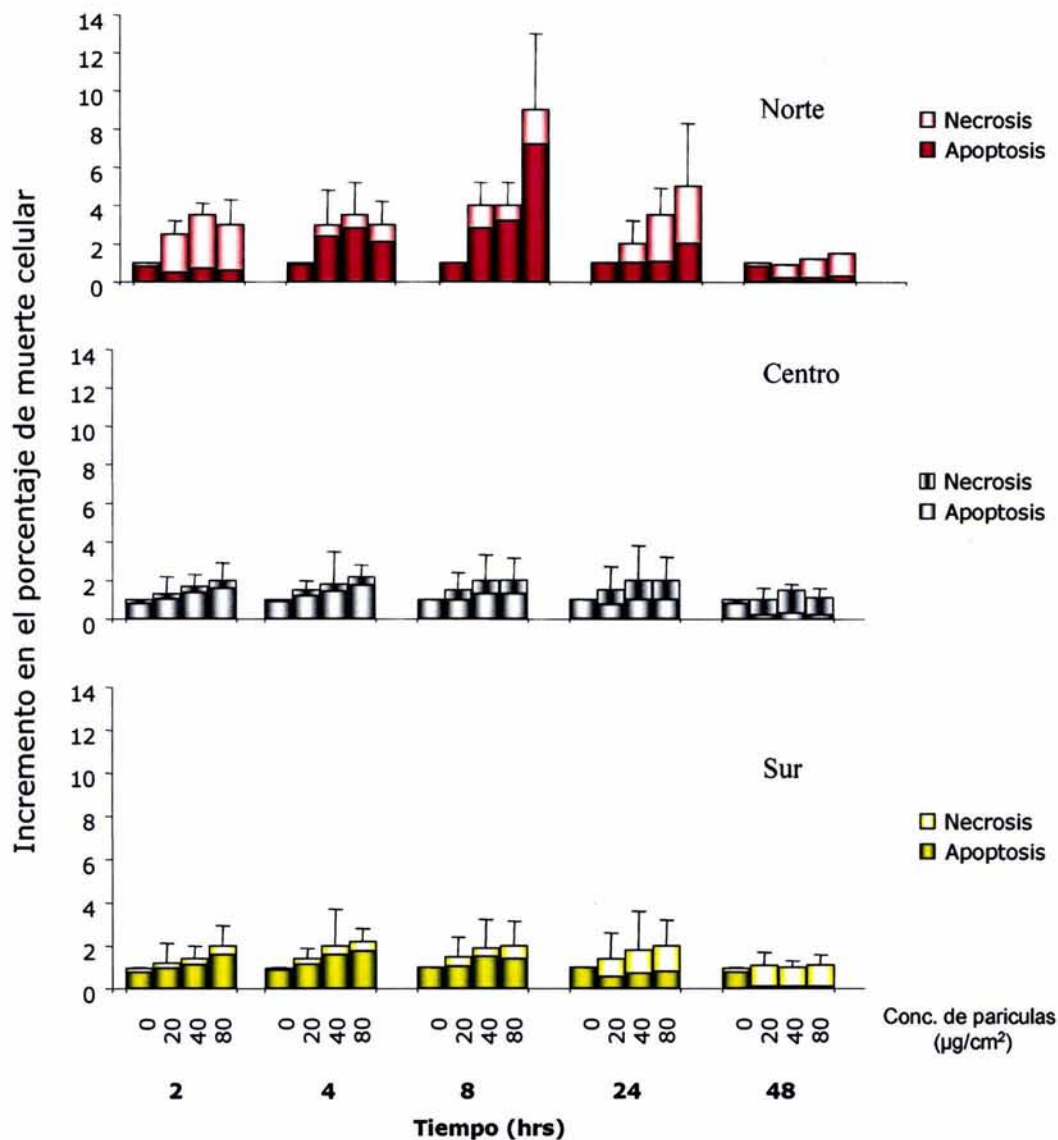


Figura 8: Incremento en el porcentaje de células que presentaron muerte celular (necrosis y apoptosis) detectable por el ensayo de unión de anexina V en cultivos de células J774A.1 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. Se presentan los resultados de un curso temporal de hasta 48 horas. Los resultados se expresan como promedio ± desviación estándar.

En el caso de las células A549 el efecto fue homogéneo a lo largo del tiempo (Figura 9), ya que las proporciones de muerte celular total fueron similares a todos los tiempos evaluados. Sin embargo se observa que a las 2 horas de exposición, las partículas del Norte

indujeron una mayor proporción de necrosis que las partículas del Centro y Sur, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Porcentaje de muerte celular por apoptosis y necrosis en células A549 expuestas a PM10 de la ciudad de México

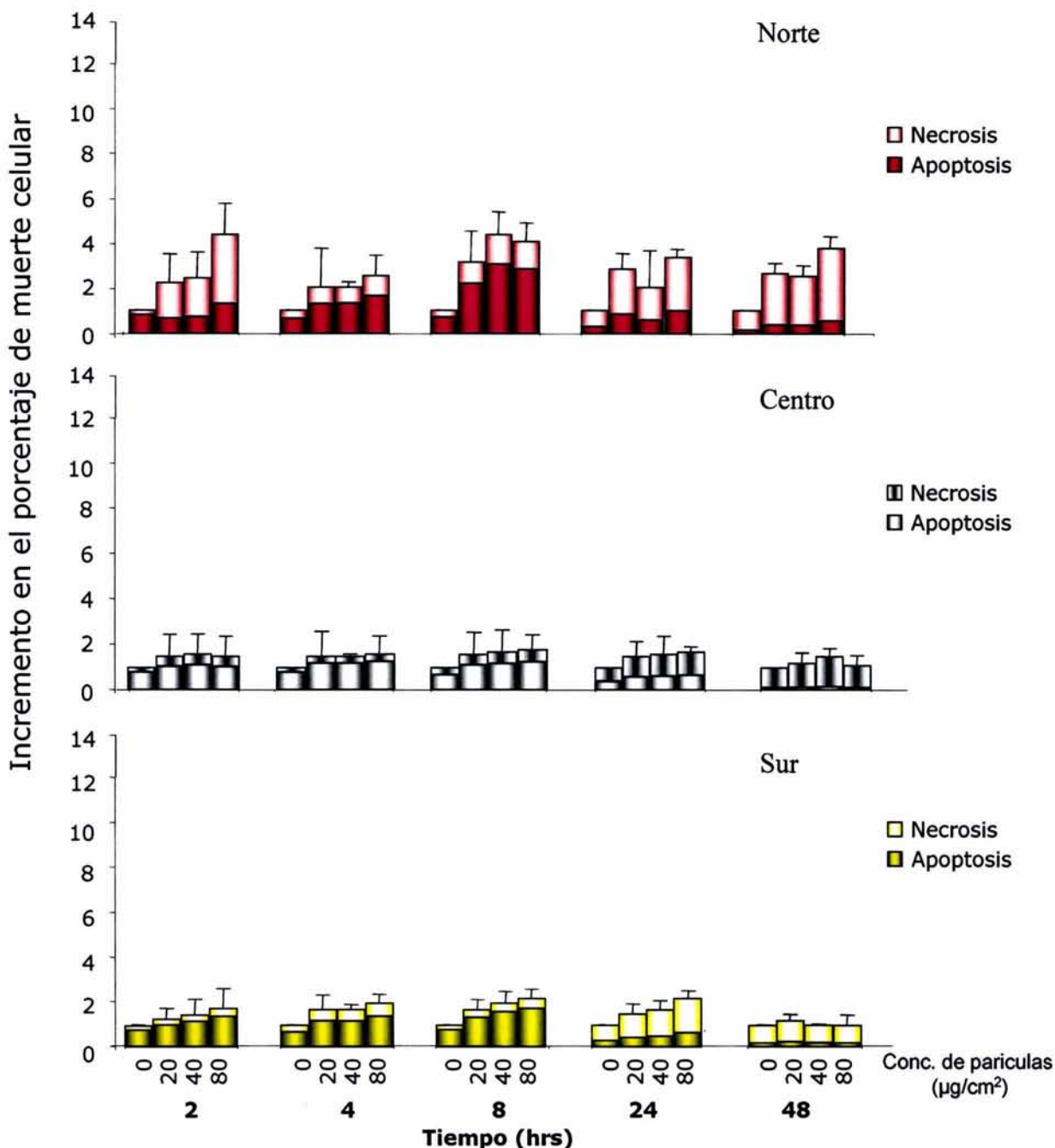


Figura 9: Incremento en el porcentaje de células que presentaron muerte celular (necrosis y apoptosis) detectable por el ensayo de unión de anexina V en cultivos de células A549 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. Se presentan los resultados de un curso temporal de hasta 48 horas. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Cuando se determinó la proporción de células apoptóticas presentes en los cultivos, se observó que después de 2 horas de exposición las partículas del Norte se asociaron con una importante proporción de necrosis (80 % de las células que se encuentran en proceso de muerte), mientras que las partículas del Centro y del Sur inducen principalmente apoptosis (70-80% de las células que se encuentran en proceso de muerte). Esta diferencia desaparece a partir de la cuarta hora de exposición (Figuras 8 y 9).

Daño al DNA producido por PM₁₀ en cultivos de células Balb C3T3

Todas las muestras de PM₁₀ evaluadas fueron capaces de inducir una mayor movilidad electroforética del DNA (cometas) después de 72 horas de exposición (Figura 10). Estos efectos fueron dependientes de la concentración. Las partículas provenientes tanto del Norte como del Centro presentaron cometas más largos que los inducidos por partículas del Sur ($p < 0.0001$). A la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ las partículas del Norte y Centro indujeron cometas de los cuales más del 50 % presentaron una longitud mayor al percentil 75 del testigo. Las partículas del Sur requirieron de una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para inducir un efecto similar. Todas las partículas al ser evaluadas a concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (datos no mostrados), indujeron cometas en los que la longitud de los cometas se mantuvo similar que a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

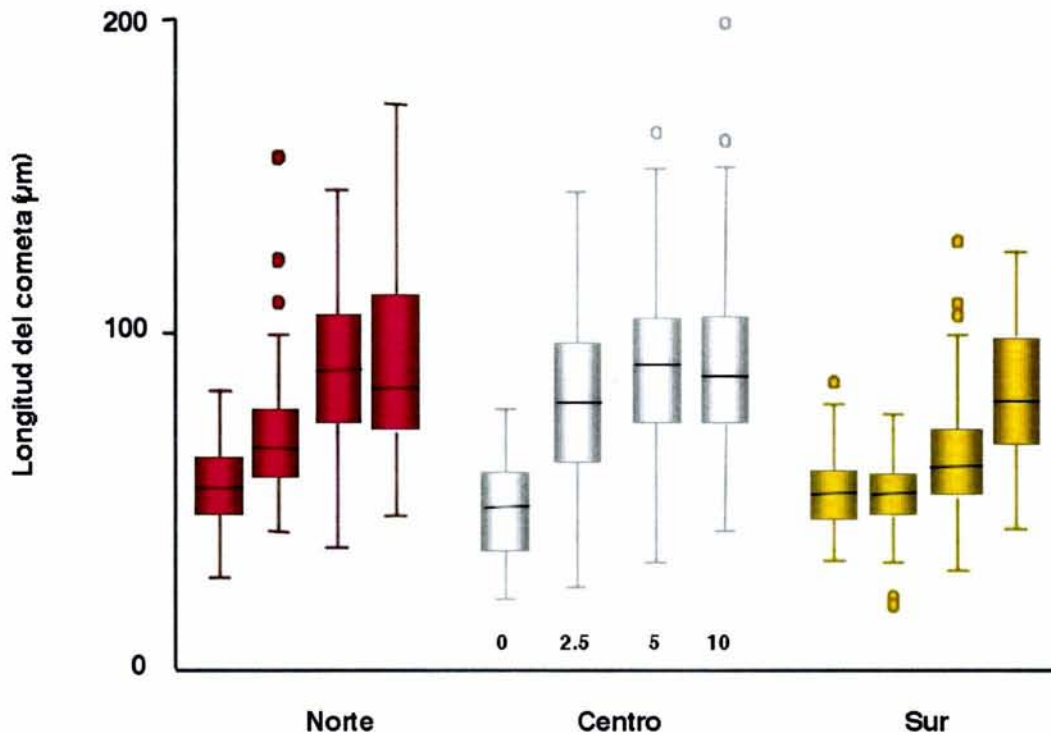


Figura 10: Distribución de las longitudes de cometas en células Balb C3T3 expuestas por 72 horas a PM_{10} de la ciudad de México. Las partículas del Norte y Centro indujeron cometas mas largas que los inducidos por las partículas del Sur ($p < 0.0001$). A partir de la concentración de $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observa que entre el 50 al 75 % de las células expuestas a PM_{10} del Norte y Centro presentan cometas con una longitud mayor a la presente en cultivos testigo. Los resultados se expresan como mediana, percentil 25 y 75, rangos y valores extremos.

Debido a que la presencia de células que mueren por apoptosis podría favorecer la presencia de cometas largos, se evaluó la presencia de células apoptóticas bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados muestran que el porcentaje de células apoptóticas es muy pequeño (Figura 11) en comparación a la proporción de cometas con una longitud mayor al percentil 75 del testigo.

Determinación de células apoptóticas presentes en cultivos de células Balb c 3T3 después de 72 horas de exposición a PM10 de la ciudad de México

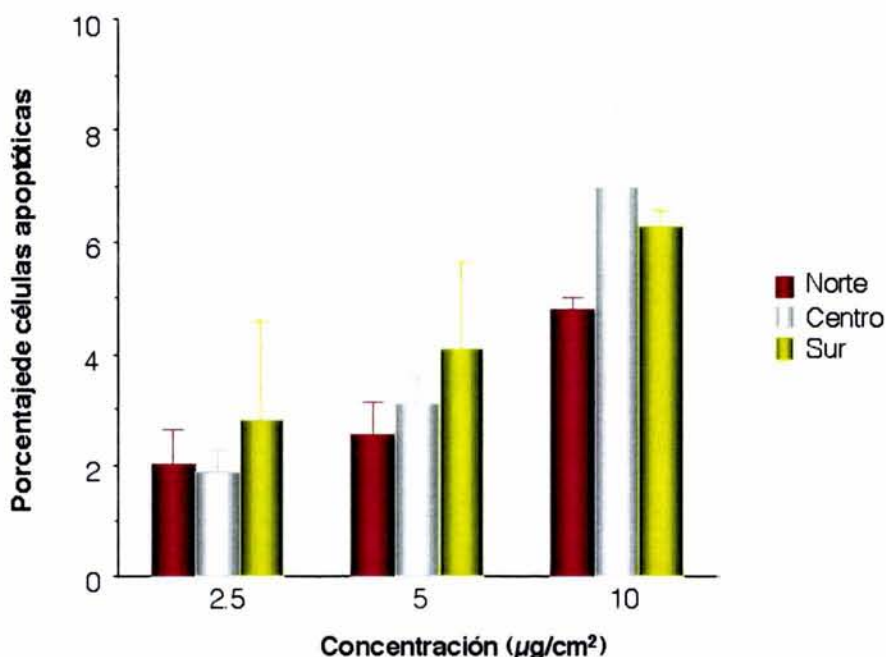


Figura 11: Muerte celular por apoptosis detectada por el método de TUNEL en cultivos de células Balb c 3T3 expuestas a PM₁₀ de la ciudad de México por 72 horas. La proporción de células apoptóticas fue menor al 10% en todos los casos. Se observa un efecto concentración-respuesta, aunque todas las partículas indujeron un efecto similar. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Expresión de Citocinas en cultivos celulares expuestos a PM₁₀:

a) Células J774A.1: Las partículas fueron capaces de inducir la secreción de TNF α e IL-6. Esta respuesta fue dependiente de la concentración de las partículas y se obtuvo la respuesta más importante a la concentración de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En la expresión de TNF α (Figura 12) se observa una tendencia de que las partículas colectadas en el Centro de la ciudad de México indujeron una mayor respuesta celular, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

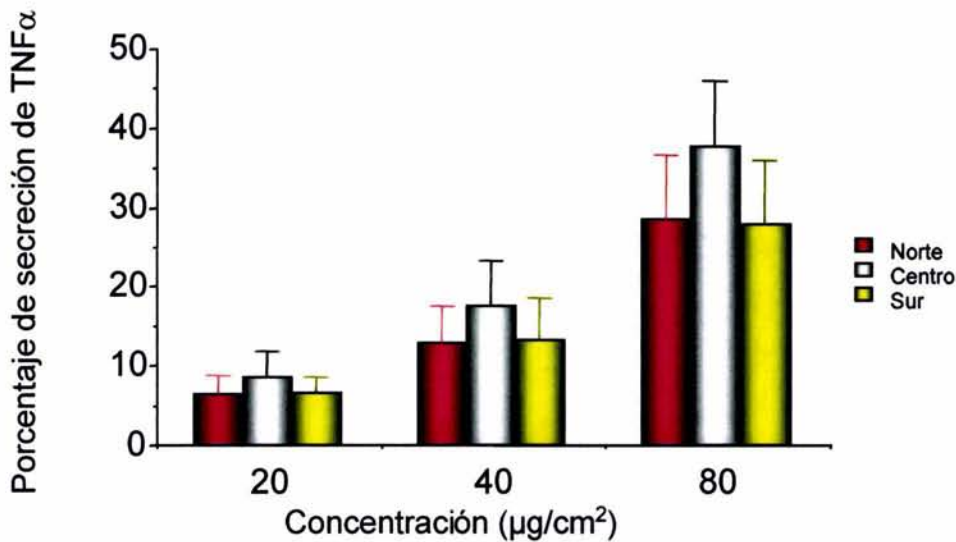


Figura 12: Porcentaje de secreción de TNF α por células J774A.1 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. El porcentaje de secreción se calculó en relación a la cantidad de TNF α secretada (17.8 ± 2.4 ng/mL) por un cultivo testigo expuesto a 10 µf/mL de LPS. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. Los incrementos en la secreción de TNF α fueron estadísticamente significativos al compararlos con el cultivo testigo.

En el caso de expresión de la IL-6 (Figura 13) se observa la misma tendencia, pero en este caso las diferencias si fueron estadísticamente significativas.

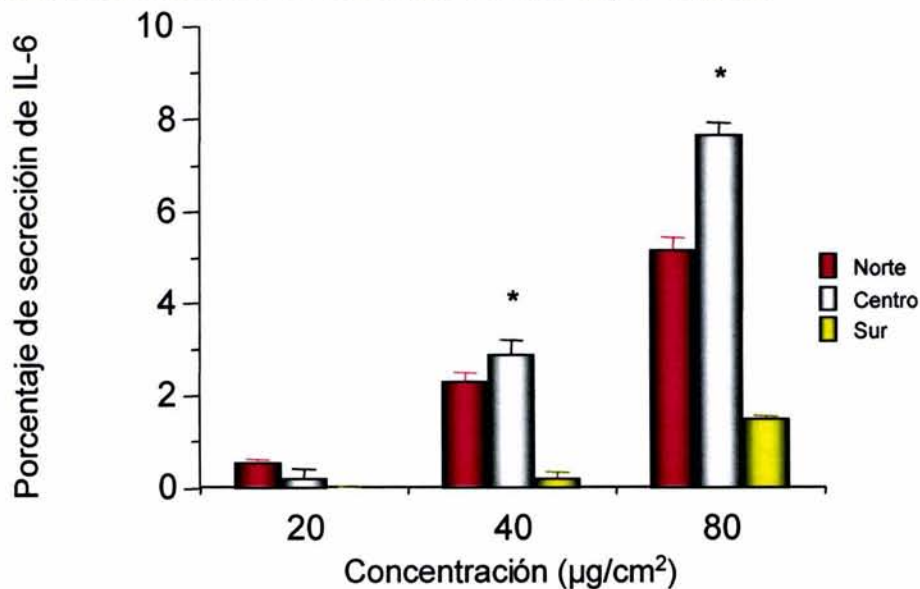


Figura 13: Porcentaje de secreción de IL-6 por células J774A.1 expuestas a PM₁₀ de tres zonas de la ciudad de México. El porcentaje de secreción se calculó en relación a la cantidad de IL-6 secretada por un cultivo expuesto a 10 µg/mL de LPS. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes zonas. Los incrementos en la secreción de IL-6 fueron estadísticamente significativos para todas las partículas al compararlos con el cultivo testigo.

Las partículas del Centro indujeron los mayores incrementos en la secreción de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 alcanzando un máximo en el porcentaje de secreción de $37.7 \pm 8.4\%$ y $7.1 \pm 0.3\%$ a la concentración de $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, cuando se compara con lo secretado por células expuestas a LPS.

Expresión de Selectina-E en cultivos de células endoteliales expuestas a PM_{10} :

Cultivos de HUVEC fueron expuestos a PM_{10} de tres diferentes zonas de la ciudad de México a concentraciones de 10, 20 y $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y se detectó la expresión de selectina-E por medio de inmunofluorescencia. La expresión de selectina-E presentó una relación concentración-respuesta para todas las partículas analizadas. A la concentración de $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se observó la mayor intensidad en la expresión de la selectina-E (figura 14).

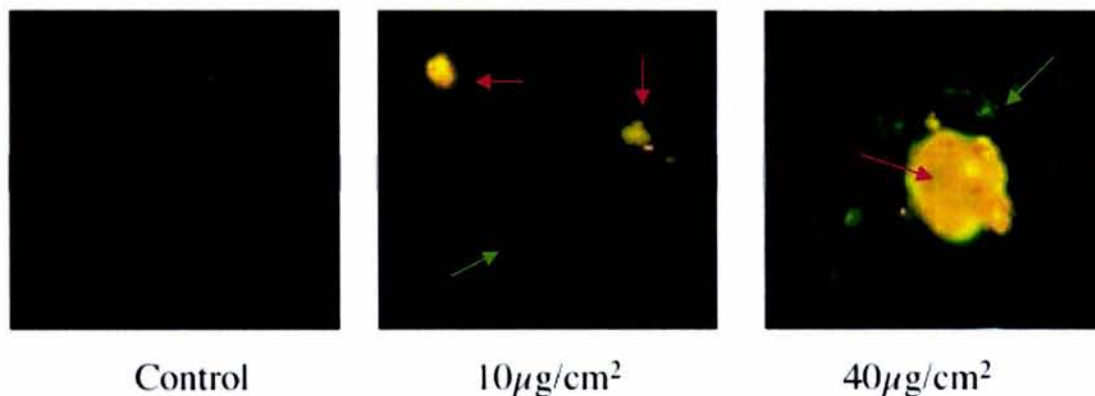


Figura 14: Detección de selectina-E por medio de inmunofluorescencia en cultivos de HUVEC expuestos a PM_{10} del Norte de la ciudad de México. Se presentan de izquierda a derecha un cultivo sin exponer a partículas, un cultivo expuesto a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y un cultivo expuesto a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de partículas provenientes del Norte de la ciudad de México. Las células marcadas con fluorescencia en verde se consideran positivas para la expresión de selectina-E (flechas verdes). Algunas partículas adicionales presentaron autofluorescencia (flechas rojas).

Cuando se comparan la expresión de selectina-E en cultivos expuestos a partículas de diferentes zonas por medio de inmunofluorescencia, las imágenes sugieren que las partículas del Norte y Centro inducen un efecto mayor que las del Sur (Figura 15)

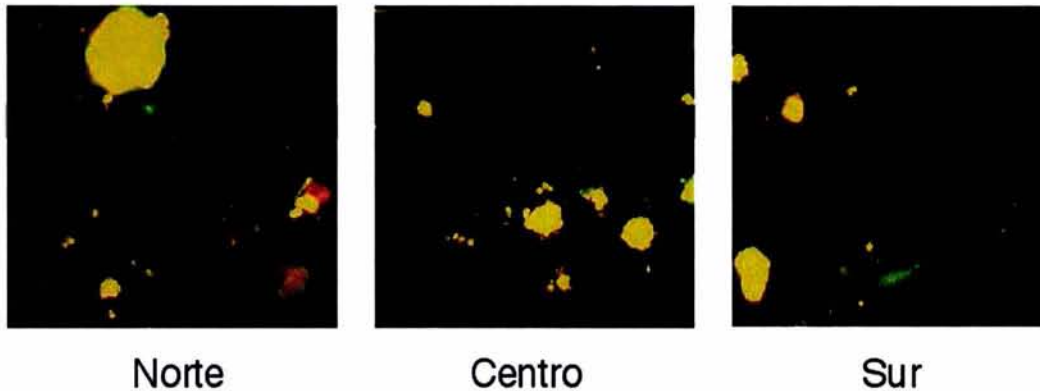


Figura 15: Detección de selectina-E por medio de inmunofluorescencia en cultivos de HUVEC expuestos a PM_{10} de tres zonas de la ciudad de México. Se presentan de izquierda a derecha cultivos expuestos a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ del Norte, Centro y Sur de la ciudad de México. Las células marcadas con fluorescencia en verde se consideran positivas para la expresión de selectina-E

Con el objeto de obtener un resultado cuantitativo de la expresión de selectina-E, cultivos de HUVEC expuestos a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} de tres diferentes zonas de la ciudad de México fueron procesados para detectar la expresión de selectina-E por citometría de flujo. El análisis por citometría de flujo mostró que las PM_{10} de las tres diferentes zonas de la ciudad de México indujeron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la activación de HUVEC expuestas, siendo este incremento entre 3 y 7 veces en comparación con el testigo negativo. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las diferentes PM_{10} (figura 16).

Debido a que la endotoxina es capaz de inducir la expresión de selectina-E, se evaluó si la presencia de un bloqueador de la endotoxina (polimixina-B) sería capaz de bloquear total o parcialmente el efecto de las partículas. En la Figura 16 se muestra que la presencia de polimixina-B bloqueó parcialmente el efecto de las PM_{10} . De las partículas que fueron

pretratadas con polimixina-B únicamente en el caso de las partículas del Centro de la ciudad se encontraron diferencias con las partículas totales ($p < 0.05$) (figura 16).

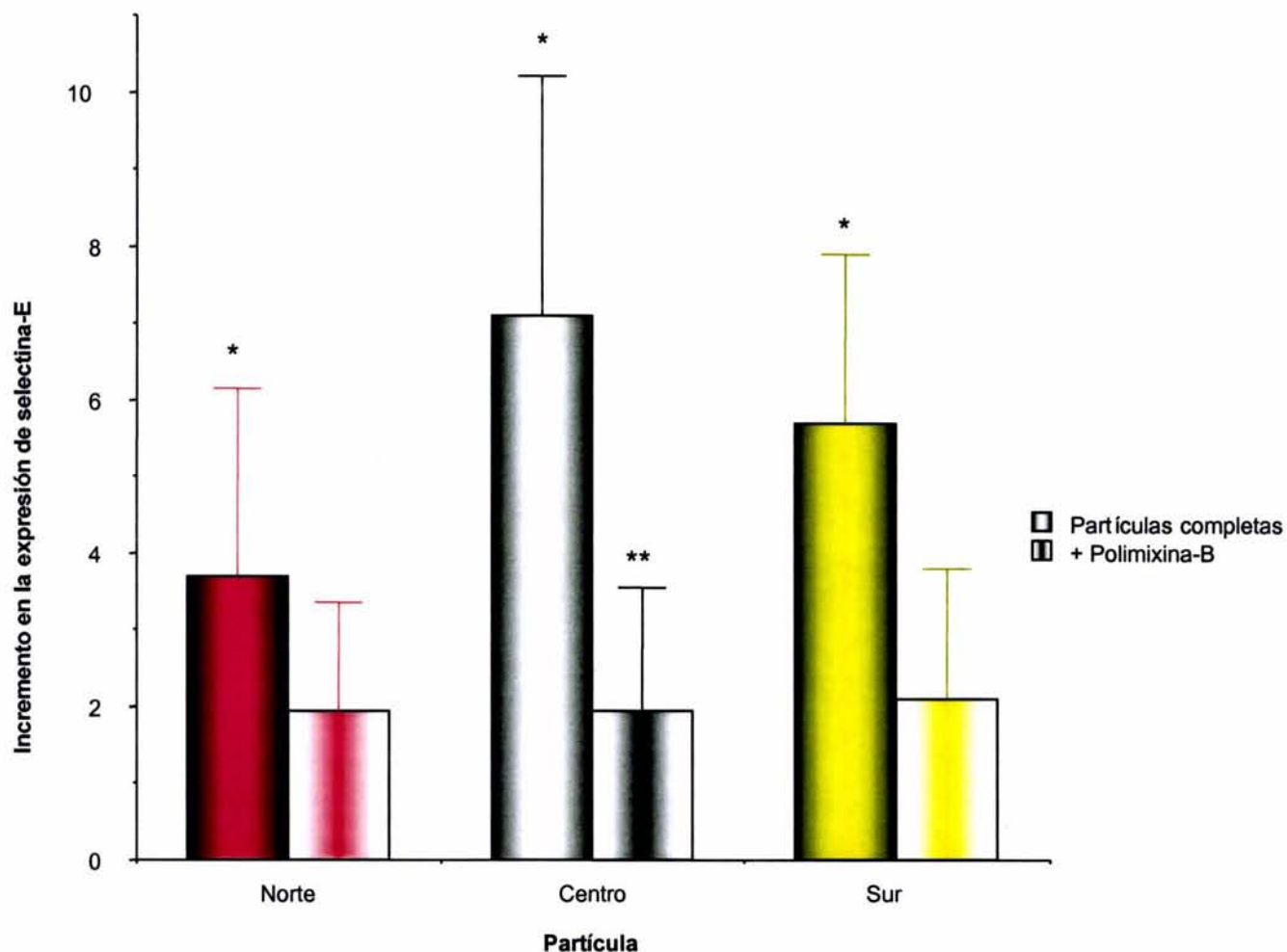


Figura 16: Incremento en la expresión de Selectina-E en cultivos de HUVEC expuestos a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} . Las partículas de las tres zonas fueron capaces de inducir incrementos en la expresión de selectina-E en comparación con los cultivos testigo (* $p < 0.05$). La presencia de polimixina inhibió de forma significativa el efecto de las partículas del Centro (** $p < 0.05$). Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Dado que en las PM_{10} se encuentran componentes solubles e insolubles se evaluó la capacidad de las fracciones insoluble y soluble de las partículas para inducir la expresión de selectina-E. Para esto se realizaron extracciones acuosas. En la Figura 16 se muestra que las fracciones insolubles de todas las partículas fueron capaces de incrementar los niveles de expresión de selectina-E (figura 17). Por otra parte, las fracciones solubles de las PM_{10} de las

tres zonas de la ciudad de México no fueron capaces de inducir incrementos significativos en la expresión de Selectina-E. Si se suman los efectos producidos por las dos fracciones, no se alcanzan los niveles de activación que inducen las partículas totales.

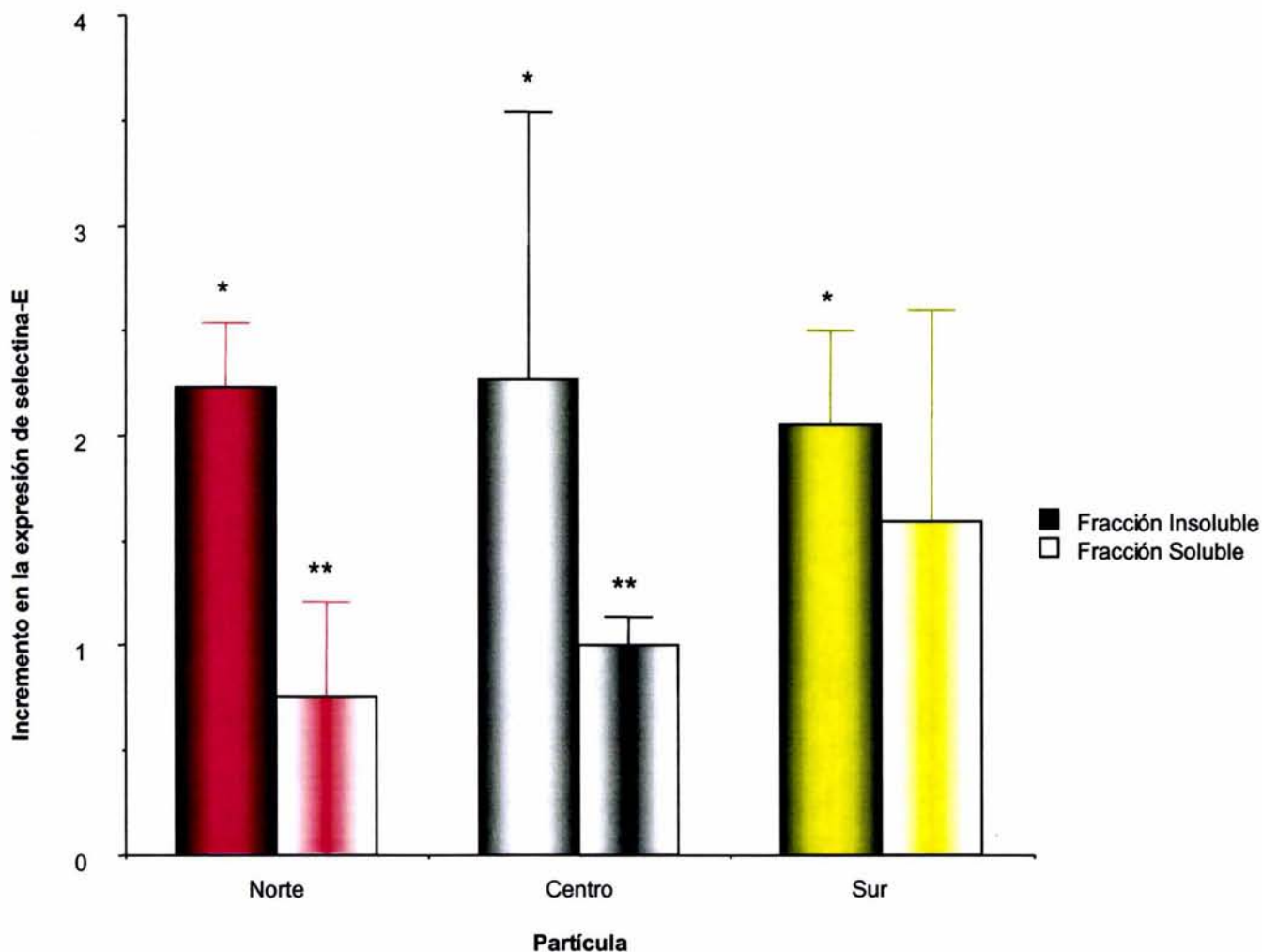


Figura 17: Incremento en la expresión de Selectina-E en cultivos de HUVEC expuestos a $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de PM_{10} . La fracción insoluble de las partículas fue capaz de inducir incrementos en la expresión de selectina-E, mientras que la fracción soluble no indujo cambios en los niveles de expresión. * $p < 0.05$ vs. el cultivo testigo. La fracción soluble de las partículas del Norte y Centro indujeron niveles de expresión de selectina-E menores a los de las correspondientes fracciones insolubles (** $p < 0.05$). Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar.

Correlación de efectos biológicos con la concentración de endotoxina y metales de transición determinados en las partículas

Los componentes que fueron analizados en las partículas presentaron diferentes niveles de correlación con los efectos biológicos evaluados (Cuadro 3). La viabilidad presentó correlaciones altas con el contenido de endotoxina ($r = -0.92$), V ($r = -0.90$), Pb ($r = -0.86$), Fe ($r = -0.88$), Cu ($r = -0.83$), Ni ($r = -0.82$) y Zn ($r = -0.82$). La secreción de $TNF\alpha$ presentó una buena correlación con la endotoxina ($r = 0.60$) el Fe ($r = 0.68$), Ni ($r = 0.64$) y V ($r = 0.65$), mientras que la secreción de IL-6 correlacionó con la presencia de endotoxina ($r = 0.75$), Cu ($r = 0.73$), V ($r = 0.85$), Fe ($r = 0.77$), Zn ($r = 0.65$) y Pb ($r = 0.87$). La expresión de Selectina-E correlacionó únicamente con el contenido de endotoxina ($r = -0.619$). La presencia de cometas no presentó correlaciones mayores a 0.50 con ninguno de los componentes analizados.

Cuadro 3: Valores de correlación (correlación lineal de Pearson) entre componentes y efectos (viabilidad, $TNF\alpha$, IL-6, selectina-E y cometas).

	Viabilidad	$TNF\alpha$	IL-6	Selectina-E	Cometas
Endotoxina	- 0.92	0.60	0.75	- 0.61	0.36
Cu	- 0.83	0.41	0.73	NS	0.41
Fe	- 0.88	0.68	0.77	NS	0.35
Ni	- 0.82	0.64	0.59	NS	0.23
V	- 0.90	0.65	0.85	NS	0.42
Zn	- 0.82	0.35	0.65	NS	0.38
Pb	- 0.86	0.58	0.87	NS	0.46

*En rojo se presentan todas aquellas correlaciones con una $p < 0.01$. En amarillo se presentan las correlaciones con valores de p entre 0.01 y 0.1. La "NS" indica correlaciones que presentaron una $p > 0.1$.

La presencia de necrosis tuvo una buena correlación con el Zn a las 2 ($r = 0.73$) y 8 ($r = 0.5$) horas de exposición y con el Cu a las 2 horas ($r = 0.65$), mientras que la apoptosis correlacionó con el Cu ($r = 0.62$), el Zn ($r = 0.67$) y la endotoxina ($r = 0.52$) a las 8 horas de exposición (Cuadro 4).

Cuadro 4: Valores de correlación entre componentes con necrosis y apoptosis.

Tiempo de exposición	Necrosis			Apoptosis		
	2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.	2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.
Endotoxina	0.40	NS	0.34 (0.08)	NS	NS	0.52
Cu	0.65	NS	0.47 (0.01)	NS	0.41 (0.04)	0.62
Fe	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ni	NS	NS	NS	0.41 (0.03)	NS	NS
V	NS	NS	NS	NS	NS	0.45 (0.02)
Zn	0.73	0.33 (0.1)	0.5 (0.01)	NS	0.45 (0.02)	0.67
Pb	0.39	NS	0.36 (0.07)	NS	NS	0.47 (0.01)

*En rojo se presentan todas aquellas correlaciones con una $p < 0.01$. En amarillo se presentan las correlaciones con valores de p entre 0.01 y 0.1. La "NS" indica correlaciones que presentaron una $p > 0.1$.

Se analizó la correlación existente entre los diferentes componentes conocidos de las PM_{10} para determinar la colinearidad. Este análisis mostró una asociación positiva muy fuerte ($r > 0.94$) entre Zn y Cu, Pb y Cu, Ni y Fe, V y Fe, Pb y V, Pb y endotoxina, así como V y endotoxina (Cuadro 5). Debido a esto se generaron dos modelos de análisis de regresión lineal múltiple, en los que se incluyeron al Ni, Zn y Pb (modelo 1) y al Cu, Fe y Endotoxina (modelo 2) como los componentes independientes. El V no pudo ser incluido en ningún modelo debido a su alta colinearidad con componentes que fueron incluidos en los dos modelos.

Cuadro 5: Análisis de colinearidad entre los componentes conocidos de las PM₁₀

	Cu	Fe	Ni	V	Zn	Pb
Cu						
Fe	0.81					
Ni	0.67	0.98				
V	0.91	0.98	0.92			
Zn	0.99	0.75	0.60	0.86		
Pb	0.96	0.93	0.83	0.98	0.91	
Endotoxina	0.90	0.90	0.92	0.99	0.86	0.95

Los resultados de la regresión lineal múltiple se resumen en los cuadros 6 y 7. El cuadro 6 muestra que la viabilidad tiene una relación directa con el contenido de Ni, Zn y endotoxina. En cuanto a la secreción de TNF α se observa que tanto Ni y Fe explican la secreción. En el caso de la IL-6 se observa que Pb, Cu y Fe son los que presentan una participación estadísticamente significativa. Para la selectina-E, ninguno de los componentes explica estadísticamente los efectos.

Cuadro 6: Valores de significancia estadística y “regresión a pasos” para los componentes analizados en las PM₁₀ en relación con los efectos biológicos medidos

		Viabilidad	TNF α	IL-6	Selectina-E
Modelo 1	Ni	0.000 (-)	0.113	0.39 (-)	Excluido
	Zn	0.000 (-)	0.36 (-)	0.001(-)	0.14 (-)
	Pb	0.008	0.11 (-)	0.000	0.35
Modelo 2	Cu	0.18	0.32	0.000	0.69
	Fe	0.04	0.01	0.000	Excluido
	Endo.	0.001 (-)	0.21 (-)	0.000(-)	0.27 (-)
	R ² _a	0.86	0.44	0.81	0.18
	p	0.0000	0.0001	0.0000	0.231
RP	Ni, Zn, Pb, Endo.	Ni, Pb, Fe	Pb, Zn, Cu, Fe, Endo.	Ninguno	

*La presencia de (-) indica que la pendiente de la recta fue negativa. Modelo 1 (componentes en azul) incluye Ni, Zn y Pb; modelo 2 (componentes en rojo) incluye Cu, Fe y Endotoxina. Endo. = Endotoxina. R²_a = valor de r² ajustado. RP = Regresión a pasos. Los valores expresados en negritas representan aquellos que explican estadísticamente el efecto inducido por las partículas.

En el cuadro 7 se muestra que la necrosis y la apoptosis presentan una correlación importante con Zn, Fe y endotoxina después de 2 horas de exposición. A los 8 horas de exposición se observa que el Zn y la endotoxina tienen una muy alta correlación con la apoptosis.

Cuadro 7: Valores de significancia estadística y “regresión a pasos” para los componentes analizados en la PM₁₀ en relación con necrosis y apoptosis

		Necrosis			Apoptosis		
		2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.	2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.
Modelo 1	Ni	0.57	0.59	0.83	0.72	0.67	0.181
	Zn	0.000	0.15	0.09	0.027 (-)	0.049	0.001
	Pb	0.001 (-)	0.37 (-)	0.47 (-)	0.077	0.24 (-)	0.045 (-)
Modelo 2	Cu	0.87	0.85	0.69	0.64	0.98	0.8 (-)
	Fe	0.000	0.26	0.22	0.011	0.11	0.011 (-)
	Endo.	0.000	0.29	0.303	0.064 (-)	0.16	0.015
	R ² _a	0.75	0.03	0.18	0.27	0.27	0.48
	p	0.0000	0.316	0.057	0.018	0.068	0.0004
	RP	Pb, Zn Endo. Fe	Zn	Zn Endo. Fe	Pb, Zn Endo. Fe	Zn Endo. Fe	Zn Endo. Fe

La presencia de (-) indica que la pendiente de la recta fue negativa. Modelo 1 (elementos en azul) incluye Ni, Zn y Pb; modelo 2 (elementos en rojo) incluye Cu, Fe y Endotoxina. Endo. = Endotoxina. R²_a = valor de r² ajustado. RP = Regresión a pasos. Los valores expresados en negritas representan aquellos que explican estadísticamente el efecto inducido por las partículas.

En el caso de los cometas se observó que el Cu (p < 0.000), Fe (p < 0.000), Pb (p < 0.000) y endotoxina (p < 0.000) tienen una correlación estadísticamente significativa con el incremento en el tamaño de los cometas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permitieron observar que las partículas de diferentes zonas de la ciudad de México inducen diferentes efectos biológicos, la mayoría de ellos de una manera diferencial relacionada con la zona en la que las PMs fueron colectadas. Los efectos evaluados fueron: muerte celular siendo las partículas del Norte las que indujeron un mayor efecto (cerca de 80 % de disminución en la viabilidad) (Figura 4). Esta muerte celular se dio tanto por necrosis como por apoptosis (Figuras 6 a 9), pero las partículas del Norte indujeron muerte por necrosis a 2 horas mayor de lo que indujeron las partículas del Centro y Sur (2.9 % vs 0.5 y 0.6 respectivamente) (Figuras 8 y 9). Las partículas indujeron daño en el DNA a concentraciones subletales y en este caso, las partículas del Norte y Centro indujeron un efecto mayor que las del Sur (78.4 y 73.3 % de cometas mayores al percentil 75 del testigo, vs 43.7 % a la concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Figura 10). En cuanto a la capacidad de provocar un efecto proinflamatorio, las partículas del Centro indujeron una mayor secreción de moléculas proinflamatorias (39 % para el Centro vs. 29 % para el Norte y Sur en el caso de $\text{TNF}\alpha$; 6.7 % para el Centro vs. 4.7 y 1.5 para el Norte y Sur en el caso de IL-6) (Figuras 12 y 13). Finalmente las partículas activaron cultivos de células endoteliales, (de 3 a 7 veces con respecto al testigo) (Figuras 14 a 16). En el caso de las células endoteliales los resultados obtenidos sugieren que la endotoxina parece jugar un papel parcial en la inducción de la expresión de la selectina-E (Figura 16) y que se requiere de la interacción directa de las partículas para inducir la expresión de selectina-E (Figura 17). Los efectos generados por las partículas mostraron diferentes correlaciones con el contenido de metales de transición y endotoxina, siendo Fe y Zn los componentes que mejor correlacionaron con los efectos evaluados (Cuadros 3-7).

La evaluación de los efectos biológicos de las partículas contaminantes ambientales a nivel celular es de gran importancia para comprender los procesos de patogénesis relacionados con estas partículas. Hasta el momento existen una gran variedad de estudios epidemiológicos en los que se describen diversos factores asociados a los efectos de las PMs, aunque en la mayoría de ellos no se considera a la composición de las partículas como un factor importante (Beeson *et al.* 1998, Borja-Aburto *et al.* 1997, Castillejos *et al.* 2000, Mar *et al.* 2000, Nel *et al.* 2001, Pope *et al.* 1999, Pope y Dockery 1992, Romieu *et al.* 1998, Samet *et al.* 2000, Schwartz 1994). Afortunadamente, dentro de los estudios experimentales, cada vez es más común observar que el factor de la composición de las partículas así como la evaluación de partículas provenientes de diferentes fuentes va tomando cada vez más importancia (Bonner *et al.* 1998, Holian *et al.* 1998, Moon y Becker 1999, Obot *et al.* 2002, Osornio-Vargas *et al.* 2003). Sin embargo, este es posiblemente el primer estudio en donde se evalúan PMs con diferencias en la composición, en diferentes estirpes celulares. Las diferentes estirpes celulares fueron seleccionadas con base en su posible papel teórico en algunos órganos expuestos en un individuo.

Las diferencias en la concentración de componentes tales como metales de transición, azufre y endotoxinas nos indican que las diferencias en las fuentes asociadas a la emisión de las aeropartículas repercuten directamente en su composición. Considerando que las partículas son una mezcla muy compleja en la que encontramos muchos otros componentes tales como hidrocarburos, biopartículas (polen, esporas, hongos, bacterias, etc), metales y minerales entre otros (Miranda J *et al.* 1992, Salazar S *et al.* 1993, Rosas *et al.* 1998, Romieu *et al.* 1999 Bonner JC *et al.* 1998), nos invita a analizar mas a fondo la composición de las partículas para identificar posibles componentes responsables de efectos biológicos. Esto

adquiere particular relevancia al considerar que en el caso de los metales, el estado de oxidación de estos es un factor importante de su toxicidad.

En el presente estudio se evaluó la muerte celular, daño al DNA, expresión de citocinas proinflamatorias y activación de células endoteliales. Todas estas respuestas participan en el posible efecto que un individuo podría presentar al exponerse a las partículas por su inhalación.

Muerte celular y PM₁₀

El primer efecto que describiremos será el de la inducción de muerte celular. Previamente hemos reportado que las PMs inducen un efecto citotóxico que se manifiesta como una disminución en la viabilidad celular (Alfaro 1999) y en diversos estudios se describe tanto la disminución de viabilidad como la muerte por apoptosis en células expuestas a partículas urbanas (Moon y Becker 1999, Holian *et al.* 1998, Obot *et al.* 2002). Sin embargo, no hay hasta el momento un estudio en donde se describa la manera en que los diferentes mecanismos de muerte celular participan.

La capacidad de inducir muerte celular puede asociarse con distintos procesos que por diferentes mecanismos provocan la muerte de la célula (Manjo y Joris 1995). Estos mecanismos pueden ser independientes de cualquier programa genético, denominado necrosis u oncosis (Ma 2001), o con la participación de un programa genético denominado apoptosis (Evan 1998). El que una célula muera por necrosis o por apoptosis nos da una idea de lo que el inductor de muerte celular puede estar haciendo a las células (Manjo y Joris 1995, Evan 1998). Los procesos de muerte celular en el tracto respiratorio podrían estar jugando un papel al menos a dos niveles. Por una parte podrían estar participando en procesos de remodelación del pulmón (Uhal 2002), o bien podrían estar inhibiendo o exacerbando los procesos proinflamatorios dependiendo de si la muerte celular se da por vía

de la apoptosis (inhibiendo inflamación) o de la necrosis (exacerbando inflamación) (Evan y Littlewood 1998). Esto se debe a que cuando una célula muere por apoptosis, no se libera el contenido celular que favorece la inflamación, sino que son eliminadas por las células vecinas, mientras que si la muerte se da por necrosis, el proceso inflamatorio se ve favorecido al haber liberación del contenido celular.

La evaluación de viabilidad en células monocíticas y epiteliales de pulmón humano muestran que las PMs son capaces de inducir disminuciones importantes en la viabilidad a partir de las 48 horas de exposición en células monocíticas. Las partículas del Norte indujeron un efecto más potente que las partículas del Centro y Sur. La disminución de la viabilidad fue mas importante después de 72 horas de exposición y a este tiempo fue posible ver células muriendo por apoptosis (5 - 15 %). En el caso de los cultivos de células epiteliales se observó un efecto diferencial, siendo las partículas del Norte las mas potentes inductoras de muerte celular por apoptosis (14 % para el Norte vs 10 y 5 % para el Centro y Sur). Esto nos sugiere que a tiempos largos la presencia de muerte celular por apoptosis sigue participando de los procesos de muerte celular inducidos por partículas.

Las partículas de la ciudad de México fueron capaces de inducir tanto necrosis como apoptosis, aunque la proporción en la que estos tipos de muerte se presentaron variaron dependiendo del tipo de partícula que se evaluó, así como del tiempo de exposición. Bajo todas las condiciones evaluadas, las partículas del Norte indujeron mayores proporciones de muerte celular que las partículas del Centro y del Sur, independientemente de si se trató de necrosis o de apoptosis. Cuando se analiza el tipo de muerte celular involucrada se observa que después de dos horas de exposición, las PM_{10} del Norte indujeron principalmente muerte celular por necrosis, mientras que las PM_{10} del Centro y Sur indujeron principalmente apoptosis. A las cuatro horas y durante el resto de la evaluación, las proporciones de

necrosis/apoptosis permanecieron similares para todas las zonas, siendo la apoptosis la forma predominante de muerte hasta las 8 horas. A las 24 y 48 horas la presencia de muerte celular por necrosis se volvió la predominante, pero esto se puede deber a la presencia de necrosis secundaria a la apoptosis (Manjo y Joris 1995), por lo que es difícil establecer si a tiempos largos la necrosis es el proceso de muerte celular, o si es una consecuencia del tiempo que las células llevan muriendo.

Las partículas del Norte indujeron una proporción importante de necrosis a tiempos cortos de exposición. Considerando que estas partículas fueron las que presentaron un mayor contenido de metales de transición, estos podrían estar relacionados con alteraciones celulares capaces de inducir necrosis, tales como despolarización de la mitocondria (Hasinoff *et al.* 2003), o alteraciones a nivel de la glucólisis (Sheline CT *et al.* 2000), que se han asociado a los efectos tóxicos por metales de transición.

Tanto las partículas del Centro como las del Sur presentaron niveles similares de muerte celular, por necrosis y apoptosis. Esto sugiere que a las concentraciones a las que se encuentran los diferentes componentes, tales como metales de transición, hidrocarburos o endotoxinas, provocan efectos de muerte celular similares para las partículas provenientes de ambas zonas. Sin embargo, en otros estudios se ha observado que las capacidades genotóxicas (Villalobos *et al.* 1995) y proinflamatorias (Bonner *et al.* 1998) de las de partículas del Centro y Sur difieren de forma importante, por lo que la evaluación de citotoxicidad es insuficiente para caracterizar toxicológicamente a una partícula.

Todas las determinaciones de viabilidad se realizaron en condiciones de cultivos en proliferación. Previamente hemos demostrado que la partículas no inducen disminuciones en la viabilidad en cultivos confluentes (Alfaro-Moreno 1999, Martínez L 2001). Las células en proliferación muestran muerte tanto por necrosis como por apoptosis, aunque a partir de las

4 horas, la muerte se presenta principalmente por apoptosis. Esto nos sugiere que las células en proliferación son más susceptibles al efecto de las partículas. Una de las razones para esto podría deberse a que en las células en proliferación el DNA celular se encuentra más expuesto a los efectos de las partículas. Es por esto que se decidió evaluar el daño al DNA generado por las PMs en células expuestas. Para esto se utilizó un modelo de evaluación en células mesenquimatosas de ratón (balb c 3T3) utilizando la técnica electroforesis celular conocido como ensayo de cometas (Singh *et al.* 1988).

Daño al DNA inducido por PM₁₀

Las células expuestas a PMs presentaron una movilidad electroforética del DNA mayor que las células no expuestas, caracterizándose por la presencia de imágenes tipo cometa, mas largas. La longitud de los cometas aumentó conforme se incrementó la concentración de las partículas y las PMs del Norte y Centro fueron más potentes inductoras de este efecto que las PMs del Sur. El ensayo de cometas nos permite conocer si el DNA se encuentra fragmentado o si se forman fragmentos con el tratamiento alcalino. Cuando se da un rompimiento en el DNA, los fragmentos de DNA tienen una mayor movilidad electroforética, por lo que la imagen que se obtiene presenta un cometa con una cola mas larga. Si el daño al DNA no provoca un rompimiento, pero se encuentra asociado a un sitio frágil, este rompimiento se hace evidente al digerir las células ya que se realizan en condiciones de alcalinidad que permiten ver el daño a nivel del sitio frágil. El grado de enrollamiento del DNA también juega un papel importante, por lo que cambios en la conformación de la cromatina podrían estar influyendo en la longitud de los cometas. Nuestros datos muestran que las partículas de dos zonas presentaron efectos muy similares (Norte y Centro). A las concentraciones a las que se evaluó el daño al DNA (2.5 a 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) la capacidad de estas partículas de producir muerte celular fue similar. En nuestro laboratorio hemos demostrado

que las PMs de la ciudad de México inducen efectos diferenciales en la degradación de DNA desnudo, dependiendo de la presencia de peróxido de hidrógeno y relacionándose con la concentración de metales (Garcia-Cuellar 2002a, García-Cuellar 2003). De esta manera las partículas del Norte que tienen un mayor contenido de metales, generan una degradación de DNA mayor que las partículas del Centro y estas que las del Sur. Sin embargo en el modelo en el que usamos células completas esta diferencia no se presentó entre las partículas del Norte y el Centro. Eso nos sugiere que debe de haber más de un mecanismo involucrado en el daño a nivel del material genético. Una posibilidad es que la degradación de DNA se dé como consecuencia de una reacción tipo Fenton (García-Cuellar *et al.* 2002a) en la que se requiere de metales y peróxido de hidrógeno, y que también se den daños que no dependen de este tipo de degradación, sino de la formación de aductos (Risom 2003) o inducción de mutaciones (Villalobos *et al.* 1995). También existe la posibilidad de que un tipo de partícula genere un daño directo sobre el DNA mientras que otro tipo de partícula genere alteraciones en la conformación de la cromatina, provocando alteraciones epigenéticas (Gilmour *et al.* 2002).

La muerte celular por apoptosis se caracteriza por la degradación internucleosomal del DNA. Por esto, una célula apoptótica puede presentar una imagen de cometa, por lo que fue importante evaluar si este tipo de muerte celular no era la responsable de los rompimientos en el material genético detectados por el ensayo de cometas. La evaluación de apoptosis bajo las condiciones en las que se detectaron los cometas nos indica que este proceso de muerte celular no es un factor que determine la presencia de células con cometas largos, ya que menos del 10% de las células que presentaron extremos 3' libres, característicos de la degradación de DNA durante la apoptosis (Figura 11). Esto contrasta con el más del 50% de

células que presentaron cometas largos a partir de la concentración de $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 10), por lo que los cometas no son producto de la muerte celular, sino de daño al DNA.

La relación entre los resultados de muerte celular, daño al DNA y muerte por apoptosis nos permite ver que las PMs son capaces de provocar alteraciones en el DNA en concentraciones subletales. En principio, tras 72 horas de exposición, este daño al DNA no pareciera llevar a muerte celular. Datos preliminares de nuestro grupo de trabajo indican que la presencia de PMs a concentraciones subletales inducen a tiempos cortos la expresión de p53 y PARP que son moléculas de reparación del DNA (Garcia-Cuellar 2002b). Sin embargo desconocemos cual sea el estado de reparación bajo las condiciones evaluadas en el presente estudio. Finalmente, debido a que el ensayo de cometas utiliza el desenrollamiento del DNA como base para el corrimiento electroforético, es posible que la inducción de alteraciones en la topología del DNA como consecuencia de alteraciones epigenéticas pudieran ser responsables al menos en parte de estos efectos.

Producción de citocinas y PM₁₀

La inducción de la expresión de citocinas proinflamatorias es un claro indicador de que estas partículas son capaces de inducir respuestas inflamatorias. Estas respuestas inflamatorias pueden ser responsables de desencadenar alteraciones que desemboquen tanto en procesos de cambios respiratorios crónicos, así como en procesos de alteraciones agudas que incluso podrían relacionarse con efectos vasculares (Lambert 1988).

La evaluación de citocinas proinflamatorias inducidas por la exposición a partículas contaminantes atmosféricas son de gran importancia, debido a que algunos de los efectos con los que han sido relacionadas las PM₁₀ involucran procesos inflamatorios (Donaldson *et al.* 2000). Tanto el TNF α como la IL-6 han sido reportados como citocinas que podrían participar en los efectos pulmonares relacionados con la exposición a partículas

contaminantes (Moon y Becker 1999) ya que estas dos moléculas juegan un papel importante en la regulación de procesos inflamatorios.

Las células de origen monocítico tuvieron una respuesta importante a la presencia de las partículas con incrementos con respecto al testigo, de hasta el 40 % para el $\text{TNF}\alpha$ y de hasta el 8 % para la IL-6. El efecto diferencial observado en los niveles de secreción, tanto del $\text{TNF}\alpha$ como de la IL-6 sugiere que las diferencias en composición juegan un papel fundamental en la determinación de la intensidad de la respuesta proinflamatoria. Las partículas que fueron más proinflamatorias fueron las partículas del Centro, seguidas por las provenientes del Norte y finalmente por las del Sur.

Las diferencias en las concentraciones de componentes nos muestran que las partículas presentan diferentes concentraciones de metales de transición (cuadro 1) y de endotoxina (cuadro 2) y existen datos que señalan que las partículas del Centro podrían contener una mayor concentración de hidrocarburos que las del Norte y éstas que las del Sur (Villalobos *et al.* 1995). De todos estos componentes el mejor candidato a inducir un efecto proinflamatorio son las endotoxinas (Bonner *et al.* 1998). Recientemente hemos reportado que un inhibidor de la endotoxina es capaz de inhibir parcialmente la secreción tanto de $\text{TNF}\alpha$ como de IL-6 (Osornio-Vargas *et al.* 2003).

Por otra parte, la relación de concentración de endotoxina contra la intensidad de la respuesta no nos muestra una relación lineal, ya que en el caso del $\text{TNF}\alpha$ se observa que las diferencias entre la respuesta de las células a las diferentes partículas es muy pequeña (Figura 12), mientras que en el caso de la producción de IL-6 observamos diferencias de más de 5 veces entre la respuesta más intensa y la respuesta más pequeña (Figura 13). Las diferencias en la concentración de endotoxina entre las diferentes zonas fue de alrededor del

doble para el Norte que para el Centro y Sur y estas dos últimas presentaron concentraciones similares (Cuadro 2). Esto nos sugiere que la respuesta proinflamatoria no necesariamente se encuentra ligada a un solo componente y que la presencia de efectos antagonistas así como de efectos sinérgicos deben de estar jugando un papel importante en los efectos biológicos. Una posible explicación de este efecto diferencial podría radicar en el contenido de metales. Si la presencia de hierro o zinc se asocian con una disminución en la producción de energía, esto podría explicar una disminución en la síntesis de proteínas (Hassinoff BB *et al.* 2003, Sheline CT *et al.* 2000). Por otra parte, se sabe que uno de los mecanismos de control de expresión de factores proinflamatorios son cambios en la acetilación de histonas. Esto se refleja como un DNA mas relajado. El hecho de que las partículas del Centro sean menos potentes inductoras de degradación de DNA (García-Cuellar *et al.* 2002), pero presenten longitudes de cometas similares, sugiere que las partículas del Centro podrían estar induciendo cambios epigenéticos que favorecieran la expresión de moléculas proinflamatorias (Gilmour *et al.* 2002).

Activación de células endoteliales expuestas a PM₁₀

Por último, la presencia de la activación de células de origen endotelial, relaciona a las PMs con efectos vasculares, lo que es de gran importancia debido a las evidencias epidemiológicas que indican que la exposición a partículas se asocia con el incremento en el riesgo de efectos vasculares.

Los resultados en el presente estudio muestran que las partículas contaminantes atmosféricas de la ciudad de México fueron capaces de activar a las células endoteliales. La selectina-E fue utilizada como un marcador de activación celular debido a que es una molécula inducible que al ser expresada participa en el proceso de reclutamiento de leucocitos (Mathieu and El-Battari 2003). La inducción de la expresión de selectina-E sugiere

un mecanismo de inflamación inducido por las PM₁₀, lo cual podría llevar a cambios de tipo hemodinámico. Por otro lado, la activación de células del endotelio vascular sugiere que la expresión de otras proteínas podría ser inducida. Para verificar esto sería necesario evaluar la activación de moléculas tales como el factor tisular o la trombomodulina, que son moléculas involucradas en el control de la coagulación (Combes *et al.* 1999), así como la expresiones de moléculas como la EMAP-II que juega un papel importante en los procesos proinflamatorios (Tas y Murray 1996)

El mecanismo que relaciona la exposición a PM₁₀ con incrementos en los procesos inflamatorios y problemas cardiovasculares no ha sido determinado. La inducción de la expresión de moléculas que participan tanto en la regulación de los procesos inflamatorios (Nadadur and Kodavanti 2002), así como de moléculas que participan en la regulación de la coagulación (Nemmar *et al.* 2002b) son algunos de los mecanismos posiblemente asociados con la exposición a partículas. Hasta este momento existen datos controversiales en torno al efecto de las PMs en cambios en la regulación de la coagulación (Nadziejko *et al.* 2002), pero se necesitan realizar estudios en este campo. El presente estudio evalúa la capacidad de las PM₁₀ de la ciudad de México de inducir activación del endotelio vascular utilizando selectina-E como marcador.

Nuestros resultados muestran que las PM₁₀ de la ciudad de México fueron capaces de inducir la expresión de selectina-E de una manera dependiente de la concentración (Figura 14). Por medio de la evaluación por inmunofluorescencia, se ve que las partículas tuvieron una diferente capacidad para inducir la expresión de la selectina-E (figura 15), sin embargo, al realizar un análisis cuantitativo por medio de citometría de flujo, estas diferencias aparentemente desaparecieron (figura 16). Como se puede ver en las figuras 14 y 15, las partículas presentaron autofluorescencia en color amarillo y anaranjado. La evaluación de la

expresión de selectina-E se realizó con un anticuerpo fluoresceinado y la autofluorescencia de las partículas podría presentarse como ruido de fondo que enmascare las diferencias de expresión de selectina-E inducida por las diferentes partículas. Otra posibilidad es que las partículas de una zona (las del Sur) induzcan una menor proporción de células activadas, pero que esta señal sea mas intensa por cada célula activada. Desafortunadamente no nos fue posible discriminar la autofluorescencia e intensidad de fluorescencia detectable en la citometría de flujo, al tratar de realizar ajustes por compensación de los diferentes canales de detección.

Debido a que en las imágenes obtenidas con la inmunofluorescencia se observan células expresando selectina-E que están asociadas a partículas y otras que no están asociadas a partículas, decidimos evaluar el efecto de las fracciones solubles e insolubles por separado. La activación de las células endoteliales por la fracción insoluble, pero no por la fracción soluble de las partículas sugiere que un contacto directo entre las partículas y las células es requerido para que se induzca la expresión de selectina-E. Resultados similares se han observado cuando la citotoxicidad ha sido evaluada en diferentes líneas celulares (Martínez L 2001).

Existe evidencia que apoya que las partículas inhaladas son capaces de alcanzar el endotelio vascular, e incluso cruzar hacia la circulación (Nemmar *et al.* 2002^a). Por otra parte, la expresión de otras proteínas deberían de ser evaluadas para determinar si esta interacción directa entre partículas y células es necesaria para la activación del endotelio vascular, o si bien es un fenómeno asociado principalmente con la expresión de selectina-E.

La endotoxina es un componente que puede inducir la expresión de selectina-E (Landolt *et al.* 2002). Algunos estudios previos han mostrado que la endotoxina juega un papel importante en los procesos proinflamatoiros inducidos por las PM₁₀ (Bonner *et al.* 1998,

Jimenez *et al.* 2000, Becker *et al.* 2002, Osornio-Vargas *et al.* 2003). Sin embargo, la endotoxina no puede ser considerada como el único factor que puede inducir efectos proinflamatorios, por lo que otros componentes tales como los metales de transición (Bonner *et al.* 1998, Jimenez *et al.* 2000), componentes del suelo como Al, Si, K, Ca, Ti y Fe (Miranda *et al.* 1998), o carga de la superficie (Nemmar *et al.* 2002) debería de ser considerados. En el presente estudio utilizamos a la polimixina-B como un bloqueador de la endotoxina (Ning *et al.* 2000, Jimenez *et al.* 2000, Becker *et al.* 2002), pero solamente se observó una inhibición parcial cuando se comparó con el efecto inducido por las partículas totales. Debido a que se encontró expresión de selectina-E después de que las PM₁₀ fueron tratadas con polimixina-B, la endotoxina no puede ser considerada como el único componente responsable de la expresión de selectina-E, pero jugando un papel importante, ya que se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las partículas totales. Recientemente hemos realizado evaluaciones del papel de la endotoxina en PM₁₀ y PM_{2.5} en las cuales se utilizó una proteína recombinante capaz de neutralizar la endotoxina (rENP) (Osornio-Vargas *et al.* 2003). En este estudio corroboramos que al neutralizar la acción de la endotoxina se inhibe parcialmente el efecto proinflamatorio.

Se requieren realizar otros estudios para evaluar posibles efectos sinérgicos o antagónicos que pudieran presentar diferentes componentes de las PM₁₀. Los resultados de este trabajo muestran que las diferentes fracciones de las partículas no son tan potentes como las partículas totales. Aún considerando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las fracciones, los resultados sugieren que hay una tendencia de que las fracciones de las partículas podría estar interactuando de tal modo que incrementaran la actividad biológica de las partículas. Esto se hace más evidente si consideramos que la suma de los efectos de las diferentes fracciones no fue tan potente como el efecto total de las

partículas. Estudios previos han sugerido este tipo de interacciones. Por ejemplo, cuando el vanadio se ha evaluado de manera independiente, se requiere de una concentración muy elevada en comparación al contenido de este componente en las partículas para inducir efectos en miofibroblastos (Bonner *et al.* 1998). Es interesante que los niveles de selectina-E inducidos por la fracción insoluble de las partículas, fue similar al de las partículas tratadas con polimixina-B. Estos resultados sugieren interacciones entre estas dos fracciones.

Correlación de efectos biológicos con la concentración de componentes determinados en las PM₁₀

Hasta el momento, las evidencias presentadas nos hacen pensar que la composición de las partículas son un factor importante que determinan su efecto biológico. Para establecer si existen componentes que pudieran ser identificados como posibles responsables de los efectos observados, se determinaron los factores de correlación entre la concentración de los componentes conocidos, con los niveles de los efectos evaluados utilizando una correlación lineal de Pearson. Este análisis nos permitió identificar algunos componentes que correlacionan fuertemente con diferentes efectos. La citotoxicidad correlacionó con todos los componentes evaluados, mientras que la necrosis (después de 2 horas) y la apoptosis (después de 8 horas) correlacionaron con el zinc. La secreción de TNF α correlacionó con el contenido de endotoxina, Fe, Ni, V y Pb, mientras que la secreción de IL-6 correlacionó con el contenido de endotoxina, cobre, hierro, vanadio, zinc y plomo. La expresión de selectina-E no correlacionó con el contenido de los componentes evaluados. La presencia de cometas presentó correlaciones discretas con todos los componentes evaluados. Se encontró una alta colinearidad entre varios de los componentes evaluados. Esto puede deberse a que existan fuentes de emisión comunes para más de un componente de la mezcla. Considerando la alta colinearidad existente entre varios de los componentes,

fue necesario establecer dos modelos de análisis de regresión múltiple. El modelo 1 incluyó al Ni, Zn y Pb, mientras que el modelo 2 incluyó al Cu, Fe y Endotoxina. Considerando que la colinearidad es tan alta entre los componentes del modelo 1 y 2, los valores de R^2_a y “p” para estos modelos fueron idénticos. Sin embargo, la determinación de los valores de “p” para cada componente de estos modelos, aunado a la regresión por pasos, nos permitió identificar a aquellos componentes que “explican” estadísticamente los eventos observados.

Se observaron correlaciones de la citotoxicidad con el Ni el Zn y la Endotoxina, la secreción de $TNF\alpha$ con el Ni y el Fe y la secreción de IL-6 con la presencia de Pb, Cu y Fe. La presencia de cometas correlacionó positivamente con el contenido de Pb y tanto La necrosis (a las 2 horas) como la apoptosis (a las 8 horas) correlacionaron con la presencia de Zn.

El Zn y el Fe fueron los componentes que consistentemente presentaron correlaciones elevadas y estadísticamente significativas (Cuadros 6 y 7) con diversos efectos biológicos. En el caso del Zn se ve que correlacionó con efectos de muerte celular (citotoxicidad, necrosis y apoptosis), mientras que el Fe correlacionó con la secreción de citocinas, necrosis, apoptosis y daño al DNA. Esto podría ser de gran utilidad ya que el zinc y el Fe podrían ser “indicadores” de las mezclas complejas que son las PM_{10} , especialmente si se considera que dichos componentes no presentan colinearidad entre ellos. Estos indicadores nos permitirían tener una idea del posible potencial citotóxico de las PMs.

Debido a que las PM_{10} son mezclas complejas de las cuales mas del 80% del contenido es materia orgánica, sería muy aventurado el señalar como responsable de un determinado efecto a los componentes que presentaron correlaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, estos resultados nos abren varias posibilidades: 1) El elemento detectado con alta correlación estadística es el responsable del efecto observado; 2) El

elemento detectado presente una alta colinearidad con algún otro componente que es el responsable del efecto observado; 3) El elemento detectado que presenta una alta correlación estadística es un componente presente una alta colinearidad con algún otro componente del que se desconoce su concentración en la mezcla de partículas y 4) Los efectos observados no pueden atribuirse a un componente de la mezcla, sino a grupos de componentes.

Los resultados nos muestran diferentes grados de correlación entre efectos y componentes, pero si consideramos los gradientes de concentración de endotoxinas y metales (norte > centro > sur), y que únicamente la citotoxicidad muestra un efecto diferencial que presenta este mismo gradiente, podemos concluir que la determinación de correlaciones nos permite establecer que el contenido de metales y endotoxinas juegan un papel importante en la citotoxicidad. Sin embargo los otros efectos no mostraron consistencia en las correlaciones. Esto se puede deber a diversas causas: 1) Efectos antagónicos entre componentes que inducen e inhiben un efecto determinado, 2) Presencia de algún componente responsable del efecto medido, del cual desconocemos su concentración en la partícula y 3) Si los componentes metálicos presentan diferentes estados de oxidación que provoquen que sus efectos sean diferentes. Para establecer el papel que juega cada componente en un efecto determinado, siempre es necesario realizar contrastes entre partículas que presenten diferencias en la concentración de componentes. Si bien el uso de inhibidores "específicos" ha cobrado importancia para determinar el papel que juegan los diferentes componentes, muchos de estos inhibidores (v gr. Deferoxamina, N-acetil cisteína, manitol, polimixina-b etc.) pueden interferir con procesos celulares que de alguna manera podrían repercutir en el efecto que se desea evaluar. Es por esto que la determinación de

correlaciones entre efectos y componentes puede ser una buena manera de evaluar a las partículas contaminantes atmosféricas.

Recientemente se ha publicado una evaluación de los efectos citotóxicos de Cu, Fe, Ni, V y Zn (Riley *et al.* 2003) que son algunos de los componentes que nosotros evaluamos. En este estudio se establece por medio de la evaluación de sales comerciales que el potencial tóxico de los metales en orden descendente es $V > Zn > Cu > Ni > Fe$. Esto contrasta con nuestros resultados en donde el $V > Fe > Pb > Cu > Zn = Ni$ en su correlación con el efecto de citotoxicidad. Esto se puede deber tanto a efectos sinérgicos o antagónicos entre diferentes componentes. Por ejemplo, Riley y col. (Riley *et al.* 2003) reportan que al mezclar Zn con Cu y V se ve parcialmente inhibido el efecto del Cu y V, mientras que la mezcla de Zn con Ni provoca un mayor efecto de este último. Dada la complejidad de la mezcla en PMs, el uso de regresiones múltiples entre niveles de efecto y componente puede ser una herramienta útil en el análisis de los efectos tóxicos y nos puede ayudar a determinar si la mezcla a la que se expone una población es mas o menos peligrosa.

Es necesario realizar estudios en donde se correlacionen los efectos medidos con la mayor cantidad posible de componentes. Esto nos permitirá saber si estas correlaciones son un buen indicador de efecto. Este análisis nos permitiría tener una herramienta para estar alerta ante la elevación de la concentración de un componente específico en las mezclas de partículas. También nos permitiría discernir entre el riesgo de exponerse a concentraciones similares de partículas que contengan concentraciones diferentes de componentes tales como metales, hidrocarburos o endotoxinas.

Finalmente, uno de los aspectos mas importantes de la evaluación de PMs ha sido su tamaño. Múltiples estudios sugieren que el factor determinante para el efecto de una

partícula es su tamaño. Hay quien sugiere que las diferencias encontradas en estudios que comparan partículas relacionadas con diferentes fuentes de emisión, podrían explicarse por diferencias en la distribución en el tamaño de las partículas. Un estudio que derivó de la presente tesis demostró que la relación $PM_{10}/PM_{2.5}$ en diferentes zonas de la ciudad de México era similar, sin embargo, los efectos biológicos presentaron resultados consistentes con los aquí presentados (Osornio-Vargas *et al.* 2003). Estos resultados refuerzan de manera importante la hipótesis que defiende esta tesis, que señala que la composición de las partículas es crucial en sus efectos biológicos.

Como se puede ver a lo largo de la presente tesis, las PMs tienen efectos biológicos a muy diferentes niveles. Si bien este estudio no nos permite concluir cuales son los mecanismos que provocan efectos biológicos en un individuo expuesto a partículas, si nos permite conocer que la exposición a partículas genera respuestas biológicas que van mas allá del efecto mecánico de las partículas, y que los efectos biológicos que inducen pueden ser relacionados con los efectos descritos para individuos expuestos a partículas.

En resumen, podemos volver al diagrama propuesto en la introducción de esta tesis para hacer un recuento de los resultados obtenidos y su posible participación en la exposición de un individuo:

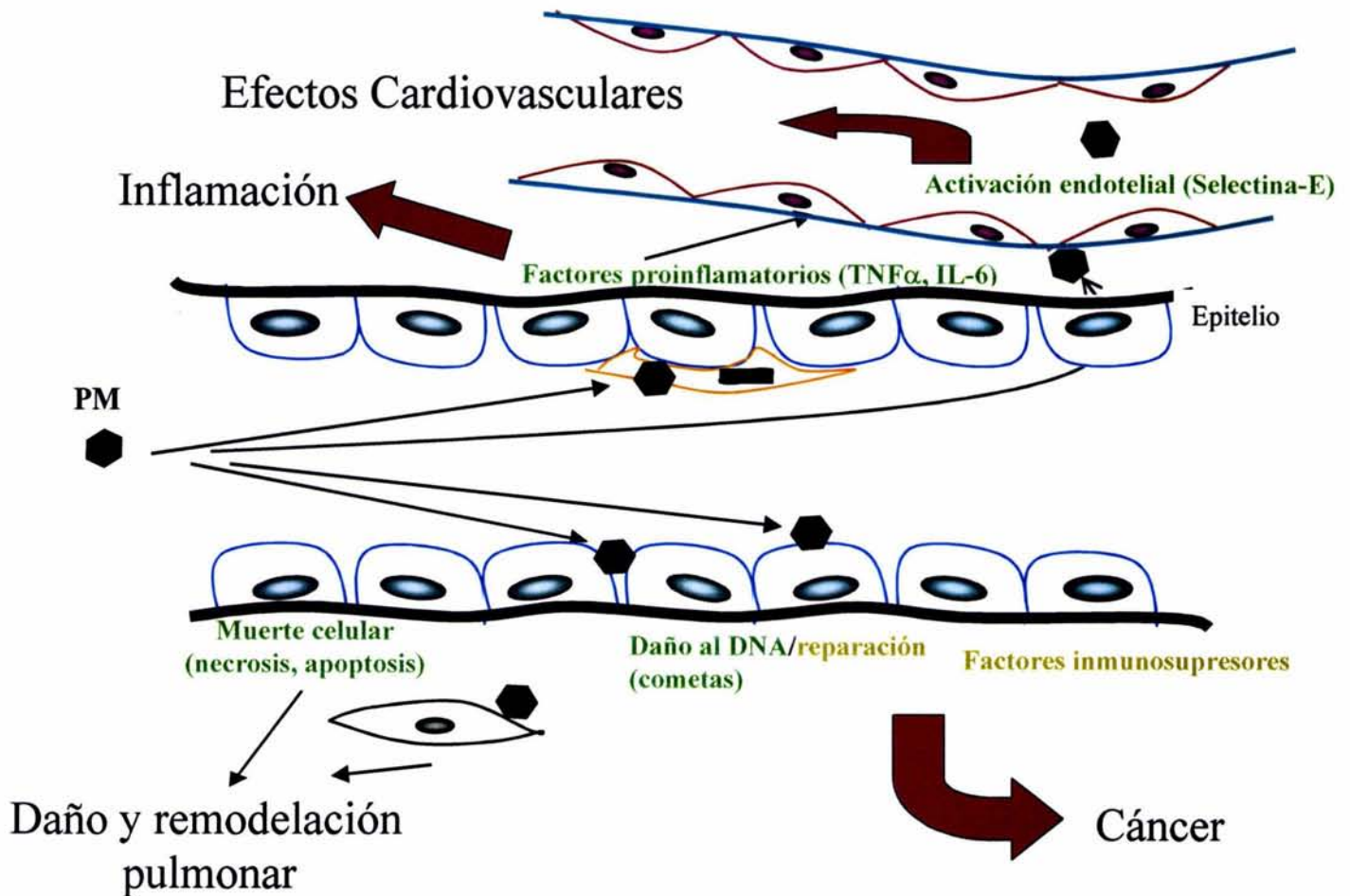


Figura 18: Esquema de los posibles efectos que se pueden inducir en un individuo expuesto a PM_{10} . En verde se marcan aquellos efectos que fueron evaluados en esta tesis y en amarillo se marca efectos de los que se ha generado evidencia posterior a esta tesis, siendo determinaciones que siguen en proceso de evaluación.

Nuestros resultados no nos permiten asegurar que alguno de los caminos propuestos en este diagrama hipotético se lleve a cabo. Sin embargo nos proporcionan una idea concreta de cuales son las posibles vías que deben ser consideradas para su evaluación. Para poder concluir cual es el camino que siguen las células al inducir un efecto biológico, será necesario realizar evaluaciones tanto en sistemas en los que se trabajen con cocultivos, así como con la exposición de animales e incluso evaluación de personas expuestas. Sin embargo, se derivan una serie de hipótesis que pueden ser evaluadas. De esta manera

nuestros resultados nos permiten proponer que es lo que sucede en un individuo expuesto y como se relaciona esto con los hallazgos epidemiológicos. Se puede postular que un individuo expuesto a partículas se relaciona con al menos cuatro eventos finales que son: lesión pulmonar y remodelación (Bonner *et al.* 1998, Dye *et al.* 2001), procesos inflamatorios (Donaldson *et al.* 2000, Nel *et al.* 2001, Saxon *et al.* 2000,) , efectos cardiovasculares (Campen *et al.* 2001, Campen *et al.* 2002, Le Tertre *et al.* 2002, Nemmar *et al.* 2002a, Peters *et al.* 1997, Vincent *et al.* 2001), y cáncer (Beeson *et al.* 1998, Pope *et al.* 2002, Risom *et al.* 2003). Cada uno de estos eventos finales se relacionan de alguna manera con nuestros resultados.

-Daño y remodelación pulmonar: La capacidad de las partículas para provocar muerte celular se puede asociar tanto a procesos de necrosis como de apoptosis. Si la muerte celular se da por necrosis, el evento que se verá favorecido es el de inflamación de las vías aéreas. Por otra parte, si la muerte celular se da por apoptosis, este tipo de muerte va a favorecer la remodelación del tejido. La muerte celular por apoptosis también se relaciona con el daño al DNA, el cual al ser controlado por medio de la apoptosis evita la perpetuación de alteraciones genéticas.

-Inflamación: Las partículas al depositarse en el tracto respiratorio son capaces de activar a los macrófagos los cuales pueden secretar citocinas tales como $TNF\alpha$, IL-1b o la IL-6. La secreción de estas citocinas puede provocar la migración de mas macrófagos al sitio del depósito de las partículas, o bien puede activar a otras estripes celulares, como puede ser el caso del endotelio vascular, facilitando la migración de células monocíticas.

-Efectos cardiovasculares: Los efectos cardiovasculares pueden darse debido a la activación del endotelio vascular como producto de las citocinas secretadas por los macrófagos, por el contacto directo de las partículas con el endotelio vascular o bien a la

entrada de las partículas en la circulación. La activación del endotelio vascular puede provocar la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E, que participan en el reclutamiento de células monocíticas. El proceso de reclutamiento celular provoca cambios vasculares en la región en donde se da la migración celular. Además de esto, las células pueden sufrir desbalances en el control de la coagulación a nivel de la expresión de trombomodulina y factor tisular.

-Daño al DNA: el daño al DNA se asocia con procesos de transformación celular. Sabemos que las partículas son capaces de provocar degradación del DNA así como daño que se manifiesta al realizar evaluaciones por el ensayo de cometas. Este tipo de lesiones pueden tener diferentes caminos. Por ejemplo, el daño al DNA puede provocar que la célula entre en muerte celular por apoptosis. En este caso, la lesión no se perpetúa. Otro camino es que la lesión active los sistemas de reparación del DNA de las células. Si el sistema de reparación trabaja adecuadamente, el daño será eliminado y la célula podrá seguir sus funciones normales. En caso de que el daño no induzca muerte celular y este daño no pueda ser reparado, se corre el riesgo de que las lesiones en el DNA se asocien con procesos de transformación celular. Para que se establezca un tumor es necesario mucho más que la presencia de mutaciones, pero se tiene evidencia preliminar de que las partículas son capaces de inducir la secreción de factores inmunosupresores que podrían favorecer el establecimiento de células transformadas.

Además de las posibles relaciones directas entre un evento y su efecto, tenemos interrelaciones entre diferentes efectos. Tal es el caso de la inducción de muerte celular que puede favorecer procesos inflamatorios e incrementar el estrés oxidativo. Estos dos procesos han sido relacionados con efectos carcinogénicos. El efecto proinflamatorio puede generar alteraciones vasculares. El daño relacionado con el material genético, ya sea por

alteraciones en el DNA o por cambios epigenéticos se asocia a la expresión de múltiples moléculas, algunas de ellas proinflamatorias, otras inmunosupresoras y otras más capaces de controlar los procesos de muerte celular. Como se puede ver, los procesos que se podrían observar en un individuo expuestos a PMs son muy complejos y no se puede asegurar que sigan una vía única de efecto.

Considerando las diferentes líneas celulares y efectos evaluados en la presente tesis podemos concluir que:

- 1) Las PM₁₀ presentan diferentes capacidades citotóxicas dependiendo de la zona de la que provengan, siendo las partículas con un mayor contenido de metales de transición y endotoxinas las más citotóxicas.
- 2) Las partículas que tuvieron un mayor contenido de metales de transición también fueron las que presentaron un mayor porcentaje de muerte celular por necrosis y por apoptosis. La muerte celular por necrosis se presenta en las primeras horas después de la exposición a las partículas.
- 3) Las partículas fueron capaces de inducir efectos proinflamatorios en células monocíticas.
- 4) La secreción de citocinas mostró un efecto diferencial dependiendo de la zona en la que las partículas fueron colectadas, siendo las partículas del Centro las más potentes.
- 5) Las partículas fueron capaces de inducir la activación de células endoteliales.
- 6) No se pudo demostrar que la activación de células endoteliales tuviera una relación con la composición de las partículas. Esta dificultad posiblemente se debe a las interferencias que la autofluorescencia de las partículas puede provocar en los

análisis por citometría de flujo, o a diferencias en la intensidad de la respuesta celular.

- 7) Algunos componentes presentan correlaciones importantes con la intensidad de los efectos evaluados, siendo el Zn y el Fe los que mejor correlacionaron con los eventos biológicos.
- 8) El uso de análisis de correlación lineal así como el análisis de regresión múltiple entre componentes y efectos puede ser una herramienta muy útil en la evaluación de partículas contaminantes. Si se validan estas correlaciones, se podrían utilizar como indicadores de capacidad tóxica de las partículas.
- 9) Quedan por evaluar los mecanismos mediante los cuales se disparan los eventos evaluados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alfaro-Moreno E. Caracterización toxicológica de partículas (PM₁₀) provenientes de tres zonas de la ciudad de México. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM. 1999
- 2) Alfaro-Moreno E, García-Cuellar C, Dueñas-Gonzalez A. Métodos de detección de apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol* 46: 275-280 (2000)
- 3) Alfaro-Moreno E, Heng YM, Edgson J, Symonds P, Osornio-Vargas AR, Rosas I, Murray JC. PM₁₀ effect of EMAP-II expression in lung epithelial cells. *Toxicol Letters* 144(suppl 1): s106 (2003)
- 4) Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and alveolar macrophages by urban air particulates: effects of oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 637-648 (1996)
- 5) Becker S., Fenton M.J., Soukup J.M. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 611-618 (2002)
- 6) Beeson W, Lawrence Abbey DE, Knutsen SF. Long term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults. Results from the AHSMOG study. *Environ Health Perspect.* 106: 813-823 (1998)
- 7) Bennet CF, Condon TP, Grimm S, Chan H, Chiang MY. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* 152: 3530-3540 (1994)
- 8) Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR, Chrysotile asbestos up-regulates gene expression and production of alpha-receptors for platelet derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblast. *J Clin Invest* 92: 425-430 (1993)

- 9) Bonner JC, Rice AB, Lindroos PM, O'brian PO, Dreher KL, Alfaro Moreno E, Rosas I, Osornio Vargas AR. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 672-680 (1998)
- 10) Bonner JC, Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL. Airway fibrosis in rats induced by vanadium pentoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L209-216 (2000)
- 11) Borja V, Loomis D, Shrikant I Shy CM, Rascon PR. Ozone, suspended particles, and daily mortality in Mexico city. *Am J Epidemiol* 145: 258-268 (1997)
- 12) Borja-Aburto VH Castillejos M, Gold DR, Bierzwinsky S, Loomis D. Mortality and ambient fine particles in south-west Mexico City, 1993-1995. *Environ Health Perspect* 106:849-855 (1998)
- 13) Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MC, Kodavanti UP, Evansky PA, Costa DL, Watkinson WP. Cardiovascular and thermoregulatory effects of inhaled PM-associated transitional metals: A potential interaction between nickel and vanadium sulfate. *Toxicol Sci* 64(2): 243-252 (2001)
- 14) Campen MJ, Nolan JP, Schladweiler MC, Kodavanti UP, Costa DL, Watkinson WP. Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. *J Toxicol Environ Health A* 65(20): 1615-1631 (2002)
- 15) Castillejos M, Borja-Aburto V, Dockery D, Gold D, Loomis D. Airborne particulate mortality. *Inhal Toxicol* 12 (suppl 1): 61-72 (2000)
- 16) Castillejos M, Retama A. Comportamiento y distribución de las partículas respirables finas y gruesas en el Norte y Sureste de la ciudad de México. CONSERVA 1998. Disponible en línea en:
http://www.sma.df.gob.mx/publicaciones/otros/conserva/conserva_publica/aire03.pdf
(consultado el 13 de octubre de 2003)

- 17) Cheng RY, Zhao A, Alvord WG, Powell DA, Bare RM, Masuda A, Takahashi T, Anderson LM, Kasprzak KS. Gene expression dose-response changes in microarrays after exposure of human peripheral lung epithelial cells to nickel (II). *Toxicol Appl Pharmacol* 191: 22-39 (2003)
- 18) Chow JC, Watson JG, Edgerton SA, Vega E. Chemical composition of PM_{2.5} and PM₁₀ in Mexico City during winter 1997. *Sci Total Environ* 287:177-201 (2002)
- 19) Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Digna-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 104: 93-102 (1999)
- 20) Comet Assay Interest Group. Applications. Disponible en linea en: <http://www.cometassay.com/applications.htm>
(Consultado el 4 de noviembre de 2003)
- 21) Dick CAJ, Stone B, Brown DM, Watt M, Cherrie JW, Howart S, Seaton A, Donaldson K. Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmos Environ* 34:2587-2592 (2000)
- 22) Diociaiuti M, Balduzzi M, De Veradis B, Cattani G, Stacchini G, Ziemacki G, Marconi A, Pauledti L. The two PM_{2.5} (fine) and PM₁₀ (coarse) fractions: Evidence of different biological activity. *Environ Res* 86:254-262 (2001)
- 23) Donaldson K, Gilmour MI, MacNee W. Asthma and PM₁₀. *Respir Res* 1: 12-15 (2000)
- 24) Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health* 50: 285-305 (1997)

- 25) Dye JA, Lehmann JR, McGee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ, Costa DL. Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utha Valley residents. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 3:395-406 (2001)
- 26) E'Aust A, Ball JC, Hu AA, Lighty JS, Smith KR, Straccia AM, Veranth JM, Young WC. Particle characteristics responsible for effects on human lung epithelial cells. HEI Research Report No. 110 Health Effects Institute (2002).
- 27) Edgerton SA, Bian X, Doran JC, Fast JD, Hubbe JM, Malone EL, Shaw WJ, Whiteman CD, Zhong S, Arriaga JL et al. Particulate air pollution in Mexico City: A collaborative research project. *J Air Waste Manage Assoc* 49:1221-1229 (1999)
- 28) Evan G, Littlewood T. A matter of life and death. *Science* 281:1317-1322 (1998)
- 29) García-Cuellar C, Alfaro-Moreno E, Martínez-Romero F, Ponce de Leon Rosales S, Rosas I, Pérez-Cardenas E, Osornio-Vargas AR. DNA damage induced by PM₁₀ from different zones of Mexico City. *Annals of Occupational Hygiene*, 46 (Suppl. 1): 425-428 (2002a)
- 30) García-Cuellar C, Alfaro-Moreno E, Torres-Flores V, Martínez Romero F, Rosas-Pérez I, Sánchez-Pérez Y, Osornio-Vargas A. Differential expression of p53 and PARP in mouse fibroblast (L929) exposed to urban air particles (PM₁₀) from different zones of Mexico City. *Toxicol Letts* 135(suppl 1): S140 (2002b)
- 31) García-Cuellar CM, Martínez-Romero F, Sánchez-Pérez Y, Calva-Treviño V, Alfaro-Moreno E, Torres-Flores V, Rosas I, Osornio-Vargas AR. Differential DNA damage produced by metals from urban air particles (PM₁₀) from different zones of Mexico City. *Toxicol Letts* 144(suppl 1) S182 (2003)

- 32) Gilmour PS, Rahman I, Stone V, Donaldson K, MacNee W. PM₁₀-mediated IL-8 release from epithelial cells involves histone acetylation. *Annals of Occupational Hygiene*, 46 (Suppl. 1): 436-439 (2002)
- 33) Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente, Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación: 2000. Compendio estadístico de la calidad del aire, 1986-1999. México D.F., México. Gobierno del Distrito Federal, 2000
- 34) Godard T, Delandes E, Lebailly P, Vigreux C, Sichel F, Poul JM, Gauduchon P. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochem Cell Biol* 112: 155-161 (1999)
- 35) Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particle. HEI Research Report No. 91, Cambridge MA: Health Effects Institute (2000)
- 36) Gorczyca W, Gong J, Ardlet B, Traganos F, Darzybkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 53: 3186-3192 (1993)
- 37) Hasinoff BB, Schnabl KL, Marusak RA, Patel D, Huebner E. Dexrazoxane (ICRF-187) protects cardiac myocytes against doxorubicin by preventing damage to mitochondria. *Cardiovasc Toxicol* 3(2): 89-99 (2003)
- 38) Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: S5-S11 (1999)
- 39) Hernandez E, Perez J, Paccagnella A, Piña MA, Munguia M, Catalán M, Rojas M. Air pollution and respiratory health in Mexico city. *J Ocup Environ Med* 1997; 39: 299-307
- 40) Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M. Silica induced cytokine release from A549 cells: importance of Surface area versus size. *Hum Exp Toxicol* 20; 46-55 (2000)

- 41) Hirano S, Furuyama A, Koike E, Kobayashi T. Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology* 187:161-170 (2003)
- 42) Holian A, Hamilton RF, Morandi MT, Brown SD, Li L. Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 106: 127-132 (1998)
- 43) Hsiao WLW, Mo, ZY Fang M, Shi X, Wang F. Cytotoxicity of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and the comet assay. *Mut Res* 471:45-55 (2000).
- 44) Imrich A, Ning YY, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 167:140-150 (2000)
- 45) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minci CR. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins: identification by morphological and immunological criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756 (1973)
- 46) Jimenez L.A., Thompson J., Brown A., Rahman I., Antonicelli F., Duffin R., Drost E.M., Hay R.T., Donaldson K., MacNee W. Activation of NF- κ B by PM₁₀ occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of I κ B degradation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166: 101-110 (2000)
- 47) Kamp DW, Weitzman SA. The molecular basis of asbestos induced lung injury. *Thorax* 54: 638-652 (1991)
- 48) Karahashi H, Amano F. Apoptotic changes preceding necrosis in lipopolysaccharide-treated macrophages in the presence of cycloheximide. *Exp Cell Res* 241: 373-383 (1998)

- 49) Kuo HP, Lin HC, Hwang KH, Wang CH, Lu LC. Lipopolysaccharide enhances substance P-mediated neutrophil adherence to epithelial cells and cytokine release. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1891-1897 (2000)
- 50) Krewski D, Burnett RT, Goldberg MS, Hoover K, Siemiatycki J, Abrahamowicz M, White WH, and Others. Reanalysis of the Harvard Six Cities Study and the American Cancer Society Study of Particulate Air Pollution and Mortality. A Special Report of the Institute's Particle Epidemiology Reanalysis Project HEI Special Research Report July 2000.
- 51) Kweng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96 well-plates. *Anal Biochem* 182: 16-19 (1989)
- 52) Lambert W. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Am J Pathol.* 133: 426-433, (1988)
- 53) Le Tertre A., Medina S., Samoli E., Forsberg B., Michelozzi P., Boumghar A., Vonk J.M., Bellini A., Atkinson R., Ayres J.G., Sunyer J., Schwartz J., Katsouyanni K. Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular disease in eight European cities. *J. Epidemiol. Community Health.* 56: 773-779 (2002)
- 54) Leppo J. Imaging cell injury and death. *Curr Cardiol Rep* 5: 40-44 (2003)
- 55) Levy JI, Hammit JK, Spengler JD. Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability. *Environ Health Perspect* 108: 109-117 (1999)
- 56) Li XY, Gilmour PS, MacNee W. Free radical activity and pro inflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀) in vivo and in vitro. *Thorax* 51: 1216-1222 (1996)
- 57) Ma F, Zhang C, Prasad KVS, Freeman G, Schossman SF. Molecular cloning of porimin, a novel cell Surface receptor mediating oncotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 98: 9778-9783 (2001)

- 58) Manjo G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis, and overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15 (1995)
- 59) Mar TF, Norris GA, Koenig JQ, Larson TV. Associations between air pollution and mortality in phoenix, 1995-1997. *Environ Health Perspect* 108: 347-353 (2000)
- 60) Martinez L. Evaluación de la toxicidad y potencial pro-inflamatorio de las aeropartículas de la ciudad de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México, 2001
- 61) Miranda J, Morales JR, Cahill T, Aldape F, Flores J. A study of elemental contents in atmospheric aerosols in Mexico City. *Atmósfera* 5: 95-108 (1992)
- 62) Miranda J, López-Suárez A, Paredes-Gutierrez R, González S, de Lucio OG, Andrade E, *et al.* A study on atmospheric aerosols from five sites in Mexico City using PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physical Research B* 136-138: 970-974 (1998)
- 63) Monn C., Becker S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* 155: 245-252 (1999)
- 64) Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 66:698-704 (1999)
- 65) National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No.1314-62-1) in F344/N rats and B6C3F1. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 2002 Dec (507): 1-343
- 66) Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* 7:20-26 (2001)

67) Nemmar A., Hoet P.H.M., Vanquickenborne B., Dinsdale D., Thomeer M., Hoylaerts M.F., Vanbilloen H., Mortelmans L., Nemery B. Passage of inhaled particles into blood circulation in humans. *Circulation* 105: 411-414 (2002a)

68) Nemmar A., Hoylaerts M.F., Hoet P.H.M., Dinsdale D., Smith T., Xu H., Vermynen J., Nemery B. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 998-1004 (2002b)

69) Ning Y.Y., Imrich A., Goldsmith C.A., Qin G., Kobzik L. Alveolar macrophage cytokine production in response to air particles in vitro: role of endotoxin. *J. Toxicol Environ Health Part A* 59(3): 165-168 (2000)

70) Obot CJ, Merandi MT, Beebe TP, Hamilton RF, Holian A. Surface components of airborne particulate matter induce macrophage apoptosis through scavenger receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 184: 98-106 (2002)

71) Osornio-Vargas AR, Alfaro Moreno E, Rosas I, Lindroos PM, Badget A, Dreher K, Bonner JC. The *in vitro* toxicity of ambient PM₁₀ particles from the southern, central and northern regions of Mexico City to lung fibroblasts is related to transition metal content. *Am J Resp Dis Crit Care Med* 153(4): A15 (1996)

72) Osornio-Vargas AR., Alfaro-Moreno E., García-Cuellar C., Rosas-Pérez I. ¿Tienen las PM₁₀ de la ciudad de México el mismo potencial tóxico?. Reporte técnico del Consejo de estudios para la restauración y valoración ambiental. Gobierno del Distrito Federal. 1999.

73) Osornio-Vargas AR, Martínez L, García C, Alfaro-Moreno E, Rosas I, Torres V, Pérez-Cárdenas E. Cellular effects induced by PM_{2.5} and PM₁₀ from two zones of Mexico city (MC). *Am J Respir Dis Crit Care Med* 165 (8): A213 (2002).

74) Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martínez L, García-Cuellar C, Ponce de Leon S, Miranda J, Rosas I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City

air pollution particulate matter *in vitro* are dependent on particle size and composition. Environ Health Perspect 111: 1289-1293 (2003)

75) Peters A, Döring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: A link to mortality? Lancet 349: 1582-1587 (1997)

76) Pope A, Verrier R, Lovett E, Larson A, Raizenne M, Kanner R, Schwartz J, Gold D, Douglas WD. Heart rate variability associated with particulate air pollution. Am Heart J 138: 890-899 (1999)

77) Pope CA., Dockery DW. Acute health effects of PM₁₀ pollution on symptomatic and asymptomatic children. Am Rev Resp Dis 145: 1123-1128 (1992)

78) Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 287: 1132-1141 (2002)

79) Frieditis H, Adamson IY. Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. Exp Lung Res 28: 563-576 (2002)

80) Red Automática de Monitoreo Ambiental. Informe anual de la calidad del aire en el valle de Mexico. Gobierno del Distrito Federal, Secretaria del Medio Ambiente. Red Automatica de Monitoreo Atmosferico. 1998.

81) Riley MR, Boesewetter DE, Kim AM, Sirvent FP. Effects of metals Cu, Fe, Ni, V, and Zn on rat lung epithelial cells. Toxicology. 190(3):171-84 (2003)

82) Risom L, Dybdahl M, Bornholdt J, Vogel U, Wallin H, Moller P, Loft S. Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by unhalation. Carcinogenesis 2003; Epub ahead of print.

83) Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Huerta J, White M, Etzel R, Hernández M. Effects of air pollution on respiratory health of children with mild asthma living in Mexico City. J Air Waste Manag Assoc 48: 327-335 (1998)

- 84) Romieu I, Ramírez M, Meneses F, Ashley D, Lemire S, Colome S, Fung K, Hernández-Avila M. Environmental exposure to volatile organic compounds among workers in Mexico City as assessed by personal monitors and blood concentrations. *Environ Health Perspect.* 107: 511-515 (1999)
- 85) Rosas I, McCartney A, Payne R, Lacey J, Chaoela R, Ruiz-Velázco S. Analysis of the relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollutants and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico City. *Allergy* 53: 394-401 (1998)
- 86) Rosas I, Yela A, Santos-Burgoa C. Occurrence of airborne enteric bacteria in Mexico City. *Eur J Aerobiol: Aerobiología* 10:39-46 (1994)
- 87) Salazar S, Manriquez L, Carrera M, Bravo H. Elemental and morphological analyses of atmospheric particles from southwestern part of Mexico City. *Bull Environ Contam Toxicol* 51: 247-254 (1993)
- 88) Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, Schwartz J, Zanobetti A. The national morbidity, mortality, and air pollution study part II: Morbidity, mortality and air pollution in the United States. HEI research report No. 94, part II. Cambridge MA. Health Effects Institute, June 2000.
- 89) Saxon A, Diaz-Sanchez D. Diesel exhaust as a model xenobiotic in allergic inflammation. *Immunopharmacology* 48: 325-327 (2000)
- 90) Schwartz DA. Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 163: 305-313 (2001)
- 91) Schwartz J, Norris G, Larson T, Sheppard L, Claiborne C, Koenig J. Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. *Environ Health Perspect* 107:339-342 (1999)
- 92) Schwartz J. Air pollution and daily mortality: A review and meta analysis. *Environ Res* 64:36-52 (1994)

- 93) Sheline CT, Beherns MM, Choi DW. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁺ and inhibition of glycolysis. *J Neurosci* 20 (9): 3139-3146 (2000)
- 94) Silbergeld EK. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutat Res* 533 (1-2): 121-133 (2003)
- 95) Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191 (1988)
- 96) Tas MP, Murray JC. Endothelial-monocyte-activating polypeptide II. *Int J Biochem Cell Biol.* 28: 837-41 (1996)
- 97) Uhal BD. Apoptosis in lung fibrosis and repair. *Chest.* 122: 293S-298S (2002)
- 98) Vega E, Reyes E, Sánchez G, Ortiz E, Ruíz M Chow J, Watson J, Edgerton S. Basic statistics of PM_{2.5} and PM₁₀ in the atmosphere of Mexico City. *Tot Sci Environ* 287: 167-176 (2002)
- 99) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51 (1995)
- 100) Vernooy JHJ, Dentener MA, van Suylen RJ, Burman WA, Wouters EFM. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells; no role for tumor necrosis factor- α and infiltrating neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24: 569-576 (2001)
- 101) Villalobos R, Blanco S, Gómez S. Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmospheric Environ* 29: 517-524 (1995)
- 102) Vincent R, Kumarathasan P, Goegan P, Bjarnason SJ, Guénette J, Bérubé D, Adamson IY, Desjardins S, Burnett RT, Miller FJ, Battistini B. Inhalation Toxicology of Urban

Ambient Particulate Matter: Acute Cardiovascular Effects in Rats. HEI Report Number 104, October 2001

103) Yaglom JA, Ekhterae D, Gabai VL, Sherman MY. Regulation of necrosis of H9C2 myogenic cells upon transient energy deprivation: Rapid de-energization of mitochondria precedes necrosis and is controlled by reactive oxygen species, stress-kinase JNK, HSP72 and ARC. J Biol Chem Epub ahead of print (2003)

Biologic Effects Induced *in Vitro* by PM₁₀ from Three Different Zones of Mexico City

Ernesto Alfaro-Moreno,¹ Leticia Martínez,² Claudia García-Cuellar,¹ James C. Bonner,³ J. Clifford Murray,⁴ Irma Rosas,² Sergio Ponce de León Rosales,⁵ and Álvaro R. Osornio-Vargas¹

¹Instituto Nacional de Cancerología, Mexico D.F., Mexico; ²Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico; ³National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina, USA; ⁴University of Nottingham, Nottingham, United Kingdom; ⁵Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán," Mexico D.F., Mexico

Exposure to urban airborne particles is associated with an increase in morbidity and mortality. There is little experimental evidence of the mechanisms involved and the role of particle composition. We assessed cytotoxicity (crystal violet assay), apoptosis [terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) or annexin V assay], DNA breakage (comet assay), and production of proinflammatory mediators [tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6), prostaglandin E₂ (PGE₂)] (enzyme-linked immunosorbent assay), and E-selectin (flow cytometry) in cell lines exposed to particulate matter < 10 μ m in size (PM₁₀) obtained from the northern, central, and southern zones of Mexico City. Particle concentrations ranged from 2.5 to 160 μ g/cm³. We used epithelial, endothelial, fibroblastic, and monocytic cells and assessed DNA damage in Balb-c cells, TNF α and IL-6 production in mouse monocytes, and PGE₂ in rat lung fibroblasts. We determined the expression of E-selectin in human endothelial cells and evaluated the cytotoxic potential of the PM₁₀ samples in all cell types. PM₁₀ from all three zones of Mexico City caused cell death, DNA breakage, and apoptosis, with particles from the north and central zones being the most toxic. All of these PM₁₀ samples induced secretion of proinflammatory molecules, and particles from the central zone were the most potent. Endothelial cells exposed to PM₁₀ from the three zones expressed similar E-selectin levels. Mexico City PM₁₀ induced biologic effects dependent on the zone of origin, which could be caused by differences in the mixture or size distribution within particle samples. Our data suggest that particle composition as well as particle size should be considered in assessing the adverse effects of airborne particulate pollution. **Key words:** apoptosis, cytotoxicity, DNA breakage, E-selectin, IL-6, Mexico City, particle composition, PGE₂, PM₁₀, TNF α . *Environ Health Perspect* 110:715–720 (2002). [Online 4 June 2002]

<http://ehpnet1.niehs.nih.gov/docs/2002/110p715-720alfaro-moreno/abstract.html>

Daily exposure to airborne particulate pollution in urban zones is associated with an increase in morbidity and mortality, mainly of cardiopulmonary origin (1). The increase in health risk occurs even when particle concentrations are well below established air quality standard levels. Epidemiologic associations of particles of smaller aerodynamic size with mortality are even more significant. For example, the increase in death risk reported for Mexico City with respect to total suspended particles (TSP) is 5.8% in mortality per 100 μ g/m³ TSP increment (2). However, particles with aerodynamic diameters of 10 μ m and less (PM₁₀) or 2.5 μ m and less (PM_{2.5}) cause a 1.83% or 1.48% increment in risk of death per 10 μ g/m³ increase of particulate matter (PM) (3,4). Therefore, PM size is clearly an important factor in the health risk of air pollution in Mexico City. Similar epidemiologic findings relating smaller PM diameter to increased mortality have been reported in several cities around the world, despite a wide variation in geographical location, climate, or economic development (1).

Particle composition may also play a major role in defining the relative toxicity of an inhaled particulate. However, although

air pollution PM has been implicated in the development of several pulmonary diseases (asthma, chronic bronchitis, lung cancer), we currently have little information to define the role of particle composition to the progression of these respiratory diseases (5–8). Growing evidence suggests that several factors in air pollution PM could play a role in promoting and perpetuating a lung inflammatory or carcinogenic response. For example, several metals detected in Mexico City PM₁₀, including vanadium, nickel, and lead, are known to cause inflammation or cancer (9). These same metals have been reported to mediate the toxic effects of fly ash particles generated during the industrial burning of coal and fuel oil (10). Organic components may also play a role in mediating the inflammation caused by the inhalation of PM. Lipopolysaccharide (LPS) derived from the walls of gram-negative bacteria has been considered a major factor in the exacerbation and development of asthma (11,12). We have reported that endotoxin is an important constituent of Mexico City PM₁₀ that triggers the production of the proinflammatory cytokine interleukin 1 β (IL-1 β) by rat pulmonary macrophages *in vitro* (9).

Hydrocarbons present in particles from diesel exhaust have been reported to increase the production of total allergic antibody [immunoglobulin E (IgE)] in nasally challenged individuals, and IgE is known to mediate allergic lung inflammation (13). Therefore, we have evidence that both organic and inorganic components mediate the toxic effects of air pollution PM.

In this study, we evaluated PM₁₀ from three different zones of Mexico City (northern, central, southern) on a variety of different cell types for their potential in triggering a variety of inflammatory and toxic end points in cultured cells *in vitro*. The northern zone is the major industrial center of the city, and particles collected from the northern zone contain higher levels of transition metals and sulfur (9). PM₁₀ from the southern zone contains a higher level of organic material (e.g., pollen) (6). Automotive emissions, including hydrocarbons from diesel, contribute heavily to the PM burden in all three zones (14). The purpose of the present study was to assess comparatively the toxic and inflammatory potential of PM₁₀ samples from the three zones of Mexico City and relate these findings to the particular particle mixture from each zone.

Materials and Methods

Reagents. We used the following: Apoptosis detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method (Roche, Mannheim, Germany), apoptosis detection by the annexin V method (Nexins Research,

Address correspondence to Á.R. Osornio-Vargas, Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando 22, Tlalpan, México, D.F., 14000. Telephone: (5255) 5628-0425. Fax: (5255) 5628-0432. E-mail: arov@servidor.unam.mx

We thank A. Rice, W. Ward, and E. Salinas for technical support, K. Dreher (U.S. Environmental Protection Agency) and R. Ramos (Red Automática de Monitoreo Ambiental, Gobierno del Distrito Federal) for providing PM₁₀ analysis and air pollution data, respectively.

This research was partially supported by CONSERVA-1999, CONACYT (F-383-M9304; 87862, 34547-M), DGEP-UNAM, and the Academia Mexicana de Ciencias-Royal Society.

Received 6 July 2001; accepted 17 December 2001.

Kattendijke, The Netherlands), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for tumor necrosis factor α (TNF α) and IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and for prostaglandin E₂ (PGE₂; Endogen, Woburn, MA, USA). We also used basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor (Prepro Tech, London, England). Sera used were bovine fetal serum (Harlan, Indianapolis, IN, USA) and goat fetal serum (Sigma, St. Louis, MO, USA). Antibodies were murine monoclonal antibody to human E-selectin (CD62E; R&D Systems), mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-IgG (Sigma).

Cells. We used the commercial cell lines A549 (human lung epithelium cells), J774A.1 (mouse monocytes), and Balb-c (mouse fibroblasts). All cell lines were from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Other primary cell cultures used were rat lung fibroblasts (RLF) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), obtained from the National Institute of Environmental Health Sciences and Nottingham University, respectively.

PM sampling. We collected PM₁₀ in the northern (industrial), central (business), and southern (residential) zones of Mexico City (Figure 1) using a high-volume particle collector (GMW model 1200 VFC HVP10; Sierra Andersen, Smyrna, GA, USA) for particles with aerodynamic diameter $\leq 10 \mu\text{m}$. We used fiberglass filters (type A/E glass 61638; Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) for 24-hour sampling (1.13 m³/min), 3 days during each week of 1991 and obtained a total of 210, 211, and 203 samples from the south, center, and north, respectively. To obtain homogeneous samples throughout the year, we selected a filter each week from each zone to recover particles. We dry sonicated filters for 45 min and recovered particles by smooth sweeping with a brush into an endotoxin-free flask. We mixed the particles of a single year by zone and stored them dry in endotoxin-free glass vials in a dryer at 4°C until their use. We determined metal and endotoxin levels in these samples, which we have reported elsewhere (9). We prepared suspensions of PM (1 mg/mL) immediately before cell exposure to minimize dissolution of particle components. We used particle concentrations in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ as a better indicator of exposure to cells that attach and spread on the surface of culture wells, as previously done by our group (9,16). We took care to control the volume with which we added particles to cultures and always maintained an equivalence of 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ equals 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Cytotoxicity. We measured cytotoxicity using the crystal violet method (17). To assess cytotoxicity, we exposed proliferating

or confluent cultures of Balb-c, J774A.1, A549, or RLF cells to particle concentrations of 10, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM sample. For the proliferating cultures, we seeded cells in 96-well plates at a density of 15,000 cells/cm² to determine cytotoxicity after 24, 48, and 72 hr of exposure. For the confluent cultures, we seeded cells in 96-well plates at a density of 180,000 cells/cm² and, once they were confluent, exposed them to PM for 24 hr in serum-free culture medium. We determined cytotoxicity by measuring the residual cell number with crystal violet staining with an ELISA plate reader at 595 nm (Multiscan MS 352; LabSystems, Helsinki, Finland). We calculated percentage viability comparing the absorbance of exposed cultures with the absorbance of nonexposed cultures.

Apoptosis assays. We measured apoptosis in A549 and J774A.1 using the TUNEL assay (18) and in HUVEC using fluoresceinated annexin V for phosphatidyl serine detection (19), and performed the analysis by flow cytometry (Scan Flow; Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). We plated cells on 6-well dishes at a density of 15,000 cells/cm² in 1% fetal bovine serum (FBS)–Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and antibiotics. After 24 hr, we changed the medium for complete medium (10% FBS–DMEM + antibiotics) and added particles from the three regions at 160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. We harvested cells after 24 hr and performed TUNEL or annexin V assays following the manufacturer's instructions. We assessed 10,000 cells by flow cytometry and determined the percentage of marked cells, which we considered apoptotic cells.

Comet assay for DNA breakage. We determined the ability of PM₁₀ to cause DNA breakage by agarose gel cellular electrophoresis following a method previously described (20). We plated cells 20,000/well and exposed to concentrations of 2.5, 5, 10, 20, and 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀. After 72 hr of exposure, we trypsinized cells (0.05%), mixed 10,000 cells in 1% low-fusion-point agarose, and then placed the mixture on a slide covered with previously solidified agarose. We treated the sample with digestion buffer [10 mM Tris, 100 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 2 M NaCl, 1% Triton X-100, pH 10] for 30 min, then rinsed it in a solution of 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and subjected it to 50-V electrophoresis for 30 min (Horizon 58; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). We rinsed the sample in cold buffer for 5 min and added 10 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide. We randomly analyzed 30 cells per slide under fluorescence microscopy (BX40F; Olympus, Tokyo, Japan) after capturing the image with a video camera (TK-1280E, JVC). We measured the length of

each comet using an image analysis system (PC Image color/Windows 3.1; Foster Findlay, Newcastle, UK).

Cytokine assays. We exposed confluent cells cultured in 24-well plates to increasing concentrations of PM₁₀ (10, 20, 40, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) in 1 mL of DMEM. After 24 hr, we collected cell supernatants, centrifuged them at 14,000 $\times g$ for 15 min, and frozen them at -70°C . We used nonexposed cells as negative control and cells exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS from *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma) as positive control. We measured TNF α and IL-6 in the supernatants of J774A.1 cells and PGE₂ in supernatants from RLF using commercial kits following the manufacturer's instructions. We express these results as a percentage of the positive controls or in pg/mL.

E-selectin expression. We evaluated E-selectin expression as previously described (21). We plated HUVEC on 25 cm² flasks until they reached confluency and then exposed them to 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM₁₀. We used TNF α (10 ng/mL) as a positive control and unexposed cells as negative control. After 6 hr of exposure, we harvested cells with 10 mM EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). We resuspended cells in 20% goat fetal serum–PBS for 20 min at 4°C, rinsed them in PBS, and then incubated them with anti-E-selectin antibody (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 hr at 4°C, and rinsed and resuspended them in FITC-murine anti-IgG

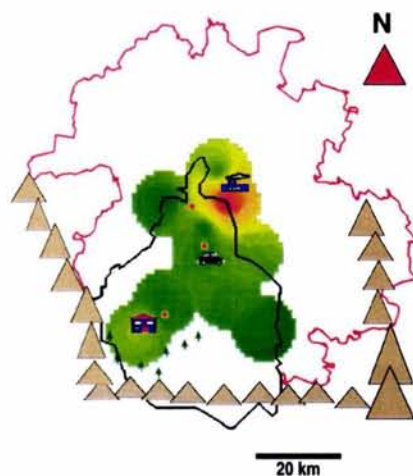


Figure 1. Map of Mexico City. The metropolitan area is composed of two regions: the Federal District (black outline) and the Estado de Mexico (red outline). Air quality monitoring stations cover the area shown in green. The most polluted areas for particles and ozone are in the northeast (red) and the southwest (yellow), respectively. We collected particles for this study in the northern (industrial), central (business), and southern (residential) zones; sites of collection are marked with red squares. Mountains (brown triangles) surround the city, mainly in the south. Adapted from Gobierno del Distrito Federal (15).

antibody (10 µg/mL) for 30 min at 4°C in the dark. We fixed cells with 4% paraformaldehyde in PBS and kept them in the dark at 4°C until analysis by flow cytometry. We measured the presence of E-selectin in 10,000 cells as fluorescence intensity after subtracting the fluorescence values obtained from cells that we incubated in the absence of the primary antibody.

Statistical analysis. We repeated all experiments at least three times and express results as mean ± standard deviation. We present results from the comet assay as median, maximum, minimum, 25th and 75th percentiles, and outlying values, and express TNFα, IL-6, and PGE₂ protein levels (pg/mL) as a percentage of the values obtained from the positive controls.

We evaluated cytotoxicity, DNA breakage, and cytokine production (TNFα, IL-6, PGE₂) results by two-way analysis of variance (ANOVA), and apoptosis and E-selectin by one-way ANOVA. We performed all analyses with Intercooled Stata for Windows (version 6.0, 1999; Stata Corp., College Station, TX, USA), and we considered differences significant when $p < 0.05$.

Results

Table 1 presents PM₁₀ levels present in the three zones of the study during 1991.

Cytotoxicity. PM produced a concentration-dependent cytotoxic effect that was apparent after 72 hr in proliferating cells of monocytic and fibroblastic origin (Figure 2). Particles from the northern zone showed a

statistically significant larger effect than did particles from the central and southern zones ($p < 0.0001$). Cell types differed in viability. Monocytic cells were more susceptible, reaching a 70% loss of viability with 160 µg/cm² of particles from the north and ~50% with particles from central or south zone ($p < 0.0001$; Figure 2A). Fibroblastic cells were less susceptible: 160 µg/cm² of particles from the north induced 65% loss of viability and only ~20% with particles from the central or southern zone ($p < 0.0001$; Figure 2B). Epithelial cells were the most resistant to PM, with little or no loss in viability over PM concentration ranges (Figure 2C).

Particles were not cytotoxic in confluent, quiescent cultures of any of the cell types that we exposed to 20–160 µg/cm² of the PM₁₀. Resistance to cytotoxic effects occurred regardless of the zone of origin of the particles (data not shown).

Apoptosis. Particles induced low ratios of cell death by apoptosis. In J774A.1 cells, particles from the three zones induced similar apoptosis levels, which were ~15% (Figure 3A). In A549 cells, the apoptosis indexes

Table 1. PM₁₀ levels (µg/m³) in three different zones of Mexico City, 1991.

	Northern zone	Central zone	Southern zone
Mean ± SE	121.6 ± 4.08	107.2 ± 3.28	75.7 ± 2.21
Range	37.2–22.9	329.6–39.7	182.7–20.0
Lower quartile	79.6	72.0	52.0
Upper quartile	158.1	138.0	96.3

See Bonner et al. (9) for transitional metal and endotoxin content of these samples.

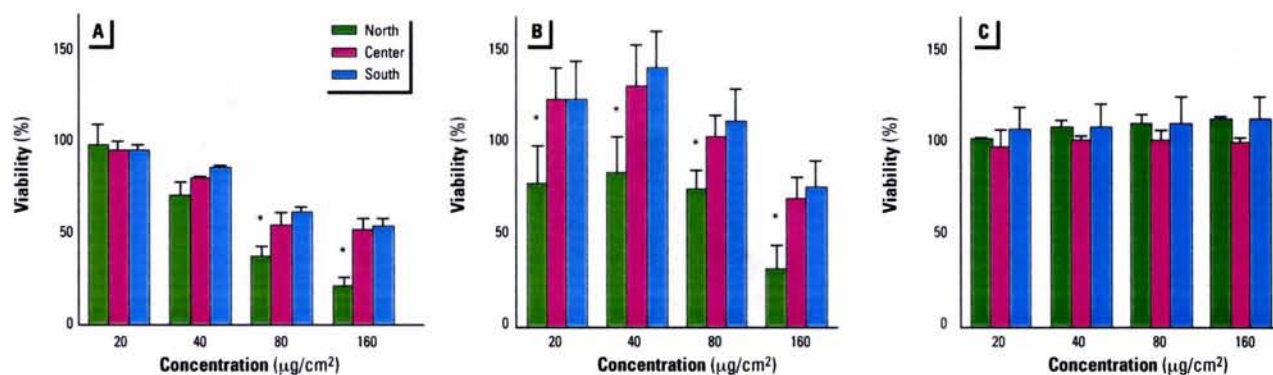


Figure 2. Viability of proliferating cells after 72 hr exposure to PM₁₀ from three Mexico City zones. (A) J774A.1 cells were the most susceptible and showed dose-related effects. Particles from the northern zone showed the greatest effect ($p < 0.0001$). (B) Balb-c cells also responded in a dose-related manner, with particles from the northern zone being the most cytotoxic ($p < 0.0001$). (C) A549 cells were not affected by any particle concentration. Viability was determined by the crystal violet colorimetric method. Values are mean + SD. *Statistically significant differences.

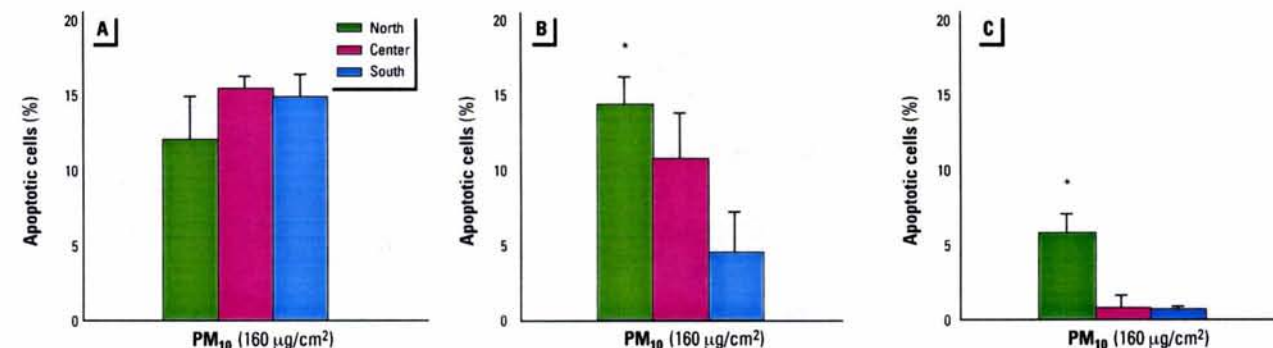


Figure 3. Percentages of apoptosis induced in cell cultures exposed to 160 µg/cm² of PM₁₀ from three different Mexico City zones. (A) J774A.1 cells responded equally to particles from the three regions. (B) A549 cells responded in a gradient pattern from north to south ($p = 0.004$). (C) HUVEC were affected only by particles from the north ($p = 0.0015$). We used TUNEL and annex V assays for these experiments, as described in "Materials and Methods." Values are mean + SD. *Statistically significant differences.

were 4% for the south, 11% for the center, and 15% for the north ($p = 0.004$; Figure 3B). HUVEC showed increased apoptosis only when exposed to particles from the north ($6 \pm 1.5\%$; $p = 0.0015$; Figure 3C).

DNA breakage (comets). All PM_{10} from Mexico City were able to induce DNA breakage measured as an increase in the electrophoretic mobility of nuclear material (comet) of exposed cells. We observed dose-response effects with concentrations between 2.5 and 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.0001$; Figure 4). Northern and central zone particles produced longer comets, compared with those of the southern zone ($p < 0.0001$). More than 50% of the comets had a length above the 75th percentile from control cells, with 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM_{10} from the northern or the central zone. On the other hand, particles from the southern zone required 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to induce a similar effect. At concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, comet length did not increase beyond that obtained with 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (results not shown).

Presence of TNF α and IL-6 in supernatants of J774A.1 cells. Particles induced TNF α and IL-6 secretion in this monocytic cell line in a dose-dependent manner, and maximal production was attained with 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.0001$). TNF α production had a trend suggesting that particles from the central zone were more powerful than were particles from northern and southern zones, but we found no statistical significance (Figure 5A). IL-6 secretion also showed the same trend, but in this case differences were statistically significant ($p < 0.0001$; Figure 5B). Maximal TNF α and IL-6 average secretion observed with particles from the center was $37.7 \pm 8.4\%$ and $7.1 \pm 0.3\%$, respectively. We express these results as percentages of levels induced by the positive control of each experiment. Negative control unexposed cells secreted 129 ± 116 pg/mL ($0.85 \pm 0.81\%$) of TNF α , whereas cells stimulated with LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reached levels of $17,817 \pm 4,876$ pg/mL (100%). We did not detect IL-6 in the supernatant of nonexposed cells, whereas cells stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS secreted $2,356 \pm 64$ pg/mL (100%) IL-6.

PGE $_2$ production by RLF. PM_{10} induced PGE $_2$ secretion in RLFs in a dose-related manner ($p < 0.0001$; Figure 6). Particles from the central zone always induced the most PGE $_2$ secretion ($p = 0.0021$). We obtained maximal secretion at 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ with particles from the three zones, reaching $69 \pm 6\%$, $163 \pm 28\%$, and $91 \pm 2\%$ for the northern, central, and southern zones, respectively. We express results as percentages of levels induced by the positive control of each experiment. Cultures unexposed to particles secreted 60 ± 1 pg/mL (5%), and those exposed to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, $1,273 \pm 13$ pg/mL (100%).

Expression of E-selectin in HUVEC. Endothelial cells had a 25% increase in E-selectin expression after exposure to 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of PM_{10} from the three zones of Mexico City (Figure 7).

Discussion

In this article we present data indicating that PM_{10} from Mexico City is able to induce *in vitro* cell death, DNA damage, and the

production of TNF α , IL-6, and PGE $_2$ in a differential pattern related to the site in the city where we collected particles (Table 2). PM induced these effects in different cell types in a dose-related manner, providing biologic plausibility to epidemiologic studies.

Cell death and apoptosis have been used as markers of cell injury induced by urban particles (22–24) and most recently have been proposed as mediators in asthma

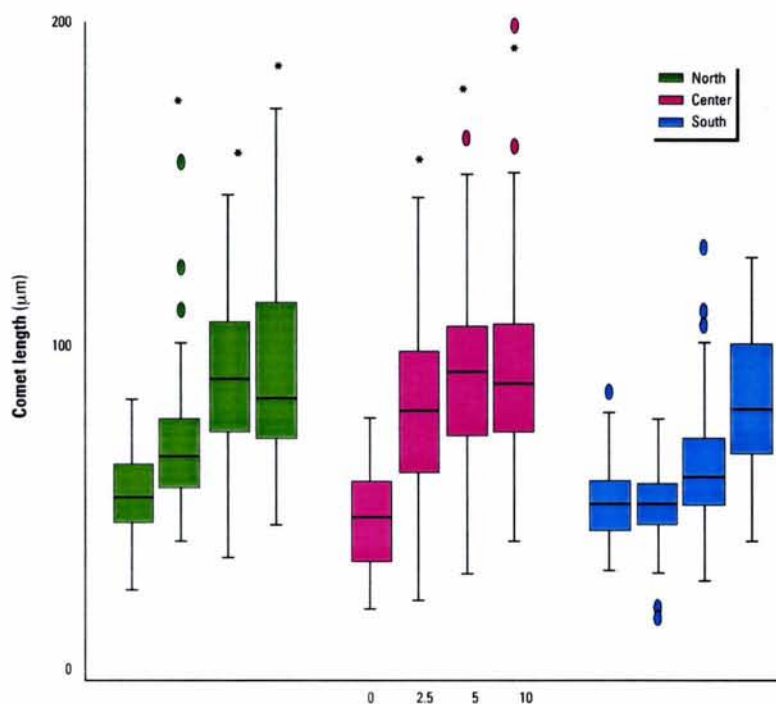


Figure 4. Distribution of comet length in Balb-c cells exposed to PM_{10} from three Mexico City zones. All samples induced in a dose-related response ($p < 0.0001$). Particles from the northern and central zones induced longer comets than did particles from the south when we used 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($p < 0.0001$). Values are the median, 25th and 75th percentiles, and maximum and minimum values. The ovals represent outlying values. Values presented under the boxes from the center represent the concentrations ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) used in these experiments and apply to all three regions.

*Statistically significant differences.

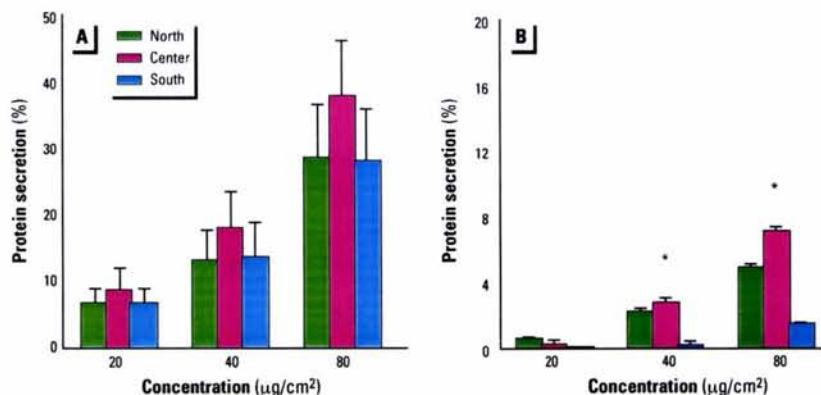


Figure 5. Particles from three different Mexico City zones induced the secretion of TNF α (A) and IL-6 (B) in a dose-related manner in J774A.1 cell cultures exposed to 20, 40, and 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM_{10} . Particles from the central zone had a tendency to be more potent, which was statistically significant for IL-6 ($p < 0.0001$). Results are expressed as a percentage of the values obtained from cells stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS.

*Statistically significant differences.

exacerbation induced by PM (25). In this study, we observed cell death only in proliferating cells, indicating the existence of vulnerable points during the cell cycle. Similar results have been reported for cells exposed to asbestos, but the significance of this phenomenon remains unknown (16). Some of the cell lines studied are more susceptible than others. Epithelial cells are the most resistant to particle-induced cell death. In the case of susceptible (monocytic and fibroblastic) cells, particles from the northern zone of Mexico City had a greater cytotoxic effect. A previous study indicated that particles from two different U.S. cities induced cell death (22,24) and apoptosis (24) in human alveolar macrophages at similar levels. However, the sources and type of pollution in them were very similar and did not show the contrasts described for Mexico City particles. Sublethal doses of particles from Mexico City produced DNA damage in Balb-c cells (a common cell type used for DNA damage assays) (26). The participation of apoptosis in the cell death process was relatively small, suggesting that DNA damage could be repaired. Cell death, apoptosis, and DNA damage were more apparent for particles from the northern and central zones. This kind of effect needs further study as a possible mediator of cancer related to air pollution.

Inflammatory mediators, including cytokines (e.g., TNF α and IL-6) and

prostaglandins (e.g., PGE₂), play major roles in pulmonary inflammation related to particle pollution (23,27,28). PM₁₀ from Mexico City was able to induce the production of inflammatory mediators in various cell types. We evaluated this in cell cultures using particle concentrations that did not affect cell viability. Cells of monocytic origin produced increased levels TNF α and IL-6 after particle stimulation. Particles from the central zone of Mexico City were the most potent in causing cytokine secretion. We also observed a similar pattern for PGE₂ production by fibroblasts. In endothelial cells exposed to PM₁₀, we observed an increase in the presence of E-selectin, a molecule that plays an important role in recruiting circulating leukocytes during inflammation (29). In this case, we found no differential effects by zones. Collectively, these data suggest that TNF α , IL-6, and PGE₂ could be important in mediating the inflammatory effects of Mexico City PM in relation to the zone where we collected the particles. Other authors have also shown that particles from different cities induce the secretion *in vitro* of proinflammatory molecules but made no attempt to discuss differences found among cities (22).

Interestingly, studies showing *in vitro* cellular effects induced by PM collected in different cities of the world found such effects with concentrations within the range

we used in this study, despite the fact that we collected particles and handled them in different ways. Unfortunately, we have no instrument that allows collecting particles in large amounts without the introduction of artifacts such as loss of volatiles (9) or soluble components (24,30), trapping of particles in the matrix of the collection substrate (9; present results), the introduction of solvents to dislodge particles from the collecting substrate (14,23), introduction of contaminants from the collecting substrate (31), or differences in the particle aerodynamic diameter range used (9,23,24,28). Therefore, comparisons between studies are difficult, and these limitations cannot be overcome until a standard method for collection exists, which should be kept in mind.

Differences in the metal and endotoxin contents previously reported for these particles from three Mexico City zones (9) may account for the variations in effects evaluated in this work. Metal content showed a decreasing north-to-south gradient, whereas endotoxin showed similar concentrations in the three zones. The relative importance of metals and endotoxin in mediating the toxic effects of these particles is currently unknown (9,10,23,28). In the present case, metal content may be related to the toxic effects produced by particles from the northern zone, but less directly to the proinflammatory effect observed with central zone particles. Particles from the northern zone showed a trend to induce cell death and DNA damage in proliferating cells, whereas those from the central zone induced proinflammatory responses. The fact that this proinflammatory effect became more noticeable when we used particles with less metal content suggests that endotoxin effects might then be seen, given that a previous study showed that biologic effects induced by these particles may be results of synergisms between metals and endotoxin (9). The role of endotoxin present in these samples is currently under study in our laboratory. However, our knowledge about the particle composition is still limited, and we cannot eliminate the role of other components.

At the present time, the toxicity of air pollution particles has been largely linked to aerodynamic diameter and their capability to reach the lower respiratory tract, providing a large surface area to interact with the target cells. However, our results provide new insight to the hypothesis that particle composition can also play a role. Recent epidemiologic evidence points in that direction and indicates that among PM_{2.5} components, elemental carbon, organic carbon, and potassium from burning vegetation had a positive association with cardiovascular mortality in the elderly (32).

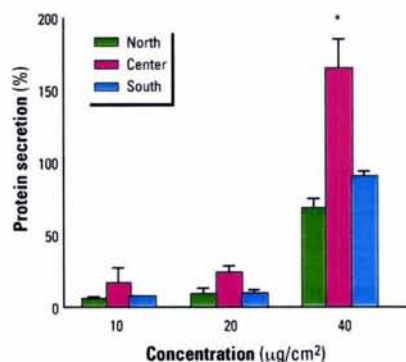


Figure 6. Production of PGE₂ by RLFs stimulated with PM₁₀ from three regions of Mexico City occurred in a dose-related manner ($p < 0.0001$). Particles from the central zone induced higher PGE₂ levels at all concentrations ($p = 0.0021$). Results are expressed as a percentage of the values obtained from cells stimulated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS.

*Statistically significant differences.

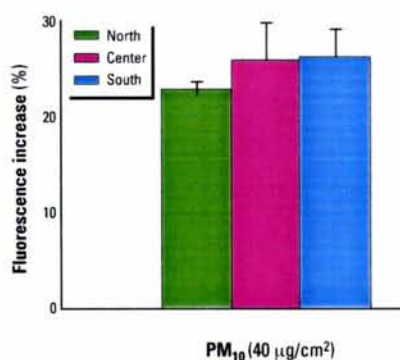


Figure 7. Expression of E-selectin by endothelial cells was stimulated around 25% when incubated 6 hr with 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ PM₁₀. We observed no difference among regions.

Table 2. Semiquantitative comparative appreciation of cellular effects induced by PM₁₀ from Mexico City.

Zone	Cytotoxic effects			Proinflammatory effects			
	Toxicity	Apoptosis	DNA damage	TNF α	IL-6	PGE ₂	E-selectin
Northern	+++	+++	+++	++	++	+	++
Central	++	++	+++	+++	+++	+++	++
Southern	++	+	++	+	+	++	++

The number of + symbols indicates the magnitude of the observed effects.

The clear epidemiologic evidence indicating an association between particle air pollution, acute adverse health effects, and increased mortality has led to hypotheses of pulmonary inflammation (7), increased blood viscosity (27), and alterations on heart rate variability (33) as possible mechanisms through which air pollutants could trigger adverse cardiopulmonary outcomes. We have experimental evidence to support each of these hypotheses (23,28,34), yet we are far from understanding the pathogenic mechanisms involved. The use of various cell types and end points could prove helpful in the future to explore pathogenic mechanisms for a wide range of diseases linked to particulate pollution, such as asthma, cardiovascular disease, and cancer.

Besides particle composition, we need to study particle size distribution in PM₁₀ samples because particle effects could also be related to PM surface area, as suggested by Schwartz et al. (35). Studies done by others in Mexico City have shown that the PM₁₀/PM_{2.5} ratios do not vary extensively among samples obtained in different regions of the city (36,37), giving support to the role of particle composition in the results presented in this study. Establishing more accurate relationships requires determining particle composition in different size fractions and understanding potential interactive effects among the different particle components. Studies in this matter are underway.

In conclusion, our results support the hypothesis that particle composition may account for the differences in the inflammatory and toxic responses induced by air pollution particles from three different zones of Mexico City. Particles from the northern zone of Mexico City that contained relatively high levels of transition metals were the most toxic in assays of cell death and DNA damage. However, particles from the central zone of the city were the most effective in causing the release of inflammatory mediators in cultured cells. Future research should identify the component or components that mediate, alone or in combination, the cytotoxic and proinflammatory potential of Mexico City air pollution particulates. The use of biologic response patterns, such as the ones presented here (Table 2), could prove useful indicators of biologic effects induced by complex pollutant particulate mixtures, instead of using single end points.

REFERENCES AND NOTES

- Levy JI, Hammit JK, Spengler JD. Estimating the mortality impacts of particulate matter: what can be learned from between-study variability. *Environ Health Perspect* 108:109–117 (1999).
- Borja V, Loomis D, Bangdiwala S, Shy C, Rascón R. Ozone, suspended particles, and daily mortality in Mexico City. *Am J Epidemiol* 145:258–268 (1997).
- Castillejos M, Borja Aburto H, Dockery D, Gold D, Loomis D. Air borne coarse particulate mortality. *Inhal Toxicol* 12(suppl 1):61–72 (2000).
- Borja-Aburto VH, Castillejos M, Gold DR, Bierzowski S, Loomis D. Mortality and ambient fine particles in southwest Mexico City, 1993–1995. *Environ Health Perspect* 106:849–855 (1998).
- Romieu I, Meneses F, Ruiz S, Huerta J, White M, Etzel R, Hernández M. Effects of air pollution on the respiratory health of children with mild asthma living in Mexico City. *J Air Waste Manag Assoc* 48:327–335 (1998).
- Rosas I, McCartney A, Payne R, Calderón C, Lacey J, Chaoela R, Ruiz-Velazco S. Analysis of the relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollution and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico City. *Allergy* 53:394–401 (1998).
- Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Currier F, Coursac I, Dockery DW, Schwartz J, Zanobetti A. The national morbidity, mortality, and air pollution study part II: morbidity, mortality, and air pollution in the United States. HEI Research Report No. 94, Part II. Cambridge, MA:Health Effects Institute, June 2000.
- Beeson W, Lawrence, Abbey DE, Knutsen SF. Long-term concentrations of ambient air pollutants and incident lung cancer in California adults. Results from the AHSMOG study. *Environ Health Perspect* 106:813–823 (1998).
- Bonner JC, Rice AB, Lindroos PM, O'Brien PO, Dreher KL, Alfaro-Moreno E, Rosas Pérez I, Osornio-Vargas AR. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:672–680 (1998).
- Dreher K, Jaskot R, Lehmann J, Richards JH, McGee JK, Ghio A, Costa D. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health* 50:285–305 (1997).
- Rosas I, Yela A, Santos-Burgoa C. Occurrence of airborne enteric bacteria in Mexico City. *European Journal of Aerobiology: Aerobiologia* 10:39–46 (1994).
- Schwartz DA. Does inhalation of endotoxin cause asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 163:305–313 (2001).
- Saxon A, Diaz-Sanchez D. Diesel exhaust as a model xenobiotic in allergic inflammation. *Immunopharmacology* 48:325–327 (2000).
- Villalobos R, Blanco S, Gómez S. Mutagenicity assessment of airborne particles in Mexico City. *Atmospheric Environ* 29:517–524 (1995).
- Gobierno del Distrito Federal, Secretaría del Medio Ambiente, Dirección General de Prevención y Control de la Contaminación: 2000. Compendio Estadístico de la Calidad del Aire, 1986–1999. México D.F., México.
- Bonner JC, Goodell AL, Coin PG, Brody AR. Chrysotile asbestos up-regulates gene expression and production of alpha receptors for platelet derived growth factor (PDGF-AA) on rat lung fibroblasts. *J Clin Invest* 92:425–430 (1993).
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182:16–19 (1989).
- Gorczyca W, Gong J, Ardelit B, Traganos F, Darzynkiewicz Z. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 53:3186–3192 (1993).
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Methods* 184:39–51 (1995).
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191 (1998).
- Bennett CF, Condon TP, Grimm S, Chan H, Chiang MY. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol* 152:3530–3540 (1994).
- Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and alveolar macrophages by urban air particulates: effects of oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141:637–648 (1996).
- Monn C, Becker S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM_{2.5}) and coarse particles (PM_{10-2.5}) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol* 155:245–252 (1999).
- Holian A, Hamilton RF, Morandi MT, Brown SD, Li L. Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 106:127–132 (1998).
- Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* 7:20–26 (2001).
- LeBoeuf RA, Kerckaert KA, Aardema MJ, Isfort RJ. Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals. *IARC Sci Publ* 146:409–425 (1999).
- Peters A, Dörig A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 349:1582–1587 (1997).
- Imrich A, Ning YY, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 167:140–150 (2000).
- Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 66:698–704 (1999).
- Diociaiuti M, Balducci M, De Verardis B, Cattani G, Staccini G, Ziemacki G, Marconi A, Pauletti L. The two PM_{2.5} (fine) and PM_{2.5-10} (coarse) fractions: evidence of different biological activity. *Environ Res* 86:254–262 (2001).
- Dick CAJ, Stone B, Brown DM, Watt M, Cherrise JW, Howarth S, Seaton A, Donaldson K. Toxic and inflammatory effects of filters frequently used for the collection of airborne particulate matter. *Atmos Environ* 34:2587–2592 (2000).
- Mar TF, Norris GA, Koenig JQ, Larson TV. Associations between air pollution and mortality in Phoenix, 1995–1997. *Environ Health Perspect* 108:347–353 (2000).
- Pope A, Verrier R, Lovett E, Larson A, Raizenne M, Kanner R, Schwartz J, Gold D, Douglas WD. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* 138: 890–899 (1999).
- Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. HEI Research Report No. 91. Cambridge, MA: Health Effects Institute, 2000.
- Schwartz J, Norris G, Larson T, Sheppard L, Claiborne C, Koenig J. Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. *Environ Health Perspect* 107: 339–342 (1999).
- Edgerton SA, Bian X, Doran JC, Fast JD, Hubbe JM, Malone EL, Shaw WJ, Whiteman CD, Zhong S, Arriaga JL, et al. Particulate air pollution in Mexico City: a collaborative research project. *J Air Waste Manag Assoc* 49:1221–1229 (1999).
- Castillejos M, Retama A. Comportamiento y distribución de las partículas respirables finas y gruesas en el norte y sureste de la Ciudad de México. CONSERVA 1998. Available: http://www.sma.df.gob.mx/publicaciones/otros/conserva/conserva_publica/aire03.pdf [cited 30 November 2001].

Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones

Ernesto Alfaro Moreno,* Claudia García Cuéllar,* Alfonso Dueñas González**,**

RESUMEN

Durante el proceso del desarrollo embrionario de un organismo o durante los procesos encaminados a mantener la homeostasis de éste, es necesario eliminar células no deseadas. Este proceso se denomina muerte celular programada o apoptosis. La apoptosis es un proceso en el que aparecen múltiples eventos en diferentes momentos. Esto puede ser activado por diferentes estímulos, tales como el daño al DNA, citocinas, pérdida de la matriz extracelular, etc. La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia en el área del cáncer, ya que puede ser útil para conocer el mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad, efectividad de tratamientos, etc. Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, la aparición de los eventos relacionados y su detección van a depender de múltiples factores. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para detectar apoptosis está la detección de degradación de DNA, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas.

El propósito de este artículo es describir las principales técnicas utilizadas para la detección de apoptosis, así como sus limitaciones. Los criterios descritos en el presente trabajo pretenden ayudar a elegir el método más conveniente para determinar la apoptosis.

Palabras clave: Apoptosis, métodos.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular es un fenómeno que puede ser resultado de mecanismos como la necrosis y la apoptosis. La necrosis es el proceso de muerte que se da cuando una célula presenta un daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana que la lleva a muerte por lisis. En estas circunstancias se libera el contenido celular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Por otra parte, la muerte celular por apoptosis es una muerte fisiológica, que se puede presentar, ya sea porque el organismo re-

ABSTRACT

Some cells have to be eliminated in an organism to keep the homeostasis, tissue remodelling or embryonic development. This process is known as programmed cell death or apoptosis. Apoptosis is a dynamic process in which a cascade of events appear at different times. Apoptosis can be induced by various stimuli, such as DNA damage, cytokines, loss of extracellular matrix, etc. Apoptosis detection has become very important in cancer, since it is helpful to understand carcinogenesis, mechanisms of chemotherapy drugs, evaluation of treatment response, etc. Importantly, apoptosis detection depends on the moment the cells or tissues are studied. The most common events used to detect apoptosis include the identification of DNA degradation by gel electrophoresis, changes on the cytoplasmic membrane and activation of specific proteins.

The aim of this article is to describe the main techniques used for detection of apoptosis, and their limitations. The criteria described in this paper pretend to help to choose the most convenient method for apoptosis detection.

Key words: Apoptosis, techniques.

quiere para su desarrollo de la muerte en particular de esa célula, o bien porque la célula sufrió un daño irreparable y la célula muere en beneficio del organismo. En este caso, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que provocan que la célula no pierda la integridad de su membrana, y sólo va a presentar pérdida de dicha integridad hacia el final del proceso.¹ Esto no se observa *in vivo* ya que las células apoptóticas son eliminadas por fagocitosis antes de perder la integridad de la membrana.² Debido a que la apoptosis requiere de la activación de genes para que se lleve a cabo este tipo de muerte celular, también ha recibido el nombre de muerte celular programada.³

La apoptosis fue descrita por primera vez durante los años 70 y se basó en las características morfológicas que presentan las células tales como la organización de la membrana citoplasmática y condensación de la cromatina, entre otras. Es durante los años 80

* Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología.

** Departamento de Genética y Toxicología Ambiental. Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Cuadro 1. Número de publicaciones relacionadas con la apoptosis, según el Medline hasta enero del 2000.

Década	# publicaciones
1970s	34
1980s	220
1990s	29,188

que se describe la participación de la apoptosis en procesos patológicos y fisiológicos. Durante los años 90 se vuelve uno de los principales tópicos de estudio dentro de la biología (*Cuadro 1*).

En la actualidad se ha demostrado que las alteraciones en la apoptosis son un mecanismo fundamental para el desarrollo del cáncer, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis –transición de lesiones preneoplásicas a invasoras–, en el fenómeno metastásico y por supuesto, en la respuesta a los tratamientos antineoplásicos, llámese radioterapia o quimioterapia.

El papel de la apoptosis en las etapas iniciales de la carcinogénesis no está perfectamente claro. En algunas lesiones preinvasoras como las hiperplasias atípicas y carcinoma *in situ* de la glándula mamaria, lesiones premalignas de estómago y cavidad oral⁴⁻⁶ se ha observado un incremento de la apoptosis lo cual parece contradecir el pensamiento simplista de que la transición a una lesión invasora necesariamente debe acompañarse de menor apoptosis. Se conoce que el fenómeno de transformación o malignización es un proceso ineficiente en el sentido de que para que ocurra se necesita alteraciones en genes que al mismo tiempo que aumenten la proliferación inhiban la apoptosis, de otra manera, como se ha observado experimentalmente, el solo aumento de la proliferación puede acompañarse de mayor apoptosis.⁷ El incremento de apoptosis en las lesiones preinvasoras por lo tanto, puede interpretarse como un mecanismo de defensa del organismo para eliminar las células con daño genético de un grado menor al requerido para tornarse malignas. Otra explicación sería que el grado de apoptosis de las lesiones preneoplásicas fuera específica de tejido. Por ejemplo, en lesiones premalignas de colon⁸ se observa mayor expresión del gen antiapoptótico bcl-2 y menos apoptosis. Esta variabilidad en la detección de apoptosis indica que nuestro conocimiento del papel de la apoptosis en la carcinogénesis es aún incompleto, y que en parte, la variabilidad puede ser debida a las técnicas utilizadas para su detección en los diferentes estudios.

El papel de la apoptosis en el fenómeno metastásico parece ser un poco más evidente. Como se mencio-

no previamente, la pérdida del contacto con la matriz extracelular y la privación de factores de crecimiento son dos estímulos apoptóticos potentes. Estos estímulos protegen al organismo del crecimiento celular más allá de los límites impuestos. Actualmente se conoce que si bien el encontrar células malignas circulantes es un fenómeno muy común, no todas estas células tienen la capacidad de establecerse y crecer en otros órganos o tejidos distantes.⁹ Para lograrlo necesitan adquirir alteraciones genéticas adicionales que supriman la apoptosis. Esto está demostrado en varios sistemas en donde la transfección de genes antiapoptóticos como bcl-2¹⁰ o disminución de la expresión de genes preapoptóticos como bak,¹¹ permiten a las células malignas poder sobrevivir en suspensión y adquirir la capacidad de formar metástasis.

Tradicionalmente se había considerado que la quimioterapia citotóxica y la radioterapia actuaban por producir daño al DNA con la subsecuente falla mitótica y muerte celular. Sin embargo, ahora se sabe que las drogas citotóxicas y la radiación utilizan los mecanismos endógenos de apoptosis para inducir su efecto antitumoral.¹² De hecho, la mayoría de los experimentos realizados para identificar los eventos bioquímicos implicados en la apoptosis se han hecho utilizando drogas quimioterápicas. Las evidencias sugieren que en las etapas más tempranas del cáncer, a pesar de que ya existen alteraciones en la apoptosis, las células son más sensibles a los estímulos apoptóticos que en las lesiones más avanzadas.¹³ Esto correlaciona con lo observado en la clínica en cuanto a que los pacientes con menor carga tumoral muestran mejor respuesta a la quimio o radioterapia.

Debido a que la apoptosis es un proceso dinámico, se presentarán diferentes características dependiendo del momento en el que se encuentre la célula. Esto permite disponer de diferentes “marcadores” de la apoptosis. Cabe considerar que no todos los marcadores están presentes en todas las células, ni todos los marcadores de apoptosis son exclusivos de este proceso. Por esto es importante considerar algunos aspectos de la apoptosis que ocurren tanto *in vivo*, como *in vitro*, tales como el momento en el que aparece un evento determinado, la duración de los procesos relacionados, así como el proceso de eliminación de la célula apoptótica por fagocitosis. Otro factor importante es que a pesar de que se induzca apoptosis en células que se encuentran en la misma fase del ciclo celular, el proceso de muerte no es sincrónico, por lo que la búsqueda de un marcador tanto *in vivo* como *in vitro* es representativo de un momento específico.

Una de las características que tiene la muerte por apoptosis en un organismo, es que las células son fagocitadas para evitar la presencia de necrosis secundaria,² por lo que muchas veces se vuelve difícil detectar su presencia de apoptosis *in vivo*, a menos que se busquen eventos que ocurren al inicio del proceso de muerte celular, los cuales podrían ser considerados como marcadores tempranos.

MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE APOPTOSIS

Debido a que la definición de apoptosis fue creada con base en parámetros morfológicos consideramos que es el primer parámetro a ser revisado.

1) Cambios morfológicos presentes en la muerte celular por apoptosis.

Una de las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular por apoptosis es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como lo son las microvellosidades. Al mismo tiempo se observan cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de condensación de la cromatina. Conforme el proceso avanza se puede observar la aparición de fragmentación nuclear. También se presentan cambios en el retículo endoplásmico, en donde se observan fusiones con la membrana citoplasmática.³

Para determinar estos cambios en la célula apoptótica se pueden utilizar tanto la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia), como la microscopía electrónica. Por medio de la microscopía de luz se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte. Para apreciar alteraciones celulares como cambios en microvellosidades, así como alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico es necesario recurrir a la microscopía electrónica.

Se debe de tener cuidado con la búsqueda de los cambios morfológicos, ya que *in vivo* muchas veces no es posible detectar algunas de estas alteraciones, ya que las células son eliminadas por fagocitosis, por lo que no siempre va a ser posible detectarlas.

2) Detección de degradación del DNA.

Uno de los procesos que se asocian generalmente con la apoptosis es la degradación de DNA de forma específica entre nucleosomas. Es sabido que durante el proceso de muerte celular por apoptosis se presenta la síntesis de endonucleasas que cortan el DNA a nivel internucleosomal, liberando nucleosomas los cuales se sabe que contienen alrededor de 200 pares de bases. Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de DNA de células apoptóticas es posible observar la aparición de un patrón característico de DNA en escalera, mejor conocido como ladder de DNA, el cual contiene fragmentos discretos, múltiplos del tamaño de un nucleosoma que recuerdan la imagen de los peldaños de una escalera.¹

Existen diversos métodos para detectar la degradación del DNA asociada a la apoptosis. El método más comúnmente utilizado es la extracción de DNA con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol.¹⁴ Este método presenta el inconveniente de que los fragmentos pequeños pueden perderse durante las extracciones, por esto se han desarrollado métodos en los que se eliminan los pasos de extracción y en los que lisados celulares son digeridos con RNAsas y proteinasa K para después realizar el corrimiento electroforético.¹⁵ Este método se realiza en mucho menor tiempo, y elimina el problema de las extracciones orgánicas. Otro método propuesto para no perder los fragmentos pequeños, e incluso enriquecer su contenido es el descrito por Daniel y colaboradores,¹⁶ en el que utilizan acarreadores minerales a los que se adsorben los fragmentos de DNA. Estos acarreadores permiten separar el DNA de la muestra y posteriormente se recupera al DNA del acarreador en volúmenes pequeños, por lo que las concentraciones de DNA obtenidas son adecuadas para realizar análisis electroforéticos.

Durante algún tiempo se consideró la aparición de esta degradación de DNA como el marcador principal de la apoptosis, pero con el tiempo se ha demostrado que no todas las células que mueren por apoptosis van a presentar este tipo de degradación del DNA. Hoy en día se sigue utilizando este tipo de análisis para determinar la apoptosis, aunque algunas consideraciones deben ser tomadas en cuenta para su análisis:

- a) La aparición del patrón en escalera de DNA es un proceso tardío por lo que no siempre se puede detectar *in vivo*.

- b) Algunas estirpes celulares no presentan este tipo de degradación de DNA y en particular es difícil de encontrar en células epiteliales y murinas.
- c) Debido a que se trabaja con extractos de DNA es posible perder los fragmentos pequeños, por lo que hay que extremar precauciones en el manejo de las muestras.

Otro método que se ha utilizado para medir la degradación internucleosomal es la detección de las proteínas presentes en los nucleosomas (histonas), en placas de 96 pozos mediante un anticuerpo acoplado con un enzima que genera una reacción colorida, conocido como ensayo de ELISA.¹⁷ Desafortunadamente en este método se cuantifica la presencia de nucleosomas en el sobrenadante de cultivos celulares, por lo que puede existir la incertidumbre del origen de dichos nucleosomas, ya que una célula necrótica también puede liberar DNA y nucleosomas al medio al presentarse la lisis celular.

Por otra parte, el proceso de degradación de DNA no necesariamente va a presentar el patrón de degradación a nivel internucleosomal, pero es posible detectar degradaciones más tempranas por medio del método de electroforesis de pulso-campo. Por medio de este método es posible detectar fragmentos grandes de DNA que pueden llegar hasta 10 megapares de bases.¹⁸ Se sabe que la fragmentación de DNA en la apoptosis a nivel internucleosomal, va precedida por la aparición de fragmentos grandes de DNA que pueden ir de los 50 a los 300 kilopares de bases, por lo que el método de electroforesis de pulso-campo permite determinar la presencia de esta fragmentación.¹⁹

3) Detección de degradación de DNA en células individuales por medio de marcaje del DNA.

Debido a que la degradación del DNA es una de las características más importantes de la apoptosis, se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de esta degradación. Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de DNA de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal²⁰ que adiciona nucleótidos marcados al DNA en extremos 3' libres. Dichos nucleótidos pueden estar marcados con fluorescencia, o bien se pueden detectar por métodos de inmunohistoquímica. Este método se conoce como método de TUNEL (*transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) y se puede utilizar tanto para la detección por medio de citometría de flujo, como por microscopía. Esta técnica permite

determinar la presencia de fragmentación de DNA en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento. Por otra parte, durante la necrosis también se presenta degradación de DNA aunque ésta no presenta el patrón de degradación internucleosomal presente en la apoptosis, pero esto no es posible de distinguir por este método,²¹ por lo que se sugiere que se complemente con otra técnica, como puede ser la evaluación morfológica.

Otra técnica ampliamente utilizada es la determinación del ciclo celular por citometría de flujo. Este ensayo se basa en la detección del contenido de DNA en la célula. Al haber degradación del DNA se van a encontrar células que presentan un menor contenido de DNA, lo cual aparece en el histograma de la citometría por abajo de la región en la que se encuentran las células antes de la replicación del DNA (G0-G1), por lo que podrían estar en apoptosis.²²

Otro método que ha sido desarrollado para la detección individual de células apoptóticas es el de la detección de cadenas sencillas de DNA por métodos de inmunohistoquímica, el cual parece tener una sensibilidad similar al ensayo de TUNEL.²³

4) Detección de la activación de caspasas.

La determinación de la activación de las moléculas que disparan el proceso de apoptosis ha adquirido gran importancia en la detección de apoptosis. Tal es el caso de las caspasas, que son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células.²⁴ La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis.²⁵ Este tipo de marcadores es de gran importancia, ya que la detección de apoptosis *in vivo* por métodos que detectan la degradación de DNA, no siempre es exitosa, ya que estas células pueden ser removidas antes de que dicha degradación se presente. La determinación de la activación de la caspasa-3 presenta la gran ventaja de que es un evento que tiene una alta correlación con la inducción de apoptosis, por lo que no existe la incertidumbre presente en otros marcadores en los que su presencia o ausencia no son determinantes en el proceso de muerte celular programada.

Cuadro 2. Métodos para la detección de apoptosis.

Método	Detección	Nivel	Momento
Morfología celular (1)	Cambios en la morfología celular	Célula individual	Temprano y tardío.
Electroforesis de DNA (2)	Degradación internucleosomal	Población celular	Tardío
Electroforesis de DNA de pulso-campo (2)	Fragmentos de 50 y/o 300 Kpb	Población celular	Temprano
ELISA para nucleosomas (3)	Degradación internucleosomas	Población celular	Tardío
TUNEL (1 y 4)	Marcaje terminal de DNA	Célula individual	Temprano y tardío
Detección de ploidía (4)	Contenido celular de DNA	Célula individual	Tardío
Detección de DNA de cadena sencilla (4)	Detección de degradación de DNA	Célula individual	Temprano y tardío
Detección de la exposición de fosfatidil serina (1 y 4)	Cambios en la simetría de la membrana	Célula individual	Temprano

1) Microscopia óptica o electrónica

2) Electroforesis

3) Ensayo inmunoenzimático o ELISA

4) Citometría de flujo

5) Evaluación de la simetría de la membrana celular.

Otro evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. Es bien sabido que la apoptosis es un proceso de muerte en el que la integridad de la membrana se mantiene, lo cual significa que la característica de ser semipermeable está presente, sin embargo se presentan cambios en su simetría. Tal es el caso de la distribución de la fosfatidil serina, la cual es una molécula que se encuentra orientada hacia el interior de la célula,²⁶ y cuando una célula entra en el proceso de muerte por apoptosis, uno de los eventos tempranos es la exposición de fosfatidil serina hacia el exterior de la membrana celular. Debido a este cambio en la simetría se han desarrollado métodos que permiten detectar la presencia de fosfatidil serina en el exterior de la membrana celular, al agregar anexina V la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana, y que tiene una alta afinidad por la fosfatidil serina, por lo que aquellas células que se encuentran marcadas con anexina V, serán aquellas que se encuentran en apoptosis. La detección de anexina V se puede acompañar de una tinción con yoduro de propidio, lo cual nos permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de la muerte celular, o si se encuentra

en una etapa tardía en la cual ya se encuentra presente la necrosis secundaria. Esta técnica requiere de la utilización de células íntegras, por lo que su uso se recomienda para estudios *in vitro*, aunque también puede ser utilizada en análisis de apoptosis en muestras obtenidas para análisis citológicos, o bien para detectar apoptosis en sangre.²⁷

Como se puede ver, la determinación de apoptosis está relacionada con diversos parámetros, y es necesario considerar diferentes aspectos para elegir el método que se va a utilizar (Cuadro II). Por esto es recomendable que se analice la bibliografía relacionada, ya que se corre el riesgo de utilizar un marcador inadecuado para la población que se desea evaluar. Sin embargo, los métodos que resultan más confiables para la detección de apoptosis son la determinación de alteraciones morfológicas, el ensayo de TUNEL, así como la detección de cambios en la simetría de la membrana celular y la activación de las caspasas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-22.
2. Strange R, Feng L, Saurer S, Burkhardt A, Friis R. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115: 49-58.
3. Schwartzman R, Cidlowski A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev* 1993; 14: 133-51.
4. Mustonen M, Raunio H, Paakko P, Soini Y. The extent of apoptosis is inversely associated with bcl-2 expression in

- pre-malignant and malignant breast lesions. *Histopathology* 1997; 31: 347-50.
5. Birchall MA, Winterford CM, Allan DM, Harmon BV. Apoptosis in normal epithelium, pre-malignant lesions of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1995; 31B: 380-3.
 6. Ishida M, Gomyio Y, Tatebe S, Ohfuji S, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling. *Virchows Arch* 1996; 428: 229-35.
 7. Manning FC, Patierno SR. Apoptosis: Inhibitor or instigator of carcinogenesis? *Cancer Invest* 1996; 14: 455-65.
 8. Fohil CC, Janssen PA, Bosman FT. Expression of bcl-2 protein in hyperplastic polyps, adenomas, and carcinomas of the colon. *J Pathol* 1996; 178: 393-7.
 9. Fidler IJ. Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labelled with ¹²⁵I-5-iodo-2' deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 46: 773-83.
 10. Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawat A, Hinodc Y, Takayama S, Reed VC, Imai K. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 1997; 14: 2971-7.
 11. Rosen K, Rak J, Jin J, Kerbel RS, Newman MJ, Filmus J. Downregulation of the pro-apoptotic protein bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr Biol* 1998; 8: 1331-4.
 12. McDonnell TJ, Meyn RE, Robertson LE. Implications of apoptotic cell death regulation in cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 53-60.
 13. Martin DS, Schwartz GK. Chemotherapeutically induced DNA damage, ATP depletion, and the apoptotic biochemical cascade. *Oncol Res* 1997; 9: 1-5.
 14. Martin SL, Lennon SV, Bonham AM, Cotter TG. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukaemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* 1990; 145: 1859-67.
 15. Park DJ, Patek PQ. Detergent and enzyme treatment of apoptotic cells for the observation of DNA fragmentation. *Biotechniques* 1998; 24: 558-60.
 16. Daniel PT, Sturm I, Ritschel S, Friederich K, Dorken B, Bendzko P, Hillebrand T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Analytical Biochem* 1999; 266: 110-15.
 17. Holian A, Hamilton RF, Morandi MT, Brown SD, Li L. Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 127-32.
 18. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
 19. Allen PD, Newland AC. Electrophoretic DNA analysis for the detection of apoptosis. *Mol Biotechnology* 1998; 9: 247-51.
 20. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 490-501.
 21. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. *In situ* detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: A cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465-8.
 22. Telford WG, King LE, Fraker PJ. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif* 1991; 24: 447-59.
 23. Watamabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T et al. Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different *in situ* methods: Antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labelling (TUNEL) methods. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 188-93.
 24. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.
 25. Benjamin CW, Hiebsch RR, Jones DA. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol* 1998 53; 446-50.
 26. Van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 1996; 24: 131-39.
 27. Wals GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods* 1998; 217: 153-63.

Dirección para correspondencia:

Ernesto Alfaro Moreno

Suddirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

Av. San Fernando 22, Tlalpan

14080, México, D.F.

Tel: 56280425

Fax: 56280432

Correo electrónico: ealfaro@mail.ssa.gob.mx

Fecha de recepción: 24/03/00.

Fecha de aceptación: 25/05/00.